



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**OLEUROPEİNİN 3T3L1 VE MAKROFAJ HÜCRE SERİSİNDE CD36
GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Proje No: TSA-2019-7965

Temel Araştırma Projesi (BAP01)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Ahmet ALVER
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyokimya

Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyokimya
Arş. Gör. ELİF ŞAHİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyokimya
Arş. Gör. NESLİHAN SAĞLAM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıbbi Biyokimya

Temmuz 2020

TRABZON

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

OLEUROPEİNİN 3T3L1 VE MAKROFAJ HÜCRE SERİSİNDE CD36 GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Proje No: TSA-2019-7965

Temel Araştırma Projesi (BAP01)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Ahmet ALVER
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyokimya

Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyokimya
Arş. Gör. ELİF ŞAHİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyokimya
Arş. Gör. NESLİHAN SAĞLAM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıbbi Biyokimya

Temmuz 2020

TRABZON

ÖNSÖZ

**“Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2019-7965”**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	9
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	31
6. KAYNAKLAR.....	33

ÖZET

Zeytin yaprağı ve yağında bulunan başlıca fenolik bileşik olan oleuropein, antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-aterojenik etkiler sergiler ve adiposit farklılaşmasını *in vitro* baskılar. Bu çalışmada, oleuropeinin 3T3-L1 pre-adiposit ve RAW264.7 makrofaj hücre serilerinde CD 36 gen ekspresyonu üzerine etkisi RT-PCR ile incelenmiştir.

Oleuropeinin (0-200 μ M) *in vitro* çoğalan preadipositlerin canlılığını azalttığını ve farklılaşmanın indüklenmesinden sonra konflüent hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadı gözlemlendi. Oleuropeinin (0-200 μ M) adiposit farklılaşmasını, peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ (PPAR γ), CCAAT- / arttırıcı bağlayıcı protein a (C/EBP α) ve CD 36 ekspresyonunu baskılayarak ortaya koyduğu kanaatine varıldı. Aynı şekilde 48 saat süreyle oleuropeinle muamele edilen RAW264.7 hücrelerinde oleuropeinin (0-100 μ M) herhangi bir sitotoksik etki göstermediğini gözlemlendi. Oleuropeinin (0-100 μ M) anti-aterojenik etkisini PPAR γ , C/EBP α ve CD 36 ekspresyonunu baskılayarak ortaya koyduğu kanaatine varıldı.

Verilerimiz, oleuropeinin hem 3T3-L1 hem de RAW264.7 hücrelerinde PPAR γ , C/EBP α ve CD 36 transkripsiyonel aktivitesini doğrudan inhibe ettiğini göstermektedir. Böylece, oleuropeinin anti-adipogenik ve anti-aterojenik etki gösterebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Obezite, okside LDL, Oleuropein, 3T3-L1, Makrofaj, CD36, RT-PCR

ABSTRACT

Oleuropein, the main phenolic compound in olive leaf and oil, exhibits antioxidant, anti-inflammatory and anti-atherogenic effects and suppresses adipocyte differentiation *in vitro*. In this study, the effect of oleuropein on CD 36 gene expression in 3T3-L1 pre-adipocyte and RAW264.7 macrophage cell lines was investigated by RT-PCR.

It was observed that oleuropein (0-200 μ M) reduced the viability of preadipocytes proliferating *in vitro* and had no cytotoxic effect in confluent cells after induction of differentiation. It was concluded that oleuropein (0-200 μ M) induced adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT- / enhancer binding protein a (C / EBP α) and CD 36 expression. Similarly, it was observed that oleuropein (0-100 μ M) did not show any cytotoxic effect in RAW264.7 cells treated with oleuropein for 48 hours. It was concluded that oleuropein (0-100 μ M) exhibited its anti-atherogenic effect by suppressing PPAR γ , C / EBP α and CD 36 expression.

Our data show that oleuropein directly inhibits PPAR γ , C / EBP α and CD 36 transcriptional activity in both 3T3-L1 and RAW264.7 cells. Thus, it has been concluded that oleuropein may have anti-adipogenic and anti-atherogenic effects.

Keywords: Obesity, oxidized LDL, Oleuropein, 3T3-L1, Macrophage, CD36, RT-PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Oleuropeinin ve hidroksitirozolün kimyasal yapısı	6
Şekil 2.	48.saat RAW264.7 makrofaj hücresinin amplifikasyon eğrileri	24
Şekil 3.	3T3L-1 hücresinin amplifikasyon eğrileri	24
Şekil 4.	3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde elde edilen mikroskop görüntüleri	26
Şekil 5.	3T3-L1 RNA örneklerinin jel görüntüsü	26
Şekil 6.	Çoğalan RAW 264. 7 hücrelerine ait mikroskop görüntüleri	28
Şekil 7.	RAW 264. 7 RNA örneklerinin jel görüntüsü	28
Şekil 8.	RT-PCR'dan sonra bazı ürünlerin agaroz jel görüntüsü.	30

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	9
Tablo 2.	Kullanılan kimyasal maddeler	10
Tablo 3.	cDNA sentezi için hazırlanan karışımın içerdiği reaktifler ve miktarları	21
Tablo 4.	RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	22
Tablo 5.	Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri	22
Tablo 6.	RT-PCR protokolü	23
Tablo 7.	Oleuropeinin 3T3-L1 hücreleri üzerine toksik etkisi(% canlılık testi)	25
Tablo 8.	3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine oleuropeinin etkileri	27
Tablo 9.	Oleuropeinin RAW264.7 hücreleri üzerine toksik etkisi(% canlılık testi)	27
Tablo 10.	3T3-L1 Hücre Serisinde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyon Sonuçları	29
Tablo 11.	RAW264.7 Hücre Serisinde 48. Saat CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyon Sonuçları	30

1. GİRİŞ

Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin artması ile karakterize, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen bir hastalıktır (1). Obezitenin diyabet, üreme ve gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, artrit, uyku apnesi, kalp damar hastalıkları ve kanser gibi patolojiler için risk faktörü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (2).

Oleuropein sekoiridoidler sınıfına ait doğal fenolik bir bileşiktir ve zeytin yapraklarında, işlenmemiş zeytinde ve Akdeniz diyetinde bulunan çeşitli zeytin ürünlerinde bol bulunmaktadır (3). Oleuropein antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiobezite ve kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu rollere sahip olduğu bildirilmiştir (4).

Sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesi olan cluster of differentiation 36 (CD36), omurgalı hayvanlarda birçok hücrenin yüzeyinde bulunan bir transmembran glikoproteinidir. CD36'nın; monositlerde, makrofajlarda, plateletlerde, kapiller endotel hücrelerinde ve adipositlerde okside LDL'nin ve uzun zincirli yağ asitlerinin alınmasında görev aldığı gösterilmiştir (5).

Perokizom proliferator aktive reseptör gama (PPAR γ) tip II nükleer reseptör ailesinin bir üyesi olup, adiposit farklılaşması, lipid metabolizması ve glukoz homeostazında yer alan çok sayıda hedef genin ekspresyonunun regülasyonuna katılmaktadır. Ayrıca, CD36 gen ekspresyonunun da önemli bir düzenleyicisidir (6).

CCAAT/enhancer bağlayıcı proteinler (C/EBP) C terminallerinde dimerizasyon ve DNA bağlanma bölgesi bulunduran iyi korunmuş bir temel lösin fermuar (bZIP) yapısı içeren transkripsiyon faktörleri ailesine aittir. C/EBP α hem adipogenez hem de normal adiposit farklılaşması için gereklidir. Çeşitli fibroblast hücre dizilerinde C/EBP α 'nın ektopik ekspresyonu adipogenezi sağlamaktadır. Ayrıca, C/EBP α ; PPAR γ ekspresyonuna sebep olarak adipogenezi uyarmaktadır (7).

Yapılan birçok çalışmada oleuropeinin, 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine farklılaşmasını inhibe ettiği, C/EBP α , PPAR γ ve yağ asidi sentazın ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (8,9).

Oleuropeinin 3T3-L1 preadiposit hücrelerde adiposit farklılaşması üzerine etkisinin bazı gen seviyelerinde değerlendirildiği fakat bu etkinin makrofajlarla olan ilişkisinin ortaya konulmadığı görülmektedir. Bu çalışma ile oleuropeinin 3T3-L1 hücrelerinde anti-adipogenik ve makrofaj hücre serisinde anti-atherojenik etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların CD 36 ile olan ilişkisinin RT-PCR ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Obezite

Hem genetik hem de çevresel faktörleri içeren çok sayıda nedeni olan karmaşık bir hastalık olan obezite, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. Hücre biyolojik seviyesinde obezite, yağ dokusunda adipositlerin sayısında ve büyüklüğünde bir artış ile karakterize edilir ve tip II diyabetes mellitus, kardiyovasküler hastalık ve hiperlipideminin gelişmesine yol açar (1). Obezite, vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun karesine (m^2) oranıyla tanımlanır ve bu değer beden kitle indeksi (BKİ) olarak adlandırılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) obezite tanısında erkekler için $BKİ > 30$, kadınlar için $BKİ > 28.6$ olarak kullanılmasını önermektedir ve $BKİ \geq 25 \text{ kg/m}^2$ üzeri olan bireyler aşırı kilolu, 30 kg/m^2 'nin üzerinde olan bireyler ise obez olarak standardize edilmiştir (10). Obezitenin diyabet, üreme bozuklukları, gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, artrit, uyku apnesi, kalp hastalıkları ve kanser gibi patolojiler için risk faktörü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (2). Obezite sıklığı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde her geçen yıl artış göstermektedir. Obezitenin dünya çapında yaygınlığı ise 1980-2014 yılları arasında iki kattan fazla artmıştır (10). Son yirmi yılda obezitenin yaygınlığı yetişkinlerde iki katına; çocuklarda ise üç katına çıkmıştır (2).

Şimdiye kadar çeşitli antiobezite mekanizmaları önerilmiştir: enerji ve gıda alımının azaltılması, preadiposit proliferasyonunun ve farklılaşmasının azaltılması ve artmış lipoliz ve yağ oksidasyonu. Obezite ile ilgili güncel çalışmalar, yağ dokularındaki adipositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını baskılama yeteneğine sahip gıda bileşenlerini keşfetmeye odaklanmaktadır (11).

