

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TİMOKİNON (TQ)' UN İNSAN HÜCRE HATTI
MODELİNDE İNSÜLİN SİNYAL YOLAKLARINA
ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sedat SEZEN**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Halit CANATAN
Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2015
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TİMOKİNON (TQ)' UN İNSAN HÜCRE HATTI
MODELİNDE İNSÜLİN SİNYAL YOLAKLARINA
ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sedat SEZEN**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Halit CANATAN
Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2014-5171 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Sedat SEZEN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Timokinon (TQ)’ un İnsan Hücre Hattı Modelinde İnsülin Sinyal Yolaklarına Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması” Adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

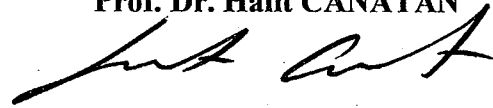
Tezi Hazırlayan

Sedat SEZEN



Danışmanlar

Prof. Dr. Halit CANATAN



Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Halit CANATAN

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Halit CANATAN ve Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR danışmanlığında **Sedat SEZEN** tarafından hazırlanan “**Timokinon (TQ)' un İnsan Hücre Hattı Modelinde İnsülin Sinyal Yolaklarına Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.... /.... / 2015

JÜRİ:

İmza

Danışman : Prof. Dr. Halit CANATAN
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

II. Danışman : Doç.Dr. Çağrı ŞAKALAR
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
(Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kenan İZGİ
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenim süreci boyunca sonsuz sabrı ve iyi niyetiyle bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini aktararak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik gelişimime katkı sağlayan, kıymetli tez danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Halit CANATAN ve Sayın Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR' a;

Yüksek Lisans ders ve tez süreci boyunca beni destekleyen, benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Yüksek Lisans Tez çalışmamın yapılmasında maddi katkı sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne ve ÖYP Kurum Koordinatörlüğü'ne;

Tez çalışmam boyunca yardımlarını benden esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma;

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, benim bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme **sonsuz teşekkür ederim.**

TİMOKİNON (TQ)' UN İNSAN HÜCRE HATTI MODELİNDE İNSÜLİN SİNYAL YOLAKLARINA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Sedat SEZEN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2015

Danışman: Prof. Dr. Halit CANATAN

II. Danışman: Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR

ÖZET

İnsülin direnci, insülin reseptörünün yapısı ve/veya fonksiyonları veya glukoz transportlarında meydana gelen bozukluklar neticesinde meydana gelmektedir. Timokinon (TQ), *Nigella sativa*'nın biyoaktif komponentidir. Deneysel çalışmalarda streptozosin (STZ) ile indüklenerek oluşturulan diyabetik hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda, TQ' un hipoglisemik ve antidiyabetik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada ilk etapta hücre kültürü ortamında insülin direnç modeli oluşturulması amaçlanmıştır. Oluşturulan insülin direnç modelinde TQ' un hücre içerisine glukoz alımındaki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Son olarak, oluşan insülin direnç modeli üzerinde TQ' un insülin sinyal yolağında gen düzeyinde meydana getirdiği değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında, *in vitro* ortamda HepG2 hücreleri kullanılarak yüksek doz insülin (1700 nm) verilmesiyle insülin direnç modeli oluşturuldu. TQ' un farklı konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25, 50 µM) uygulanarak insülin direncine olan etkisi incelendi. TQ' un HepG2 hücrelerinde indüklediği sitotoksisite ve apoptoz incelendi. Sitotoksisite deneyinde, TQ' un HepG2 hücrelerinde IC₅₀ değeri 23.75 µM olarak belirlendi. Apoptoz deneyinde, kontrol, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM dozlarını kapsayan TQ uygulandığında, apoptoz yüzdelerinin sırasıyla % 1,6 ± 0,16, % 6,8 ± 0,22, % 9,9 ± 1,07, % 19,4 ± 1,16, % 26,6 ± 1,17 olduğu belirlendi (p<0,05).

Glukoz alım deneyinde, hücrelerin glukoz alım oranları yüzde olarak, insülin direnç modeli oluşturulan kontrol grubunda % 1,56 ± 0,6 iken, farklı TQ dozlarında glukoz alımı şu şekilde belirlendi: TQ-6.25 µM, % 4,31 ± 0,58, TQ-12.5 µM % 6,29 ± 0,89,

TQ-25 % $18,87 \pm 2,45$, TQ-50 μM % $43,04 \pm 4,69$ ($p < 0,05$). İnsülin direnci oluşturulmayan HepG2 hücrelerinde ise glukoz alımı % $44,06 \pm 1,89$ olarak bulundu. Bu veriler insülin direnci sonucu azalan glukoz alımının TQ tarafından düzeltiltiğini açıkça ortaya koymaktadır.

Gen ifadesi düzeyinde yapılan çalışmada insülin direnci oluşturulmuş hücrelerde farklı TQ dozlarında insülin direnci ile ilişkili 84 genin ekspresyon seviyeleri incelendi. TQ'un 12,5, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarında, sitokin-sitokin reseptör etkileşimi ile ilişkili gen ifadelerinin (IL6, TNF- α , IL1R1, IL18R1), insülin sinyal yolağı ile ilişkili gen ifadelerinin (INSR, IRS2, AKT3, PDK2, MAPK) ve sitokin bağlama ile ilişkili gen ifadelerinin (CCR4, CCR5, CXCR3, CXCR4) etkilendiği tespit edildi ($p < 0,05$).

Sonuç olarak, insülin direnç modeli oluşturulan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 üzerinde TQ' un insülin direnç mekanizmasını zayıflattığını gözlemledik. Buna ilaveten, TQ' un insülin sinyal yolağı ile ilişkili kritik genlerin ekspresyon seviyelerine etki göstererek glukoz alımına katkı sağladığını düşünmekteyiz. TQ' un gösterdiği bu önemli etkinin *in vivo* çalışmalarla daha ayrıntılı çalışılarak terapötik bir ajan olarak kullanılma potansiyelinin araştırılması gerektiği öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, Glukoz Alımı, HepG2 Hücre Hattı, İnsülin Direnci, İnsülin Sinyal Yolakları,

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THYMOQUINONE (TQ) ON
INSULIN SIGNALING PATHWAYS AT THE MOLECULAR LEVEL USING A
HUMAN CELL LINE MODEL**

Sedat SEZEN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
M.Sc. Thesis, August 2015
Supervisor: Prof. Dr. Halit CANATAN
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Çağrı ŞAKALAR**

ABSTRACT

Insulin resistance develops as a result of irregularities in glucose transports and insulin receptor structure and/or functions. Thymoquinone (TQ) is the active ingredient of *Nigella sativa*. It has been well documented in experimental studies in which the diabetes is induced by streptozotocin (STZ) in diabetic animals that TQ has hypoglycemic and anti-diabetic effects.

In the present study, insulin resistance model in cell culture has been aimed to be developed in the first phase. It was aimed to study the effect of TQ on intra-cellular uptake of glucose in established insulin resistance model. In the last phase, the aim was to evaluate the effect of TQ on the expression levels genes involved in the insulin signaling pathway in established insulin resistance model.

Insulin resistance model was established by using high dose insulin (1700 nm) in HepG2 cells in *in vitro* conditions. Effects of the application of different concentrations of TQ (6.25, 12.5, 25, 50 μ M) on insulin resistance were evaluated. Cytotoxicity and apoptosis induced by TQ on HepG2 cells were investigated. IC₅₀ value of TQ on HepG2 cells was determined to be 23.75 μ M in cytotoxicity experiment. In apoptosis experiment, apoptosis levels were determined to be $1,6 \pm 0,16$ %, $6,8 \pm 0,22$ %, $9,9 \pm 1,07$ %, $19,4 \pm 1,16$ %, $26,6 \pm 1,17$ %, respectively in control , 6.25, 12.5, 25 and 50 μ M TQ doses ($p < 0.05$).

In glucose uptake experiment, the percentage of glucose uptake of cells was determined to be $1,56 \pm 0,6$ % in insulin resistance model (control) while different concentrations of TQ value (TQ-6.25 μ M, $4,31 \pm 0,58$ %, TQ-12.5 μ M $6,29 \pm 0,89$ %, TQ-25 $18,87 \pm$

2,45 %, TQ-50 μ M 43,04 \pm 4,69 % ($p < 0.05$). Glucose uptake on HepG2 cells without insulin resistance development was determined to be 44,06 \pm 1.89 %. These data clearly demonstrate that reduced glucose uptake due to insulin resistance is restored by TQ.

In gene expression level study, the effect of different doses of TQ on 84 genes related with insulin resistance were investigated in cells with established insulin resistance with the doses at 12.5, 25, 50 μ M of TQ. The expression of genes related with cytokine cytokine interactions (IL6, TNF- α , IL1R1, IL18R1), insulin signaling pathway (INSR, IRS2, AKT3, PDK2, MAPK), cytokine binding (CCR4, CCR5, CXCR3, CXCR4) was determined to be affected ($p < 0,05$).

In conclusion, we observed that TQ weakens insulin resistance in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 with established insulin resistance model. In addition, we believe that TQ contributes to glucose uptake by affecting the expression levels of critical genes in insulin signaling pathway. We propose that this important effect of TQ needs to be further investigated in *in vivo* studies to explore TQ' s potential as a therapeutic agent.

Key Words: Thymoquinone, Glucose Uptake, HepG2 Cell Line, Insulin Resistance, Insulin Signaling Pathways,

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DİYABET	3
2.1.1. Diyabetes Mellitus Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. DİYABETES MELLİTUSUN SINIFLANDIRILMASI	4
2.1.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM).....	5
2.1.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM).....	5
2.1.2.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM).....	7
2.1.2.4. Diğer Spesifik Türler	7
2.1.3. Diyabet Modelleri	10
2.1.3.1. <i>İn Vitro</i> Modeller	10
2.1.3.2. <i>İn Vivo</i> Modeller	11
2.1.3.2.1. Cerrahi Yöntem Kullanılarak Oluşturulan Diyabet Modelleri	11
2.1.3.2.2. Kimyasal Ajanlar ile Oluşturulan Diyabet	11
2.1.3.2.2.1. Alloksan	11
2.1.3.2.2.2. Steptozotosin.....	12
2.1.3.2.3. Spontan Şekilde Oluşan Diyabet Modelleri	13
2.1.3.2.4. Diyet ile Oluşturulan Diyabet Modelleri	14
2.1.3.2.5. Transgenik modeller	14

2.2. Timokinon (TQ)	15
2.2.1. <i>Nigella Sativa</i>	15
2.2.2. TQ' un Tanımı;.....	15
2.2.3. TQ' un Etki Alanları.....	15
2.2.3.1. TQ' un Anti-diyabetik Etkisi	15
2.2.3.2. TQ' un Anti-tümör ve Anti-kanser Etkisi.....	17
2.2.3.3. TQ' un Analjezik ve Anti-inflamatuar Etkisi	18
2.2.3.4. TQ' un Anti-oksidan Etkisi.....	19
2.2.3.5. TQ' un Karaciğer Koruyucu Etkisi	20
2.2.3.6. TQ' un İmmün Sistem Üzerine Etkisi	21
2.2.4. TQ' un Etki Mekanizması.....	21
2.3. İnsülin	22
2.4. İnsülin Sinyal Yolağı	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. GEREÇLER.....	30
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	30
3.1.2. Sarf Malzemeler.....	31
3.2. YÖNTEM.....	32
3.2.1. Hücre Kültürü	32
3.2.2. İnsülin Direnç Modeli	32
3.2.3. TQ Konsantrasyonlarının Ayarlanması.....	32
3.2.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tespiti	32
3.2.5. Hücre İçine Glukoz Alım Deneyi	33
3.2.6. Apoptoz Deneyi	34
3.2.7. Gen İfade Düzeylerinin Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (quantitative real time polymerase chain reaction: QPZR) ile Analizleri.....	34

3.2.7.1. RNA İzolasyonu	34
3.2.7.2. RNA miktar ve kalite tayini	35
3.2.7.3. Tamamlayıcı (Complementary) DNA (cDNA) Sentezi	35
3.2.7.4. RT ² PZR Array İnsan İnsulin Direnç Panelinin Hazırlanması ve RT-PZR İşlemi	36
3.2.8. İstatistiksel Analizler	41
4. BULGULAR	42
4.1. TQ' un HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	42
4.2. TQ' un HepG2 Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkisi	42
4.3. Hücre İçine Glukoz Alım Deneyi.....	43
4.4. Kantitatif PZR ile Gen Ekspresyon Analizi	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	59
6. KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ.....	84

KISALTMALAR ve SİMGELER

TQ	Timokinon
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)
T1DM	Tip 1 Diyabetes Mellitus (Type I Diabetes Mellitus)
T2DM	Tip 2 Diyabetes Mellitus (Type 2 Diabetes Mellitus)
GDM	Gestasyonel Diyabetes Mellitus (Gestational Diabetes Mellitus)
PI3K	Fosfotidil inozitol 3 kinaz (phosphatidylinositide 3-kinases)
GLUT4	Glukoz Transport Tip 4 (Glucose transporter type 4)
TNF	Tumör Nekrozis Faktör (Tumor necrosis factor)
ADA	Amerika Diyabet Derneği (American Diabetes Association)
AMPK	5' Adenozin Monofosfat-aktive protein kinaz (5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase)
IR	İnsülin Reseptör (Insulin receptor)
IRS 1-6	İnsülin Reseptör Substrat 1-6 (Insulin receptor substrate 1-6)
Bcl-2	B-hücre lenfoma-2 (B-cell lymphoma 2)
Bcl-xL	B-hücre lenfoma-extra uzun (B-cell lymphoma-extra large)
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)
Bax	Bcl-2-ilişkili X proteini (Bcl-2-associated X protein)
CB 1954	5-(Aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide
FBS	Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
DMSO	Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
STZ	Streptozotosin
NOD	Şişman olmayan diyabetik fare (Non-obese Diabetic mice)
BB	"Bio Breeding1 sıçan (Bio Breeding rat)

KPD	Komodo Prone Diyabetik sıçan (Komodo Prone Diabetic rat)
LETL	Long-Evans Tokushima zayıf sıçan (Long-Evans Tokushima Lean rat)
ZDF	Zucker diyabetik şişman sıçan (Zucker diabetic fatty rat)
COX	Siklooksijenaz (Cyclooxygenase)
LO	Lipooksijenaz (Lipoxygenases)
LT	Lökotrien (Leukotriene)
PG	Prostaglandin
MCP-1	Monosit Kemoattractan Protein-1 (monocyte chemotactic protein 1)
DOX	Doksorubisin (Doxorubicin)
NO	Nitrik Oksit (Nitric oxide)
L-NAME	L-NG-nitro-1-arjinin metil esterleri (L-NG-Nitroarginine Methyl Ester)
MDA	Malondialdehit (Malondialdehyde)
CCl₄	Karbon Tetraklorür (Carbon tetrachloride)
ALT	Alanin Transferaz (Alanine transaminase)
AST	Aspartat Transaminaz (Aspartate transaminase)
LDH	Laktat Dehidrogenaz (lactate dehydrogenase)
TAM	Tamoksifen (Tamoxifen)
SOD	Süperoksit Dismutaz (Superoxide dismutase)
GSH	Glutatyon (Glutathione)
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz (Glutathione peroxidase)
GST	Glutatyon S transferaz (Glutathione S-transferase)
AKT/PKB	Protein Kinaz B (V-akt murine thymoma viral oncogene/ protein kinase B)
JNK	c-Jun-N-terminal kinaz (c-Jun N-terminal Kinase)
ERK	Hücre dışı signal düzenleyici kinazlar (Extracellular Signal-Regulated Kinases)
PTP	Protein tirozin fosfotaz (Protein Tyrosine Phosphatase)
SOCS	Sitokin sinyal baskılayıcı (Suppressor Of Cytokine Signalling)
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor)
SH2	Src-homoloji-2 alanı (Src Homoloji-2 Domain)

SHP 2	Fosfotaz 2 içeren Src-homoloji-2 alanı (Src-Homology 2 Domain-Containing Phosphatase 2)
SOS	Son of Sevenless
NF-κB	Nükleer Faktör kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfat (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
PTEN	Fosfataz Ve Tensin Homoloğu (Phosphatase and tensin homolog)
PTB	Poliprimidin yolu bağlayıcı (Polypyrimidine tract-binding)
PDK1	Piruvat dehidrogenaz lipoamid kinaz izozim 1 (Pyruvate Dehydrogenase Lipoamide Kinase Isozyme 1)
p70^{s6k}	Ribozomal Protein 70 Kda S6 Kinaz 1
DMEM	Dulbecco Minimum Essential Medium
HS	Hücre Sayısı
SF	Seyreltme Faktörü
OHS	Ortalama Hücre Sayısı
aa	Aminoasit
nm	Nanomolar
aPKC	Atipik Protein Kinaz C
ROS	Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)
RT-PZR	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ACACA	Asetil-CoA- karboksilaz alfa (Acetyl-CoA carboxylase alpha)
ACACB	Asetil-CoA- karboksilaz beta (Acetyl-CoA carboxylase beta)
ACSL1	Açıl-Coa sentetaz uzun zincir aile üyesi 1 (Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1)
ACSL4	Açıl-CoA sentetaz uzun zincir aile üyesi 4 (Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4)
APOE	Apolipoprotein E
CASP1	Kaspaz 1 (Caspase 1, apoptosis-related cysteine)
CCL2	Kemokin ligand 2 (Chemokine (C-C motif) ligand 2)

CCRs	Kemokin Reseptörleri (Chemokine (C-C motif) receptors)
CD36	CD36 molekülü (CD36 molecule ,thrombospondin receptor)
CD3E	CD3e molekülü (CD3e molecule, epsilon ,CD3-TCR complex)
CEBPA	CCAAT /arttırıcı bağlanma proteinin (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha)
CRLF2	Sitokin reseptör benzeri-2 (Cytokine receptor-like factor 2)
CXCR	Kemokin reseptörü (Chemokine (C-X-C motif) receptor)
EMR1	Egf benzeri hormon reseptörü-1 (Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1)
HK2	Heksokinaz 2 (Hexokinase 2)
IGF1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (Insulin-like growth factor 1)
IGF1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (Insulin-like growth factor 1 receptor)
IKBKB	B hücrelerde, kapa hafif polipeptid yükseltici inhibitörü (Inhibitor of kapa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta)
IL18R1	İnterlökin 18 reseptör 1 (Interleukin 18 receptor 1)
IL1B	İnterlökin 1 beta (Interleukin 1, beta)
IL1R1	İnterlökin 11 reseptör, tip 1 (Interleukin 1 receptor, type I)
IL23R	İnterlökin 23 reseptör (Interleukin 23 receptor)
IL6	İnterlökin 6 (Interleukin 6)
IL8	İnterlökin 8 (Interleukin 8)
JAK2	Janus kinaz 2 (Janus kinase 2)
MAPK	Mitojen-aktive protein kinaz (Mitogen-activated protein kinase)
NLRP3	NLR ailesi, pürin içeren alan 3 (NLR family, pyrin domain containing 3)
PDE3B	Fosfodiesteraz 3B, cGMP-inhibitörü (Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited)
PDK2	Pirüvat dehidrogenaz kinaz izozim 2 (Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2)
PTPN1	Protein tirozin fosfotaz, reseptör olmayan tip 1 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1)
PYCARD	PYD ve CARD alanı içeren (PYD and CARD domain containing)
RBP4	Retinol bağlanma proteini 4 (Retinol binding protein 4)

RELA	V-rel retikuloendotelioz viral onkogen homolog A (V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A)
RETN	Resistin
µM	Mikromolar
ADIPOQ	Adiponektin C1Q kollajen Adiponectin, C1Q and collagen domain containing
ADIPOR1	Adiponektin reseptör 1 (Adiponectin receptor 1)
ADIPOR2	Adiponektin reseptör 2 (Adiponectin receptor 2)
ALOX5	Araşidonat 5-lipooksigenaz (Arachidonate 5-lipoxygenase)
CASP1	Kaspaz 1, apoptoz düzenleyici sistein peptidaz (Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase)
CCL2	Kemokin Ligand 2 (Chemokine (C-C motif) ligand 2)
CCR4	Kemokin Ligand 4 (Chemokine (C-C motif) receptor 4)
CCR5	Kemokin Ligand 5 (Chemokine (C-C motif) receptor 5)
CCR6	Kemokin Ligand 6 (Chemokine (C-C motif) receptor 6)
CHUK	Korunmuş heliks-loop-heliks ubikitin kinaz (Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase)
CNBP	CCHC-tip çinko parmak, nükleik asit bağlayıcı protein (CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein)
CRLF2	Sitokin reseptör benzeri faktör 2 (Cytokine receptor-like factor 2)
CS	Sitrat sentaz (Citrate synthase)
CXCR3	Kemokin reseptör 3 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 3)
CXCR4	Kemokin reseptör 4 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4)
FABP4	Yağ asidi bağlanma proteini 4 (Fatty acid binding protein 4)
FASN	Yağ asit sentaz (Fatty acid synthase)
IFNG	Interferon, gamma
LEP	Leptin
LEPR	Leptin reseptörü (Leptin receptor)
LIPE	Hormon duyarlı lipaz (Lipase, hormone-sensitive)
LPL	Lipoprotein lipaz (Lipoprotein lipase)
LTA4H	Lökotrien A4 hidrolaz (Leukotriene A4 hydrolase)

MAP2K1	Mitojen-aktive protein kinaz-kinaz -1 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1)
MAPK3	Mitojen-aktive protein kinaz 3 (Mitogen-activated protein kinase 3)
MAPK9	Mitojen-aktive protein kinaz 9 (Mitogen-activated protein kinase 9)
MTOR	Memeli rapamisin hedefi (Mammalian target of rapamycin)
NAMPT	Nikotinamid fosforibozil transferaz (Nicotinamide phosphoribosyl transferase)
NFKBIA	B hücrelerde, nükleer faktör kappa hafif polipeptid yükseltici inhibitörü (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)
OLR1	Okside düşük yoğunlukta lipoprotein reseptör 1 (Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1)
PCK1	Fosfoenolpiruvat karboksilaz (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)
PDX1	Pankreatik ve duodenum pankreatik ve duodenal homeobox 1
PIK3CA	Fosfoinozidit-3-kinaz, katalitik alfa polipeptid (Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)
PIK3R1	Fosfoinozidit-3-kinaz , düzenleyici alt ünite 1 (Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1)
PPARA	Peroksizom proliferatör-aktive reseptör alfa (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha)
PPARG	Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PPARGC1A	Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama, koaktivatör 1 alfa (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha)
RPS6KB1	Ribozomal protein S6 kinaz 70 kDa, polipeptid 1 (Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1)
SCD	Akrilamid deasetilaz (Arylacetamide deacetylase)
SERPINE1	Serpin peptidaz inhibitör (Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1)
SLC27A1	Çözünür taşıyıcı ailesi 27, üye 1 (Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1)
SLC2A4	Çözünür taşıyıcı ailesi 2, üye 4 (Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4)
SOCS3	Sitokin sinyal baskılayıcı 3 (Suppressor of cytokine signaling 3)

SREBF1	Sterol düzenleyici element transkripsiyon bağlama faktörü 1 (Sterol regulatory element binding transcription factor 1)
SREBF2	Sterol düzenleyici element transkripsiyon bağlama faktörü 2 (Sterol regulatory element binding transcription factor 2)
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör 3 (Signal transducer and activator of transcription 3)
TLR4	Toll-benzeri reseptör 4 (Toll-like receptor 4)
TNFRSF1A	Tümör nekroz faktör reseptörü süperaile üyesi 1A (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A)
TNFRSF1B	Tümör nekroz faktör reseptörü süperaile üyesi 1B (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B)
UCP1	Eşleşmemiş protein 1 (Uncoupling protein 1)
VLDLR	Çok düşük yoğunlukta lipoprotein reseptörü (Very low density lipoprotein receptor)
ACTB	Beta aktin (Actin, beta)
B2M	Beta-2-mikroglobulin (Beta-2-microglobulin)
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
HPRT1	Hipoksantin fosforibozil transferaz 1 (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1)
RPLP0	Uzun Ribozomal protein, P0 (Ribosomal protein, large, P0)
HGDC	İnsan genomik DNA kontaminasyonu (Human Genomic DNA Contamination)
RTC	Reverz Trankripsiyon kontrol (Reverse Transcription Control)
PPC	Pozitif PCR kontrol (Positive PCR Control)