2.2. Yağ Dokusu

Yağ dokusu, etrafı kan damarları, immün hücreler, kollajen lifleri ve fibroblastlar ile çevrili gevşek bağ dokusudur. Yağ dokusu adiposit hücrelerinden oluşmaktadır. Adipositler yağ dokusunda ya tek başına ya da küçük gruplar halinde bulunabilirler. İnsanlarda yağ dokusu farklı fonksiyonlarına göre beyaz (uniloküler) ve kahverengi (multiloküler) yağ dokusu olmak üzere ikiye ayrılır. Beyaz yağ dokusu tek ve büyük bir lipid damlası içeren tek damlacıklı hücre tipinden oluşmaktadır (12,13). Lipid damlacıkları kolesterol, fosfolipid, yağ asitleri, triaçilgliserol (TAG) ve nötral yağların karışımını içerir. Yaklaşık olarak depolanan toplam lipid içeriğinin % 95'i genelde palmitik asit ve oleik asitten oluşan TAG'dir. Geriye kalan ise

diyaçilgliserol, fosfolipit, esterleşmemiş yağ asidi ve kolesterolü oluşturmaktadır (14). Lipid damlacığı herhangi bir hücre içi organel içermemektedir. Kahverengi yağ dokusu ise çok damlacıklı hücrelerden oluşmaktadır. Beyaz ve kahverengi yağ dokusu içerdikleri damar ve mitokondri miktarından dolayı renklerinde farklılık gözlenmektedir. Ayrıca, kahverengi yağ dokusu zengin bir damar ağına sahiptir (13). Beyaz yağ dokusu enerjinin TAG şeklinde depolandığı yerdir. Enerji deposu olmasının yanı sıra vücutta başka görevleri de vardır. Özellikle deri altı yağ dokusu vücut yüzeyinin şekillenmesinde rol oynar. Isı geçirgenliği az olduğu için vücudun ısı yalıtımını ve dokular arasındaki boşlukları doldurarak bazı organların yerinin korunmasını sağlar. Kahverengi yağ dokusu ise enerji tüketiminde özelleşmiştir ve insanlarda özellikle yeni doğanlarda ısı dengesinin düzenlenmesinde etkilidir (12, 15).

Yağ dokusu anatomik yerleşimlerine göre subkutan ve visseral yağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık % 80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusudur. Subkutan yağ dokusu boyun, sırt, bel, karın, femoral ve meme bölgesinde bulunur. Yağ dokusunun yaklaşık % 20'si visseral yağ olarak mide, bağırsak, pankreas, aort, kalp, böbrek ve iç üreme organları çevresinde bulunmaktadır. Ayrıca kas içinde ve çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da visseral yağ dokusuna dahil edilmektedir (14).

Yağ dokusu bir endokrin doku gibi davranarak enerji dengesinin ayarlanmasında, nöroendokrin ve immün fonksiyonların düzenlenmesinde aktif rol alan proteinleri salgılar. Adipoz doku adipokinler olarak adlandırılan biyoaktif peptidlerin sentezlendiği ve salgılandığı yerdir. Adipoz doku, enerji metabolizmasını düzenleyen fizyolojik ve patolojik süreçlerin bir kısmında aktif rol oynamaktadır. Ayrıca yağ dokusu enerji metabolizması, immün sistem ve üreme sistemi üzerine etkisi olan faktörleri de salgılar. Bu salgı maddelerinin bazıları, leptin, adiponektin, rezistin, interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), interlökin-10 (IL-10) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α)'dır. Bu faktörlerin dolaşıma geçişi hormonal sinyallerle kontrol edilir. Yağ hücrelerinin fonksiyonu dışarıdan gelen insülin, adrenalin, noradrenalin ve kortizon gibi hormonlar ve sitokinler aracılığı ile endokrin, parakrin ve otokrin sinyaller aracılığıyla düzenlenir. Yağ hücresi membranında ve sitoplazmasında farklı hormon ve sitokinlere ait reseptörler bulunur. Yağ hücresi membranında bulunan reseptörler; leptin, insülin, tiroid uyarıcı hormon, anjiyotensin II gibi hormon sitokin reseptörleri, α_1 , α_2 , β_1 ve β_2 reseptör gibi adrenerjik reseptörleri, lipoprotein reseptörleri (çok düşük yoğunluklu lipoprotein, düşük yoğunluklu lipoprotein, yüksek yoğunluklu lipoprotein gibi), okside LDL çöpçü reseptörü (CD36 gibi) ve sitoplazmada bulunan nükleer reseptörleridir. Bu reseptörlerin uyarılması ile

oluşan sinyaller, hücre fonksiyonlarını uyararak veya inhibe ederek düzenlerler (16). Bu nedenle adipositler obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için potansiyel terapötik hedef olarak gösterilmektedir (17).

2.3. CD36 Reseptörü

CD36, moleküler ağırlığı 88 kDa olan, birçok hücre yüzeyinde bulunan ve monositler, makrofajlar, trombositler, mikrovasküler endotelial hücreler, adipositler, böbrek ve kalp miyositlerindeki epitelyal hücrelerden eksprese edilen bir transmembran glikoproteindir. CD36, temizleyici reseptörü B1 ve lizozomal integral membran proteini 2'yi içeren B sınıfı temizleyici reseptör ailesine aittir (18). CD36, trombospondin-1, okside fosfolipidler (oxPL), okside düşük yoğunluklu lipoprotein (oksLDL), heksarelin, fibriler A β amiloid peptitleri ve uzun zincirli yağ asitleri gibi birçok farklı ligantları bağlar (19).

Endemann ve arkadaşları, CD36 aktarılmış insan epitelyal böbrek hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda, CD36' nın özgül olarak okside LDL bağlama kapasitesini ilk defa ortaya koyarak CD36' nın bir okside lipoprotein reseptörü olduğunu göstermişlerdir (20). CD36 aracılığıyla makrofajlar tarafından okside LDL' nin alınması, insanlarda ateroskleroza yol açan köpük hücre farklılaşmasının başlangıcı ve gelişiminin önemli bir basamağıdır.

2.4. Peroksisom Proliferatör Aktive Reseptör γ (PPAR γ)

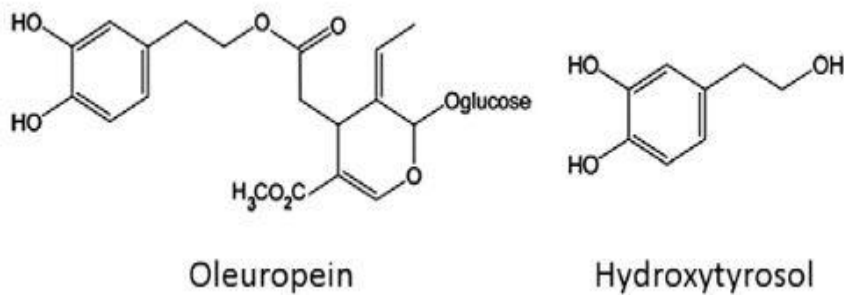
PPAR γ , pre-adiposit farklılaşmasında, adipositlerde lipogenezi oluşturma, insülin direncini arttırma ve inflamatuvar cevabın baskılanmasında önemli rollere sahiptir. PPAR γ adipoz hücre farklılaşması, glukoz homeostazı ile lipid depolanmasında görev alır ve bu olaylarla ilgili birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder. Ayrıca bu reseptör insülin duyarlılığı ve lipoprotein metabolizmasına da katılabilir. PPAR γ 'ın hedef genleri arasında açıl-CoA oksidaz, açıl-CoA sentaz, adiposit tip yağ asidi taşıyıcı protein, fosfoenol piruvat karboksikinas, malik enzim, CD36, C/EBP α , leptin, resistin, lipoprotein lipaz ve adiponektin gösterilebilir (21,22).

2.5. CCAAT/Enhancer Bağlayan Protein α (C/EBP α)

C/EBP α adipoz doku, karaciğer, bağırsak, akciğer, adrenal bez, periferal kan mononükleer hücreleri ve plasentada yüksek düzeyde sentez edilmektedir. C/EBP α 'nın daha çok farklılaşma sürecinde rol aldığı, proliferasyon sürecini inhibe ettiği düşünülmektedir. C/EBP α , farklılaşmasını tamamlamış adipositlerde yüksek düzeylerde eksprese edilmekte ve proliferasyon sırasında ekspresyonu azalmaktadır. C/EBP α 'nın ekspresyonu olgun hepatositlerde fazla iken karaciğer rejenerasyonu sırasında azalmaktadır. C/EBP α hem adipogenez hem de normal adiposit farklılaşması için gereklidir. Çeşitli fibroblast hücre dizilerinde C/EBP α 'nın ektopik ekspresyonu adipogenezini sağlar. Ayrıca, C/EBP α PPAR γ ekspresyonuna sebep olarak adipogenezini sağlamaktadır (23).

2.6 Oleuropein ve Fonksiyonları

İkincil bitki ürünleri olan fenolik bileşikler, insan diyetinin bir parçası olarak düzenli olarak tüketilir ve bazı hastalıkların önlenmesinde önemli bir role sahiptirler. Akdeniz diyetiyle beslenen kişilerin kardiyovasküler hastalık ve kanserlerden ölme oranlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir. Zeytin ağacı ürünlerinin, yüksek fenolik içerikleri nedeniyle sağlıklı Akdeniz diyeti bileşenlerinin ana kaynağı olduğu bilinmektedir. Zeytinyağı ve yapraklarındaki fenolik bileşikler, hidroksitirozol, tirozol, hidroksitirozol asetat ve diğer benzoik ve sinamik asit türevlerini içeren sekoiridoid türevlerinin kompleks bir karışımıdır (24). Oleuropein, zeytinyağı ve yapraklarındaki başlıca fenolik bileşik gibi görünmektedir (Şekil 1). Konsantrasyonu çeşit ve iklime göre değişir ve zeytin yaprağında yağdan birkaç kat daha fazladır (25).



Şekil 1. Oleuropeinin ve hidroksitirozolün kimyasal yapısı (Drira'dan, 24)

Zeytinyağından elde edilen fenolik bileşiklerin biyolojik olarak oldukça kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Oleuropein oral alımdan sonra hızlıca absorbe edilir ve 2 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. İdrara temel olarak glukuronidler olarak ve çok az bir kısmı da serbest olarak atılır (26,27). Oleuropein antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiobezite ve kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu rollere sahiptir. Yapılan bir çalışmada oleuropeinin nitrik oksitleri süpürme yeteneğinin olduğu ve in vitro indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (28). Han ve ark. oleuropeinin doza bağlı olarak, lösemi, melanom ve meme kanseri hücreleri gibi çeşitli kanser hücresi serilerinin proliferasyonunu ve göçünü inhibe ettiğini göstermişlerdir (29). Ayrıca oleuropeinin hem gram negatif hem de gram pozitif ve aynı zamanda mikoplazmaya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (30). Park ve ark. yaptıkları bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle indüklenmiş hepatik steatoza karşı oleuropeinin koruyucu bir etkisinin olduğunu bunu da farelerin karaciğerinde lipogenez ve fibrozis ile ilişkili hepatik genlerin ekspresyonlarını önemli derecede azaltarak yaptığını göstermişlerdir (31).

Oleuropeinin adipoz doku üzerine etkisi konusunda yapılan çalışmalara bakıldığında birkaç çalışma dikkat çekmektedir. Hadrich ve ark. yaptıkları bir çalışmada lipogenik genlerle ilişkili proteinlerin ekspresyonları üzerine oleuropeinin etkisini incelemişler ve sonuçlar oleuropein uygulamasının PPAR γ , SREBP-1c ve FAS'ı anlamlı derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Buna ilaveten, oleuropeinin epididimal adipoz dokuda AMP ile aktive protein kinaz (AMPK)'ın yüksek kolesterolü diyetle indüklü inhibisyonunu uyardığı da bulunmuştur. Bu sonuçlar, oleuropeinin yüksek kolesterolü diyetle beslenen ratlarda antiobezite etkilerini AMPK ekspresyonunu aktive, PPAR γ ekspresyonunu baskılayarak göstermiştir. Bu veriler obeziteyi önlemede oleuropeinin önemli etkilere sahip olduğunu göstermiştir (32). Diğer bir çalışmada oleuropeinin AMPK'nın fosforilasyonu yolu ile yağ asidi sentezinin kontrol enzimi olan asetil KoA karboksilazı %38 oranında inhibe ettiği bulunmuştur (33). Svobodova ve ark. oleuropeinin 3T3-L1 hücrelerde adiposit farklılaşması üzerine yaptıkları diğer bir çalışmada, oleuropeinin (>100 μ M) in vitro preadiposit proliferasyonunun canlılığını azalttığı ve herhangi bir toksit etki göstermediği bulunmuştur. Oleuropeinin (>100 μ M) adiposit farklılaşmasını inhibe ettiği, C/EBP α , PPAR γ ve yağ asidi sentazın ekspresyonunu baskıladığı da bulunmuştur (34). Başka bir çalışmada, oleuropeinin adipogenik transkripsiyon faktörlerinin (C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1c) ve onların hedef genlerinin (FAS, LPL, aP2, CD36) ekspresyonlarını epididimal adipoz dokuda önemli derecede azalttığı bulunmuştur (35). Farelerde yapılan bir çalışmada ise oleuropeinin uygulamasının, cd36 mRNA ekspresyonunu arttırdığı, serum trigliserid ve

kolesterol seviyesini azalttığı hepatosit hücre serisinde gösterilmiştir (36). Dünya genelindeki ölümler en sık kalp damar hastalıkları (KDH) sebebiyledir. KDH açısından olumlu olan husus büyük ölçüde önlenabilir olmalarıdır. Dünya Sağlık Örgütü, kan basıncı, obezite, kolesterol ve sigara kullanımının kontrolü ile KDH'lerin görülme sıklığının yarıya indirilebileceğini bildirmektedir. (37). KDH'lara karşı oleuropeinin etkisine bakıldığında; birçok çalışma ateroskleroza karşı oleuropeinin koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Visoli ve ark. oleuropeinin, LDL'nin bakır sülfat indüklü oksidasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (38). Oleuropeinin ayrıca HOCl ortamdan kaldırarak, apo B-100'ün klorlama yolu ile lipid peroksidasyonundaki başlamayı geciktirdiği de bulunmuştur (39). Buna ilaveten Jemai ve ark. yüksek-kolesterolü diyetle beslenen sıçalarda, oleuropein ve hidroksitirozolün hipokolesterolemiyi arttırdıklarını, LDL plazma ve total kolesterol seviyelerini azalttığını bulmuşlardır; ayrıca oleuropein ve hidroksitirozol HDL seviyelerini ve LDL oksidasyonunu azaltan antioksidan enzimlerin aktivitelerini de arttırmıştır (40,41).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu projede kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 1’de listelenmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu, -20oC	Vestel
Derin dondurucu, -80oC	Thermo Electron Corporation
Dalga boyu ayarlanabilir ELISA okuyucusu	VERSAmx Molecular Devices
Etüv	Heraeus
Çalkalayıcı	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB204-S
Manyetik karıştırıcı	Termal
Çeşitli hacimlerde otomatik pipet kullanıldı	Eppendorf
Aspiratörlü pipet	JetPip Pipette Aid
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Mikro santrifüj	Thermo EC Micromax Eppendorf 5810
Spektrofotometre	Shimadzu, UV – 1601
Vorteks (Karıştırıcı)	IKA Genius 3
Membran filtreleri	Agilent Econofilter 0.2µm
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO2inkübatör	Thermo Forma 381
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 17I
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Hücre kültür pleyti(6 kuyucuklu)	Nulcolone
15 mL’ lik ve 50 mL’ lik steril falkon tüpler	TPP, Greiner
10 mL’ lik steril disposable pipetler	Grenierbio-one, 607 180
Steril DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Greiner (0,5-10, 1-200, 100-1000 µL)
Neubauer lamı ve lameli	
0.5 ve 1.5 mL’ lik eppendorf tüpler	Greiner
Elektroforez tankı	Thermo EC320
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Thermocycle	Aplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
Real Time PCR Cihazı	Roche Light cyclers 480 II
Eppendorf Marka mikro küvet okuyucu	Eppendorf Biophotometer
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Gel Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200 Imaging System Carestream Health

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 2’te bu projede kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı
3T3-L1 embriyonik Fibroblast hücre serisi	ATCC, 70016785
RAW 264.7 Makrofaj hücresi serisi	ATCC, 70012232
Oil Red O	Sigma, O0625
Formaldehit	Labkim, F.13.93300.21, % 35-40
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid(MTT)	Sigma, M2128-1G
Etanol	Merck, 1.00971, % 96
Hidroklorik asit	Carlo Erba, , 7647-01-0, % 37
Metanol	J.T.Barker
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ATCC, Cat. No. 4-X-5
Amphotericin B	Gibco, 2027013
Gentamycin Sulfate	Wisentbioproduct, 450-135-XL
Fetal Bovine Serum	Capricorn, CP18-2144
Trypsin/ EDTA çözeltisi	Gibco,2177715
Trypan Blue	Sigma, T8154
DMEM	Gibco, 2143789
Agaroz	Sigma, A9539-500G
Etidyum Bromür	Sigma, E7637-1G
PBS Tablet	Medicago, 09-2051-100
2-Propanol	Labkim, cod no: P.0428.01.21, analytical grade
Kloroform	Merck, 1.02444. 2500, ekstra saf
DPEC	Sigma, D5758
İnsulin, from bovine pancreas	Sigma, I6634-50MG
Deksametazon(DEX)	Sigma, D4902-25MG
3-İzobütıl-1-metılksantin(İBMX)	Sigma, I5879-250MG
Biotin	Sigma, B4501
Tripure RNA İsolation Reagent	Roche, Cat. No: 11 667 165 001(50mL)
cDNA synthesis kit	Roche, 43619120
Real time ready CD36 Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 311921
Real time ready PPARγ Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 310239
Real time ready C/EBPα Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 313484
Real time ready β-aktin Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 300236
RT-PCR reaksiyon ortamı kiti	Roche, 04707494001

3.3. 3T3-L1 ve RAW264. 7 Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü kabininde (air flow kabin) steril ortamda gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce kabin % 70'lik etil alkol ile silindi. UV ışıktan etkilenmeyen ve kabin içerisinde kullanılacak olan malzemeler kabin içerisine bırakılarak 15 dakika UV ışığa maruz bırakıldı. Çalışma sonunda kabin % 70'lik etil alkol ile tekrar silindi. Kabinin kapağı kapatıldı. Kabin ve hücre kültürü odası 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı.

3.3.1. 3T3-L1 ve RAW264. 7 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada ATCC (American Type culture collection)'den temin edilen 3T3-L1 embriyonik fibroblast hücreleri (LOT: 58078556) ve RAW 264.7 makrofaj hücreleri (LOT: 70012232) kullanıldı

3T3-L1 ve RAW264.7 hücrelerinin elde edilmesi ve çoğaltılması deneyinde kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı.

PBS (Phosphate Buffer Solution), 0.01 M, pH 7,4: Beher içerisine 900 mL kadar saf su dolduruldu ve 10 tane PBS tableti behere konularak çözüldü. pH metre ile çözeltinin pH' sı 7,4 e ayarlandı. Çözelti balon jojeye aktararak, saf su ile son hacim 1 L' ye tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra hücre kültüründe kullanıldı.

Kullanıma Hazır DMEM: 43.4 mL DMEM (glukoz içeren 4.5 mg/dL) üzerine 5 mL FCS, 1 mL L-Glutamin, 0,5 mL gentamicin ve 100 µl amphotericin b eklendi. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de saklandı.

1. Kriyovial içinde bulunan 1 mL 3T3-L1 hücreleri azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda tamamen çözüldü.

2. 3T3-L1 hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi L-Glutaminli, % 10 FCS, % 1 gentamicin ve %0,2 amphotericin b içeren yüksek oranda (4,5 g/dL) glukoz içeren DMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.

3. Hücre süspansiyonu 300 g de 5 dakika santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve hücre çökeleği tüpün ucuna parmak ucuyla vurularak hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırıldı.

5. Sulandırılan hücrenin üzerine 5 mL taze DMEM besiyeri eklendi ve % 5 CO₂ ortamında, 37°C' de, T-25'lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

Aynı işlemler RAW264.7 makrofaj hücrelerine de uygulandı

3.3.2. 3T3-L1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Pasajlanması

Çoğalan hücreler flask yüzeyinin % 70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

1. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.