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. ADA' ya göre Diyabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması	9
Tablo 3.1. RT ² PZR İnsan insülin direnç panelinde yer alan genlerin kısaltmalarına karşılık gelen açık adları ve gen erişim numaraları	38
Tablo 3.2. RT ² PZR panelinde genlerin dağılım şeması . RT ² PZR paneli Qiagen firmasından temin edilmiştir.	40
Tablo 4.1. HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-12.5 µM ile mumaele edilen hücrenin gen ekspresyon ifadelerinde insan insülin direnç RT ² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki değişikliklerin sayısal değerleri.	49
Tablo 4.2. HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-25 µM ile mumaele edilen hücrenin gen ekspresyon ifadelerinde insan insülin direnç RT ² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki değişikliklerin sayısal değerleri.	51
Tablo 4.3. HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-50 µM ile mumaele edilen hücrenin gen ekspresyon ifadelerinde insan insülin direnç RT ² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki değişikliklerin sayısal değerleri.	53
Tablo 4.4. Gen ekspresyonunda 2 kat artan/azalan genlerin dozlara göre değişimi.	54
Tablo 4.5. Timokinon dozlarının en az iki dozundan etkilenen genlerin biyoinformatik analizi.	56
Tablo 4.6. RT ² PZR İnsan insülin direnç paneli kullanarak HepG2 hücrelerine uygulanan TQ' un Global gen ekspresyon profilinin biyoinformatik analiz sonuçları.	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** T1DM ve T2DM hücrelerinin normal hücre ile karşılaştırılması..... 8
- Şekil 2.2.** Çörek otu bitkisinin ve tohumunun şekli ve TQ' un kimyasal yapısı. 16
- Şekil 2.3.** İnsülin sinyal yolağı. 24
- Şekil 4.1.** Hücrelerin TQ ile 24 saat muamele edildikten sonra thoma lamıyla sayılmasından sonraki hücre yoğunluklarının şekilde gösterilmesi. 44
- Şekil 4.2.a.** HepG2 hücresinde farklı dozlarda uygulanan TQ dozunun apoptotik etkisinin gösterimi. **b.** Apoptotik hücrelerin grafiksel gösterimi..... 45
- Şekil 4.3.** İnsülin direnç modelinde TQ' un glukoz alımı üzerine etkisinin incelenmesi. ..
a. Şekilsel Gösterimi. **b.** Grafiksel gösterimi. 46
- Şekil 4.4.** İnsülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ-12.5 μM ' ın etkisi. **a.** HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturulduktan sonra TQ-12.5 μM ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon düzeyindeki analizin dağılım grafiği.. **b.** Etkilenen genlerin grafiksel gösterimi. 48
- Şekil 4.5** İnsülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ-25 μM ' ın etkisi **a.** HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-25 μM ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon düzeyindeki analizin dağılım grafiği. **b.** Etkilenen genlerin grafiksel gösterimi. 50
- Şekil 4.6.** İnsülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ-50 μM ' ın etkisi . **a.** HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-50 μM ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon düzeyindeki analizin dağılım grafiği. **b.** Etkilenen genlerin grafiksel gösterimi.. 52
- Şekil 4.7.** Timokinon dozlarından en az iki dozda etkilenen genlerin grafiksel gösterimi 55
- Şekil 5.1.** İnsülin sinyal yolağındaki genlerden TQ' un etkilediği temel genlerin şematik gösterimi..... 65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisinde meydana gelen bozukluklar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, bunun sonucunda hiperglisemiye neden olan kronik bir metabolizma hastalığıdır (1, 2). İnsülin eksikliği ve/veya insülin direnci neticede kan glukoz seviyesini artırmakta ve hiperglisemiye neden olmaktadır (3). İnsülin düzeyinde meydana gelen bozukluk, yetersiz insülin salgılanması veya insülin sinyal iletim yollarında oluşacak bir veya birden fazla anormalliklerden kaynaklanmaktadır (4).

Timokinon (TQ), *Nigella sativa*'nın biyoaktif bileşenidir. TQ' un, anti-diyabetik, anti-kanserojenik, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-immünojenik ve hepatoprotektif birçok etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (5-21).

İnsülin sinyal yolağı, diyabet ve insülin direnç mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Genel olarak insülin direncinin önemli oranda insülin reseptörlerinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (22, 23). Reseptörde meydana gelen bozukluklar ya da insülin sinyal yolağında gerçekleşen değişiklikler insülin direncinin mekanizmasını oluşturur. İnsülin direnci diyabet ve buna bağlı birtakım metabolik hastalıklara da neden olmaktadır.

Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda insülin direnç modeli meydana getirilerek, TQ' un insülin direnç modelinde, hücre içerisine glukoz alımında meydana getirdiği değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, TQ' un farklı konsantrasyonlarda insülin sinyal yolağı üzerinde etkisinin gen ekspresyon düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır. Bildiğimiz kadarı ile, yapılan literatür araştırmasında, TQ maddesi ile

yapılmış bu şekilde bir çalışmaya rastlanılmadığı için, özgün bir çalışmadır. Yapılan bu çalışma ile, TQ' un insülin direnç modeli üzerindeki olası etkisinin mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABET

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisinde meydana gelen bozukluklar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, bunun sonucunda hiperglisemiye neden olan kronik bir metabolizma hastalığıdır (1, 2). Diyabetin gelişiminde birçok patolojik süreç önemli rol oynamaktadır. Patolojik olan bu süreçler, insülin etkisine karşı gelişen dirençten, insülin eksikliğiyle pankreasın beta hücrelerindeki otoimmün yıkımına kadar geniş bir skala içerisinde. İnsülin eksikliği ve/veya insülin direnci neticede kan glukoz seviyesini artırmakta ve hiperglisemiye neden olmaktadır (3). İnsülin düzeyinin bu şekilde bozukluk göstermesi, diyabetli hastalarda karbonhidrat, yağ ve proteinlerde meydana gelen anormalliklerin temelini oluşturmaktadır (4). İnsülin düzeyinde meydana gelen bozukluk, yetersiz insülin salgılanması veya insülin sinyal iletim yollarında oluşacak bir veya birden fazla anormalliklerden kaynaklanmaktadır (4).

Diyabet, hiperglisemi sonucu gözlerde, böbreklerde, sinirlerde, kalp ve damar sistemi gibi çeşitli yapılarda kronik komplikasyonlara yol açarak bu organların fonksiyonlarını bozan bir hastalıktır. Hiperglisemiye bağlı gelişen en belirgin semptomlar arasında kilo kaybı, poliüri, polidipsi, bazen polifaji, görmede bulanıklık ve büyüme geriliği sayılabilir (24).

Diyabetin akut metabolik komplikasyonlarının yanında uzun süren dönemlerinde körlüğe neden olan retinopati (25), böbrek yetersizliği ile sonuçlanan nefropati (26), ayak yaraları ve amputasyona yol açan nöropati (27) ve ayrıca damar hastalığı,

kardiyovasküler, gastrointestinal sistem bozukluklarına yol açabilen otonom nöropati görülebilmektedir. Ayrıca diyabet, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi kronik komplikasyonlarla seyreden morbidite ve erken mortalite riski yüksek bir hastalıktır (28).

2.1.1. Diyabetes Mellitus Epidemiyolojisi

Diyabetes Mellitus (DM), dünyada prevalansı hızla yükselen hastalıklar arasındadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation, IDF) 2013 verilerine göre dünya genelinde 382 milyon diyabet hastasının bulunduğu, bunların 175 milyonunun hasta olduklarını dahi bilmediklerini ve %80'nin gelir düzeyi düşük olan ülkelerde olduğu tahmin edilmektedir (29). Günümüzde diyabetin hızla artmasını göz önünde bulundurursak bu rakamın 2035 yılında 592 milyona ulaşması tahmin edilmektedir (29). Türkiye' de ise 1998 yılında diyabetli olan hasta sayısı 2.5 milyon iken bu sayı 2013 yılında yaklaşık 7 milyona yükselmiştir (30). Türkiye' de 1998 ve 2010 yıllarında gerçekleştirilen iki adet toplum temelli Türkiye diyabet prevalans (TURDEP-1, TURDEP-2) çalışmalarında diyabet sıklığının % 90 oranında önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (30). Ayrıca Türkiye' de bulunan diyabet hastalarının, Avrupa' da bulunan diyabet hastalarının yaklaşık olarak % 13' ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir (30). Yaklaşık 3 milyon kadar kişide de tip 2 diyabetin (T2DM) belirtisi olan bozulmuş glukoz toleransı gözlemlenmiştir (31). Diyabetin giderek artmasına bağlı olarak IDF 2035 yılında bu rakamın 12 milyona ulaşacağını tahmin etmektedir (29). Avrupa' da diyabet prevalansı benzer şekilde artmakta ve 2013 yılı itibariyle 56 milyon olan hasta sayısının, Avrupa' daki genç nüfusun azalması ve yaşlı nüfusun artmasına bağlı olarak 2035 yılında yaklaşık olarak 69 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (29). Yaşa bağlı olarak dünyada özellikle T2DM artışı gözlenmektedir. Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgelerinde 2013 yılı itibariyle 35 milyon olan diyabetli hasta sayısının 2035 yılında 68 milyona ulaşması öngörülmektedir (32).

2.1.2. DİYABETES MELLİTUSUN SINIFLANDIRILMASI

Diyabetes mellitus sınıflandırılmasında hiperglisemiye neden olan patolojik sebeplerden faydalanılarak bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. Bu bağlamda, Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association; ADA), DM' un sınıflandırmasını Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM), Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM), diğer spesifik türler

ve Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM) olmak üzere 4 ana başlık altında toplamışlardır (1) (Tablo 2.1).

2.1.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)

T1DM, genellikle insülin üreten pankreatik beta hücrelerinin doğrudan ve/veya dolaylı yollarla immün aracılı bağışıklığın tahribatıyla meydana gelen ve bu tahribat neticesinde mutlak insülin yetersizliğiyle karakterize bir hastalıktır (33, 34). Tarihsel olarak bakıldığında T1DM, daha çok çocuksal bir rahatsızlık olarak görülse de, bu görüşün son on yıl içerisinde yapılan araştırmalar ışığında değiştiği görülmektedir. Yapılan bu çalışmalarda polidipsi, polifaji ve poliüri gibi hastalığın başlangıcı ile ilişkili septomların birtakım yetişkin bireylerde de gözlemlendiği görülmüştür. T1DM hastaları pankreatik beta hücrelerindeki harabiyet neticesinde insülin üretemedikleri için hayatları devam ettiği müddetçe dışarıdan insülin takviyesi almaları gerekmektedir. Günümüzde hala T1DM hastalığının kesin kullanılan bir tedavi olmamakla beraber bu noktada yapılan çalışmalar devam etmektedir.

2.1.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM)

T2DM, fizyolojik veya genetiksel yatkınlık sonucunda glukoz üretiminde meydana gelen artış ve bu artış ile meydana gelen insülin direnci, insülin sekresyonunda meydana gelen metabolik defektler ile karakterize, kompleks bir hastalıktır (35). T2DM, yağ dokusu, karaciğer, pankreas adacıklarıyla kan dolaşımındaki lökositlerin damar sistemi içinde meydana gelen değişikliklere, bununla birlikte bağışıklık sistemi bileşenlerinde de belirgin olarak değişikliklere sebep olmaktadır. T2DM, hiperglisemiye bağlı olarak pankreastan salınan insülinin periferal dokulara bağlanamaması sonucu gerçekleşen insülin direnci ile başlamaktadır (35). T2DM' da insülin direncinin moleküler mekanizması henüz kesin olarak belirlenememiştir. Hücrelerde bulunan insülin reseptör seviyeleri ve tirozin kinaz aktiviteleri azalmıştır. Bu azalmanın hiperinsülinemi sonucunda oluşan sekonder bir bozukluk olduğu düşünülmektedir (36) (Şekil 2.1). Bundan dolayı insülin ile gerçekleşen fosforilasyon /defosforilasyondaki öncelikle meydana gelen kusurların insülin direncinde rol aldığı düşünülmektedir. Fosfoinozitol-3-kinaz (phosphatidylinositide 3-kinases; PI3K) sinyal yolağında meydana gelen herhangi bir hata, glukoz transport tip 4 (Glucose transporter type 4; GLUT-4)' ün membran translokasyonunda düşüşüne neden olması bu durumun örneği olarak

gösterilmiştir (36). Vücut dolaşımında meydana gelen serbest yağ asit miktarındaki artışlar, karaciğer ve kasta yağ birikime neden olarak insülin direnç mekanizmasının gelişmesini sağlamaktadır. Hücre içerisindeki serbest yağ asitlerinin ise, serin fosforilasyonu ile, insülin sinyal mekanizmasını etkileyerek insülin direncine katkı sağladığı belirtilmiştir (37).

Obezitenin T2DM gelişiminde patojenik bir sürecin parçası olduğu düşünülmektedir (35). Obezite sonucunda artan adiposit kitlesi, yağ hücresi ürünlerinin ve serbest yağ asitlerinin artışına neden olmaktadır (38). Artan adipositler birçok biyolojik ürün (leptin, resistin vb.) salgırlar (39). Vücutta birçok metabolik faaliyette rol oynayan bu adipokinler, insülin duyarlılığında da rol alırlar. Serbest yağ asitlerinin miktarındaki artış ile beraber iskelet kasında ve karaciğerde insülin direncinin oluşumuna neden olabileceği belirtilmiştir. Gelişen insülin direnci beta hücre fonksiyonunda bozukluklara neden olabilmektedir (40).

Kronik hiperglisemi, zamanla pankreastaki beta hücrelerinin glukoza olan yanıtını bozarak insülin direncinin artışına neden olabilir. Glisemik noktada gerçekleşecek olan iyileşmenin, adacık fonksiyonunda meydana gelen iyileşme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte serbest yağ asitlerinin artışı, benzer şekilde glukoz metabolizmasını bozarak, adacık fonksiyonlarının da kısmi engellenmesine neden olmaktadır. Artan yağ asitlerinin, karaciğerde hepatik glukoneogenezi arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda yağ asitleri, pankreas beta hücrelerinin fonksiyonunu bozarak, kas glukoz metabolizmasını inhibe etmektedir (41).

Karaciğerde yüksek seviyedeki insülinin, glukoneogenezi baskılamada yeterli olmaması nedeniyle insülin direncinin meydana geldiği düşünülmektedir. Hepatik glukoz üretiminde meydana gelen artma, T2DM erken dönemlerinde iskelet kasında insülin direnci başlamasından sonra meydana geldiği belirtilmiştir. Kas dokusunda meydana gelen insülin direnciyle beraber artan yağ asidi, hepatositlerde lipid sentezinin artışına neden olmaktadır (42).

Karaciğer, yağ dokusu ve iskelet kası gibi yapılarda gerçekleşen insülin direnci nedeniyle glukoz dokulara nüfuz edemez. Böylece belirtilen dokularda glukoz miktarında azalma, hepatik glukoz miktarında artma gerçekleşmektedir. T2DM hastaları insülin salgılayan pankreas beta hücrelerinde mutlak harabiyet olmadığından dışarıdan

insüline ihtiyaç duymazlar. Bu nedenle insüline bağımlı olmadıklarından bu hastalığa "insüline bağımlı olmayan diyabet" adı da verilmektedir (42).

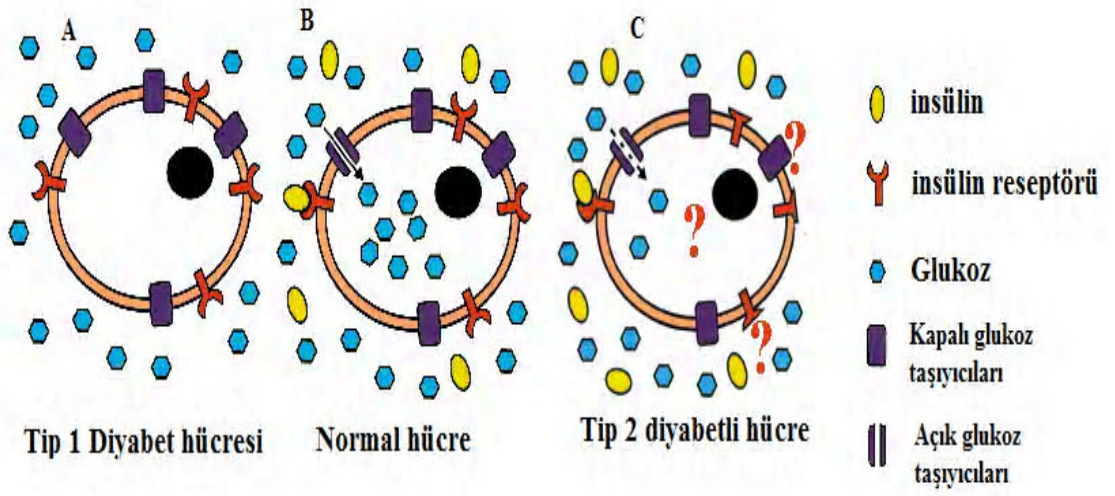
T2DM'un, insülinin etkisine bağılı olarak farklı genetik ve/veya metabolik defektler ile ilişkili olarak hiperglisemi gelişimine neden olduğu belirtilmiştir. T2DM' da bu şekilde meydana gelen patolojik süreçlerin gözlemlenip belirlenmesi, spesifik metabolik bozuklukları hedefleyerek onlarda etki oluşturmayı amaçlayan farmokolojik ajanların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (43, 44).

2.1.2.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)

GDM, gebelik sırasında başlayan plasental hormonların insülin direncini tetiklemesiyle meydana gelen glukoz intoleransıdır (45). Görülme oranı % 1-3 arasındadır. ADA gebe kadınların % 4' ünde yani yılda yaklaşık 150000 kadında GDM tespit edildiğini bildirmiştir. Gestasyonel diyabeti olan hastaların bir diğer sık karşılaşılan durumu hipertansiyon olup, kan şekerinin düzenlenmesinin hipertansiyonlu hastalarda, hipertansiyon sıklığını azaltmadığı düşünülmektedir (46). GDM fizyolojik olup, ilerleyen zamanlarda T2DM görülme olasılığı fazladır (46).

2.1.2.4. Diğer Spesifik Türler

Diğer spesifik türde gelişen DM, Tablo 2.1.'de özetlendiği gibi, DM' un etiyolojik sınıflandırılmasında T1DM, T2DM ve GDM dışında, beta hücre fonksiyonunda meydana gelen defektler, insülin etkisinde meydana gelen defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaç ve kimyasal kaynaklı, immün bağlantılı, çeşitli enfeksiyonlar gibi etkenlere bağılı olarak, farklı nedenler yer almaktadır (1).



Şekil 2.1. T1DM ve T2DM hücrelerinin normal hücre ile karşılaştırılması. T1DM insülin eksikliği neticesinde gelişen bir hastalıktır (a). Normal hücre reseptörlerinde ve taşıyıcılarda herhangi bir sorun yok (b). T2DM hücrede insülin reseptörlerinde meydana gelen bozukluklar neticesinde glukoz taşıyıcılarında meydana gelen kısmi işlevsizlik sonucunda gelişen hastalık (c) (47).

Tablo 2.1. ADA' ya göre Diyabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması (1).

<p>I. Tip 1 diyabet (Beta hücre yıkımı, genellikle mutlak insülin eksikliğine neden olur.)</p> <p>A. İmmün ilişkili</p> <p>B. İdiyopatik</p> <p>II. Tip 2 diyabet</p> <p>III. Diğer spesifik türler</p> <p>A. β Hücre fonksiyonlarının genetik defektleri</p> <p>1. MODY 3 (kromozom 12, HNF-1α)</p> <p>2. MODY 2 (kromozom 7, glukokinaz)</p> <p>3. MODY 1 (Kromozom 20, HNF-4α)</p> <p>4. MODY' nin nadir diğer formları; MODY 4: Kromozom 13, insülin promotör faktör-1; MODY 6: Kromozom 2, NeuroD1; MODY 7: Kromozom 9, Karboksil ester lipaz</p> <p>5. Kalıcı neonatal diyabet</p> <p>6. Geçici neonatal diyabet</p> <p>7. Mitokondriyal DNA</p> <p>8. Diğerleri</p> <p>B. İnsülin etkisindeki genetik defektler</p> <p>1. Tip A insülin direnci</p> <p>2. Leprechaunizm</p> <p>3. Rabson-Mendenhall sendromu</p> <p>4. Lipoatrofik diyabet</p> <p>5. Diğerleri</p> <p>C. Ekzokrin pankreas hastalıkları</p> <p>1. Pankreatit</p> <p>2. Travma/pankreatektomi</p> <p>3. Neoplazi</p> <p>4. Kistik fibrozis</p> <p>5. Hemikromatozis</p> <p>6. Fibrokalkülos pankreatopati</p> <p>7. Diğerleri</p> <p>D. Endokrinopatiler</p> <p>1. Akromegali</p> <p>2. Cushing sendromu</p> <p>3. Glukagonoma</p> <p>4. Feokromositoma</p> <p>5. Hipertroidi</p> <p>6. Somatostatinoma</p> <p>7. Aldesteronoma</p> <p>8. Diğerleri</p>	<p>E. İlaç ve kimyasal kaynaklı</p> <p>1. Vacor</p> <p>2. Pentamidin</p> <p>3. Nikotik asit</p> <p>4. Glukokortikoidler</p> <p>5. Tiroid hormonu</p> <p>6. Diazoksit</p> <p>7. B-adrenerjik agonistleri</p> <p>8. Tiazidler</p> <p>9. Dilantin</p> <p>10. \square-interferon</p> <p>11. Diğerleri</p> <p>F. Enfeksiyonlar</p> <p>1. Konjenital rubella</p> <p>2. Sitomegalovirüs</p> <p>3. Diğerleri</p> <p>G. İmmün bağlantılı diyabetin yaygın olmayan formları</p> <p>1. Stiff-man sendromu</p> <p>2. Anti-insülin reseptör antikoru</p> <p>3. Diğerleri</p> <p>H. Diyabetle bazen ilişkili genetik sendromlar</p> <p>1. Down sendromu</p> <p>2. Klinefelter sendromu</p> <p>3. Turner sendromu</p> <p>4. Wolfram sendromu</p> <p>5. Friedreich ataksi</p> <p>6. Huntigton koresi</p> <p>7. Laurence Moon-Biedl sendromu</p> <p>İ. Myotonik distofi</p> <p>1. Porfiria</p> <p>2. Prader-will sendromu</p> <p>3. Diğerleri</p> <p>IV. Gestasyonel diyabetes mellitus</p>
---	--

HNF-1 α : Hepatosit nükleer faktör-1 α , MODY : Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10 (maturity onset diabetes of the young 1-10), HNF-4 α : Hepatosit nükleer faktör-4 α , IPF-1: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1 β : Hepatosit nükleer faktör-1 β , NeuroD1: Neurojenik diferansiyasyon 1, BLK: Beta lenfosit spesifik kinaz, DNA: deoksiribonükleik asit, HIV: İnsan immün eksiklik virüsü, DIDMOAD sendromu: Diyabetes insipidus, diyabetes mellitus, sağırılık ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu), KLF11: Kruppel like factor 11, CEL: Carboxyl ester lipase, PAX4: Paired box 4, ABCC8: ATP-binding cassette C8, KCNJ11: Potassium inwardly-rectifying channel J11, INS: İnsülin (1).

2.1.3. Diyabet Modelleri

2.1.3.1. *In Vitro* Modeller

İnsülin direnç mekanizmalarının oluşmasında öne çıkan iki önemli mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan biri yüksek dozda glukoz verilerek glukoz transportlarında hasar oluşturmak suretiyle insülin direnci meydana getirmektir. Diğer bir mekanizma ise yüksek dozda insülin miktarı verilerek insülin transportlarını hasara uğratarak insülin direnç mekanizması geliştirmektir. Genelde *in vitro* modellerde bu iki mekanizmanın kullanıldığı görülmüştür (7, 48).

Hu ve arkadaşları, hepatosellüler kanser hücre hattı olan HepG2 hücre hattında insülin direnç modeli oluşturabilmek için hücreleri 6' lı kuyucuklara ilave ettikten sonra 24 saat inkübe etmişlerdir. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında 24 saat serumsuz inkübasyonda bırakılmıştır. Bu ön işlemde sonra normal (5.5 mM) ve yüksek (30 mM) konsantrasyonlarda d-glukoz, serumsuz besiyeri içerisine ilave edilmiştir. Ardından 100 mg/L insülin ilavesi yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir (48-50). Oluşturulan insülin direnci üzerinde *Stauntonia chinensis* isimli terapötik ajanın AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase), IR (İnsülin reseptörü), IRS1 (insülin reseptör substratı-1), PI3K (phosphatidylinositide 3-kinases), AKT (V-akt murine thymoma viral oncogene) sinyal yollarıyla olan etkileri irdelenmiştir (7).