2.5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 25cm²'lik flasklara, 3T3-L1 hücreleri için 1 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi (PBS ile hücrelerin yıkanma amacı ortamdan tripsinin inhibitörü olan FBS'yi uzaklaştırmaktır).

3. İnkübasyon sonrası 10'ar mL % 10 FBS içeren DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.

4. RAW264.7 makrofaj hücrelerini kaldırmak için steril öze kullanıldı. Özenin ucuyla yavaşça kazınarak flaskın tabanından besiyeri yardımıyla hücreler kaldırıldı. 10'ar mL % 10 FBS içeren DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.

5. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-25 flasklara uygun sayıda (2×10^5) hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 5 mL'ye tamamlandı.

3.3.3. 3T3-L1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi

1. Tripsinizasyon ve kazıma sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL'si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

2. Karışım pipetle tekrar karıştırılarak 10 µL alınarak Neubauer hematositometre camına aktarıldı.

3. Işık mikroskobu altında 10x objektif kullanılarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen Na⁺-K⁺ ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta

ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü.

3.3.4. 3T3-L1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

1. Hücreleri dondurmak için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 1 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası 5' er mL % 10 FBS içeren DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı.
5. Hücre sayısı mililitrede 1.10^6 olacak şekilde % 20 FBS içeren DMEM ile seyreltildi ve kriyoviallere 900 μ L bölüştürüldü.
6. Buz üzerine alındı ve son hacminin %10'u olacak şekilde DMSO damla damla eklendi. DMSO eklenirken parmak ucuyla kriyovialler karıştırıldı.
7. Kriyoviallerin kapakları kapatıldıktan sonra 1 saat + 4 °C buzdolabının buzluğunda daha sonra 1 gece – 80 °C de bekletildi. Kısa süre içinde kullanılacak hücreler – 80 °C de saklanmaya devam edildi. Uzun süre kullanılmayacak hücreler azot tankının buharında saklandı.

3.3.5. 3T3-L1 Hücrelerinin Adiposit Farklılaşması

3.3.5.1. Çözeltiler

3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması deneyinde kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı.

DEX Stok Çözeltisi (0, 25 M): 49 mg DEX tartıldı, bir miktar DMSO'da çözüldü. Son hacmi DMSO ile 0,5 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

IBMX Stok Çözeltisi (0, 5M): 111,12 mg IBMX tartıldı, bir miktar DMSO'da çözüldü. Son hacmi DMSO ile 1 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

İnsülin (1 mg/mL): 10 mg insülin bir miktar HCl (pH 2-3) çözeltisinde çözüldü. Son hacmi HCl (pH 2-3) çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Biotin Stok Çözeltisi (1 mg/mL): 20 mg biotin tartıldı, bir miktar 0,1M NaOH çözeltisinde çözüldü. Son hacmi 0,1M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlandı. Ardından 1mg/mL konsantrasyondaki biotin çözeltisinden 200µL alındı ve hacmi 0,1M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 100 kat seyreltildi. Böylece 10 µg/mL konsantrasyonda ara stok hazırlandı. Hazırlanan her iki biotin stok çözeltileri ependorflara bölünerek -200C'de saklandı.

Farklılaştırma DMEM'i (2X): 20 µL stok DEX çözeltisi(0,25M) az miktarda %10 FBS içeren DMEM'e eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Üzerine 20 µL stok IBMX çözeltisi(0,5M) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Karışımın üzerine 200 µL stok insülin çözeltisi(1mg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Son olarak 200 µL ara stok biotin çözeltisi(10µg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Son hacim %10 FBS içeren DMEM ile 10 mL'ye tamamlandı. Elde edilen farklılaştırma DMEM'i (2X) 0,5 µM DEX, 1 mM IBMX, 20 µg/mL insülin ve 200 ng/mL biotin ihtiva etmektedir.

Konfülie Sonrası DMEM'i (2X): az miktarda %10 FBS içeren DMEM üzerine 200 µL stok insülin çözeltisi(1mg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Elde edilen Konfülie Sonrası DMEM'i (2X) 20 µg/mL insülin ihtiva etmektedir.

Olgunlaştırma DMEM'i (2X): 200 µL stok insülin çözeltisi(1mg/mL) 10mL %10 FBS içeren DMEM'e eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Karışımın üzerine 200 µL ara stok biotin çözeltisi(10µg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Elde edilen Olgunlaştırma DMEM'i (2X) 20 µg/mL insülin ve 200 ng/mL biotin ihtiva etmektedir.

3.3.5.2. Farklılaştırma işlemi

1. Hücreler sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 4 mL besiyeri içinde 1.10^5 hücre ekildi.

2. Kuyucuklarda çoğalan hücreler kuyucuk yüzeyinin % 100' ünü kaplayana kadar besiyeri 2 günde bir değiştirildi. Besiyerlerinin değişimi esnasında kuyucuklardan 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı(besiyerinin tamamını uzaklaştırmak kuyucuk yüzeyine yapışan hücrelerin kopmasına neden olabildiğinden kuyucuk yüzeyine değmeden besiyerinin yarısının uzaklaştırılması tercih edildi. Buna bağlı olarak besiyeri içeriğinin son konsantrasyonu ayarlandı). Üzerine 2 mL yeni besiyeri eklendi. Bu süre yaklaşık 6 gün sürdü.

3. Altıncı günün sonunda kuyucuklardan 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı. Farklılaştırma yapılacak kuyucuklara son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde insulin içeren konfülie

sonrası DMEM'i, farklılaştırma yapılmayacak olan kuyucuklara sadece %10 FBS içeren DMEM eklenerek 48 saat 37 °C' de inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonunda (48 saat) 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı. Yağ hücrelerine farklılaştırılacak hücreleri içeren kuyucuklara 2 mL farklılaştırma DMEM'i, yağ hücrelerine farklılaştırılmayacak hücreleri içeren kuyucuklara 2 mL %10 FBS içeren DMEM eklendi. 48 saat 37 °C' de inkübe edildi. (Not: Farklılaştırma DMEM'i son konsantrasyonları 0,25 µM Dexamethasone, 0,5 mM IBMX, 10 µg/mL insulin ve 100 ng/mL biotin olacak şekilde hazırlandı. 2 mL taze DMEM 2 mL eski DMEM'in üzerine ekleneceğinden konfülie sonrası, farklılaştırma ve olgunlaştırma DMEM'leri hazırlanırken içerikleri 2 kat konsantre hazırlandı.)

5. İnkübasyonunun sonunda (48 saat) 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı. Yağ hücrelerine farklılaştırılacak hücreleri içeren kuyucuklara 2 mL olgunlaştırma DMEM'i (20 µg/mL insulin ve 200 ng/mL biotin içeren) yağ hücrelerine farklılaştırılmayacak hücreleri içeren kuyucuklara da 2 mL %10 FBS ihtiva eden DMEM eklendi. Yağ hücrelerinin olgunlaşması işlemi yaklaşık 6 gün sürdü.

3.3.6. Adiposit Boyanması

Olgun adipositlerin boyanması deneyinde kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı:

Oil Red-O Stok Çözeltisi: 0,7 g oil red-o az miktarda 2-propanolde çözüldü. Hacmi 2-propanolle 200 mL'ye tamamlandı ve 1 gece magnetik karıştırıcıda bekletildi. 0,22 µm membran filtreden süzüldü ve + 4 °C de saklandı.

Oil Red-O Çalışma Çözeltisi: 6 mL oil red-o stok çözeltisi 4 mL steril destile su ile karıştırıldı. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 0,22 µm membran filtreden süzüldü.

% 10 Formaldehit çözeltisi: 27 mL %37'lik formaldehit + 73 mL PBS ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı

% 60 2-propanol Çözeltisi: 60 mL 2-propanol + 40 mL steril saf su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra farklılaşma işlemi uygulanmış hücrelerde TG birikimini görmek için aşağıdaki işlemler sırası ile yapıldı.

1.Olgun adipositlerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı.

2. % 10 luk 2,4 mL formaldehit ile 5 dakika muamele edildi. Eski formaldehit ortamdan uzaklaştırıldı. Yeni % 10 luk 2,4 mL formaldehit ortama eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi(bu miktarlar 6 kuyucuklu pleyt için geçerlidir).
3. İnkübasyon sonunda formaldehit uzaklaştırıldı, kuyucuklar % 60'lık 2,4 mL 2-propanol ile yıkandı.
4. Pleytler 37 °C etüvde kuruyana kadar bekletildi.
5. kuyucuklara 1 mL oil red-o çalışma çözeltisi eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Oil red-O ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar dört kez saf su ile yıkandı.
7. Pleytler 37 °C etüvde kurutuldu.
8. 3,6 mL %100 lük 2-propanol kuyucuklara eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler tarafından tutulan oil red-o nun 2-propanol fazına geçmesi sağlandı.
9. 1 mL çözelti küvete alındı ve spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans okundu.

3.3.7. MTT Testi

Oleuropein Stok Çözeltisi(10 mM): 270,3 mg oleuropein tartıldı, FBS ihtiva etmeyen 5 mL DMEM'de çözüldü ve üzeri DMEM ile 50 mL'ye tamamlandı ve -20°C saklandı. Oleuropein stok çözeltisi kullanılarak 0, 10, 50, 100, 200, 400, 750 ve 1000 µM konsantrasyonda oleuropein çözeltileri DMEM ile seyreltilerek hazırlandı.

MTT([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Çözeltisi (5 mg/mL): Hcy'nin hücreler üzerine toksik etkisi MTT testi ile değerlendirildi(120). Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanılır. Canlı hücreler mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyası mor renkli formazan ürününe dönüştürülür (Şekil 13). Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi için aşağıdaki işlemler sırası ile yapıldı.

1. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200 µL besiyeri içinde 1.104 hücre ekildi.

2. Başlangıçtan 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı ve oleuropeinin her konsantrasyonu için (0, 10, 50, 100, 200, 400, 750 ve 1000 μ M) ayrılmış olan üç well'e 200 μ L farklı konsantrasyonlarda Hcy eklendi. 72 saat 37 °C' de inkübe edildi.
3. inkübasyondan sonra sonra pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek vuruldu ve kalan besiyerinin uzaklaştırılması sağlandı.
4. Her kuyucuğa 200 μ L DMEM eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde her kuyucuğa 10 μ L MTT boyası eklendi.
5. 2 saat 37 °C' de inkübe edildi.
6. Pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek vuruldu ve kalan içerik uzaklaştırıldı.
7. Her kuyucuğa 200 μ L DMSO eklendi ve pleyt 20 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
8. İnvert mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edildi.
9. Mor renk şiddetinin absorbansı ELISA okuyucusunda 570 nm dalga boyunda 620 nm referans dalga boyuna karşı okundu. Her oleuropeinin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı.

3.4. Oleuropeinin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

3.3.5.2. farklılaştırma işlemi başlığı altındaki ilk dört madde aynen tekrarlandı. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulandı.

5. Oleuropeinin 0, 10, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında çözeltileri olgunlaştırma çözeltisi içerisinde hazırlandı.
6. Oleuropeinin her konsantrasyonu için farklılaştırma başlatılan üçer kuyucuk, farklılaştırma başlatılan ancak ilaç uygulanmayan üç kuyucuk ve farklılaştırma DMEM'i kullanılmayan yani farklılaştırılmayan üç kuyucuk kullanıldı. Farklılaştırma İnkübasyonunun sonunda (48 saat) 2 mL besiyeri uzaklaştırıldı. Oleuropeinin için ayrılan kuyucuklara farklı konsantrasyonda 2 mL Oleuropeinin içeren olgunlaştırma DMEM'i, oleuropeinin uygulaması yapılmayan üç kuyucuğa 2mL olgunlaştırma DMEM'i ve farklılaştırma yapılmayan (kontrol) kuyucuğa 2mL % 10 FBS içeren DMEM eklendi.

7. 48 saat sonra 2 mL besiyeri uzaklaştırıldı. Farklılaştırma başlatılan kuyucuklara olgunlaştırma DMEM'i, kontrol kuyucuğuna 2 mL % 10 FBS içeren DMEM eklendi. Yağ hücrelerinin olgunlaşması işlemi yaklaşık 6 gün sürdü. Olgunlaştırma işlemi süresince besiyerleri iki günde bir değiştirildi.

8. İnkübasyon sonunda wellere adiposit boyama protokolü uygulandı ve absorbanlar ölçüldü.

3.5. Oleuropein 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılması Esnasında CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

3.4. Oleuropeinin 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine etkisinin incelenmesi başlığı altındaki ilk yedi madde aynen tekrarlandı. İnkübasyon sonunda RNA izolasyonu yapıldı.

3.6. RAW264.7 Hücreleri İçin MTT Testi

Oleuropein Stok Çözeltisi(10 mM): 270,3 mg oleuropein tartıldı, FBS ihtiva etmeyen 5 mL DMEM'de çözüldü ve üzeri DMEM ile 50 mL'ye tamamlandı ve -20oC saklandı. Oleuropein stok çözeltisi kullanılarak 0, 1, 10, 25, 75, 100 μ M konsantrasyonda oleuropein çözeltileri DMEM ile seyreltilerek hazırlandı. 3.3.7 MTT testi başlığı altındaki maddeler aynen tekrarlandı.

3.7. Oleuropein RAW264.7 Hücrelerinde CD36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

1.Hücreler sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 4 mL besiyeri içinde 1.10^5 hücre ekildi.

2. Kuyucuklarda çoğalan hücreler kuyucuk yüzeyinin % 100' ünü kaplayana kadar besiyeri 2 günde bir değiştirildi. Besiyerlerinin değişimi esnasında kuyucuklardan 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı (besiyerinin tamamını uzaklaştırmak kuyucuk yüzeyine yapışan hücrelerin kopmasına neden olabileğinden kuyucuk yüzeyine değmeden besiyerinin yarısının uzaklaştırılması tercih edildi. Buna bağlı olarak besiyeri içeriğinin son konsantrasyonu ayarlandı). Üzerine 2 mL yeni besiyeri eklendi. Bu süre yaklaşık 6 gün sürdü.

3. Altıncı günün sonunda kuyucuklardan 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı.

4. Oleuropeinin 0, 5, 10, 25, 75, 100 μ M konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltileri 6'lı pleytin kuyucuklarına ekledi. 24 saat 37 °C' de inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda RNA izolasyonu yapıldı.

3.8. RNA İzolasyonu

Olgun adipositlerden ve RAW264.7 hücrelerinden RNA izolasyonu TriPure Isolation Reagent (Roche)kullanılarak yapıldı. Bu işlemlerde kullanılan malzemeler sterilildi ve DPEC'li su ile yıkandı.

1. Kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırıldı.
2. Kuyucuklara 1mL TriPure Isolation Reagent eklendi ve pipetajla iyice karışması sağlandı.
3. Elde edilen içerik hacminin iki katı hacme sahip polipropilen santrifüj tüpüne alındı.
4. Homojenize örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek nükleoproteinlerin ayrılması sağlandı.
5. Her örneğin üzerine 0,2 mL kloroform eklendi, ağzı kapatıldı. 15 saniye karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
6. Çözelti 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üç faza ayrıldı.
7. En üstteki faz ayrı polipropilen tüpe alındı ve üzerine 0,5 mL izopropil alkol eklendi, ağzı kapatıldı ve 10-20 s vortekslendi.
8. Oda sıcaklığında 7 dakika bekletilerek RNA çökeleği oluşması sağlandı.
9. Çökeleğin ayrılması için 12000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve ardından süpernatant atıldı.
10. 1 mL %75'lik etanol tüpe eklendi ve vortekslendi.
11. 7500 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
12. Tamamen kurumasına müsaade edilmeden fazla etanol uzaklaştırıldı.
13. RNA pelleti Dietil piro karbonatlı (DPEC) su ile pipetaj yapılarak tekrar çözüldü ve 55°C'da 10-15 dakika bekletildi.

14. elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları ve RNA saflığının bir göstergesi olan A260/A280 oranı NanoDrop kullanılarak belirlendi. İzole edilen RNA'lar DEPC'li su çözeltisinde çözüldüğü için, ölçümde bu çözelti kör olarak kullanıldı. Total RNA numuneleri ng/ μ L cinsinden hesaplandı.

15. RNA örnekleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütüldü.

16. RNA örneklerinden Reverse Transkripsiyon ile cDNA elde edildi.

3.9. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi

RNA izolasyonu sonunda elde edilen RNA örnekleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve görüntü kaydedildi. Jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı:

Stok TAE (Tris-asetikasit-EDTA) elektroforez tamponu: 242 g Tris, 37,2 g Na₂EDTA.2H₂O bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzerine 57,1 asetik asit ilave edildi. 1N NaOH ile pH 8,5'a ayarlandı ve son hacim 1L'ye tamamlandı. Bu çözelti 50 kat seyreltilerek, hem elektroforez tamponu olarak, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

Etidium Bromür Çözeltisi: 100 mg etidium bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü (10mg/mL). Işıktan korunarak buzdolabında saklandı.

% 0,8'lik agaroz jel hazırlanması: 0,4 g agaroz 50 mL TAE (tris-asetikasit-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 10 μ L etidium bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi.

% 2'lik agaroz jel hazırlanması: 0,8 g agaroz 40 mL TAE (tris-asetikasit-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 10 μ L etidium bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi.

RNA numunelerinin Jele Yüklenmesi: Her bir örneğe ait 5 μ L RNA numunesi 2,5 μ L yükleme tamponu ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki jele kuyucuklara zarar vermeden yüklendi ve 80 voltta 1 saat jelde yürütüldü. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve kaydedildi.

3.10. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi 04 896 866 001 ürün kodlu Roche (İsviçre) marka "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA numuneler cDNA sentezi aşağıda verilen aşamaların sonucunda gerçekleştirildi. cDNA sentezi için gerekli karışım, 1.5 mL'lik RNaz/DNaz'dan yoksun reaksiyon tüplerinde Tablo 3'te verilen reaktifler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 3. cDNA sentezi için hazırlanan karışımın içerdiği reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Su	1
Tampon	4
RNaz İnhibitörü	0.5
dNTP Karışımı (10 mM)	2
Random Hekzamer Primer	2
Ters Transkriptaz (20 U/µL)	0.5

10 µL numunelerden elde edilen total RNA'ya hazırlanan karışımdan 10'ar mL eklendi. PCR cihazı 25 °C'de 10 dk, 55 °C'de 30 dk ve 85 °C'de 5 dk olacak şekilde ayarlandı, hazırlanan numuneler cihaza yüklendi ve reaksiyonların sonucunda total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Oluşan cDNA ürün konsantrasyonları (ng/µL) ve saflığı NanoDrop'ta belirlendi. -80 °C'de gen ekspresyon analizlerinin yapılacağı ana kadar saklandı.

3.11. RT-PCR Analizleri

Gen ekspresyon çalışmaları; ekspresyonu ölçülmek istenen hedef gen için spesifik olarak üretilen UPL (Universal Probe Library) problemleri kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche Light Cycler 480 II marka cihaz kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullandığımız primerler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer Adı		Primer dizisi
β -Aktin	İleri primer	5’- GGATGCAGAAGGAGATTACTGC -3’
	Geri primer	5’- CCACCGATCCACACAGAGTA -3’
CD36	İleri primer	5’-GCGACATGATTAATGGCACA -3’
	Geri primer	5’-CAATGTCCGAGACTTTTCAACA -3’
PPAR γ	İleri primer	5’-AAGACAACGGACAAATCACCA -3’
	Geri primer	5’-GGGGGTGATATGTTTGAAGTTG -3’
C/EBP α	İleri primer	5’-CCCAGAGGACCAATGAAATG -3’
	Geri primer	5’-ATACACCCTTGGACAAGTAGGG -3’

RT-PCR analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

1. 1.5 mL hacimli tüp içerisinde hedef gen ve referans gen için ayrı ayrı olmak üzere gerekli reaksiyon ortamı Tablo 5’te verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 5. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktif	Her bir örnek için gerekli hacim (μ L)
LightCycler 480 Probes master	10
Real time ready assay (<i>CD36</i> , <i>PPARγ</i> , <i>C/EBPα</i> ya da β -Aktin)	1
PCR saflığında su	4

2. Hazırlanan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde RT-PCR için özel olarak üretilmiş beyaz 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucukta 15’er μ L olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 5’er μ L cDNA örneği ilave edildi.