Sun ve arkadaşları, HepG2 hücreleri üzerinde insülin direncini indüklemek için hücre besiyeri içerisinde 5 mM glukoz ile 18 mM glukozamin verip 18 saat inkübe ettiklerini belirtmişlerdir (51). Aynı şekilde C2C12 miyotüp hücrelerinde de birtakım transfekte işlemlerinden geçirildikten sonra, %2 BSA (bovine serum albumin) ve %10 FBS (Fetal bovine serum) içerikli besiyeriyle 0.75 mM palmitat varlığı ve yokluğunda 18 saat süre inkübe edilerek insülin direncini indüklemesine bakılmıştır (51).

In vitro koşullarda oluşturulan insülin direnç mekanizmaları genel olarak benzer yollar kullanılarak, bazı çalışmalarda ufak değişiklikler uygulanarak oluşturulmuştur. Ma ve ark., HepG2 hücre hattı üzerinde insülin direnç modeli oluşturmak için öncelikle hücreleri 96'lı kuyucuklara ekip 24 saat inkübe etmişlerdir (52, 53). Daha sonra her bir kuyucuğa 10^{-6} molL⁻¹ insülin (yüksek doz) ilavesi yapılarak 36 saat inkübasyonda bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra serum olmayan besiyeri ile *Grifola frondosa* isimli

ajan ile belirli konsantrasyonlarda ilave ederek, bu maddenin insülin direnci üzerine olan etkisi incelenmiştir (52).

Xie ve arkadaşları HepG2 hücrelerini taze hazırlanan besiyeri içerisinde %1 FBS, 10^{-7} M (yüksek doz) insülin ilave ederek insülin direnç modeli oluşturmuştur. Daha sonra kullandıkları madden olan *Ananas comosus*'un farklı konsantrasyonlarını da ilave ederek 24 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyondan sonra besiyerini değiştirerek %1 FBS, 10^{-9} M (düşük doz) insülin ve 5-15 mM glukoz içerikli besiyeri ilave ederek 12-24 saat inkübasyon sonrası incelemelerini gerçekleştirmişlerdir (54, 55).

2.1.3.2. *In Vivo* Modeller

Birçok hastalıktan korunma ve tedavi yollarının bulunması, bu hastalıkların patogenezinin araştırılması amacıyla deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Genellikle insandaki hastalıkları taklit eden ve çalışılabilirliği etik olarak engel teşkil etmeyen hayvanlar üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir. İnsanlarda yaygın bir hastalık olan DM oluşmasında rol alan moleküler mekanizmaların araştırılmasında, engellenmesi ve yan etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı metodlar kullanılarak deneysel diyabet modelleri oluşturulmuştur (56).

2.1.3.2.1. Cerrahi Yöntem Kullanılarak Oluşturulan Diyabet Modelleri

Pankreatektomi yöntemi, pankreasın tamamı ya da pankreasın kısmi olarak çıkartılma işlemidir. Pankreasın tamamının çıkarılmasıyla T1DM modeli, kısmi pankreatektomi işlemi uygulaması yapılarak pankreastaki beta hücrelerinin yaklaşık %60' ının çıkarılma işlemiyle de T2DM modeli oluşturulmaktadır (57). Bu tür cerrahi işlemler büyük canlılarda denenmiştir (58). Ancak günümüzde cerrahi yöntemle DM oluşturulmasının uygulamaları oldukça azalmıştır.

2.1.3.2.2. Kimyasal Ajanlar ile Oluşturulan Diyabet

Alloksan ve Streptozotosin (STZ) diyabet model oluşturmada en çok kullanılan kimsayasal ajanlardır.

2.1.3.2.2.1. Alloksan (2,4,5,6 Tetraokzohekzahidropirimidin)

Alloksan suda kolayca çözünebilen monohidrat yapısında olan, ürik asidin nitrik asit tarafından oksidasyonu ile elde edilen kimyasal bir ajandır (59). Alloksan, hidrofilik

özelliği ve kimyasal yapısı sayesinde glukozu taklit ederek pankreas beta hücrelerine rahatlıkla nüfuz edebilmektedir (60). Bu şekilde iki mekanizma aracılığıyla diyabete neden olduğu düşünülmektedir. İlk olarak alloksan, glukokinaz enzimini inhibe ederek pankreastaki beta hücrelerinin salgıladığı insülin salınımını inhibe etmektedir (61). İkinci mekanizma ise beta hücresinde toksik etki oluşturan reaktif oksijen türlerini (Reactive oxygen species; ROS) oluşturarak nekroza neden olup insülin salınımını inhibe etmektedir (62). Bu şekilde pankreas beta hücrelerini hasara uğratarak doza bağlı olarak diyabete neden olduğu belirtilmektedir (63, 64).

Farelerde alloksan kullanılarak yapılan diyabet çalışmalarında, fareler öncelikle 18 saat aç bırakıldıktan sonra günde 150 mg/kg dozda, su yada serum fizyolojik sıvı içerisinde çözündürülüp periton içi yolla 48 saat arayla 3 kez olarak enjekte edilir. Son enjeksiyondan itibaren 7-9 gün sonrası fareler 18 saat aç bırakıldıktan sonra kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden kan alınarak ölçülür. Açlık kan şeker düzeyi 200 mg/dL üzerinde olanlar diyabetli fare olarak kabul edilir (65).

Alloksan periton içi uygulamasının dışında intravenöz ve deri altı olarak da enjekte edilebilmektedir. İntravenöz uygulamanın diğer yöntemlerden 2-3 kat daha verimli olduğu tespit edilmiştir. İntravenöz uygulamasında ortalama doz 65 mg/kg verilirken, periton içi ve deri altı uygulamalarda ortalama 150 mg/kg şeklinde doz ayarlaması gerçekleştirilir (66, 67).

2.1.3.2.2.2. Steptozotosin (STZ)

STZ, *Streptomyces achromogenes* suşundan elde edilen, 2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoüreido) D-Glukopiranoz'dur. Yapısında glukoz molekülü bulunduğu için plazma membranında bulunan glukoz taşıyıcısı 2' ye (Glucose transporter 2; GLUT2) bağlanıp insülin salınımını inhibe ederek pankreas beta hücresinde toksisite meydana getirir (68). Böylelikle doza bağlı STZ uygulamasıyla hem insüline bağımlı, hem de insülin bağımsız modeller oluşturulabilmektedir (63). GLUT2 aracılığıyla beta hücrelerine giren STZ, nitrik oksit düzeyini etkileyerek, mitokondriyal ATP üretimini azaltır. Bunun neticesinde DNA hasarı oluşturarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunda artışa neden olmaktadır (69).

STZ çalışmanın durumuna göre doz oranları düşük olarak 40 mg/kg, toksik olarak yaklaşık 60-70 mg/kg, yüksek doz olarak 150-200 mg/kg uygulanmaktadır (70). Birkaç

örnek vermek gerekirse, Çakmak ve ark. farelere 250 mg/kg serum fizyolojik içerisinde damar içerisine STZ enjekte etmişlerdir. STZ enjeksiyonunda 10 gün sonra kan glukoz seviyeleri ölçülmüş ve 300 mg/dL üzerinde olan değerler diyabetik model olarak kabul edilmiştir (71). Sitrat tamponu içerisinde çözülen STZ farelerde tek doz halinde 200 mg/kg periton içi uygulanmaktadır (72). Ayrıca tek doz 150 mg/kg periton içi yoluyla verildiğinde de diyabet oluştuğu gözlenmiştir (73).

2.1.3.2.3. Spontan Şekilde Oluşan Diyabet Modelleri

Spontan olarak gelişen T1DM modelinde en yaygın olarak kullanılan laboratuvar hayvanları; şişman olmayan diyabetli fare (Non-Obese Diabetic fare; NOD), Bio Breeding sıçan (BB), Komodo Prone Diabetic sıçan (KPD), Long-Evans Tokushima Lean sıçan (LETL), İnsülin-dependent Diabetes Mellitus (LEW-IDDM) belirtilmektedir. Ayrıca NOD fare ve BB sıçanlar İnsan modeline daha uygun oldukları için daha fazla kullanılmaktadır (74).

Spontan T2DM modelleri olarak en yaygın kullanılan laboratuvar hayvanları arasında obez fareler, diyabetik fareler ile Zucker cinsi obez sıçanlar yer almaktadır (75). Bu diyabet modellerinde obesitenin gelişmesi, leptin geninde veya leptin reseptöründe meydana gelen mutasyonların neticesi olarak diyabet ortaya çıkmaktadır. Genotipi obez olarak belirtilen fare türü C57BL/6J' de diyabet gözlenmiştir. Bu model ayrıca hiperfaji ve düşük enerji tüketimi ile karakterize edilmiştir. Ayrıca obez farelerde aşırı yemek yemeye bağlı olarak 3-4 haftalıkken hiperfaji, obezite ve insülin direnci gözlemlenmektedir (75). Diğer bir tür olan diyabetik fare türünde ise 2 haftalık iken hiperinsülinemik ve insüline karşı dirençli, 4 haftalık iken obez olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu türler 4-8 hafta sonrasında gelişen hiperglisemi neticesinde beta hücrelerindeki harabiyetten dolayı 8-10 aydan fazla yaşamlarını sürdürememektedirler (76). Zucker obez sıçanların gelişimi ise diyabetik farelerinin patofizyolojik karakterleriyle benzer yapıdadır. Ancak bu türde obesitenin yanında insanlarda da zaman zaman gerçekleşebilen hipertansiyon ve hiperlipidemi de gerçekleşebilmektedir (75, 77). Zucker diyabetik şişman sıçan türünde hiperglisemi beta hücrelerinde gelişen apoptoz neticesinde, doğumdan sonra yaklaşık 8 hafta süre içerisinde, sadece erkeklerde diyabet gelişmektedir (78).

2.1.3.2.4. Diyet ile Oluşturulan Diyabet Modelleri

Diyet ile oluşturulan modeller genel olarak, yüksek yağlı diyet, fruktoz, sükroz, yüksek karbonhidrat ile oluşturulabilmektedir (79). Bunlardan yüksek yağlı diyet kullanılarak oluşturulan modeller yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan bazı klinik ve epidemiyolojik çalışmalar neticesinde yağlı diyet miktarı ile vücut ağırlığında meydana gelen artış arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yine aynı şekilde bu orantı yapılan hayvan deneylerinde de ortaya çıkarılmıştır. Besin içeriği genel olarak %30 ve üzeri yağ oranı diyabet gelişimini tetiklemektedir. Bu modeli oluşturmak için farklı kombinasyonlarda, farklı besin miktarlarını ve yağ oranları içeren özel yemler kullanılmaktadır. Yüksek yağlı besin kullanmak insülin direnci, dislipidemi ve obezite oluşturmak için kullanılan yöntemlerden biridir (80). Genel olarak bu modeli oluşturma süresi çalışmanın düzenlemesine göre değişiklik göstermektedir. Diğer modellere göre daha uzun zaman gerektiren bir modeldir. Bu modelde zamanla obezite, hiperinsülinemi, insülin direnci ve glukozu karşı tolerans bozuklukları gözlemlenebilir (79).

2.1.3.2.5. Transgenik modeller

Genetik modifikasyona uğratarak oluşturulan hayvan modelleridir. Günümüzde genetik modellerin çeşitliliği ve kullanılabilirliği gün geçtikçe artmaktadır. Transgenik hayvanlar, fertilize yumurta içerisine yabancı DNA enjeksiyonu ile oluşturulan modellerdir. Aslında genetik modeller gerek tip 1 gerek tip 2 diyabette olsun, diyabet modellerini tam olarak kategorize etmeyebilirler. Ancak bazı genlerin, diyabet mekanizması altında yatan spesifik etkilerinin araştırılmaları için önemli rol oynamaktadırlar (81). Örneğin, pankreas gelişiminde rol oynayan faktörlerin (Pancreatic and duodenal homeobox 1; PDX1 gibi) incelenmesinde kullanılabilirler. Aynı şekilde beta hücre büyümesi ve sağkalım sürelerinin incelenmesi için (örneğin, Insulin receptor substrate 2; IRS-2, Protein Kinase B; PKB, siklin D2) transgenik modeller yaygın olarak kullanılmaktadır (74, 82). Böylece T2DM ile ilgili beta hücre kütlesi veya pankreas gelişimi gibi parametrelerin mekanizmasının araştırılması transgenik modeller sayesinde mümkün olmaktadır.

2.2. Timokinon (TQ)

2.2.1. *Nigella Sativa*

Nigella sativa yaygın olarak çörek otu olarak bilinen, Pakistan, Hindistan ve Akdeniz ülkelerinde yoğun olarak yetişen, *Ranunculaceae* (Düğün çiçeğigiller) familyasından, 20-30 cm yükseklikte, tek yıllık çiçekli bir bitkidir (Şekil 2.2.a.,b). Uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakla beraber günümüzde gıda üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır (83-86). Ülkemizde başlıca Konya, Kütahya, Isparta, Antalya olmak üzere 12-14 arasında *Nigella* türü yetişmekte olup, özellikle *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, ile *Nigella arvensis* türleri yaygın olarak kullanılmaktadır (87).

2.2.2. TQ' un Tanımı;

Çörek otunun biyoaktif kompotenti olan TQ ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) (Şekil 2.2.c), uçucu yağında %18-24 oranında bulunan ve 164,2 g/mol moleküler ağırlığına sahip sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpendir (5, 88).

2.2.3. TQ' un Etki Alanları

2.2.3.1. TQ' un Anti-diyabetik Etkisi

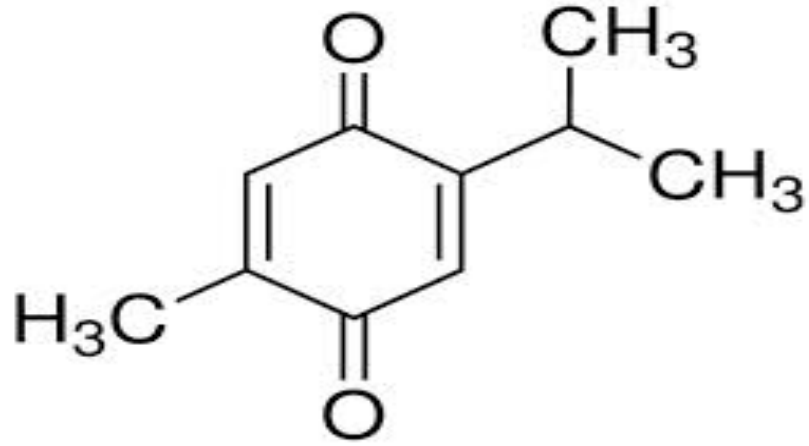
Deneyisel çalışmalarda STZ ile indüklenerek oluşturulan diyabetik hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda, TQ' un hipoglisemik ve anti-diyabetik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (6, 89-91). TQ' un insülin sekresyonu üzerindeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. TQ' un, insülin sekresyonunu yükselttiği ve buna bağlı olarak glukoz alımını artırdığı ve glukoneogenez oluşumunu inhibe ederek kan glukoz seviyesinin düşmesini sağladığı belirtilmiştir (5, 89). Ratlarda STZ ile indüklenmiş diyabet modelinde, *Nigella sativa* uçucu yağıyla muamele edilen hayvanların, serum glukoz seviyeleri düşerek normale yaklaşmış, serumdaki insülin miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca pankreas beta hücrelerinde kısmen rejenerasyon olduğu tespit edilmiştir (90).

A.



B.

C.



Şekil 2.2. Çörek otu bitkisinin ve tohumunun şekli ve TQ' un kimyasal yapısı.
Çörek otu (*Nigella sativa*) bitkisi (A). Çörek otu tohumu (B).TQ' un moleküler yapısı (C) (114).

Yapılan diğerk bir çalışmada, kan glukoz seviyelerinin araştırılmasında klinik öneme sahip belirteç olan HbA1C (hemogloblin A1c) zerine TQ' un etkisi analiz edilmiştir. TQ' un HbA1C seviyesini anlamlı şekilde düşürdüğü bildirilmiştir (5). Aynı çalışmada, karaciğer enzim aktivitesini de iyileştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca su ve katı yiyecek alımını dengeleyerek vücut ağırlığının normale yaklaşmasını sağladığı belirtilmiştir (5). STZ ile indüklenmiş diyabet rat modelinde artan lipid peroksidasyon ve nitrik oksit seviyeleri, *Nigella sativa* uçucu yağı muamelesiyle tersine dönmüş ve anti-oksidan enzim aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir (91). Aynı şekilde STZ ile indüklenen diyabetik ratlarda TQ ile çalışmalar tekrarlanmış ve serum glukoz seviyelerinin düştüğü belirtilmiştir. Buna bağlı olarak serumdaki insülin miktarında artış görülmüştür. Ayrıca diyabet rat modelinde, TQ ile muamele edildiğinde, pankreasta insülin üreten beta hücrelerinde de önemli derecede artış tespit edilmiştir (8). Yine STZ ile oluşturulan diyabetik ratlarda, TQ' un pankreastaki beta hücre üzerine etkisi daha detaylı araştırılmış, STZ sonucu oluşan birçok toksik etkinin TQ uygulamasıyla pozitif yönde düzeldiği gösterilmiştir (92). Diğer bir çalışmada, STZ ile oluşturulan diyabetik farelerde gebelik döneminde TQ uygulaması yapılmış, embriyoların gelişimde ve boyutlarında artış gözlenmiştir. Ayrıca toksik etkilere neden olabilecek serbest radikallerin miktarında azalmayı sağlayarak sakat doğma oranlarını düşürdüğü görülmüştür (93).

2.2.3.2. TQ' un Anti-tümör ve Anti-kanser Etkisi

In vivo ve *in vitro* alışmalar *Nigella sativa* tohumlarının hem yağı hem aktif maddesi olan TQ' un anti-tümör etkisi olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada TQ' un doza bağlı olarak hepatoselüler karsinoma hücrelerindeki proliferasyonu önemli ölçüde yavaşlattığı bildirilmiştir (94). Yapılan başka bir çalışmada, pankreatik kanser hücrelerinde TQ' un etkisi gemzar denilen kemoterapötik madde ile birlikte *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılmıştır. Farelerde oluşturulan kanser modelinde ve *in vitro* kanser hücre hatlarında uygulanan gemzar ve TQ' un tümör büyümesini engellediği belirtilmiştir (9). Pankreatik kanser hücrelerinde ise apoptozunu arttırdığı görülmüştür (9). Aynı zamanda anti-apoptotik Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) 'ın negatif regülasyonunu, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax (Bcl-2-associated X protein) gibi pro-apoptotik moleküllerin pozitif regülasyonunu sağladığı gözlenilmiştir (9). Başka bir çalışmada,

kolanjiyokarsinom hücrelerinde yine mezar kemoterapik ajan ile TQ' un etkisi araştırılmış, *in vitro* olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. *İn vivo* olarak da tümör hücre büyümesi ve anjiogenezini engellediği belirtilmiştir. Ayrıca PI3K/AKT, NF-κB ve gen ürünlerinin düzenleyicileri AKT, p65, XIAP, Bcl-2, COX-2 (Cyclooxygenase-2), VEGF (Vascular endothelial growth factor) gibi genleri negatif regüle ettiği tespit edilmiştir (95). Başka bir çalışmada, insan servikal kanser hücresi üzerinde *Nigella sativa* yağı ve TQ' un etkileri incelenmiştir. HeLa hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada TQ' un kanser hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiği, pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarını indüklerken (BIK, FASL, BCL2L10 ve CASP1), kanser ve NFκB (Nükleer Faktör kapa B) sinyali ve kanserden sorumlu anti-apoptotik genlerdeki ekspresyon seviyesini de düşürdüğü belirtilmiştir (96). Diğer bir çalışmada, fareler üzerinde oluşturulan kanser modelinde karaciğer toksisitesine neden olan CB 1954 (5-(Aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide) maddesi ile TQ' un kombine çalışmasıdır. Yapılan araştırma sonucunda TQ' un karaciğer toksisitesine neden olan CB 1954 maddesinin etkisini azalttığı, buna bağlı olarak karaciğer enzimleri aspartat transaminaz (AST) ve alanin transferaz (ALT) miktarlarını normal seviyeye getirdiği belirtilmiştir. Ayrıca tümör boyunda ve buna bağlı kitle ağırlıklarında da TQ uygulanan grup ile kontrol grubu arasında önemli oranlarda farklılıklar gözlemlenmiştir (97). Yapılan başka bir çalışmada, insan miyoblastik kanser hücre hattı olan HL-60 hücreleri üzerinde TQ' un etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda TQ' un HL-60 hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği, mitokondrinin membran yapısını bozduğu, kaspaz 3,8,9 aktivasyonlarını düzenleyerek apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca, TQ ile muamelede bulunan HL-60 hücrelerinde proapoptotik Bax proteinini pozitif regüle ederek, anti-apoptotik protein olan Bcl2' yi ise negatif regüle ederek Bax/Bcl2 oranının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir (98).

2.2.3.3. TQ' un Analjezik ve Anti-inflamatuar Etkisi

İnflamasyon başlıca iki enzim olan siklooksijenaz (Cyclooxygenase; COX) ve lipooksijenaz (Lipoxygenases; LO) tarafından düzenlenir (99). Bu enzimlerden COX prostaglandin (PG)' leri katalize ederken, LO' da lökotrienleri (LT) katalize etmektedir. Katalize edilen PG ve LT' ler alerji ve inflamasyon sürecinde başlıca aracılık eden moleküllerdir (100). Yapılan bir çalışmada, TQ' un kalsiyum iyonofor ile indüklenen rat

peritoneal lökositlerde, doza bağılı olarak COX ve LO enzim ürünlerinin aktivitesini inhibe ederek anti-inflamatuar etki gösterdiği belirtilmiştir (101).

Pankreatik kanser hücrelerinde yapılan çalışmada, TQ' un doza ve zamana bağılı olarak pankreatik duktal adenokarsinom oluşumunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. İnflamasyon katı tümörlerin gelişmesinde önemli bir faktör olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, monosit kemoatraktan protein-1 (monocyte chemotactic protein 1; MCP-1), TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör- α , IL-1beta (İnterlölin-1 beta), Cox-2 (siklooksijenaz-2), NFkB' nin de aktivitelerini önemli derecede azaltarak anti-inflamatuar etki gösterdiği belirtilmiştir (12). Yapılan çalışmalar, ensefalomyelit, kolit ve artrit gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda TQ' un anti-inflamatuar etki gösterdiğini belirtmiştir (14, 102, 103).

Yapılan başka bir çalışmada, lipopolisakkaritin indüklemesiyle rat bazofil hücrelerinde TNF- α üretiminin önemli derecede arttığı, TQ uygulamasıyla TNF- α oranının mRNA ve protein seviyesinde önemli oranda azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca NF-kappaB' nin nükleer aktivasyonunun regülasyonunu sağlayarak anti-inflamatuar etki gösterdiği gözlemlenmiştir (13).

2.2.3.4. TQ' un Anti-oksidan Etkisi

Ortaklanmamış elektronlar nedeniyle kararsız bir yapıya sahip olan serbest radikaller, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların en önemli nedenlerinden biridir (104). Yapılan araştırmalar TQ' un önemli derecede anti-oksidan özelliğe sahip olduğunu ortaya çıkarmaktadır (15, 17, 18, 90). Yapılan bir çalışmada, ratlara TQ verdikten 1 saat sonra uygulanan karbon tetraklorür (Carbon tetrachloride; CCl₄)' ün toksik etkisini, serum enzim seviyesinde azalma ile beraber anti-oksidan glutatyon (GSH) seviyesindeki artma izlemiştir. Böylece hepatoksisiteyi düzenleme işleminin gerçekleştiği belirtilmiştir (15, 105). Doksorubisin (DOX) ile indüklenen nefropati modelinde, uygulanan TQ' un lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve buna bağılı olarak nefropatiyi baskıladığı, böylelikle anti-oksidan bir etki gösterildiği belirtilmiştir (106). Yapılan başka bir çalışmada ratlarda kadmiyum indüklenerek testis toksisitesinde TQ' un etkileri araştırılmıştır. Ratlarda oluşturulan toksisiteden sonra TQ uygulaması yapılmış ve malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) seviyelerinde önemli derecede azalma görülmüştür. Aynı zamanda TNF- α , COX-2, NFkB ve kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesinde önemli azalma

tespit edilmiştir (16). Diğer bir çalışmada, NO sentezi ile N (omega)-nitro-L-arjinin metil esterleri (L-NG-Nitroarginine Methyl Ester; L-NAME) birlikte meydana getirdikleri kronik inhibisyon rat modelinde, TQ uygulaması yapılarak kontrole göre kreatin miktarında azalma, GSH miktarında artma meydana geldiği tespit edilmiştir (107).