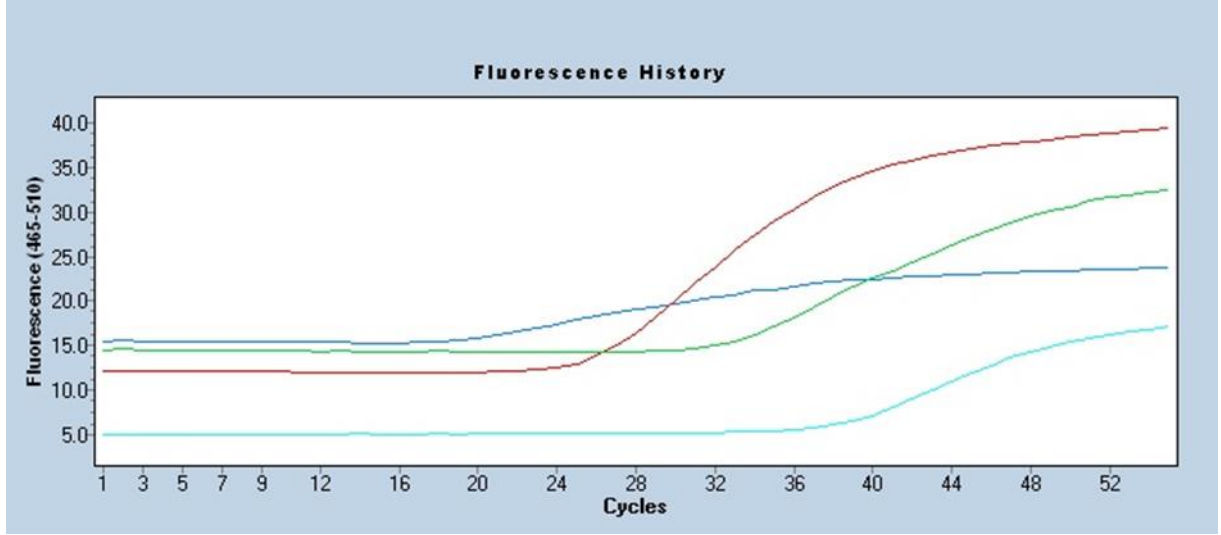
3. Cihaz ayarları Tablo 6’da verilen şablona göre düzenlendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 6. RT-PCR protokolü

Tespit formatı: Tek Renkli Hidroliz Prob/ UPL Probe			
Pleyt türü: 96 kuyucuklu			
Reaksiyon hacmi: 20 µL			
Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon	
Soğutma	1	-	
Hedef Sıcaklık °C	Elde etme modu	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	10 dakika	4.4
Amplifikasyon			
95	-	10 saniye	4.4
60	-	30 saniye	2.2
72	Tek	1 saniye	4.4
Soğutma			
40	-	30 saniye	2.2

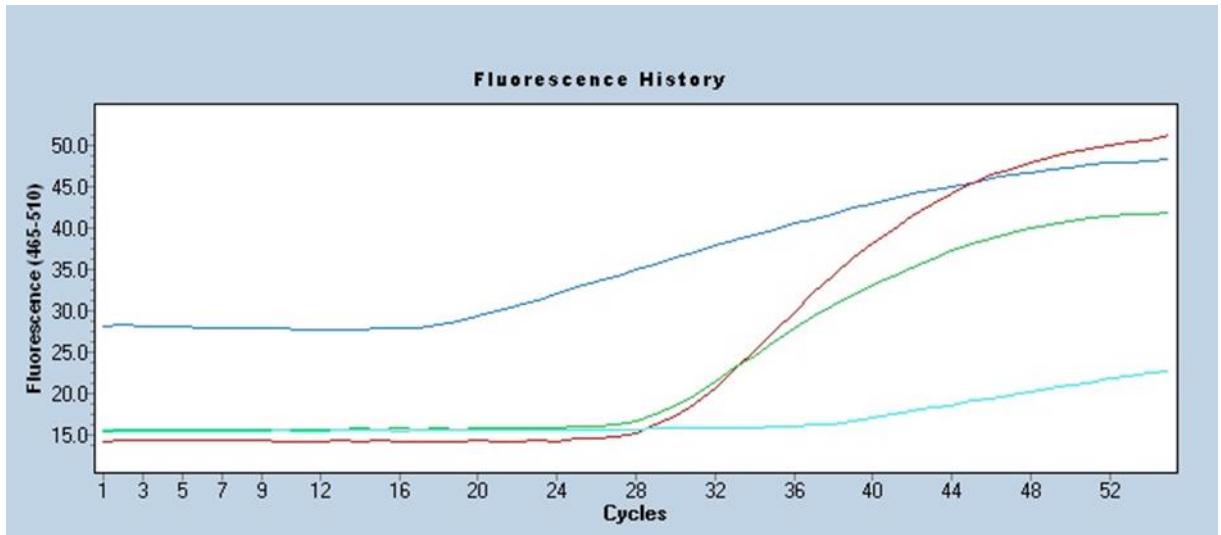
RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: mRNA ekspresyon çalışmalarında RT-PCR ile verilerin değerlendirilmesine yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılanı göreceli (rölatif, karşılaştırmalı) kantitasyon yöntemidir. Gen ekspresyonu analizlerinde göreceli kantitasyon birçok numunedeki genin veya genlerin mRNA ekspresyonlarındaki değişimini nicelleştirir. RT-PCR ile elde edilen sonuçların kantite edilmesinde karşılaştırmalı Cp metodu (2- $\Delta\Delta$ Cp metodu) rölatif kantitasyonu analiz etmede kullanılan normalize edilmiş gen ekspresyonunun matematiksel modelidir (42). Her bir örneğin PCR amplifikasyonu sırasında ekponensiyal faza geçtiği devir (Cp, crossing point) tespit edilerek 2- $\Delta\Delta$ Cp formülde yerine koyuldu. Her örnekten üçlü çalışıldığı için Cp değeri olarak bu değerlerin ortalamaları alındı. Kontrol olarak aldığımız gruba (standart diyetle beslenen wild tip) göre diğer grupların nasıl değişim gösterdiği Kat değişimi=2- $\Delta\Delta$ Cp = 2-(Δ Cp hedef- Δ Cp kontrol) eşitliği kullanılarak hesaplandı. Bu eşitliğe göre Δ Cp hedef: Cp hedef gen-Cp referans gen (housekeeping gen), Δ Cp kontrol: Cp Hedef gen-Cp Referans gen.

RT - PCR çalışmasında oleuropeinle 48 saat muamele edilen RAW264.7 makrofaj hücresinin β -Aktin, CD36, PPAR γ ve C/EBP α 'ya ait amplifikasyon grafiği Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 48.saat RAW264.7 makrofaj hücresinin amplifikasyon eğrileri
– β -Aktin, – CD36, – PPAR γ , – C/EBP α

RT - PCR çalışmasında 3T3L-1 hücresinin β -Aktin, CD36, PPAR γ ve C/EBP α 'ya ait amplifikasyon grafiği Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 3T3L-1 hücresinin amplifikasyon eğrileri
– β -Aktin, – CD36, – PPAR γ , – C/EBP α

3.12. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma cinsinden verildi. Gruplar arasındaki farklılık eşleştirilmiş örnekler t testi kullanılarak tespit edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Oleuropeinin 3T3-L1 Hücreleri Üzerine Toksik Etkisi

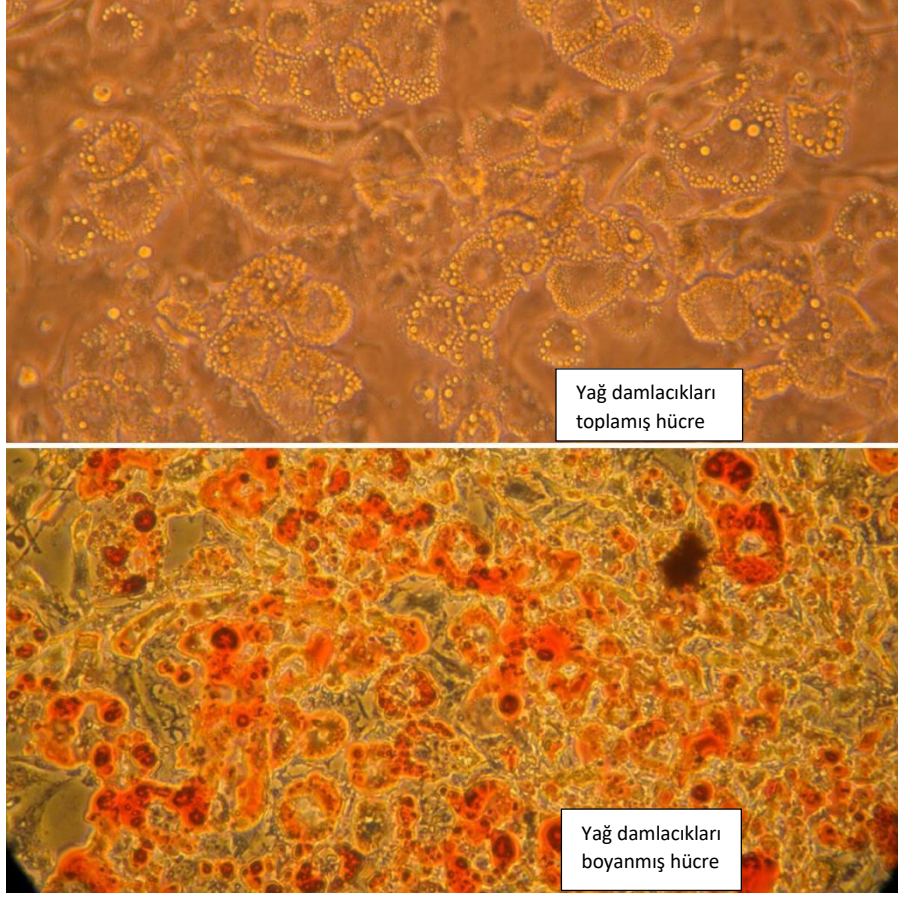
Hücre kültürü deneyinde kullanılacak oleuropein için en uygun dozların belirlenmesi için MTT testi yapıldı. MTT testi sonunda farklı oleuropein konsantrasyonlarına karşılık elde edilen % canlılık sonuçları tablo 7’da verildi. Elde edilen bu sonuçlara göre deneylerde 0, 10, 50, 100, 200 μ M konsantrasyonlarda oleuropein kullanılmasına karar verildi.

Tablo 7. Oleuropeinin 3T3-L1 hücreleri üzerine toksik etkisi (% canlılık testi)

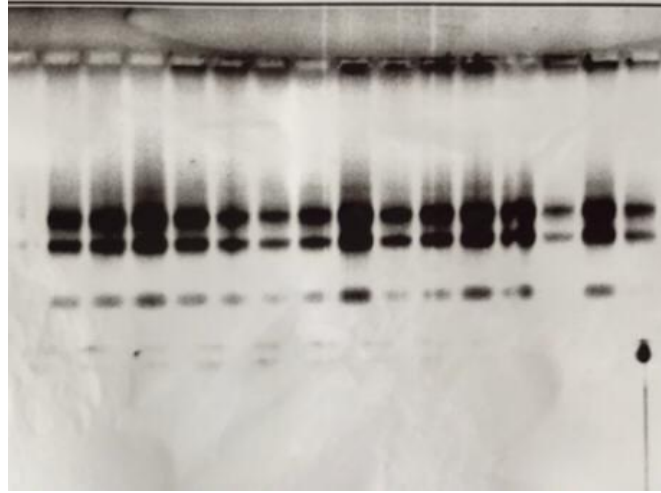
n	3	3	3	3	3	3	3	3
Oleuropein (μ M)	0	10	50	100	200	400	750	1000
% canlılık	100	113	121	107	87	73	54	29

4.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması

Deneylere başlamadan önce standart protokol uygulanarak 3T3-L1 hücre serisinin yağ hücrelerine dönüşümünün belirlenmesi için yaptığımız deneylerde, farklılaşmanın %80 civarında gerçekleştiği tespit edildi. Hücrenin yağ hücrelerine dönüştüğünde ve yağ hücrelerinin Oil Red O ile boyandığı zamanlara ait mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4’te verildi.



Şekil 4. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde elde edilen mikroskop görüntüleri



Şekil 5. RNA örneklerinin jel görüntüsü

4.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Oleuropeinin Etkisinin İncelenmesi

Oleuropeinin 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla deney sonunda her kuyucukta bulunan yağ hücresine farklılaşmamış hücreler ve farklılaşmış olgun yağ hücreleri Oil Red O boyası ile boyandı ve 520 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri tablo 8’de verildi.

Tablo 8. 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine oleuropeinin etkileri

Farklılaşma	-	+	+	+	+	+
Oleuropein (µM)	-	-	10	50	100	200
Absorbans	0,510	0,782	0,799	0,779	0,691	0,597

Yağ hücrelerine farklılaşmamış hücreler ile farklılaşmış olgun yağ hücreleri Oil Red O boyası ile boyandıktan sonra elde edilen ortalama absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanan hücreler oleuropein uygulanmayan hücrelerle karşılaştırıldığında oleuropeinin farklılaşmayı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur ($P<0,05$).

4.4. Oleuropeinin RAW264.7 Hücreleri Üzerine Toksik Etkisi

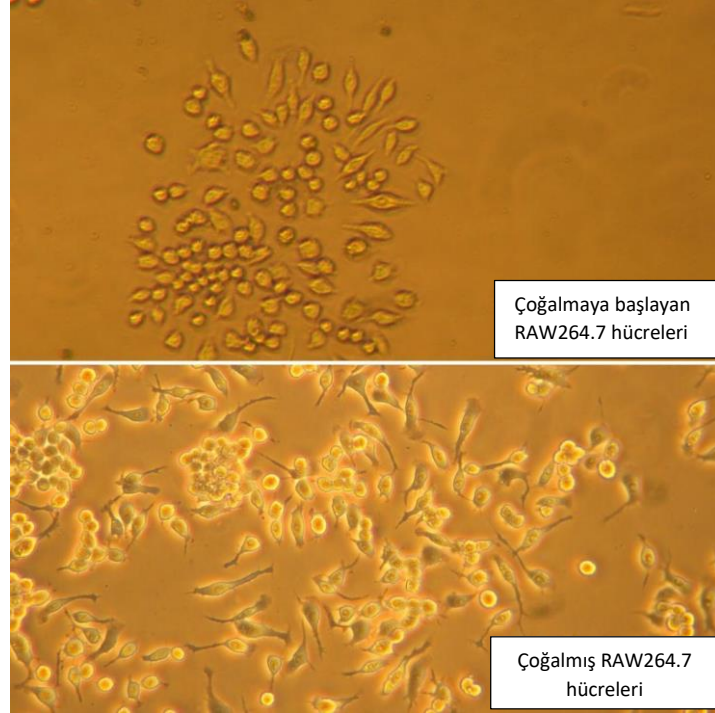
Hücre kültürü deneyinde kullanılacak oleuropein için en uygun dozların belirlenmesi için MTT testi yapıldı. MTT testi sonunda farklı oleuropein konsantrasyonlarına karşılık elde edilen % canlılık sonuçları tablo 9’da verildi. Elde edilen bu sonuçlara göre deneylerde 0, 10, 25, 75, 100 µM konsantrasyonlarda oleuropein kullanılmasına karar verildi.

Tablo 9. Oleuropeinin RAW264.7 hücreleri üzerine toksik etkisi(% canlılık testi)

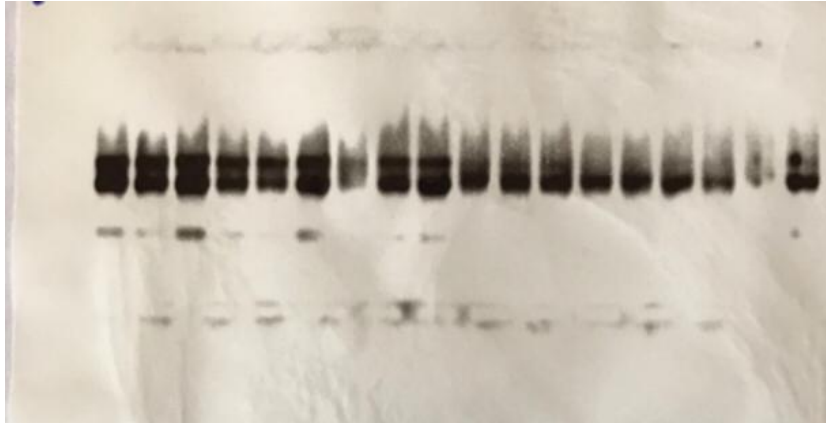
n	3	3	3	3	3	3	3
Oleuropein (µM)	0	5	10	25	50	75	100
% canlılık	100	83	83	103	63	75	70

4.5. RAW264.7 Hücrelerinin Çoğalması

RAW 264.7 makrofaj hücrelerine ait çoğalma görüntüleri Şekil 6’da RNA izolasyonu sonrası elde edilen bazı ürünlerin jelde yürütülmesine ait görüntü Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 6. Çoğalan RAW 264. 7 hücrelerine ait mikroskop görüntüleri



Şekil 7. RNA jel görüntüsü

4.6. 3T3-L1 ve RAW264.7 Hücrelerinde Ölçülen Genlerin Ekspresyonları İle İlgili Bulgular

Oleuropein ile muamele edilen 3T3-L1 hücre serisinden ve RAW264.7 makrofaj hücrelerinden elde edilen cDNA’lardan her bir gen için pleyte üçlü yükleme yapıldı. RT-PCR ile bu hücrelerde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α ekspresyonlarına bakıldı ve her numune için kesişim noktası (Cp, crossing point) değerleri elde edildi. Üçlü çalışmadan elde edilen Cp değerlerinin ortalamaları alındı ve bu Cp değerlerinden yararlanılarak kontrol grubuna (oleuropein ile muamelesiz) göre her grup için kat değişimleri hesaplandı.

4.6.1. 3T3-L1 Hücre Serisinde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

CD 36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 10’da verildi.

Tablo 10. 3T3-L1 Hücre Serisinde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyon Sonuçları

n	3	3	3	3	3	3
Farklılaşma	-	+	+	+	+	+
Oleuropein(μ M)	-	-	10	50	100	200
CD36	-	1	0,71 $\pm$ 0,23	0,62 $\pm$ 0,10	0,046 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,05
PPAR γ	-	1	6,72 $\pm$ 1,36	1,75 $\pm$ 0,19	1,09 $\pm$ 0,35	0,38 $\pm$ 0,10
C/EBP α	-	1	1,23 $\pm$ 0,93	0,80 $\pm$ 0,37	0,48 $\pm$ 0,47	0,63 $\pm$ 0,60

Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile oleuropein uygulanan farklılaşmış olgun yağ hücreleri real-time PCR sonrası CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonu açısından karşılaştırıldı. CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonlarında anlamlı bir azalış olmuştur (p< 0,05).

4.6.2. RAW264.7 Hücre Serisinde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

CD 36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonuna ait sonuçlar tablo 11’de verildi.

Tablo 11. RAW264.7 Hücre Serisinde 48. Saat CD 36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyon Sonuçları

n	3	3	3	3	3	3
Oleuropein(μ M)	-	5	10	25	75	100
CD36	1	1,53 $\pm$ 0,9	1,20 $\pm$ 0,78	0,57 $\pm$ 0,47	1,37 $\pm$ 1,11	0,72 $\pm$ 0,25*
PPAR γ	1	0,65 $\pm$ 0,53	0,45 $\pm$ 0,14	0,15 $\pm$ 0,11	0,59 $\pm$ 0,57	0,33 $\pm$ 0,09*
C/EBP α	1	1,40 $\pm$ 0,97	1,04 $\pm$ 1,01	0,84 $\pm$ 0,98	0,36 $\pm$ 0,13	0,45 $\pm$ 0,09*

Oleuropein uygulanmayan ve oleuropein uygulanan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde real-time PCR sonrası CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonu açısından karşılaştırıldı. CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon sonuçları incelendiğinde sadece 100 μ M konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 8. RT-PCR’den sonra bazı ürünlerin agaroz jel görüntüsü. Jele yüklenen ürünler sırasıyla 1: beta aktin, 2: CD 36, 3: PPAR γ , 4: C/EBP α ’dır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin artması ile karakterize, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen bir hastalıktır. Obezitenin diyabet, üreme bozuklukları, gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, artrit, uyku apnesi, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojiler için risk faktörü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (2).