2.2.3.5. TQ' un Karaciğer Koruyucu Etkisi

TQ' un karaciğer üzerine olan koruyucu etkisi hayvan modellerinde araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, gentamisin indüklenerek karaciğerde hasar oluşturulmuş ve ardından TQ ve kurkumin maddesi verilmiştir. Daha sonra serum AST, ALT ve LDH aktiviteleri ile TNF- α ve bilirubin seviyelerinde önemli derecede azalma görülmüştür. Benzer çalışmada ayrıca pro-apoptotik proteinler olan kaspaz 3 ve Bax ekspresyonunun, TQ uygulamasından sonra azaldığı gözlemlenirken, anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunda artma tespit edilmiştir. Böylelikle TQ ve kurkuminin karaciğerde anti-oksidan savunma sistemini güçlendirirken, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu baskıladığı belirtilmiştir (108). Cisplatin olarak bilinen anti-kanser ilacın yan etkisi, hepatoksisiteyi indükleyici etkiye sahiptir. Al-Melki ve ark., tarafından yapılan çalışmada, tek doz olarak verilen cisplatinin karaciğerde enzim aktivitelerini bozduğu gözlemlenmiştir. Tek doz cisplatin verildikten sonra 1 ay süreyle TQ ile muamele edilmiştir. TQ ile muamelede bulunduğu anti-oksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon S transferaz (GST) enzim seviyelerinde artma görülürken, MDA seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Buna ek olarak TNF- α , iNOS ve IL-1 β 'nin ekspresyon seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir (18). Başka bir çalışmada, tek doz CCl₄ verilerek indüklenen hepatoksisiteye TQ uygulaması yapılmış ve serum enzim aktiviteleri incelenmiştir. TQ' un serum enzimleri olan ALT, AST ve laktat dehidrogenaz (LDH) ile MDA seviyelerini azaltarak hepatoksisiteyi düzenleyici bir ajan olduğu gösterilmiştir (109). Bir başka çalışmada, farelere oral yoldan verilen TQ' un karaciğerdeki enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. TQ' un kinon redüktaz ve glutatyon transferaz enzimlerini doza bağlı olarak arttırdığı tespit edilmiştir (110).

Tamoxifen (TAM), anti-karsinogen ilaç olarak kullanılmakla beraber, karaciğer hasarına neden olabilmektedir (20). TAM ile indüklenen ratlarda karaciğer hasarı üzerine TQ uygulaması yapılmıştır. Anti-oksidan enzim düzeyleri analiz edilmiş ve önemli ölçüde

farklılıklar gözlemlenmiştir. Böylece TQ' un TAM ile indüklenen karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ortaya konulmuştur (20). Başka bir çalışmada, tüberküloza karşı kullanılan ilaçların oluşturduğu hepatotoksisitenin TQ ile uygulaması araştırılmıştır. Bu çalışmada tüberküloza karşı kullanılan ilaçlar uygulanarak hepatotoksisite oluşturulan ratlarda, TQ uygulaması yapılmış ve AST, ALT, alkalın fosfotaz, bilirubin, albumin, kolesterol, ürik asit, kreatinin gibi parametrelerde önemli ölçüde azalma görüldüğü belirtilmiştir (111). Başka bir çalışmada, asetaminofen ile indüklenmiş karaciğer toksisite rat modelinde, serum ALT, AST seviyeleriyle, süperoksit dismutaz (SOD), GSH-Px ile MDA seviyeleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda kontrole göre TQ uygulaması yapılan grupta serum ALT, AST seviyeleriyle, SOD, GSH-Px ile MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (19).

2.2.3.6. TQ' un İmmün Sistem Üzerine Etkisi

TQ' un immün sistemine olan terapötik etkisi yapılan birçok çalışmalarda gösterilmiştir (112). Özellikle TQ' un humoral ve hücrel immüniteyi etkilediği belirtilmiştir. Ayrıca Th1/Th2 ve doğal öldürücü hücreleri düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (112). Badr ve ark., tarafından ratlar üzerinde yapılan çalışmada STZ ile indüklenen ratlarda gebelik sonrası yeni doğan yavrularda diyabetin etkisi üzerine olmuştur. Gebelik sırasında oluşturulan gestasyonel diyabet modelinde, doğan yavruların iri olmasının yanında IL-1 β , IL-6, and TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin seviyesinde artma, IL-2 ve T lenfosit ile uyarılan süperantijenlerin plazma düzeyinde belirgin bir azalma görülmüştür. Gebelik ve emzirme dönemlerinde TQ tedavisi uygulandığında yeni doğanların ortalama vücut ağırlıklarında belirgin ve önemli bir etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca yavrularda IL-2 ve T hücre proliferasyonunun regülasyonunu sağladığı belirtilmiştir (21).

2.2.4. TQ' un Etki Mekanizması

TQ' un birçok kanser hücre hattında Dox vb. standart kemoterapötiklerden olan ilaçlardan yaklaşık on katı kadar proliferasyonu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (113). TQ, multiple myeloma kanserinde (114), sküamöz hücre karsinomu (115), insan prostat hücre kanseri (116) gibi bazı kanser hücre hatlarında anti-proliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu etkiyi mitojen tarafından aktive edilen protein kinazı (Mitogen-

activated protein kinase; MAPK) ve protein kinaz B (AKT / PKB)' yi regüle ederek gösterdiği ortaya konulmuştur (114-116).

Yapılan diğer çalışmalarda, TQ' un AKT ve MAPK yollarına olan etkisi incelenmiştir. TQ' un meme kanser hücresinde ve primer enfüzyon lenfomalarda AKT fosforilasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (117, 118). Ayrıca, vasküler endotelial büyüme faktörünün (Vascular endothelial growth factor; VEGF) negatif regülasyonu ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (extracellular-signal-regulated kinases; ERK) fosforilasyonunun inhibisyonu ile bağlantılıdır. AKT fosforilasyonunun inhibisyonu fosfotaz ve tensin homologunun (Phosphatase and tensin homolog; PTEN) pozitif regülasyonu ve ROS üretimi ile ilişkilidir (116-118).

TQ ile tedavi edilen insan kolon kanser hücreleri MAPK ailesinin üyeleri olan c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve ERKs proteinlerini aktive ettiği belirtilmiştir (118). Buna ek iki çalışmada ise, TQ ile tedavi edilen prostat ve pankreatik kanser hücreleri sırasıyla JNK ve p38 proteinlerinin aktif olduğunu göstermiştir (119, 120). Literatürdeki bilgilere göre, MAPK protein ailesini aktive veya inhibe yönünden etkilemesi TQ dozuna ve kullanılan hücre hattına bağlı olarak değişiklik gösterebileceği anlaşılmaktadır (119, 120).

TQ' un yaygın olarak apoptoz, proliferasyon ve inflamasyon yollarını çoğunlukla etkileyen ve AKT-MEK-ERK gibi anahtar molekülleri içeren yollarda olmak üzere yaklaşık 11 proteini regüle ettiği belirlenmiştir. Genel olarak AKT ve MAPK sinyal yollarında güçlü olarak anti-proliferatif etkisi olduğu tespit edilmiştir. MAPK yolağını nasıl regüle ettiğine dair kesin bir mekanizma olmamakla birlikte bu mekanizmaların anlaşılması için araştırmalar sürdürülmektedir (10).

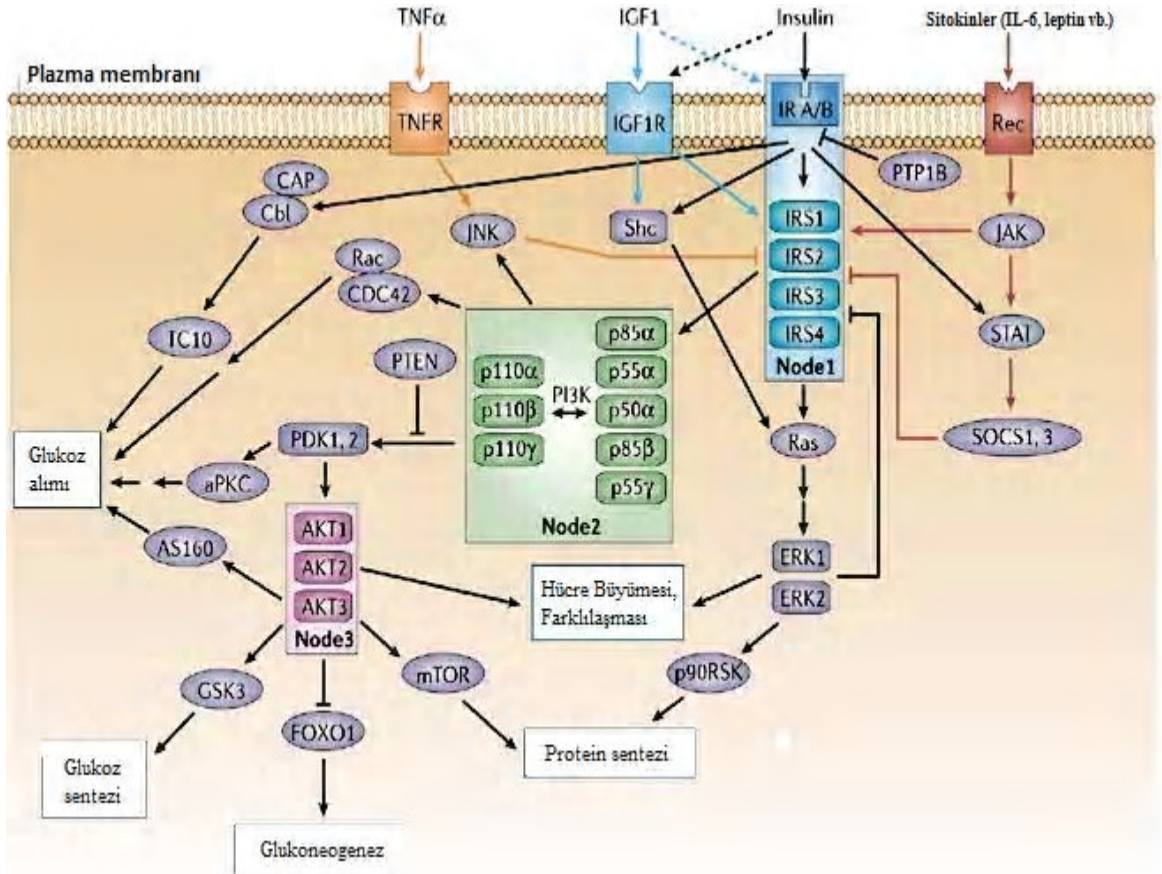
2.3. İnsülin

İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarında transkribe olan, beta hücreleri tarafından üretilen 51 amino asit (aa) uzunluğunda polipeptid bir hormondur. İnsan insülini 21 aa A zinciri ve 30 aa B zinciri olmak üzere çift disülfid bağları içermektedir (121). İnsülin molekülleri histidin rezidüleri çinko iyonuna bağlanarak oldukça stabil heksamerler oluştururlar. Endoplazmik retikulumdaki işleme esnasında, sinyal peptidinin koparılmasıyla pro-insülin salınır. Pro-insülin, B zincirin N-ucundan ve A zincirinin C-ucundan bağlı, aynı zamanda C-peptitide içinde barındıran yapıdır. C-peptit,

karboksipeptidaz ve akabinde pro-hormon dönüştürücü 1 ve 2 enzimlerini kullanılarak, disülfid köprüleriyle bağlı olan A ve B zincirlerinden ayrılır ve insülin meydana gelir (121).

2.4. İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin sinyal yolağında ilk kritik nokta, insülin reseptörü (IR) ve IR bağlantılı olarak insülin reseptör substrat (IRS) proteinleridir. Aşağı yönlü efektörlerin sitoplazmik kuyruğuna bağlanan diğer tirozin kinaz reseptörlerinden farklı olarak (122) , IRS proteinleri olarak bilinen IR ve IGF1R uydu proteinleri hücreler arası efektörlerin bağlanmasına aracılık ederler. Buna ilave olarak, IR ve IRS proteinleri ortak regülasyon mekanizmalarını paylaşırlar, tirozin fosforilasyonu ile aktive olurlar. Ayrıca tirozin fosfataz proteini (Protein tyrosine phosphatase; PTP), serin fosforilasyonu ve ligandla uyarılarak negatif regüle edilirler. IR aktivitesi, kontrol edilmeyen aktivasyon veya inaktivasyon esnasında ciddi metabolik sonuçlara yol açacağı için sıkı bir şekilde regüle edilir. IR' nün iki bağlantı izoformu vardır. Bunların her birinin insülin ve IGF1 için farklı bağlantı eğilimleri vardır. Buna ilaveten, negatif regülasyonun da birkaç mekanizması vardır. Regülatör proteinlerin bir sınıfı tirozin fosfatazlardır ki bunların en fonksiyoneli PTP1B' dir. PTP1B direk olarak IR ile etkileşime girer ve önemli tirozin aminoasitlerini defosforile eder. Böylece aktivitesini düşürür. PTP1B' lerin nakavtlarının insülin hassasiyetini *in vivo* olarak arttırdığı ve bu artışın insülin sinyal yolağının aydınlatılmasında dikkate değer fayda sağladığı belirtilmiştir (123). Sitokin sinyali-baskılayıcısı 1 ve 3 (Suppressor of cytokine signaling 1/3; SOCS1, SOCS3) (124), büyüme faktörü reseptör bağ proteini 10 ve plazma hücre zarı glikoprotein-1 gibi diğer proteinler, IR fonksiyonunu IRS proteinleriyle etkileşimini bloke ederek veya onun kinaz aktivitesini modifiye ederek negatif regülasyonu sağlarlar (Şekil 2.3). SOCS proteinlerinin özel bir önemi vardır. Çünkü obezite gibi insülin direnci durumlarında pozitif regüle edildikleri gösterilmiştir. Böylece diyabetin patofizyolojisine katkı sağlayabilirler (125). IR aynı zamanda ligand uyarımı ve degradasyonunda protein seviyesinde negatif regüle edilir. Bu durum obezite ve T2DM dahil birçok insülin dirençli, hiperinsülinemik durumun ortak özelliğidir (126).



Şekil 2.3. İnsülin sinyal yolağı. İnsülin sinyal yolağı oldukça karmaşık olup, insülin molekülünün insülin reseptörüne (IR) bağlanması ile başlamaktadır. Sinyal iletiminde üç temel mekanizma önemli rol oynamaktadır. Bu üç temel mekanizma IR substratları (IRS) 1-4 (mavi kutu), fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) ve çeşitli düzenleyici katalitik alt üniteleri (yeşil kutu), AKT/Protein kinaz B (PKB) izoformlarıdır (pembe kutu). Genel olarak insülin sinyal yolağındaki genler hücre büyümesi ve farklılaşmasında, protein ve glukoz sentezinde, glukoneogenez ve glukoz alımında önemli rol oynarlar (127).

IR ve IGF1R kinazın en azından 11 tane hücre içi substratı tanımlanmıştır. Bunlardan altı tanesi IRS proteinleri ailesine aittir. Bunlar IRS1-6 olarak isimlendirilmişlerdir (128-132). IR/IGF1R'nin diğer substratları Grb2-birleşik-bağlantı-1 (Gab1), Cas-Br-M (murin) ekotropik retroviral transform homoloğu (Cbl) ve Src-homoloji-2 içeren protein (Shc) içerir (133-135). IRS1 ve IRS2 geniş yayılışlıdır, fakat IRS3 büyük ölçüde adipositlere ve beyine bağlıdır. IRS4 ise temel olarak embriyonik dokularda ve hücre hatlarında görülür. IRS5 ve IRS6'nın dokularda çok sınırlı olarak görüldüğü bilinmektedir ve fonksiyonu sinyal vermedir (132, 136). IRS proteinlerinin N ucunda hem plekstrin-homoloji domainleri hem de fosfotirozin bağlanma domainleri vardır ki bunlar bu substratların IR için yüksek affinitelerinin sebebidir. IRS proteinlerinin merkezi ve C ucu 20' ye kadar potansiyel tirozin-fosforilasyon bölgesi içerir. IR tarafından fosforilasyondan sonra Src-homoloji-2 (SH2) domain içeren hücre içi moleküllere bağlanır. Fosforile edilmiş IRS proteinlerine bağlanan en çok çalışılmış SH2 proteinleri PI3K'nın regülatör alt ünitesi veya Ras-MAPK metabolik yolunu aktive etmek için hücre sinyal molekülü SOS (Son of Sevenless) ile bağlantı kuran adaptör molekül Grb2 benzeri adaptör moleküllerdir (136). IRS proteinlerine bağlanan diğer protein kategorisi tirozin fosfataz-2 içeren SH2-domain (SHP2) ve Fyn gibi sitoplazmik tirozin kinaz enzimleridir (137). IRS proteinlerine bağlanan ve SH2 domaini içermeyen kalsiyum ATPaz SERCA1,2 ve SV40 geniş T antijeni gibi birkaç protein de vardır (138, 139). IR gibi, IRS proteinlerinin hücre içi sinyal vermeye aracılık etmesi de yine tirozin fosfotazların etkisi sayesinde regüle edilir. İlginç bir şekilde, IRS1'e C ucundaki iki fosfotirozin atom grubu bölgesinden bağlanan SHP2, PI3K ve Grb2'nin bağlanmasına aracılık eden diğer fosfotirozinleri defosforile eder (137).

İnsülin, IRS proteinleri ve sitokinler, serbest yağ asitleri gibi diğer uyarılara tepki olarak serin fosforilasyonuna girerler (140). IRS1'de 70' in üzerinde serin fosforilasyon bölgesi vardır ve genel olarak serin fosforilasyonu IRS sinyal vermesini negatif şekilde regüle ediyor görünmektedir. IRS1' in serin fosforilasyonu insülin dirençli durumlarda artar. Ayrıca insülin direnci hastalığının oluşumunda bir rolü olabilir. ERK, S6 kinaz ve c-Jun-N-terminal kinaz (JNK) gibi birçok IRS kinaz insülin tarafından aktive edilir. Böylelikle IRS proteinlerinin serin fosforilasyonunun insülin sinyal metabolik yolu için bir negatif geri beslemeyi temsil edebileceğini önerilmektedir (141-143). IRS proteinlerinin serin fosforilasyonu aynı zamanda sinyal sistemleri arasında etkileşime de

aracılık eden bir mekanizma olabilir. Yakın zamanda, NFkB tarafından aracılık edilen metabolik yolların aktivasyonunun da IRS1' in serin fosforilasyonunun arttırılması yoluyla insülin sinyali verilmesini inhibe edeceği gösterilmiştir (144). Serin fosforilasyonunun IRS1 fonksiyonunu nasıl değiştirdiğine dair kesin bir mekanizma net olarak bilinmemektedir. Muhtemel bir mekanizma şudur ki fosforile edilen serin, içinde kaldığı IRS1' in fonksiyonel domaini ile karışmaktadır. Örneğin, IRS1' in PTB (Polypyrimidine tract-binding) domaininde bulunan Ser307'nin fosforilasyonu insülin sinyalizasyonunun negatif regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (145). Bu atom grubunun *in vitro* fosforilasyonu bir maya trihibrit analizindeki IR ve IRS1 arasındaki ilişkiye zarar vermeye yeterli olmuştur (146). Yine PTB domaininde olan Ser270'in fosforilasyonunun IRS1' in 14-3-3 proteinleri ile (ki bunlar PTB domaininin fonksiyonu ile etkileşime girebilir) ilişkisini güçlendirdiği görülmüştür (147). Buna ilaveten, yakın zamanda yapılan bir *in vivo* çalışma da MAPK' den dolayı Ser612' deki azalan fosforilasyon Tyr608' in artan fosforilasyonu ile ilişki içerisindedir (148). IRS1' in serin fosforilasyonu insülin direnci ile güçlü bir ilişkisi olsa da, bunun insülin direnci hastalığının oluşmasındaki kesin rolü halen tam olarak anlaşılmamıştır. Dahası, diğer IRS proteinlerinin serin fosforilasyonunun önemli bir regülatör etkiye sahip olup olmadığı da halen bilinmemektedir (147, 148).

IRS proteinlerinin düzeyleri aynı zamanda düşük seviyelerde protein ekspresyonu ile de düzenleniyor olabileceği öngörülmektedir (149). Hiperinsülineminin hem hücre kültürü modellerinde hem de farelerde IRS1 ve IRS2' nin ekspresyonunu düşürdüğü bilinmektedir (149). Bu etkiyi iki muhtemel mekanizma açıklayabilir. Birincisi, hiperinsülinemi IRS1 proteininin degradasyonunu indükler. Böylece IRS2' nin transkripsiyonel seviyede sentezlenmesini durdurabilir (149). İkincisi, bazı çalışmalar SOCS proteinleri IRS1 ve IRS2' nin ubiquitin aracılığıyla degradasyonunu indükleyebildiğini göstermiştir (150). Mekanizmadan bağımsız olarak, IRS proteinlerinin düşük seviyeleri, IR' ın da düşük seviyede olması ile birleşince hem kemirgenlerde hem de insanlarda diyabetik durumlarda insülin direncine kesinlikle katkıda bulunmaktadır (151).

Nakavt çalışmaların verdiği fikirler, IRS proteinleri yüksek oranda homolog özelliği ve birçok tirozin fosforilasyon motifleri taşıdığı yönündedir (152-154). Nakavt farelerde ve nakavt hücre hatlarındaki çalışmalar çeşitli IRS proteinleri, insülin/IGF1 sinyalinde

gereksiz olmadığı, aksine birbirini tamamlar nitelikte olduğu gösterilmiştir (155). IRS1 nakavt farelerin özellikle kaslarında ve genel olarak da vücut gelişimlerinde IGF1 direncinden dolayı eksik insülin etkisi vardır (152). IRS2 nakavt farelerin karaciğerlerinde daha da ciddi seviyede insülin sinyalinde noksanlıklar vardır. Bazı nöronlar ve pankreatik beta hücreleri gibi sadece birkaç dokuda bozuk gelişim göstermektedir (153, 156). Buna benzer şekilde hücre düzeyinde IRS1 nakavt pre-adipositlerin farklılaşmasında bazı anormallikler olduğu belirtilmiştir (154). IRS2 nakavt pre-adipositleri normal şekilde farklılaşmışlar, fakat insülin uyarımlı glukoz taşınmasına cevap vermede başarısız olmuşlardır (157). Bu nakavt çalışmalar açıkça göstermektedir ki IRS proteinleri insülin sinyal yolağı için önemli bir nokta oluşturur. Her bir izoformun silinmesi farklı biyolojik etkilere sahiptir. IRS izoformları arasında, özellikle IRS1 ve IRS2 arasında farklılıklara yol açan mekanizmalar hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yakın zamanda keşfedilmiştir. Özellikle L6 miyotüplerindeki IRS1 ve IRS2' nin ekspresyonunun azaltılmasında küçük engelleyici RNAlar (siRNA) kullanıldığında, IRS1' in glukoz alımını daha yakından regüle ettiği belirtilmiştir. Ancak IRS2' nin daha çok MAPK aktivasyonu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (158). Hepatik IRS1 ve IRS2' nin kısa kıvrımlı adenoviral RNA kullanılarak *in vivo* ortamda dokuya özel yıkımı çalışmaları IRS1 ve IRS2' nin AKT/PKB aktivasyonunun sürdürülebilirliğinde tamamlayıcı rollere sahip oldukları gösterilmiştir. Fakat gen ekspresyonunun düzenlenmesinde farklı roller ortaya koyarlar (159). Bundan dolayı, düşük hepatik IRS1' in glukoneogenezde rol oynayan genlerin ekspresyonunun artmasıyla ilgisi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca IRS2'nin negatif regülasyonu lipogenezde rol oynayan genlerin ekspresyonunun artmasına yol açmıştır. Biyokimyasal çalışmalar neticesinde, IRS proteinlerinin özel etkilerini ortaya koymaları için birkaç mekanizma bulunmaktadır. Örneğin, IRS1 ve IRS2' nin çeşitli SH2 partnerlerine bağlanma kabiliyetlerinin farklı olduğu gösterilmiştir. IRS1 Abl tirozin kinaz ve SHP2' ye bağlanabilirken, IRS2 bağlanamamaktadır (160). Buna ek olarak, IRS1' in Grb2, Crk adaptör proteini ve fosfolipaz C dahil olmak üzere bazı SH2 proteinlerine IRS2' ye göre daha büyük bir ilgiyle bağlandığı gösterilmiştir (160). IRS1 ve IRS2' nin aynı zamanda atipik protein kinaz C ailesinin çeşitli üyelerini aktive etme kabiliyetinde de farklı oldukları gösterilmiştir (161). IRS3 ve IRS4' ün, MAPK ve PI3K' yı, IRS1 ve IRS2 kadar aktive edemedikleri belirtilmiştir. Muhtemelen IRS1 ve IRS2' nin aktivitelerini modifiye etmekte ve yüksek seviyelerde bulduklarında onların bazı fonksiyonlarını

aleyhlerine çevirebilmektedir (162). IRS protein izoformları aynı zamanda hücresel bölümlerinde ve aktivasyon kinetiklerinde de farklılıklar göstermektedir (163, 164). Buna ek olarak, IRS2 diğer IRS proteinlerinden yapısal olarak farklıdır. IR' ne tek kinaz regülatör loop domaini ile bağlanabilir, bu da özel etkilerine katkıda bulunabilir (165).

Genel olarak İnsülin direncinin önemli oranda IR' lerinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (22, 23). Reseptörde meydana gelen bozukluklar yada insülin sinyal yolağında gerçekleşen değişiklikler insülin direncinin mekanizmasını oluşturur. Yağ ve kas hücrelerinde insülin ilk etapta hücre yüzeyinde bulunan reseptöre bağlanır. İnsülinin reseptöre bağlanması durumunda insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) fosforile ederek aktif hale geçmesini sağlar. IRS-1 de fosfatidilinositol-3-kinaz (PI-3-kinaz) aktivasyonunu gerçekleştirir. PI3K'da fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2)'in, fosfatidilinositol-3,4,5-fosfat (PIP3)'a dönüşümünü gerçekleştirir (166). PIP3'ün PIP2'ye dönüşümü de PTEN aracılığıyla sağlanır (167). PIP3'te serin / treonin kinaz fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) aktivasyonunu sağlar. PDK1 AKT'yi ve ardından AS160 fosforile ederek plazma membranında bulunan GLUT4'ün translokasyonunu sağlayarak hücrelere glukoz alımını sağlamaktadır. Buna bağlı olarak ribozomal protein 70 kDa S6 kinaz 1 (p70c6k) aktivasyon yolu da ribozomal S6 proteini vasıtasıyla aktive olur. Aktive olan p70c6k hücre büyümesini ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan proteinlerin sentezini uyarır. Ancak p70c6k Akt sinyal yolağında negatif geri dönüş etkisi oluşturarak IRS' nin inhibe edilmesini sağlar (168). Böylelikle p70c6k potansiyel bir insülin direnci oluşturulmasına katkı sağlamış olur. memeli rapamisin hedefi (Mammalian target of rapamycin; mTOR) ekspresyonunun obezite ve insülin direncine etkileri vardır. mTOR hücre büyümesinde anahtar rol oynar (169). Bunun dışında iki ayrı önemli protein olan akt ve p60c6k fosforilasyonun aktivasyonunda rol oynar. Ayrıca mTOR kompleks diye adlandırılan (mTORC1) p60c6k yapısı, fosforilasyonu aktif hale getirir. Rheb molekülünün mTORC1 sinyal aktivasyonunu tetiklediği düşünülmektedir. Daha sonra aktifleşen p60c6k yapısı insülin ve PI3K sinyal yollarını inhibe etmektedir. Ayrıca bu mTOR kompleksinin çeşitli ökaryotik başlama faktörlerini de inhibe etmektedir. Bu da çeşitli transkripsiyon faktörlerinin özellikle adipositlerde de birtakım CCAAT / arttırıcı bağlanma proteinleri olan C/EBP α , C/EBP δ ile peroksizom proliferatör aktivatör

reseptörlerine mRNA düzeyinde ekspresyonu düzenlenmemesi neticesinde obezite ve insülin direncinin başlangıcını meydana getirmektedir (170).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

- 1.Laminar akım kabini (Clean Air)
- 2.Co₂ inkübatör (Sanyo, MCO-19 A/C(UV))
- 3.Soğutmalı santrifüj (Beckman Counter, cat. no. 369436)
- 4.Hassas Terazî(Mrc)
- 5.Su banyosu (Nüve st30)
- 6.Thermal cyclers (Bio-rad C1000 Touch)
7. Nanodrop (Biospec-nano)
8. Çalkalayıcı (Heidolph)
9. Derin dondurucu -196 (MVE/Chart)
10. Derin dondurucu -20 (Uğur, kod. no. 100703000000)
11. Derin dondurucu -80 (Binder)
- 12.Buzdolabı +4 (Siemens, no. KG57NVW20N)
13. Floresan Mikroskop (Nikon Eclipse Ti-S, no. 606090)
14. Invert mikroskop (Leica)
15. Otoklav (Alp, CL-40M)
16. Flow sitometri (BD-FacsCanto™ II Flow Cytometer)
17. Pipet Tabancası (Gilson)

18. Mikropipet seti (Gilson)
19. Vorteks (Heidolph)
20. Manyetik karıştırıcı (Heidolph)
21. Light Cyclers 480II (Roche)

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. DMEM (Biochrom, kat.no. F 0435),
2. DMEM-F12 (Biochrom, kat. no. F4815.),
3. Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom, kat.no.S 0115),
4. L-glutamin (Gibco, Lot. 1570845),
5. Penisilin-streptomisin (Gibco, Lot. 1491906),
6. Trpsin-EDTA (%0,05) (Gibco, Ref. 25300-054),
7. İnsülin (Sigma, kat.no. I0516),
8. Timokinon (Sigma, kat.no. 274666)
9. Serolojik pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml (Grenier)
10. Steril 6'lı (kat.no. 657160), 24'lü (kat.no.662160), 96 kuyucuklu (kat.no. 655180) plaklar (Grenier)
11. Pipet ucu 0,1-10 µl, 5-200 µl, 200-1000 µl (Gilson)
12. Hücre kültür plakları 25 cm² (Grenier , kat. no. 690160)
13. Hücre kültür plakları 75 cm² (Grenier, kat. no. 658170)
14. Cryo tüp steril (isolab, kat. no. N403522),
15. RT² Profiler PCR Array (Human insülin resistance panel) (Qiagen, kat.no. 330231),
16. RNA izolasyon kiti (Qiagen, kat.no.74134)
17. cDNA sentez kiti (Qiagen, kat.no. 330411),
18. Fosfat buffer saline (PBS) (Biochrom, kat.no. L 1825)
19. Metanol (Merck, Index-no: 603-001-00-x),
20. Glucose uptake cell-based assay kit (Item no. 600470, Cayman)
21. Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, kat-no: 64-68-5)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı (HepG2) 15 yaşındaki erkek bireyden alınan hücrelerdir (171). Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Mürkerrem Betül Aycan'dan temin edilen insan HepG2 hücrelerinin (American Type Culture Collection , ATCC), kültür ortamında Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM), % 10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin streptomisin, %1 L-glutamin içerikli besiyer ile flasklara ekilerek hücrelerin çoğalmaları sağlandı. Hücreler 37⁰C sıcaklıkta % 5 CO₂' li ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.2. İnsülin Direnç Modeli

Hücreler T-25 flasklara ekimi yapılarak %70-80 yoğunluğa ulaşması için inkübasyona bırakıldı. %70-80 yoğunluğa geldiğinde hücre kültürü için kullanılmaya uygun, steril insülin kullanıldı. Hücrelere yüksek dozda 1700 nm insülin verilerek 24 saat inkübe edilerek insülin direnç modeli oluşturuldu.

3.2.3. TQ Konsantrasyonlarının Ayarlanması

Çörek otu (*Nigella sativa*) nun aktif maddesi olan TQ (Sigma, kat.no. 274666) Dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülerek farklı konsantrasyonlarda (1.56 µM, 3.125 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM) olacak şekilde steril kabin içerisinde hazırlandı ve filtreden geçirildi. Saklama kabının etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve -20⁰C' de muhafaza edildi.

3.2.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tespiti

HepG2 hücreleri 6' lı kuyucuklara her bir kuyucukta 5x10⁵ hücre olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirildi. Hücrelere, kültür işleminden 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda (1.56 µM, 3.125 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM) TQ ilave edildi ve 24 saatlik sürede sitotoksosite incelemeleri yapıldı. Belirtilen süreden sonra hücreler tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp taze besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Daha sonra tripan mavisi kullanarak 1:1 oranında hücrelerle muamele edilip Thoma lamında sayıldı. Sayılan hücrelerin ortalaması alınıp sayıreltme faktörü ve 10⁴ ile çarpılarak hücre miktarları aşağıdaki formül ile hesaplandı:

HS= OHS x SF x 10000 formülü ile hesaplanır.

(HS= Hücre Sayısı, SF= Seyreltme Faktörü, OHS= Ortalama Hücre Sayısı)

Yaptığımız ön çalışmalarda en düşük ilk iki dozda fark görülmediği için diğer çalışmalarda bu iki doz kullanılmamıştır.

3.2.5. Hücre İçine Glukoz Alım Deneyi

Hücre içerisine glukoz alım deneyi daha önce yapılan çalışmalarda floresan işaretli glukoz kullanılarak gerçekleştirildiği belirtilmiştir (172, 173). Hücrelerin glukoz alımı floresan mikroskobu ile 2-NBDG kiti (Cayman, item.no.600470) kullanılarak gerçekleştirildi. HepG2 hücreleri 96 kuyulu plaklara her kuyucukta 5×10^5 hücre bulunacak şekilde ekim yapılarak 24 saat 37°C %5 CO_2 ' li ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştığında 1700 nM insülin (Sigma, kat.no. I0516) ve farklı konsantrasyonlardaki TQ (6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM) ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuk içerisinde 150 $\mu\text{g/ml}$ 2-NBDG maddesi ve 10 nm insülin olacak şekilde 100 μl glukoz içermeyen besiyeri ilave edilerek 10-30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi hücre hattına göre değişiklik göstermekle birlikte, bu sürenin hücre hattına göre optimum koşulda olması glukoz alımı için daha verimli sonuç alınması açısından önemlidir. Kontrol olarak 1: 1000 oranında kültür medyumunu ile seyreltilen Apigenin maddesi kullanıldı. Apigenin maddesi glukoz trasport inhibitörü işlevi görmektedir (174). İnkübasyondan sonra 5 dakika $400 \times g'$ de oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı. Her bir kuyucuğa 200 μl kitin içinde bulunan Cell-Based Assay Buffer ilave edildi. Bu sırada hücrelerin kalkmamasına dikkat edildi. Tekrar oda sıcaklığında 5 dakika $400 \times g'$ de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Son olarak her kuyucuğa 100 μl Cell-Based Assay Buffer ilave edilerek hücreler analize hazır hale getirildi ve vakit kaybetmeden okuma işlemi yapıldı. Ölçüm işlemi için floresan mikroskoptan yararlanıldı. Floresan mikroskop altında 20X objektif büyüklüğünde hücreler görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Her bir örnek için 3 kuyu olacak şekilde çalışma yapıldı. Her bir konsantrasyon için glukoz alımı gerçekleşen hücreler toplanarak toplamda bulunan hücreye oranlanıp yüzde değerleri hesaplandı.

3.2.6. Apoptoz Deneyi

HepG2 hücreleri 6'lı kuyucuklara 5×10^5 hücre / kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat büyümeye bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler farklı konsantrasyonlardaki TQ (6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M) ile 24 saat muamele edildi. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkama işleminin hemen ardından 2-3 ml soğuk metanol ile 5 dakika fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra metanol çekilerek bir süre kuyucukların kuruması beklenildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 2-3 ml hazırlanan %6'luk Giemsa boyasından ilave edilerek, 8-10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 3 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra hücreler mikroskop altında 40X objektif büyüklüğünde incelenerek fotoğrafları çekildi. Her bir örnek için 1000 tane hücre sayıldı ve apoptotik hücre sayıları toplam hücre sayısına oranlanarak apoptotik hücrelerin yüzde değerleri hesaplandı.

3.2.7. Gen İfade Düzeylerinin Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (quantitative real time polymerase chain reaction: QPZR) ile Analizleri

3.2.7.1. RNA İzolasyonu

HepG2 hücreleri 25 cm²'lik flasklara 5×10^5 - 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim işlemi yapılarak inkübasyona bırakıldı. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında, 10^{-6} M insülin ve farklı konsantrasyonlardaki TQ (12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M) ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler tripsin/EDTA ile muamele edilerek 5-10 dk daha inkübasyonda bırakıldı. İnkübasyondan sonra invert mikroskop ile bakılarak hücrelerin kalkıp kalkmadığı gözlemlendi. Kalktığı gözlemlenen hücreler vakit kaybetmeden üzerine taze besiyeri ilave edilerek tripsinin etkisini kaybetmesi sağlandı. Besiyeri eklendikten sonra pipetaj yapılarak kalkmayan hücrelerinde kalkması sağlandı. Daha sonra hücreler 200 x g ' de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dipte kalan pellet üzerine 350 μ l RNA izolasyon kitinin (Qiagen, kat.no.74134) içerisinde bulunan lizis maddesi eklenip, lizis buffer içerisindeki hücreler 30 saniye vortekslendi. Vorteks işleminden sonra örnekler buz üzerine konularak genomik DNA kontaminasyonunu elimine etmek amacıyla gDNA kolon üzerine transfer edilerek, 8000 x g ' de 30 saniye santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işleminden sonra kolon atılarak, alttaki sıvı korundu. Sıvının üzerine 350 μ l %70 ' lik etil alkol ilave ederek hafifçe pipetaj yapıldı. Pipetaj işleminden sonra çözelti RNeasy spin kolonlara transfer edildi

ve 15 saniye 8000 x g ' de santrifüj işlemi yapıldı. Akışkan kısmı atıldıktan sonra kolonun üzerine kit içerisinde yer alan Buffer RW1' den 700 µl kadar konularak 15 saniye 8000 x g ' de santrifüj edildi. Akışkan kısım yeniden atıldı. Daha sonra 500 µl Buffer RPE ilave edilerek yeniden 15 saniye 8000 x g ' de santrifüj edilip, akışkan kısım atıldı. Tekrar olarak 500 µl Buffer RPE ilave edildi ve 8000 x g ' de bu kez 2 dakika santrifüj yapıp, akışkan kısmı atıldı. Boş olarak kolonlar yeni bir tüpe alındı ve 8000 x g ' de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra kolonlar 1,5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüpleri üzerine alındı. Kolonların üzerine dikkatli bir şekilde kolon membranına yakın bir biçimde, membrana temas etmeden 50 µl RNaz-DNaz bulunmayan sudan ilave edildi ve 1 dakika 8000 x g ' de santrifüj işlemi yapıldı. Daha sonra kolonlar yeni mikrosantrifüj tüplerin üzerine alınarak, tekrar aynı oranda su ve santrifüjleme işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen RNA' ların miktar ve kalitesini belirlemek için spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

3.2.7.2. RNA miktar ve kalite tayini

RNA'nın miktarı ve kalitesi spektrofotometrik olarak Nanodrop (Biospec-nano) adlı cihaz kullanılarak belirlendi. Kullanmadan önce cihazda gerekli ayarlamalar yapıldı. Öncelikle Nanodrop cihazı steril su ile temizlendi. Temizlik işlemi yapıldıktan sonra kolonun membranında bulunan RNA maddesini almak için, içerisinde RNaz-DNaz olmayan su RNA ölçümü için blank (kör) olarak kullanıldı. Blank yapıldıktan sonra RNA örnekleri her biri için 1 µl alındı ve ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümlerde µl' deki konsantrasyon ile beraber 260/280 absorban değerleri ve 260/230 absorban değerleri de ölçüldü.

3.2.7.3. Tamamlayıcı (Complementary) DNA (cDNA) Sentezi

Elde ettiğimiz RNA' dan cDNA eldesi Qiagen firmasına ait cDNA sentez kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. RNA yoğunluğunu 500 ng/µl olarak hesaplayıp, bu değer miktarı kadar RNA karışım içine ilave edildi. İlk önce genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Bunun için kitin içerisinde bulunan buffer GE' den 2 µl, RNA miktarı olarak belirlenen miktar ve son hacim 10 µl olacak şekilde DNaz-RNaz içermeyen su ilavesi ile tamamladıktan sonra 5 dakika 42⁰C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışımları buza alıp içerisine 5x buffer BC3' ten 4 µl, control P2' den 1 µl, RE3 revers transkriptaz karışımından 2 µl, son olarak da DNaz-RNaz içermeyen sudan 3 µl ilave ettikten sonra yavaşca pipet yardımıyla

karıştırıldı. Pipet ile karıştırma işleminden sonra 42⁰C' de 15 dakika, ardından 95⁰C' de 5 dakika inkübasyona bırakılarak reverz transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyon işlemi bittikten sonra sentezlenen cDNA' nın üzerine 91 µl RNaz içermeyen su ilave edilerek 96'lı panellere yüklenmek üzere buz üzerinde bekletildi.

3.2.7.4. RT² PZR Array İnsan İnsülin Direnç Panelinin Hazırlanması ve RT-PZR İşlemi

RT-PZR insülin direnç paneli (Qiagen, kat.no. 330231) için yapılacak işlemler protokol sırasına göre uygulanmaktadır. Buna göre her bir panel için; 102 µl cDNA, -20⁰C' de muhafaza ettiğimiz 1350 µl RT² STBR Green Mastermix karışımı ve son olarak 1248 RNaz-DNaz içermeyen su katılarak deney karışımı rezervuar üzerinde hazırlanarak dikkatlice karıştırıldı. Daha sonra -20⁰C' de saklanan 96 kuyucuklu insan insülin direnç panelini alınıp oda sıcaklığında açıldı. Dikkatli bir şekilde multikanallı pipet yardımıyla her bir kuyucuğa 25 µl olacak şekilde hazırlanan karışım solüsyonu ilave edildi. İlave işlemi bittikten sonra şeffaf yapışkan bir şerit yardımıyla panelin üzeri kapatıldı. Kuyucukların arası ince bir aparat vasıtasıyla kapanması sağlandıktan sonra 1 dakika 1000 g ' de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası kuyucuklar da baloncuk olmaması için kontrol edilerek Roche firmasına ait 480 II cihazına yerleştirildi.

Termal profil aşağıda verildiği şekilde programlanmıştır:

Segment 1 (1 döngü); 95 °C 10 dakika,

Segment 2 (40 döngü); 95 °C 15 saniye, 60 °C 1 dakika,

Segment 3 (1 döngü); 95 °C 1 dakika, 55 °C 30 saniye, 95 °C de 30 saniye.

RT² PZR insan insülin resistance array ile incelenmiş olan 84 adet genin ifadeleri ve plate üzerindeki dağılımı Tablo 3.2.'de belirtilmektedir. Tablo 3.1.'de panelde yer alan genlerin isimleri ve gen erişim numaraları verilmiştir. Panelde yer alan 84 genin ontolojik dağılımları aşağıda belirtilmiştir (47).

İnsülin Sinyal yolağı: AKT3, IGF1, IGF1R, IKBKB, INSR, IRS1, IRS2, MAP2K1 (MEK1), MAPK3 (ERK1), MAPK9 (JNK2), MTOR, PDE3B, PIK3CA (p110A), PIK3R1 (PI3K p85α), PPARGC1A (PGC-1α), PTPN1, RPS6KB1, SLC2A4 (GLUT4), SOCS3, SREBF1.

İnsüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) içeren genler: ADIPOQ, HK2, IKBKB, INSR, IRS1, IRS2, MAPK3 (ERK1), MAPK9 (JNK2), MTOR, PDX1 (IPF1), PIK3CA (p110A), PIK3R1 (PI3K p85 α), SLC2A4 (GLUT4), SOCS3, TNF.

Adipokin Sinyal yolağı:

Ligandlar: ADIPOQ, IL6, LEP, NAMPT, RETN, SERPINE1 (PAI-1), TNF.

Reseptörler/Taşıyıcılar: ADIPOR1, ADIPOR2, CD36, LEPR, SLC2A4 (GLUT4), TNFRSF1A, TNFRSF1B.

Aşağı yönlü sinyalizasyon: AKT3, CHUK (IKK α), IKBKB, IRS1, IRS2, JAK2, MAPK9 (JNK2), MTOR, NFKBIA (I κ B α /MAD3), PPARA, PPARGC1A (PGC-1 α), RELA, SOCS3, STAT3.

Doğuştan bağışıklık: CASP1 (ICE), CHUK (IKK α), IKBKB, IRS1, IRS2, NLRP3, NFKBIA (I κ B α /MAD3), PYCARD (TMS1/ASC), RELA, TLR4.

İnflamatuar: ALOX5, CASP1 (ICE), CCL2 (MCP-1), CCR4, CCR5, CHUK (IKK α), CXCR4, IFNG, IKBKB, IL1B, IL23R, IL6, IL8, LTA4H, NLRP3, OLR1, PYCARD (TMS1/ASC), RELA, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B.

Apoptozis: PPARG, SERPINE1 (PAI-1), TNF, CASP1 (ICE), IKBKB, IRS2, MAPK9 (JNK2), NFKBIA (I κ B α /MAD3), NLRP3, PYCARD (TMS1/ASC), RELA, TNFRSF1A, JAK2, PIK3CA (p110A), SOCS3, RPS6KB1, TNFRSF1B.

Metabolik yolaklar:

Karbonhidrat Metabolizması: CS, HK2, PCK1, PDK2.

Lipid Metabolizması: ACACA, ACACB, ACSL1, ACSL4, APOE, CEBPA, CNBP, FABP4, FASN, LEPR, LIPE, LPL, PPARA, PPARG, PPARGC1A (PGC-1 α), SCD, SREBF1, SREBF2.

Metabolit Taşıyıcılar: APOE, CD36, FABP4, RBP4, SLC2A4 (GLUT4), SLC27A1, UCP1, VLDLR.

Infiltrating Lökosit İşaretleyicileri:

Makrofajlar: CCR5, CXCR4, EMR1.

Th1 Hücreleri: CCR5, CD3E, CXCR3, IL18R1.

Th2 Hücreleri: CCR4, CD3E, CRLF2 (TSLPR), IL1R1.

Th17 Hücreleri: CCR6, CD3E, IL23R.

Tablo 3.1. RT² PZR İnsan insülin direnç panelinde yer alan genlerin kısaltmalarına karşılık gelen açık adları ve gen erişim numaraları (47).