Zeytin meyvesinden ve yapraklarından elde edilen oleuropein ve diğer polifenoller, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyak iskemi ve diğer bozukluklara karşı koruma yetenekleri nedeniyle hem insanlarda (43) hem de deney hayvan modellerinde incelenmiştir (44). 3T3-L1 hücre hattı, adiposit farklılaşması ve adipoz biyolojisinin bir modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklılaşmış 3T3-L1 preadipositler, hayvan dokusundaki adipositlerin birçok özelliğini yansıtmaktadır (45).

Daha önce bildirildiği gibi, oleuropein murin 3T3-L1 hücre kültürü modelinde doza bağımlı bir şekilde adipogenezi bastırmıştır (24). Mevcut bulgularımız oleuropeinin, 3T3-L1 hücrelerinin hücre canlılığını etkilemeden farklılaşmasını ve adipogenezi inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmamız, oleuropeinin PPAR γ ve C/EBP α ve bunların alt hedef CD36'nın ekspresyonunu, farklılaşma işlemi sırasında azalttığını göstermiştir.

Ryu ve ark. oleuropeinin, belirtilen konsantrasyon aralığında (0-400 μ M) RAW 264.7 hücrelerine toksik olmadığı ve 12, 24, 48 ve 72 saatlik muamelede toksisitesi göstermediğini bildirmişlerdir. Mikroskopik analiz temelinde hücrelerde morfolojik değişiklik gözlenmediği ve bu sonucun oleuropeinin hücre apoptozu üzerinde hiçbir etkisi olmadığı kanaatine varmışlardır (46). Yaptığımız çalışmada 48 saat boyunca oleuropeinle muamele edilen RAW 264.7 makrofaj hücre serisinde, çalışılan dozlarda (0,100 μ M) toksik bir etki gözlemlenmemiştir. Deney sonucunda yapılan RT-PCR sonucunda, 100 μ M oleuropein konsantrasyonunun RAW 264.7 hücre serisinde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur.

CD36, birçok hücre yüzeyinde bulunan 88 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran glikoproteindir. CD36; monositler, makrofajlar, trombositler, mikrovasküler endotel hücreleri, adipositler, böbrek ve kalp miyositlerindeki epitel hücrelerinden eksprese edilmektedir. CD36; trombospondin-1, okside fosfolipidler, okside LDL, hekzarelin, fibriller beta amiloid peptidler ve uzun zincirli yağ asitleri gibi molekülleri bağlama özelliğine sahiptir.

Aterojenik süreç makrofajların farklılaştığı arteriyel intima alanına kanda dolaşan monositlerin transmigasyonuyla başlamaktadır. Özellikle makrofajlar CD36 aracılığıyla okside LDL'yi bağlayarak hücre içine alırlar. Zamanla makrofajlardan köpük hücre oluşumu ateroskleroz için başlangıç aşaması olarak kabul edilmektedir (12). Oleuropein makrofajlarda CD36 gen ekspresyonunu azaltarak köpük hücre oluşumunu önleyici ve anti-aterojenik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *in vitro* olarak oleuropein, hem 3TL-L1 hem de RAW264.7 hücre serisinde CD 36, PPAR γ ve C/EBP α ekspresyonunu inhibisyonu yoluyla anti-adipojenik ve anti-aterojenik etki gösterebileceği kanaatine varılmıştır. Bu nedenle oleuropein, obezite ve aterosklerozun önlenmesi ve tedavisi için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde bir diyet takviyesi olarak kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Shamseddeez, H., Getty, J.Z., Hamdallah, I.N., Ali, M.R. 2011. "Epidemiology and economic impact of obesity and type 2 diabetes" *Surg Clin N Am*, 91, 1163-1172.
2. Kuzcmarski, R.J., Flegal, K.M. 2000. "CDC growth charts", *United States Adv Data*, 314, 1-27.
3. Jemai, H., El Feki, A., Sayadi, S. 2009. "Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats" *J. Agric. Food Chem*, 57, 8798–8804.
4. Castejón, M.L., Montoya, T., Alarcón-de-la-Lastra, C., Sánchez-Hidalgo, M. 2020. "Potential Protective Role Exerted by Secoiridoids from *Olea europaea* L. in Cancer, Cardiovascular, Neurodegenerative, Aging-Related, and Immunoinflammatory Diseases", *Antioxidants*, 9(2), 149.
5. Febbraio, M., Hajjar, D.P., Silverstein, R.L. 2001. "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism", *J Clin Invest*, 108, 785-791.
6. Zhang, L., Chawla, A. 2004. "Role of PPARgamma in macrophage biology and atherosclerosis", *Trends Endocrinol Metab*, 15(10), 500-505.
7. Ramji, D.P., Foka, P. 2002. "CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation" *Biochem J*, 365(3), 561-575.
8. Svobodova, M., Andreadou, I., Skaltsounis, A.L., Kopecky, J. 2014. "Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma", *Genes Nutr*, 9, 376.
9. Kuem, N., Song, S., Yu, R., Won, J. 2014. "Oleuropein attenuates visceral adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b- and galanin-mediated signalings", *Mol Nutr Food Res*, 58, 2166–2176.
10. WHO. "Obesity and overweight". <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Son erişim tarihi: 11 Mayıs 2020.
11. Lee, M.S., Kim, C.T., Kim, I.H., Kim, Y. 2008. "Inhibitory effect of green tea catechin on the lipid accumulation in 3 T3-L1 adipocytes", *Phytother Res*, 23, 1088-1091.
12. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, O.R. 1993. *Temel Histoloji* (Çev. Y. Aytekin). Barış kitapevi, 150-158.

13. Gimble, J.M. 2003. "Adipose tissue-derived therapeutics", *Expert Opin Biol Therapy*, 3(5), 705-713.
14. Frühbeck, G. 2001. "Adipose Tissue Protocols. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders", New jorsey, 1-22.
15. Ahima, R.S., Flier, J.S. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ, *Trends Endocrinol Metab*, 11, 327-332.
16. Ergün, A. 2005. "Adipose tissue and the adipocyte", *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 25, 412-420.
17. Abumrad, N.A., El-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., Grimaldi, P.A. 1993. "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is included during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36", *J Biol Chem*, 268,17665–17668.
18. Park, Y.M. 2014. "CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis", *Exp Mol Med*, 46(6), e99.
19. Puente Navazo, M.D., Daviet, L., Ninio, E., McGregor, J.L.1996. "Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL)", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(8),1033-9.
20. Endemann, G. Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., Protter, A.A. 1993. "CD36 is a receptor for oxidized low density Lipoprotein", *J Biol Chem*, 268, 11811–11816.
21. Poulsen, L., Siersbæk, M., Mandrup, S. 2012. "PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism", *Semin Cell Dev Biol*, 23(6), 631-639.
22. Grygiel-Górniak B. 2014. "Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review", *Nutr J*, 13: 17.
23. Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., Auron, P.E. 2011. "The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation", *Cytokine* 54(1), 6-19.
24. Drira, R., Chen, C., Sakamoto, K. 2011. "Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells", *Life Sciences*, 89, 708–716.
25. Ryan, D., Antolovich, A. 2002. "Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L.", *Scientia Horticulturae*, 92, 147-176.
26. Del Boccio, P., Di Deo, A., De Curtis, A., Celli, N. 2003. "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in

- rat plasma and urine after oral administration”, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 785, 47–56.
27. Tan, H.W., Tuck, K.L., Stupans, I., Hayball, P.J. 2003. “Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection”, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 785, 187–191.
 28. de la Puerta, R., Martinez Dominguez, M.E., Ruiz-Gutierrez, V., Flavill, J.A. 2001. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission”, *Life Sci.*, 69, 1213–1222.
 29. Han, J., Talorete, T.P., Yamada, P., Isoda, H. 2009. “Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells”, *Cytotechnology*, 59, 45–53.
 30. Furneri, P.M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N. 2002. “In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein”, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 20, 293–296.
 31. Park, S., Choi, Y., Um, S.J., Yoon, S.K. 2011. “Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice”, *J. Hepatol*, 54, 984–993.
 32. Hadrich, H., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Feki, I. 2016. “Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol fed rats”, *Chemico-Biological Interactions*, 252, 54-60.
 33. Priore, P., Siculella, L., Gnoni, G.V. 2014. “Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 683–691.
 34. Svobodova, M., Andreadou, I., Skaltsounis, A.L., Kopecky, J. 2014. “Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma” *Genes Nutr*, 9, 376.
 35. Kuem, N., Song, S., Yu, R., Won, J. 2014. “Oleuropein attenuates visceral adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b- and galanin-mediated signalings”, *Mol. Nutr. Food Res*, 58, 2166–2176
 36. Mallioua, F., Andreadoub, I., Gonzalezc, F.J. 2018. “The olive constituent oleuropein, as a PPAR α agonist, markedly reduces serum triglycerides”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 59, 17–28.
 37. World Health Organization. Cardiovascular diseases fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Son erişim tarihi: 11 Mayıs 2020.
 38. Visioli, F., Poli, A., Gall, C. 2002. “Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil”, *Med Res Rev* 22:65–75.

39. Carr, A.C., Tijerina, T., Frei, B. 2000. "Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density Lipoprotein", *Biochem J*, 346, 491–499.
40. Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S. 2008. "Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves", *Chem Biol Interact*, 176, 88–98.
41. Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H., Sayadi, S. 2008. "Lipid lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats", *J Agric Food Chem*, 56, 2630–2636.
42. Livak, K.J., Schmittgen, TD .2001." Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method", *Methods*, 25, 402-408.
43. de Bock, M., Derraik, J.G., Brennan, C.M., Biggs, J.B., Morgan, P.E., Hodgkinson, S.C., Hofman, P.L., Cutfield, WS .2013. " Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial", *PLoS ONE*, 8(3), e57622.
44. Oi-Kano, Y., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., Watanabe, K., Senbongi, R., Iwai, K.2008. "Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats", *J Nutr Sci Vitaminol*, 54(5), 363–370.
45. Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Rosen, O.M., Rubin, C.S. 1980. "Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes", *J. Cell Biol*, 87, 180–196.
46. Ryu, S.J., Choi, H.S., Yoon, K.Y., Lee, O.H.2015. "Oleuropein Suppresses LPS-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cell and Zebrafish", *J. Agric. Food Chem*, 63, 2098–2105.