Genlerin Kısa Adları	Gen Erişim Numaraları	Genlerin Açık Adları
ACACA	NM_198834	Acetyl-CoA carboxylase alpha
ACACB	NM_001093	Acetyl-CoA carboxylase beta
ACSL1	NM_001995	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
ACSL4	NM_004458	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
ADIPOQ	NM_004797	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing
ADIPOR1	NM_015999	Adiponectin receptor 1
ADIPOR2	NM_024551	Adiponectin receptor 2
AKT3	NM_005465	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)
ALOX5	NM_000698	Arachidonate 5-lipoxygenase
APOE	NM_000041	Apolipoprotein E
CASP1	NM_033292	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
CCL2	NM_002982	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR4	NM_005508	Chemokine (C-C motif) receptor 4
CCR5	NM_000579	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CCR6	NM_004367	Chemokine (C-C motif) receptor 6
CD36	NM_000072	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
CD3E	NM_000733	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
CEBPA	NM_004364	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
CHUK	NM_001278	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CNBP	NM_003418	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
CRLF2	NM_001012288	Cytokine receptor-like factor 2
CS	NM_004077	Citrate synthase
CXCR3	NM_001504	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
CXCR4	NM_003467	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
EMR1	NM_001974	Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
FABP4	NM_001442	Fatty acid binding protein 4, adipocyte
FASN	NM_004104	Fatty acid synthase
HK2	NM_000189	Hexokinase 2
IFNG	NM_000619	Interferon, gamma
IGF1	NM_000618	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
IGF1R	NM_000875	Insulin-like growth factor 1 receptor
IKBKB	NM_001556	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
IL18R1	NM_003855	Interleukin 18 receptor 1
IL1B	NM_000576	Interleukin 1, beta
IL1R1	NM_000877	Interleukin 1 receptor, type I
IL23R	NM_144701	Interleukin 23 receptor
IL6	NM_000600	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
IL8	NM_000584	Interleukin 8
INSR	NM_000208	Insulin receptor
IRS1	NM_005544	Insulin receptor substrate 1
IRS2	NM_003749	Insulin receptor substrate 2
JAK2	NM_004972	Janus kinase 2
LEP	NM_000230	Leptin
LEPR	NM_002303	Leptin receptor
LIPE	NM_005357	Lipase, hormone-sensitive

(Tablo 3.1.'in devamı)

LPL	NM_000237	Lipoprotein lipase
LTA4H	NM_000895	Leukotriene A4 hydrolase
MAP2K1	NM_002755	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAPK3	NM_002746	Mitogen-activated protein kinase 3
MAPK9	NM_002752	Mitogen-activated protein kinase 9
MTOR	NM_004958	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
NAMPT	NM_005746	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NFKBIA	NM_020529	NFkB light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NLRP3	NM_183395	NLR family, pyrin domain containing 3
OLR1	NM_002543	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
PCK1	NM_002591	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)
PDE3B	NM_000922	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
PDK2	NM_002611	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2
PDX1	NM_000209	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PIK3CA	NM_006218	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PIK3R1	NM_181504	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
PPARA	NM_005036	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARG	NM_015869	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPARGC1A	NM_013261	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
PTPN1	NM_002827	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
PYCARD	NM_013258	PYD and CARD domain containing
RBP4	NM_006744	Retinol binding protein 4, plasma
RELA	NM_021975	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
RETN	NM_020415	Resistin
RPS6KB1	NM_003161	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
SCD	NM_005063	Arylacetamide deacetylase
SERPINE1	NM_000602	Serpin peptidase inhibitor, clade, member 1
SLC27A1	NM_198580	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
SLC2A4	NM_001042	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
SOCS3	NM_003955	Suppressor of cytokine signaling 3
SREBF1	NM_004176	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
SREBF2	NM_004599	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
STAT3	NM_003150	Signal transducer and activator of transcription 3
TLR4	NM_138554	Toll-like receptor 4
TNF	NM_000594	Tumor necrosis factor
TNFRSF1A	NM_001065	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF1B	NM_001066	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
UCP1	NM_021833	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
VLDLR	NM_003383	Very low density lipoprotein receptor
ACTB	NM_001101	Actin, beta
B2M	NM_004048	Beta-2-microglobulin
GAPDH	NM_002046	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	NM_000194	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	NM_001002	Ribosomal protein, large, P0
HGDC	SA_00105	Human Genomic DNA Contamination
RTC	SA_00104	Reverse Transcription Control
PPC	SA_00103	Positive PCR Control

Tablo 3.2. RT² PZR panelinde genlerin dağılım şeması (47). RT² PZR paneli Qiagen firmasından temin edilmiştir.

ACACA A01	ACACB A02	ACSL1 A03	ACSL4 A04	ADIPOQ A05	ADIPOR1 A06	ADIPOR2 A07	AKT3 A08	ALOX5 A09	APOE A10	CASP1 A11	CCL2 A12
CCR4 B01	CCR5 B02	CCR6 B03	CD36 B04	CD3E B05	CEBPA B06	CHUK B07	CNBP B08	CRLF2 B09	CS B10	CXCR3 B11	CXCR4 B12
EMR1 C01	FABP4 C02	FASN C03	HK2 C04	IFNG C05	IGF1 C06	IGF1R C07	IKBKB C08	IL18R1 C09	IL1B C10	IL1R1 C11	IL23R C12
IL6 D01	IL8 D02	INSR D03	IRS1 D04	IRS2 D05	JAK2 D06	LEP D07	LEPR D08	LIPE D09	LPL D10	LTA4H D11	MAP2K1 D12
MAPK3 E01	MAPK9 E02	MTOR E03	NAMPT E04	NFKBIA E05	NLRP3 E06	OLR1 E07	PCK1 E08	PDE3B E09	PDK2 E10	PDX1 E11	PIK3CA E12
PIK3R1 F01	PPARA F02	PPARG F03	PPARGC1A F04	PTPN1 F05	PYCARD F06	RBP4 F07	RELA F08	RETN F09	RPS6KB1 F10	SCD F11	SERPINE1 F12
SLC27A1 G01	SLC2A4 G02	SOCS3 G03	SREBF1 G04	SREBF2 G05	STAT3 G06	TLR4 G07	TNF G08	TNFRSF1A G09	TNFRSF1B G10	UCP1 G11	VLDLR G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda istatistik analiz yöntemi olarak unpaired t testi kullanıldı. Gen ekspresyon analizleri için ise elde edilen dataların ct değerleri program üzerinden hesaplanarak <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> internet adresinden analiz işlemleri gerçekleştirildi. Biyoinformatik analiz işlemi için ise "The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), version 6.7." programı kullanılarak analiz işlemi gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ değerinden küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyoinformatik analiz işlemine yalnızca gen ekspresyon sonucunda 2 kat artan/azalan genler dahil edilip analiz işlemi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. TQ' un HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

TQ' un HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisine tripan mavisi yöntemiyle analiz edilmiştir. HepG2 hücreleri TQ' un farklı konsantrasyonlarına (1.56 μ M, 3.125 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M) 24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Yaptığımız ön çalışmalarda en düşük iki konsantrasyonlarda (1.56 μ M ve 3.125 μ M) TQ' un hücre üzerinde bariz bir etki bulunmadığından, daha sonraki deneylerde en düşük iki konsantrasyon kullanılmamıştır. Hücrelerin canlılık oranları Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. TQ uygulamasında zamana bağlı olarak HepG2 hücrelerinde doza bağlı olarak hücre sayısında anlamlı azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol hücrelerinde % değere göre hesapladığımızda kontroldeki hücre sayısı $1000000 \pm 7,5$ hücre bulunurken, TQ-6 μ M konsantrasyonda 779500 ± 4 hücre, TQ-12 μ M konsantrasyonda 592310 ± 3 hücre, TQ-25 μ M konsantrasyonda 482100 ± 2 hücre, TQ-50 μ M konsantrasyonda ise $353800 \pm 2,5$ hücre olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1.' de görüldüğü üzere, tüm konsantrasyonlarda TQ hücre sayılarında düşüşe neden olmuştur.

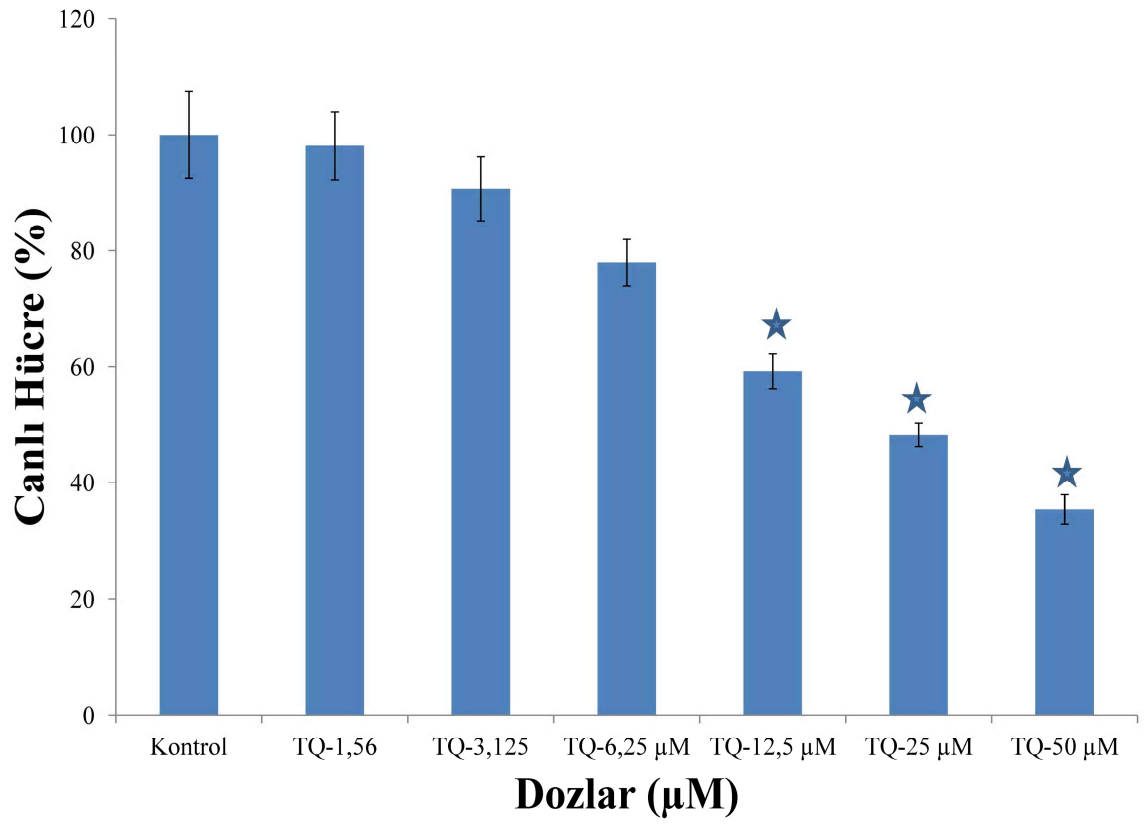
4.2. TQ' un HepG2 Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkisi

TQ' un farklı konsantrasyonlarına (TQ-6.25 μ M, TQ-12.5 μ M, TQ-25 μ M, TQ-50 μ M) 24 saat maruz bırakılarak giemsa boyamasıyla apoptoz deneyi gerçekleştirilmiştir. TQ' un HepG2 hücreleri apoptotik etkisi Şekil 4.2.a.' de gösterilmiştir. TQ' un farklı konsantrasyonuna bağlı olarak apoptotik hücre sayısında artış görülmüştür. Kontrol hücrelerinde % $1,6 \pm 0,16$, TQ-6 μ M konsantrasyonlu HepG2 hücrelerinde % $6,8 \pm 0,22$, TQ-12.5 μ M konsantrasyonlu HepG2 hücrelerinde % $9,9 \pm 1,07$, TQ-25 μ M

konsantrasyonlu HepG2 hücresinde $\% 19,4 \pm 1,16$, TQ-50 μM konsantrasyonlu HepG2 hücresinde $\% 26,6 \pm 1,17$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.b).

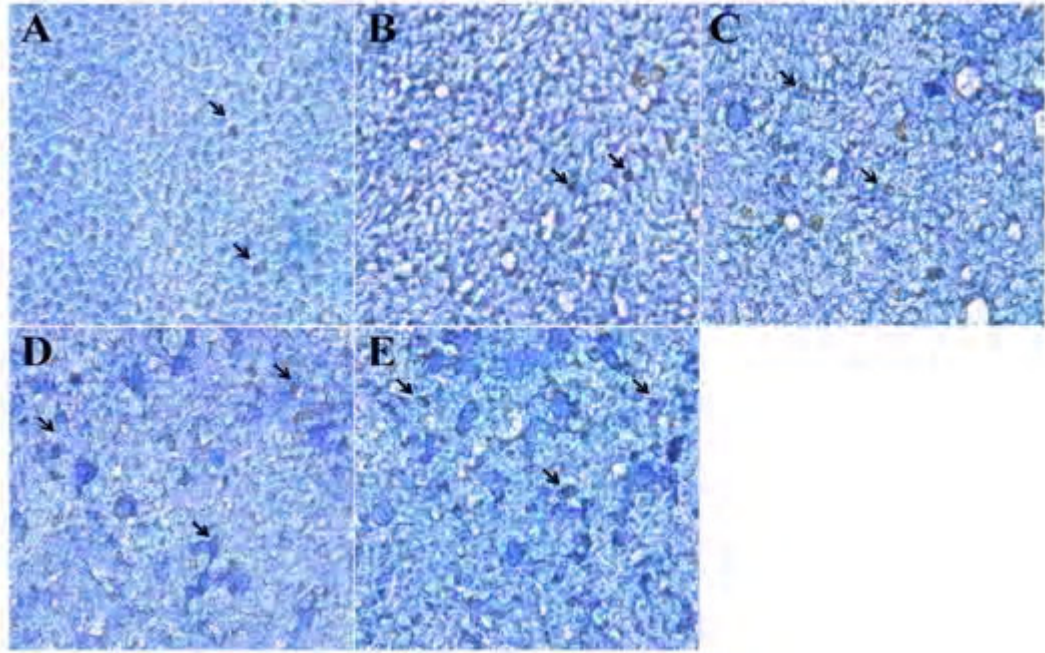
4.3. Hücre İçine Glukoz Alım Deneyi

HepG2 hücreleri $\%70-80$ yoğunluğa ulaştıktan sonra 1700 nm INS verilerek 24 saat inkübe edildi. Daha sonra glukozdan yoksun medium ile floresan işaretli glukoz 150 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ve 10 nm INS hücrelerin üzerine konularak 30 dakika inkübasyonda tutuldu. İnkübasyondan sonra bir dizi yıkama işlemlerinden geçirilerek floresan mikroskopta incelendi. Hücrelerin glukoz alımı Şekil 4.3.a.'da gösterilmiştir. İnsülin direnç modeli oluşan kontrol ve farklı konsantrasyondaki TQ (6 μM , 12.5 μM , 25 μM , 50 μM) 'nun floresan işaretli glukoz içeriğinin $\%$ ortalaması kontrol $1,56 \pm 0,6$, TQ-6.25 μM $4,31 \pm 0,58$, TQ-12,5 μM $6,29 \pm 0,89$, TQ-25 μM $18,87 \pm 2,45$, TQ-50 μM $43,04 \pm 4,69$, pozitif kontrol için insülin direnci oluşturulmayan HepG2 hücresinde floresan işaretli glukoz içeriğinin $\%$ ortalaması $44,06 \pm 1.89$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.3.b).

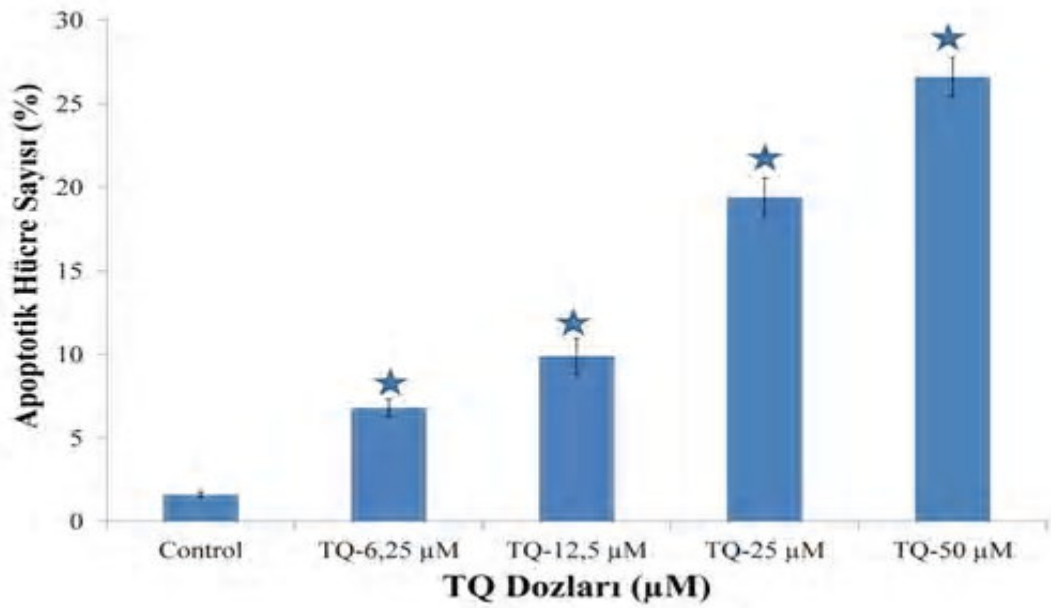


Şekil 4.1. Hücrelerin TQ ile 24 saat muamele edildikten sonra thoma lamıyla sayılmasından sonraki hücre yoğunluklarının şekilde gösterilmesi. ★ Kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı değerler ($p < 0,05$).

a.

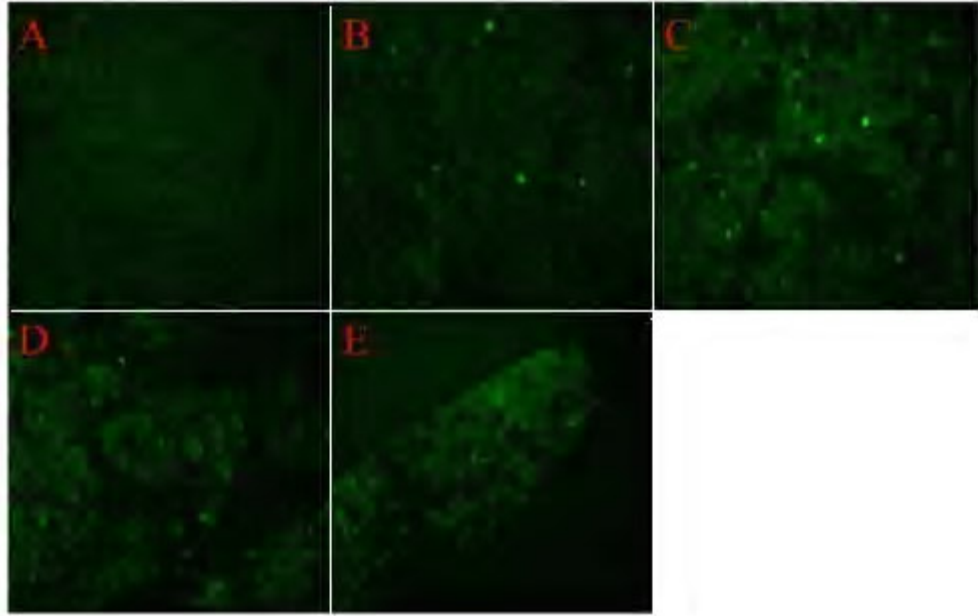


b.

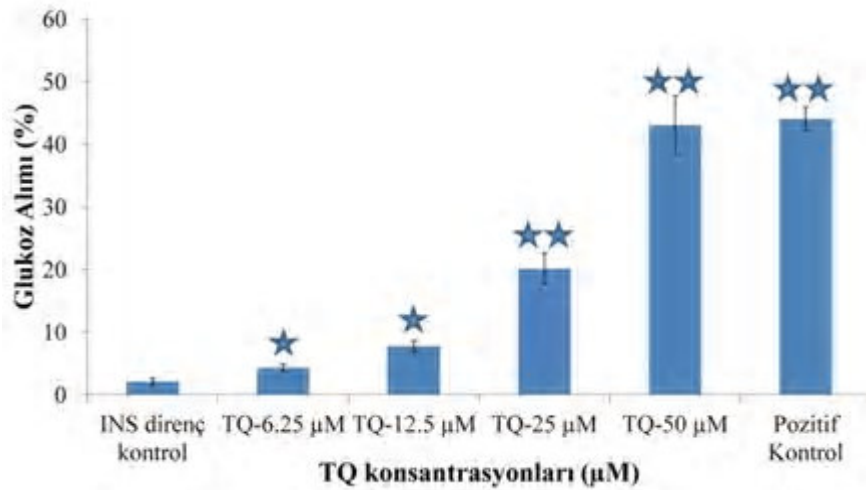


Şekil 4.2.a. HepG2 hücrelerinde farklı dozlarda uygulanan TQ dozunun apoptotik etkisinin gösterimi. **b.** Apoptotik hücrelerin grafiksel gösterimi. A. Kontrol, B. TQ-6.25 μM, C. TQ-12.5 μM, D. TQ-25 μM E. TQ-50 μM ★ Kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı değerler (p<0,05).

a.



b.



Şekil 4.3. İnsülin direnç modelinde TQ' un glukoz alımı üzerine etkisinin incelenmesi.

a. Şekilsel Gösterimi. b. Grafiksel gösterimi. Hücreler %70-80 olduğunda 1700 nm INS ve farklı konsantrasyonlarda TQ verilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10 nm INS floresans işaretli glukoz ile beraber verilerek floresan mikroskopta incelendi. A. Kontrol, B. TQ-6,25 µM, C. TQ-12,5 µM, D. TQ-12,5 µM, E. TQ-50 µM (a). (★p<0,05), (★★p<0,001)

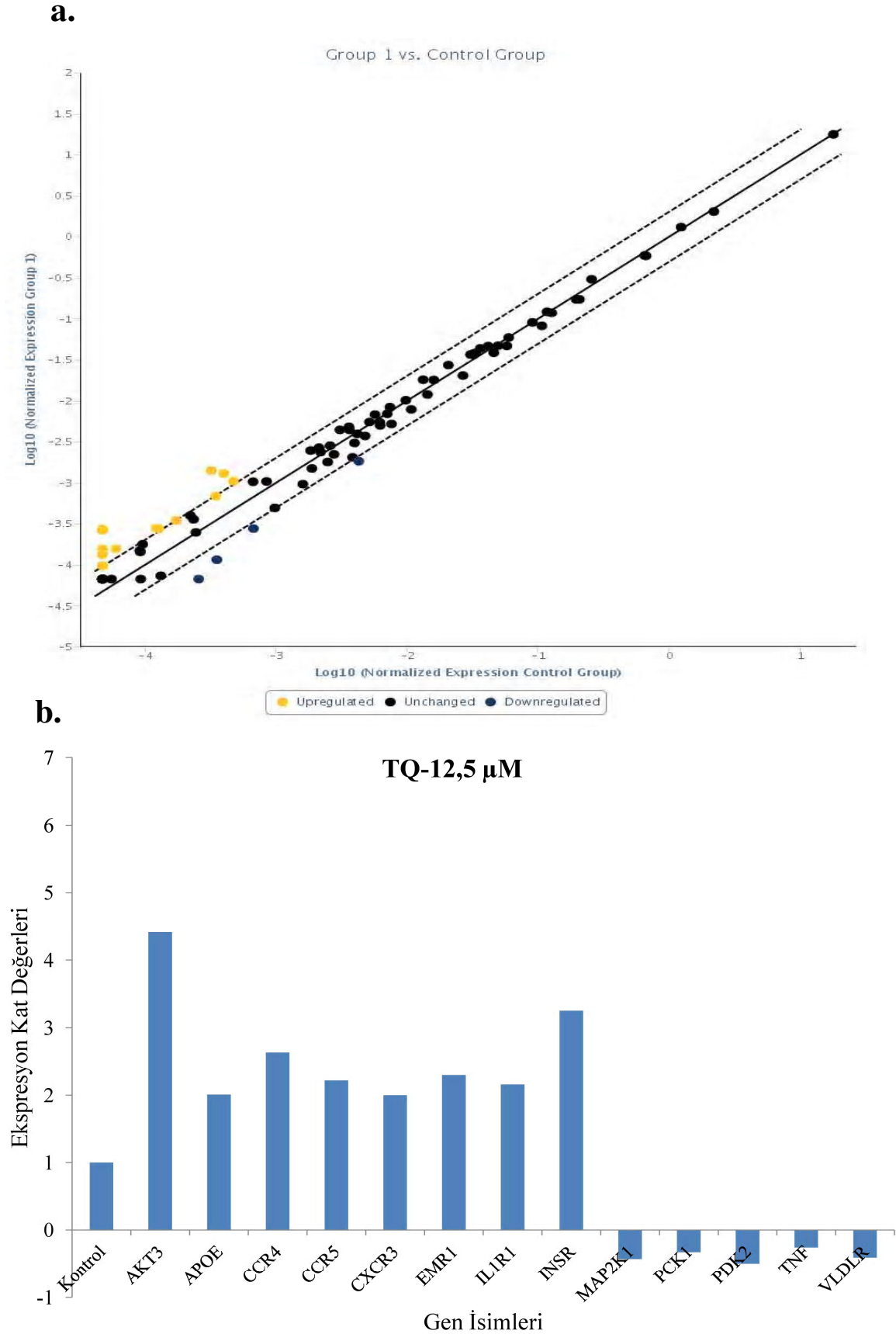
4.4. Kantitatif PZR ile Gen Ekspresyon Analizi

HepG2 hücreleri farklı konsantrasyonlarda TQ (12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M) ile 24 saat inkübe edildi. Daha sonra bu hücrelerden RNA izolasyonu, ardından cDNA sentezi yapılarak kantitatif PZR yöntemiyle gen ekspresyon seviyeleri incelendi.

Yapılan kantitatif PZR sonuçlarına göre kontrol ile TQ-12.5 μ M konsantrasyonuyla muamelede bulunan HepG2 hücresinde, kontrole göre 8 gende (AKT3, APOE, CCR4, CCR5, CXCR3, EMR1, IL1R1, INSR) pozitif regüle olurken, 5 gende (MAP2K1, PCK1, PDK2, TNF, VLDLR) negatif regüle olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.a., Şekil 4.4.b.). Yine aynı çalışmada ısı haritası ve buna bağlı olarak gen ifade seviyesindeki değişiklikler Tablo 4.1.' de verilmiştir.

TQ-25 μ M konsantrasyon ile yapılan çalışmada 9 gen (CD3E, EMR1, IGF1, IL18R1, IL1R1, INSR, IRS2, SLC27A1, UCP1) pozitif regüle olurken, 5 gende (MAP2K1, PCK1, PDK2, SREBF1, TNF) negatif regüle olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.a., Şekil 4.5.b.). Yine aynı çalışmada ısı haritası ve buna bağlı olarak gen ifade seviyesindeki değişiklikler Tablo 4.2.' de verilmiştir.

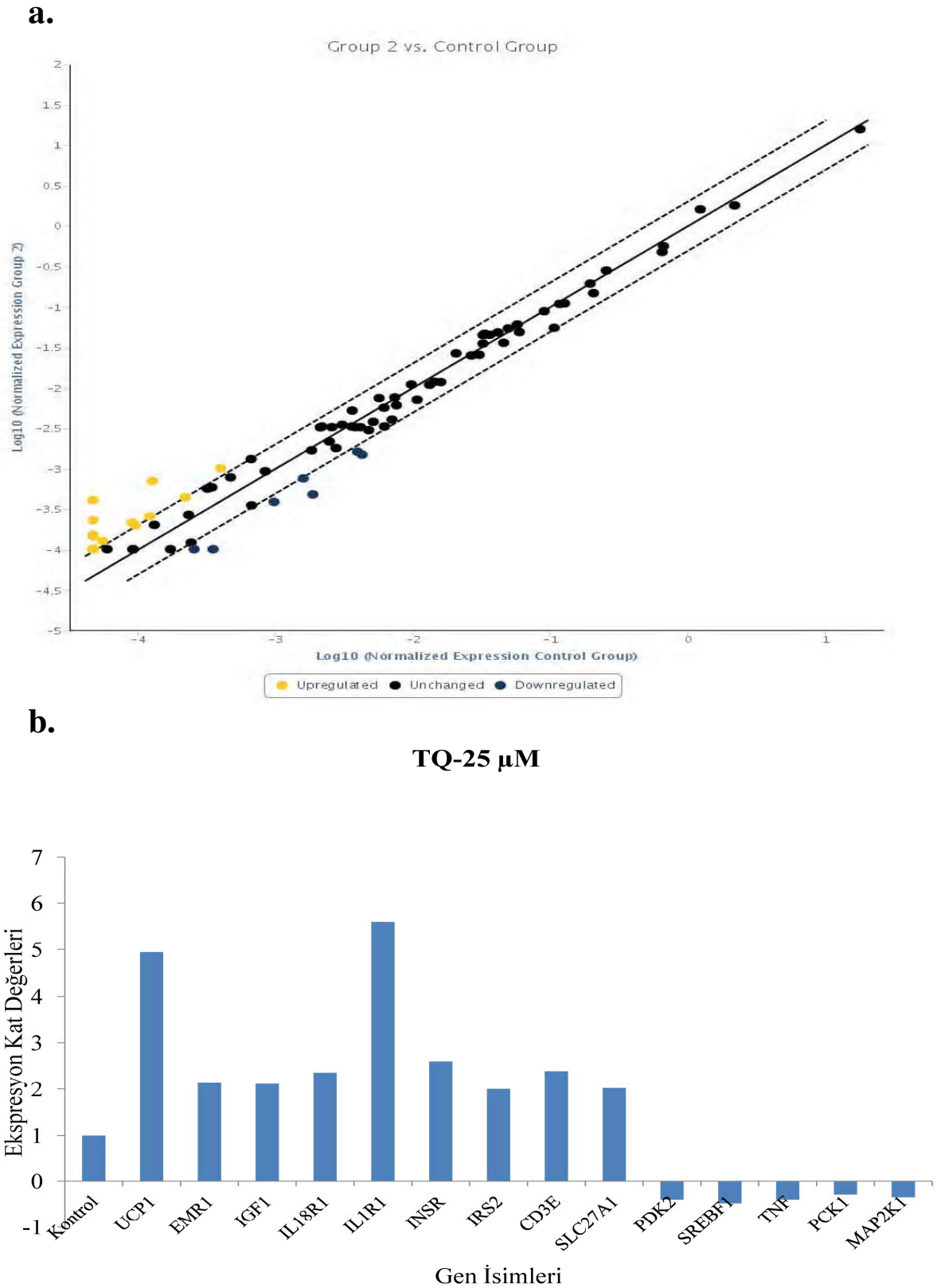
TQ-50 μ M konsantrasyonu ile yapılan çalışmada 10 gen (ACACB, CCR4, CCR5, CD3E, CXCR4, EMR1, IL6, IRS2, SLC27A1, UCP1) pozitif regüle olurken, 2 gende (PYCARD, TNF) negatif regüle olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6.a., Şekil 4.6.b.). Yine aynı çalışmada ısı haritası ve buna bağlı olarak gen ifade seviyesindeki değişiklikler Tablo 4.3.' de verilmiştir. Gen ekspresyonlarındaki kat değişimleri Tablo 4.4.' de özetlenmiştir.



Şekil 4.4. İnsülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ-12.5 μM ' in etkisi. **a.** HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturulduktan sonra TQ-12.5 μM ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon düzeyindeki analiz dağılım grafiği. **b.** Etkilenen genlerin grafiksel gösterimi. 2 kat artan/azalan genler değerlendirilmeye alınmıştır

Tablo 4.1. HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-12.5 μ M ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon ifadelerinde insan insülin direnç RT² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki değişikliklerin sayısal değerleri.

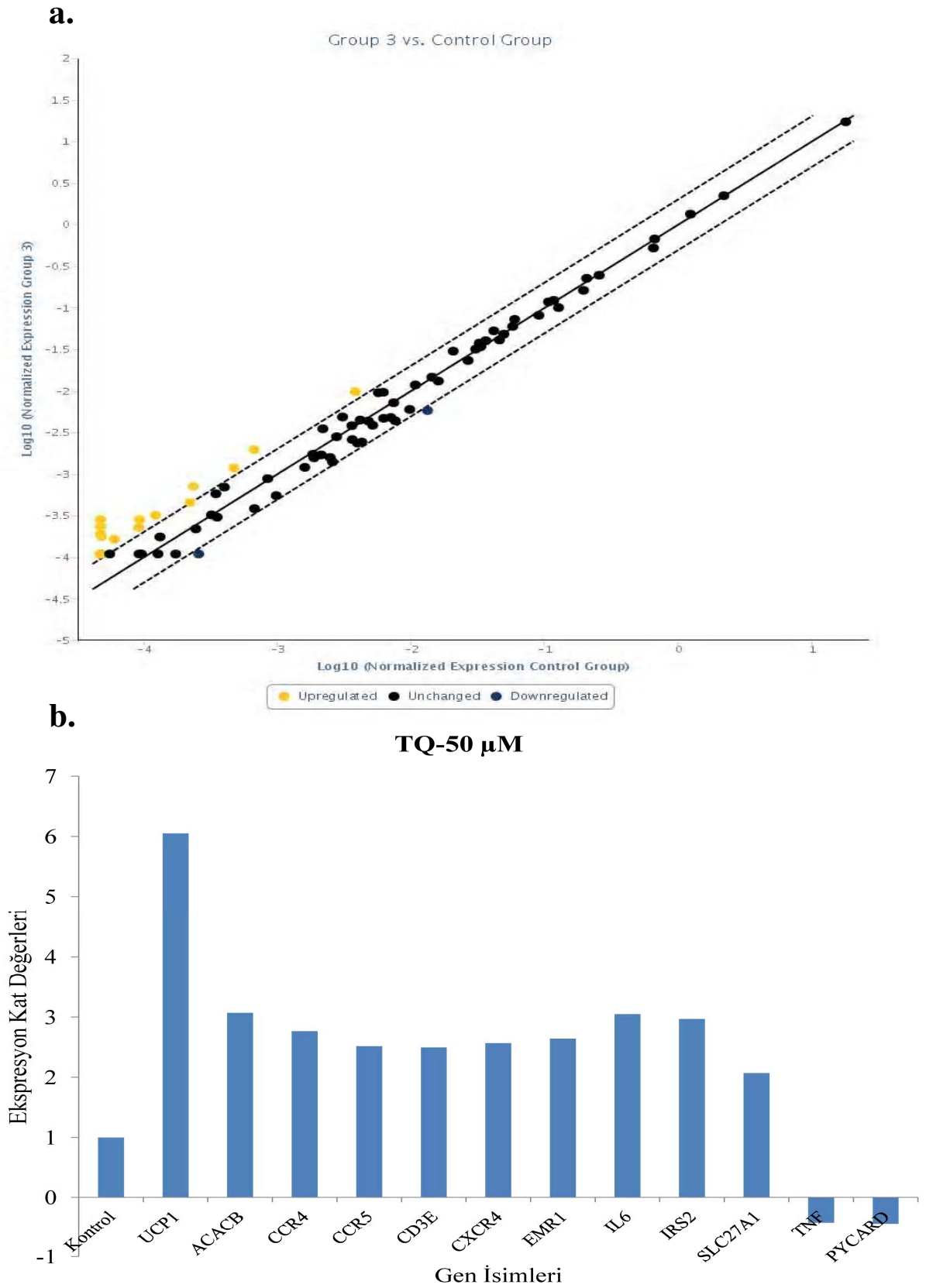
Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACACA 1.21	ACACB -1.38	ACSL1 -1.20	ACSL4 1.00	ADIPOQ 1.42	ADIPOR1 -1.07	ADIPOR2 -1.19	AKT3 4.41	ALOX5 1.12	APOE 2.01	CASP1 1.42	CCL2 1.42
B	CCR4 2.64	CCR5 2.22	CCR6 1.42	CD36 1.57	CD3E 1.64	CEBPA -1.45	CHUK -1.31	CNBP -1.13	CRLF2 5.62	CS 1.04	CXCR3 2.00	CXCR4 -1.87
C	EMR1 2.30	FABP4 3.34	FASN -1.13	HK2 1.13	IFNG 2.81	IGF1 1.87	IGF1R 1.34	IKBKB -1.38	IL18R1 1.21	IL1B -1.79	IL1R1 2.16	IL23R 5.78
D	IL6 1.54	IL8 -1.30	INSR 3.25	IRS1 -1.28	IRS2 1.55	JAK2 1.27	LEP 1.44	LEPR -1.05	LIPE 1.09	LPL 1.42	LTA4H 1.19	MAP2K1 -2.33
E	MAPK3 1.35	MAPK9 1.15	MTOR -1.05	NAMPT -1.20	NFKBIA -1.37	NLRP3 2.06	OLR1 1.40	PCK1 -3.05	PDE3B 1.13	PDK2 -1.97	PDX1 1.10	PIK3CA 1.21
F	PIK3R1 -1.24	PPARA 1.04	PPARG -1.13	PPARGC1 A 1.22	PTPN1 -1.24	PYCARD 1.37	RBP4 -1.29	RELA 1.17	RETN 2.07	RPS6KB1 -1.23	SCD -1.01	SERPINE 1 -1.25
G	SLC27A1 1.80	SLC2A4 1.42	SOCS3 1.23	SREBF1 -1.66	SREBF2 1.20	STAT3 1.32	TLR4 1.07	TNF -3.81	TNFRSF1 A -1.01	TNFRSF1 B 1.02	UCP1 1.42	VLDLR -2.43



Şekil 4.5 İnsülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ-25 μM ' in etkisi **a.** HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-25 μM ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon düzeyindeki analizin dağılım grafiği. **b.** Etkilenen genlerin grafiksel gösterimi. 2 kat artan/azalan genler değerlendirmeye alınmıştır.

Tablo 4.2. HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-25 μM ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon ifadelelerinde insan insülin direnç RT² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki değişikliklerin sayısal değerleri.

Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACACA -1.18	ACACB 1.11	ACSL1 -1.19	ACSL4 -1.01	ADIPOQ 2.17	ADIPOR1 -1.14	ADIPOR2 -1.26	AKT3 1.80	ALOX5 1.18	APOE -1.69	CASP1 2.17	CCL2 2.17
B	CCR4 1.71	CCR5 1.68	CCR6 2.17	CD36 1.11	CD3E 2.39	CEBPA -1.23	CHUK -1.05	CNBP -1.17	CRLF2 3.26	CS -1.06	CXCR3 1.72	CXCR4 -1.16
C	EMR1 2.14	FABP4 3.15	FASN -1.07	HK2 -1.34	IFNG 2.17	IGF1 2.11	IGF1R -1.07	IKKBK -1.13	IL18R1 2.36	IL1B 1.55	IL1R1 5.60	IL23R 2.17 C
D	IL6 1.16 B	IL8 -1.91	INSR 2.56 B	IRS1 -1.57 B	IRS2 1.99 B	JAK2 1.54 B	LEP 1.15 B	LEPR -1.26 B	LIPE 1.54 B	LPL 2.17 C	LTA4H 1.11	MAP2K1 -2.84
E	MAPK3 -1.07	MAPK9 1.41	MTOR 1.11	NAMPT -1.38	NFKBIA -1.49	NLRP3 8.73	OLR1 2.14	PCK1 -3.44	PDE3B 1.04	PDK2 -2.49	PDX1 1.28	PIK3CA 1.26
F	PIK3R1 -1.85	PPARA 1.14	PPARG 1.00	PPARGC1 A 1.46	PTPN1 -1.52	PYCARD -1.20	RBP4 -2.42	RELA 1.10	RETN 2.17	RPS6KB1 1.06	SCD -1.21	SERPINE 1 -3.85
G	SLC27A1 2.02	SLC2A4 2.17	SOCS3 1.11	SREBF1 -2.08	SREBF2 1.33	STAT3 1.31	TLR4 -1.34	TNF -2.50	TNFRSF1 A -1.72	TNFRSF1 B -1.98	UCP1 4.95	VLDLR -1.88



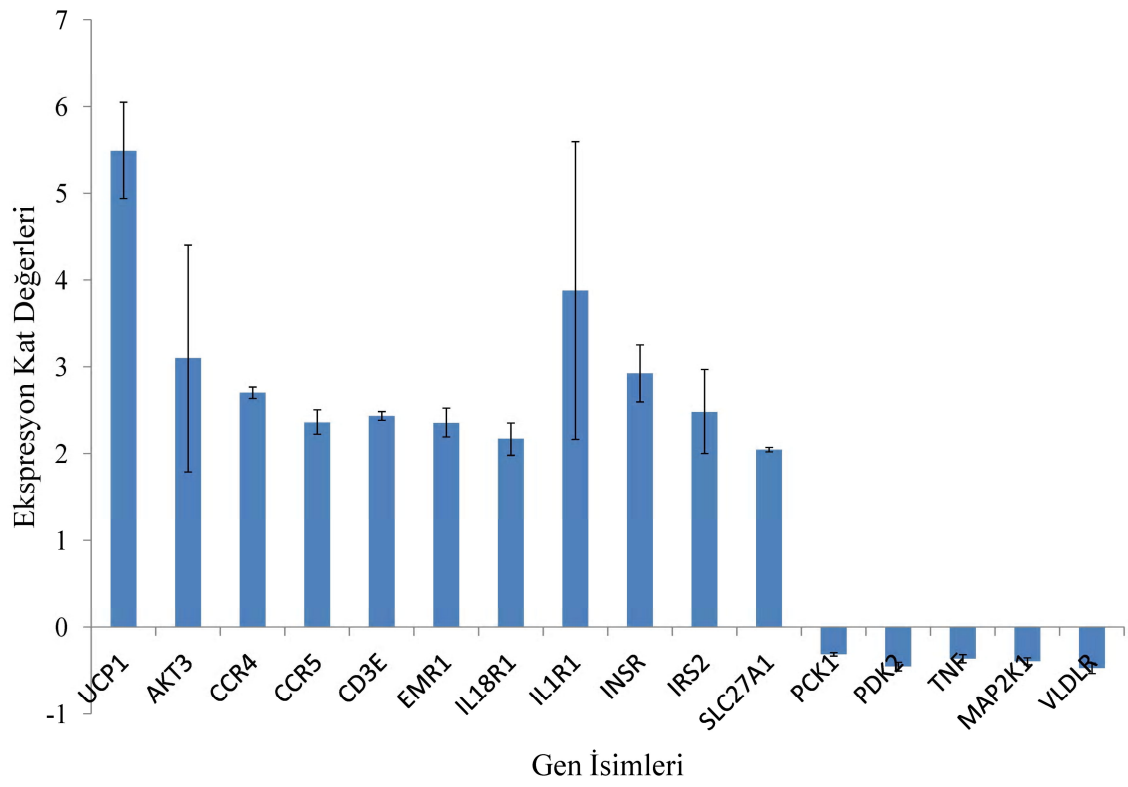
Şekil 4.6. İnsülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ-50 μ M' in etkisi . **a.** HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-50 μ M ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon düzeyindeki analizin dağılım grafiği. **b.** Etkilenen genlerin grafiksel gösterimi. 2 kat artan/azalan genler değerlendirmeye alınmıştır.

Tablo 4.3. HepG2 hücrelerinde insülin direnç modeli oluşturduktan sonra TQ-50 μ M ile muamele edilen hücrenin gen ekspresyon ifadelerinde insan insülin direnç RT² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki değişikliklerin sayısal değerleri.

Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACACA 1.05	ACACB 3.07	ACSL1 1.03	ACSL4 -1.11	ADIPOQ 2.33	ADIPOR1 -1.26	ADIPOR2 -1.11	AKT3 1.01	ALOX5 1.27	APOE -1.57	CASP1 2.33	CCL2 2.33
	CCR4 2.77	CCR5 2.51	CCR6 4.99	CD36 1.20	CD3E 2.49	CEBPA -1.73	CHUK -1.14	CNBP 1.01	CRLF2 2.33	CS 1.06	CXCR3 1.68	CXCR4 2.56
C	EMR1 2.64	FABP4 2.33	FASN 1.57	HK2 -1.21	IFNG 2.33	IGF1 1.15	IGF1R 1.06	IKBKB -1.56	IL18R1 1.98	IL1B 1.34	IL1R1 -1.16	IL23R 2.33
	IL6 3.05	IL8 1.11	INSR 1.75	IRS1 -1.10	IRS2 2.96	JAK2 -1.24	LEP 1.59	LEPR 1.08	LIPE 1.61	LPL 2.33	LTA4H -1.04	MAP2K1 -1.76
D	MAPK3 -1.06	MAPK9 1.03	MTOR -1.02	NAMPT 1.10	NFKBIA 1.10	NLRP3 4.05	OLR1 3.70	PCK1 -1.16	PDE3B -1.02	PDK2 -1.77	PDX1 -1.83	PIK3CA 1.12
	PIK3R1 -1.32	PPARA -1.63	PPARG -1.20	PPARGC1 A -1.39	PTPN1 1.02	PYCARD -2.27	RBP4 -1.67	RELA 1.04	RETN 2.33	RPS6KB1 1.04	SCD 1.22	SERPINE 1 -1.19
E	SLC27A1 2.07	SLC2A4 2.33	SOCS3 1.05	SREBF1 -1.32	SREBF2 1.68	STAT3 1.46	TLR4 -1.33	TNF -2.33	TNFRSF1 A -1.47	TNFRSF1 B -1.11	UCP1 6.05	VLDLR -1.74

Tablo 4.4. Gen ekspresyonunda 2 kat artan/azalan genlerin dozlara göre değişimi.

GEN BİLGİLERİ			TQ Konsantrasyonları		
Sembol	Erişim Numaraları	Tanım	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M
ACACB	NM_001093	Acetyl-CoA carboxylase beta	0.73	1.11	3.07
AKT3	NM_005465	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	4.41	1.79	1.01
APOE	NM_000041	Apolipoprotein E	2.01	0.59	0.64
CCR4	NM_005508	Chemokine (C-C motif) receptor 4	2.64	1.71	2.77
CCR5	NM_000579	Chemokine (C-C motif) receptor 5	2.22	1.68	2.51
CD3E	NM_000733	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	1.64	2.39	2.49
CXCR3	NM_001504	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3	2.00	1.72	1.68
CXCR4	NM_003467	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0.54	0.86	2.56
EMR1	NM_001974	Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	2.30	2.14	2.64
IGF1	NM_000618	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	1.87	2.11	1.15
IL18R1	NM_003855	Interleukin 18 receptor 1	1.21	2.36	1.98
IL1R1	NM_000875	Interleukin 1 receptor, type I	2.16	5.60	0.86
IL6	NM_000600	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	1.54	1.16	3,05
INSR	NM_000208	Insulin receptor	3.25	2.60	1.75
IRS2	NM_003749	Insulin receptor substrate 2	1.55	2.00	2.97
MAP2K1	NM_002755	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	0.43	0.35	0.57
PCK1	NM_002591	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	0.33	0.29	0.86
PDK2	NM_002611	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	0.50	0.40	0.56
PYCARD	NM_013258	PYD and CARD domain containing	1.37	0,830	0.44
SLC27A1	NM_198580	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	1.80	2.02	2.07
SREBF1	NM_004176	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	0.60	0.48	0.76
TNF	NM_000594	Tumor necrosis factor	0.26	0.40	0.42
UCP1	NM_021833	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	1.42	4.94	6.05
VLDLR	NM_003383	Very low density lipoprotein receptor	0.41	0,53	0.57



Şekil 4.7. Timokinon dozlarından en az iki dozda etkilenen genlerin grafiksel gösterimi

Tablo 4.5. Timokinon dozlarının en az iki dozundan etkilenen genlerin biyoinformatik analizi.

Mekanizma/Yolaklar	P-değeri	Etkilenen Genler
Adipositokin Sinyal Yolağı (KEGG Pathway)	4.4×10^{-4}	IRS2, PCK1, TNF, AKT3
İnsülin Sinyal Yolağı (KEGG Pathway)	2×10^{-4}	INSR, IRS2, MAP2K1, AKT3, PCK1
Tip II Diyabet (KEGG Pathway)	5.2×10^{-3}	INSR, IRS2, TNF

İnsülin direnç modeli oluşturulan HepG2 hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda TQ uygulaması sonucu yapılan real-time PCR çalışmasında insülin direnç paneli üzerinde insülin sinyal yollarıyla ilişkili 84 genin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Yapılan çalışma TQ 12,5 µM konsantrasyonuyla yapılan çalışmada 2 kat artan / azalan genler Şekil 4.4.b.'de gösterilmiştir. TQ 25 µM konsantrasyonuyla yapılan çalışmada 2 kat artan / azalan genler Şekil 4.5.b.' da gösterilmiştir. çalışma TQ 50 µM konsantrasyonuyla yapılan çalışmada 2 kat artan / azalan genler Şekil 4.6.b.' de gösterilmiştir.

Gen ekspresyon seviyelerinde 2 kat artan/azalan genlerin listesinde yapılan ayrıntılı biyoinformatik analiz sonucu farklı sinyal yollarıyla olan bağlantıları Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Ayrıca TQ dozlarından en az iki dozda etkilenen genler Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. TQ'un en az iki dozunda etki gösteren genlerin biyoinformatik analizi Tablo 4.5.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. RT² PZR İnsan insülin direnç paneli kullanarak HepG2 hücrelerine uygulanan TQ' un Global gen ekspresyon profilinin biyoinformatik analiz sonuçları.

Mekanizma/Yolaklar	P-değeri	Etkilenen Genler
Sitokin- sitokin reseptör etkileşimi	$1,7 \times 10^{-5}$	CCR4, CCR5, CXCR3, CXCR4, IL1R1, IL18R1, IL6, TNF- α
Pozitif transport düzenleyici	$1,9 \times 10^{-5}$	PYCARD, APOE, INSR, IRS2, IL6, TNF- α
İnsülin uyarımına cevap	$1,9 \times 10^{-5}$	INSR, IRS2, PCK1
Sitokin bağlama	7×10^{-7}	CCR4, CCR5, CXCR3, CXCR4, IL1R1, IL18R1
Adipositokin sinyal yolağı	$7,3 \times 10^{-5}$	ACACB, IRS2, PCK1, TNF- α , AKT3
Glukoz metabolik süreci	$1,6 \times 10^{-3}$	IRS2, PCK1, PDK2, TNF- α
Glukoz alımı düzenlenmesi	$1,2 \times 10^{-3}$	INSR, IRS2, TNF- α
Taşınım pozitif düzenlenmesi	$1,9 \times 10^{-5}$	PYCARD, APOE, INSR, IRS2, IL6, TNF- α

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Timokinon, çörek otu yağının en önemli biyoaktif bileşeni olup, *in vitro* ve *in vivo* yapılan pek çok çalışma ile TQ' un anti-diyabetik etkisi araştırılmıştır (6, 175-177). Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar TQ' un anti-diyabetik etkisini ortaya koymuştur (175). TQ anti-diyabetik etkisini temel olarak insülin direncini zayıflatarak göstermektedir. Bunun sonucunda kan glukoz seviyelerinde önemli oranda düşüşe neden olduğu belirtilmiştir (6, 176, 177).

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisinde meydana gelen bozukluklar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, bunun sonucunda hiperglisemiye neden olan kronik bir metabolizma hastalığıdır (1, 2).

Yapılan bir çalışmada, TQ' un HepG2 hücre hatları üzerine toksik etkisi araştırılmıştır. HepG2 hücrelerine TQ 1, 10, 25, 50, 100 μM olarak 24 saat uygulanarak sitotoksisite incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda TQ' un IC_{50} değeri 34 μM olarak bulunmuştur. TQ' un artan konsantrasyonunun, pro-apoptotik mitokondriyal sinyal yolağının inaktif hale getirilmesinde rolü olan Akt fosforilasyonunu inaktive ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (178). Yapılan başka bir çalışmada da TQ' un HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkisine bakılmış ve IC_{50} değeri 12,5 μM olarak bulunmuştur (96). Yaptığımız çalışmada ise, değişik konsantrasyonlarda uygulanan TQ' un HepG2 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve IC_{50} değeri 23,75 μM olduğu belirlenmiştir. Sitotoksisite deneylerinde sonuçların farklı çıkmasının nedeninin, çalışma başlangıcında hücre yoğunluklarının ve buna bağlı olarak ilaç metabolizmasının farklı olmasının neden olabileceğini düşünmekteyiz.

T2DM hastalığının başlangıcından önce bazı subklinik inflamatuvar reaksiyonlar gösterilmiştir. T2DM gelişmesinde rol oynayan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın merkez inflamatuvar sitokinleri olarak etki gösterdikleri belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 192 kişiden oluşan T2DM hasta grubu ile 384 kişiden oluşan kontrol grubu arasında sitokin düzeyinde karşılaştırmalar yapılmıştır (179). Çalışmada T2DM olan hastalarda plazmada IL-6 ve TNF- α düzeyleri kontrole göre yüksek bulunmuştur. Fakat IL-1 β plazma seviyelerinde herhangi bir farklılığa rastlanılmamıştır. İlginç bir şekilde, sitokin analizleri yapıldığında IL-1 β ve IL-6 arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Özel olarak dizayn edilen bir modelde, normal seviyelerdeki IL-1 β 'nin ve yüksek seviyelerde IL-6'nın, T2DM gelişimini yüksek oranda bağımsız olarak arttırdığı belirtilmiştir. (179).

Yapılan başka bir çalışma da ise, 20 T2DM hasta ile, 17 sağlıklı bireyin kan örneklerinde sitokin düzeyinde araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmada kanlar 24 saat *in vitro* ortamda lipopolisakkarit ile uyarılarak sitokin sekresyonları ölçülmüştür. Plazma IL-6 ve TNF- α seviyelerinde diyabetli hastalarda, kontrol grubuna göre önemli oranda artış bulunmuştur (180).

Yaptığımız çalışmalardaki bulgulara göre, TQ' un insülin direnç modeli üzerinde insülin direnç mekanizmasını arttırdığı bilinen TNF- α , IL-6 gibi sitokinlere etki ederek bu sitokinlerin miktarını azalttığı ve böylelikle olası insülin direnç mekanizmasının gelişimi engelleyebileceği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda TQ'un tüm dozlarda TNF- α seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir ve bu etki sayesinde HepG2 hücrelerinde insülin direncinin kırılmasında terapötik bir rolü olabileceği düşünülmektedir.

Cell ve ark., yaptığı çalışmada, L6 miyotüp hücre hattında, iskelet kas hücresinde ve insan primer miyotüp hücreleri üzerinde insülin direnci oluşturulmuş ve kemokin motif reseptörlerinin (C-C chemokine receptor types; CCRs) ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Çalışmada iskelet kas hücresinde uyarılan insülin direncinde kemokin motif reseptörlerinin ekspresyon seviyelerinin etkilendiği gösterilmiştir. CCRs'ler genel olarak immün hücrelerde kronik inflamasyonda inflamatuvar süreçlerde rol almaktadır. Kronik inflamasyon T2DM temel bir süreç olduğu için, bu reseptörler insülin direnci ve T2DM'de rol oynuyor olabilirler (181). Çalışmada ilginç olarak CCR4 ve CCR10 ekspresyon seviyelerinin insülin dirençli miyotüp hücrelerinde azaldığı görülmüştür.

CCR2'nin ekspresyon seviyeleri ise insülin dirençli miyotüp hücrelerinde arttığı belirtilmiştir (182).

Bizim bulgularımızda kemokin motif reseptörlerinden CCR4 geninin ekspresyon seviyesinde artma görülmüştür. Bu tür kemokinlerin tip 2 diyabet sürecinde rol aldığı göz önüne alınacak olursa, bu kemokin miktarında meydana gelen artışın insülin direncinin düzelmesi doğrultusunda rol oynayan mekanizmalardan bir tanesi olabileceğini tahmin etmekteyiz.

Yapılan başka bir çalışma, insülin sinyal yolağında önemli rol oynayan Akt ile ilgili çalışmadır. Çalışmada Akt izoformları olan Akt1, Akt2 ve Akt3 genlerinin diyabet üzerine olan etkisinin belirlenmesi için ilk etapta Akt2 nakavt fareler incelenmiştir (183). Yapılan çalışma sonucunda Akt2 eksikliğiyle beklenen diyabetik fenotipin, Akt1 ve muhtemelen Akt3'ün katkısıyla telafi edilebildiği ortaya konmuştur (183). Dummler ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada fareler üzerinde Akt2, Akt3 genleri eksik bırakılarak Akt1 geninin işlevi incelenmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda Akt2 ve Akt3'ten yoksun bırakılan farelerde kontrol grubuna göre glukoz ve insülin intoleranslarında ve vücut ağırlıklarında yaklaşık %25 oranında bir azalma görülmüştür. Aynı şekilde beyin ağırlıklarında %35 oranında, aynı şekilde testis oranlarında da %40 oranında bir azalmanın olduğunu belirlenmiştir. İlginç olarak Akt2 ve Akt3'ün ayrı ayrı olarak eksikliğinde yapılan çalışmalarda aynı sonuca ulaşılmadığı ve bunun neticesinde Akt2 ve Akt3'ün birbiri ile bağlantılı olabileceği vurgulanmıştır (184). Krook ve ark., yaptığı bir çalışmada ise yüksek konsantrasyonda insülin ile muamele edilen T2DM hastaların kas hücrelerinde Akt aktivasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (185). *In vitro* olarak yapılan başka bir çalışmada ise kas hücrelerinin yüksek doz insülin ile Akt aktivasyonlarını azalttığı belirtilmiştir (186).

Bizim bulgularımızda insülin direnci oluşturulan hücrelerde TQ' un insülin direncini etkileyerek Akt3 oranında ciddi miktarda artışa sebep olduğunu saptadık. Böylece TQ' un insülin direnci ile azalan Akt aktivasyonunu artırması sonucu insülin sinyal mekanizmasını etkileyerek glukoz alınımına önemli katkı sağladığı düşünülmektedir. Akt3 genelde beyin bölgesinde sık eksprese edilmesine rağmen, bilindiği üzere Akt2 ile koordineli bir sinyalizasyon ağı olması nedeniyle (Akt2 glukoz transportlarıyla ilişkilidir) glukoz transportlarına dolaylı yünden etki gösterebileceğini düşünmekteyiz. Böylece Akt3 gen ekspresyonunda meydana gelen artmanın insülin sinyal

mekanizmasının regülasyonuna katkı sağlayarak insülin direnç mekanizmasının zayıflamasına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Suzuki ve ark., diyabet esnasında belirlenen kolesterol biyosentezinde meydana gelen azalmanın doğrudan hiperglisemiye bağlı olarak değil beyin insülin eksikliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir (187). Yazarlar ayrıca sistemik insülinin aksine diyabetik farelerde beyinde sreb2 ve sreb1 genlerinde azalma olduğunu belirtmiştir (188). Diyabetli ratlarda yapılan başka bir çalışmada ise retinada, sreb2 ekspresyonu azalırken, sreb1 ekspresyonunda artma görülmüş, her ikisi de anti-diyabetik ajan ile normalize edilmesine rağmen sreb2 lokal olarak total insülin miktarını değiştirirken, Sreb1 de ise marjinal bir etki görülmediği belirtilmiştir (189).

Bizim yaptığımız çalışmada Sreb1 gen ekspresyon çalışmasında azalma gözlemlenmiştir. Sreb1 beyinde kolesterol ile ilişkili olan bir gen olduğu belirtilmiştir (189). TQ maddesinin kolesterol ile ilişkili Sreb1 geninin ekspresyonunu etkileyerek kolesterolü pozitif yönde düzenlemesine katkı sağladığını düşünmekteyiz. Benzer şekilde dolaylı olarak da insülin sinyalizasyonunu etkilediğinden, TQ bu sinyalizasyonun onarımına katkı sağladığını düşünmekteyiz. Sreb1 geninin Akt3 ile bir sinyalizasyon ağının olabileceği ve bu şekilde etki gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Eşleşmemiş protein 1 (uncoupling protein 1; UCP1) 'in, T2DM ve/veya obezite ile ilişkili mekanizmalarda, mitokondride ROS üretiminin azaltılmasında, diyetle ilgili termogenezin düzenlenmesinde, kısacası metabolik ve enerji dengesinin sağlanmasında önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (190-192). Yapılan UCP1 gen polimorfizmi çalışmalarında, UCP1 geninde -3826A/G (rs1800592) polimorfizminin T2DM ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (193, 194). Fukuyama ve ark., T2DM hastalığı teşhisi konan Japon hastalarda UCP1 -112A/C polimorfizminin insülin direnci ve hepatik lipid içeriğinin artırılmasıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (195). UCP1'in ayrıca MAPK sinyal yolağını ve lizozomal sinyal yolağı ile ilişkili düzenleyici rol oynadığı da belirtilmiştir (191, 192). Li ve ark., iskelet kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada UCP1 ekspresyonunun AMPK pozitif regülasyonunu sağlayarak diyetle ilgili obezite ve insülin direncinin önlenmesini, glukoz alımında artış sağladığı belirtilmiştir (196, 197).

Yaptığımız mevcut çalışmada TQ' un miktarına bağlı olarak UCP1 gen ekspresyon seviyesinde bir artış meydana geldiği görülmüştür. Böylece TQ' un UCP1 geni

üzerinden MAPK sinyal yolağını etkileyerek insülin sinyal iletimine pozitif yönde katkı sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca UCP1 geninin AMPK sinyal yolağı ile glukoz transportlarını etkileyerek, insülin direncinin etkisi zayıflatarak, glukoz metabolizmasının düzenlenmesine katkı sağladığı da düşünülmektedir.

Huang ve ark., tarafından yapılan çalışmada farelerde adipoz dokuda APOE geninin seçici olarak bastırılması sonucunda açlık lipid, insülin ve glukoz düzeylerinde azalma görüldüğü bununda insülin hassasiyetinin artmasıyla tutarlı olduğu belirtilmiştir (198). Yaptığımız çalışmada APOE geninin TQ düşük dozunda artma olduğu, diğer dozlarda ilginç olarak azaldığı görülmektedir. Bu noktada APOE geni lipid metabolizmasında önemli bir etken olduğundan, TQ' un lipid metabolizmasını düzenlemede ve buna bağlı olarak glukoz ve enerjinin de açığa çıkması noktasında etki gösterdiği düşünülmektedir. TQ doz miktarının artmasıyla lipid metabolizmasında doza bağlı olarak toksisite oluştuğundan dolayı APOE seviyesinde azalmanın gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

İnsülin direnci pankreastaki beta hücre kaybı ile insülin miktarında meydana gelen azalmayla ilişkili olarak T2DM oluşumuna neden olmaktadır. İnsülin reseptor substratları (IRS) T2DM mekanizmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca IRS' ları, insülin ve diğer sitokinler için insülin sinyal yolağı ile ilgili başlatıcı sinyallere aracılık edebileceği ifade edilmiştir (199). Farelerde IRS1 geninde meydana gelen bozukluğun büyümeyi geciktirdiği, ancak diyabeti ortaya çıkarmayacağı, çünkü gelişen hafif insülin direncini telafi etmek amacıyla insülin salgısının artacağı belirtilmiştir (200, 201). Withers ve ark., IRS-2 geninin etkisini bozarak yaptıkları çalışmada, periferik insülin sinyalizasyonunda ve pankreas beta hücre fonksiyonunda bozulmalar meydana geldiğini göstermektedir. Buna bağlı olarak insülin direnci glukoz homeostasisinin bozulmasına neden olmaktadır (202).

Juan ve ark., IRS-2 eksik farelerde yaptıkları çalışmada beta hücre kaybı ve insülin direncine bağlı olarak diyabet geliştiğini belirtmişlerdir. Hepatosit büyüme faktörü aktivitesi IRS-1 ve IRS-2 yoksun olan transgenik farelerin beta hücrelerinde, PI3K sinyal yolağının aktive eder. Aktive olan PI3K sinyal yolağı, beta hücreleri içerisinde aşırı ekspresyonu sağlayarak beta hücrelerinin çoğalmalarını, hayatta kalma ve kütle miktarlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (203). Ayrıca IRS-2 eksik olan

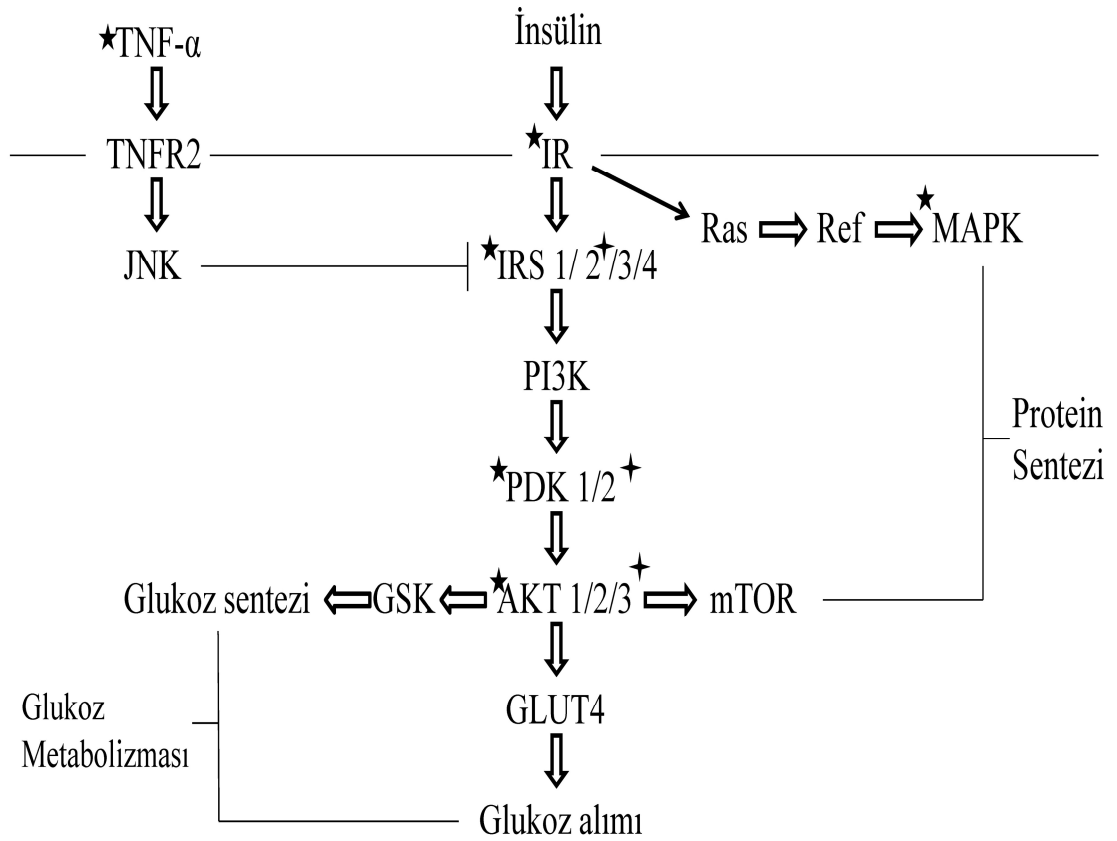
transgenik farelerde pdx-1 pozitif regüle olduğu, Akt/FoxO1 fosforilasyonu ve p27 negatif regülasyonu olduğu gösterilmiştir (203).

Hashimoto ve ark., endotel hücre spesifik IRS-2 bozulmuş fare modelinde glukoz, arjinin, glukagon kaynaklı insülin sekresyonu ve glukoz intoleransının bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu fare modelinde adacık kan akışının da bozulduğu, enalapril maleat adlı ilaç ile muamele edildiğinde ise, kan akışını arttırıcı etkisi olduğu aynı zamanda insülin sekresyonunu da düzene koyduğu belirtilmiştir (204).

Olivera ve ark., IRS-2 geninden yoksun bırakılan fare modelinde yaptıkları çalışmada, IRS-2 eksikliğinin periferik insülin direnci ve hepatik glukoneogenez fonksiyonunu bozarak diyabete neden olduğunu, aynı zamanda pankreas beta hücrelerinde de azalmaya sebep olduğunu gözlemlemişlerdir (205).

Bizim yaptığımız çalışmada insülin direnç modelinde IRS2 ve IGF1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli oranda artma görülmüştür. Görülen bu artış literatürde yapılan araştırmalar ile örtüşmektedir. Böylece TQ' un INSR ve buna bağlı olarak IRS2 ve IGF1 genlerindeki ekspresyon artışı ile insülin miktarını ve bununla ilişkili beta hücrelerinin düzenlenmesi sağlayarak, T2DM oluşumunu inhibe edebileceği düşünülmektedir. Ayrıca beta hücrelerinin sağkalım oranları ve artış miktarlarına yönelik yapılacak olan *in vivo* çalışmalar ile de TQ' un etkin olduğu metabolik süreçlerin ve yan etkilerinin daha iyi saptanabilmesinin mümkün olduğunu düşünmekteyiz. İnsülin sinyal yolağında önemli fonksiyonları olan insülin reseptör subsratları, AKT ve mTOR' un TQ tarafından etkilendiğini göz önüne alacak olursak, TQ' un, T2DM da etkili olan genlerin sinyalizasyonuna etki ettiğini söyleyebiliriz (Şekil 5.1.)

Mevcut çalışma insülin dirençli HepG2 hücreleri üzerinde TQ etkisinin gen ekspresyon düzeyinde incelenmesi açısından ilk olma özelliği taşımaktadır. TQ' un T2DM ile ilişkili insülin sinyal yollarını etkileyen anahtar genlerin ekspresyon seviyelerinde meydana getirdiği artış/azalış dikkat çekici bir sonuçtur. Böylece T2DM hastalığıyla bağlantılı genler incelenerek TQ' un olası etki mekanizmaları incelenmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca TQ' un gösterdiği bu önemli etkinin *in vivo* çalışmalarla daha ayrıntılı araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda ilerleyen süreçlerde, TQ' un terapötik bir ajan olarak kullanılmasını öngörmekteyiz.



Şekil 5.1. İnsülin sinyal yolağındaki genlerden TQ' un etkilediği temel genlerin şematik gösterimi (206) TQ' un etkilediği genler "★" ile gösterilmiştir. Ayrıca spesifik olarak "☆" işareti ile etkilediği genin çeşidi gösterilmiştir (206'nolu kaynaktan modifiye edilerek alınmıştır).

6. KAYNAKLAR

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37 :S81-90.
2. Kerner W, Bruckel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122:384-386.
3. Roden M. [Diabetes mellitus: Definition, classification and diagnosis]. *Wien Klin Wochenschr* 2012;124:1-3.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35:S64-71.
5. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2009;85:830-834.
6. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, et al. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *Int Immunopharmacol* 2005;5:195-207.
7. Hu X, Wang S, Xu J, et al. Triterpenoid saponins from *Stauntonia chinensis* ameliorate insulin resistance via the AMP-activated protein kinase and IR/IRS-1/PI3K/Akt pathways in insulin-resistant HepG2 cells. *Int J Mol Sci* 2014;15:10446-10458.
8. Kanter M. Effects of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochem Res* 2008;33:87-96.

9. Mu GG, Zhang LL, Li HY, Liao Y, Yu HG. Thymoquinone Pretreatment Overcomes the Insensitivity and Potentiates the Antitumor Effect of Gemcitabine Through Abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR Regulated Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci* 2014;60:1067-1080.
10. Schneider-Stock R, Fakhoury IH, Zaki AM, El-Baba CO, Gali-Muhtasib HU. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discovery Today* 2014;19:18-30.
11. Woo CC, Hsu A, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB. Thymoquinone Inhibits Tumor Growth and Induces Apoptosis in a Breast Cancer Xenograft Mouse Model: The Role of p38 MAPK and ROS. *PLoS One* 2013;8:e75356.
12. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)* 2009;11:373-381.
13. El Gazzar MA, El Mezayen R, Nicolls MR, Dreskin SC. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NF-kappaB nuclear transactivation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770:556-564.
14. Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, et al. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum* 2003;39:440-445.
15. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000;14:323-328.
16. Fouad AA, Jresat I. Thymoquinone therapy abrogates toxic effect of cadmium on rat testes. *Andrologia* 2015;47:417-426
17. Cikman O, Taysi S, Gulsen MT, et al. The Radio-protective effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Thymoquinone in rats exposed to total head irradiation. *Wien Klin Wochenschr* 2015;127:103-108.
18. Al-Malki AL, Sayed AA. Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa-beta. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:282.
19. Aycan IO, Tufek A, Tokgoz O, et al. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Surg* 2014;12:213-218.

20. Suddek GM. Protective role of thymoquinone against liver damage induced by tamoxifen in female rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:640-644.
21. Badr G, Alwasel S, Ebaid H, Mohany M, Alhazza I. Perinatal supplementation with thymoquinone improves diabetic complications and T cell immune responses in rat offspring. *Cell Immunol* 2011;267:133-140.
22. Andreelli F, Jacquier D, Troy S. Molecular aspects of insulin therapy in critically ill patients. *Curr Opin in Clin Nutr and Metab Care* 2006;9:124-130.
23. Gearhart MM, Parbhoo SK. Hyperglycemia in the critically ill patient. *AACN Clin Issues* 2006;17:50-55.
24. Alberti KGMM, Zimmet PZ, Consultation W. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-553.
25. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:84-87.
26. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2008;358:2433-2446.
27. Misur I, Zarkovic K, Barada A, et al. Advanced glycation endproducts in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy. *Acta Diabetologica* 2004;41:158-166.
28. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33:62-69.
29. International Diabetes Federation Annual Report 2013. Available from: <http://www.idf.org/publications/annual-report> (26.07.2015).
30. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol* 2013;28:169-180.
31. Satman I, Imamoglu S, Yilmaz C, Grp AS. A patient-based study on the adherence of physicians to guidelines for the management of type 2 diabetes in Turkey. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;98:75-82.
32. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4-14.

33. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 2010;32:457-467.
34. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010;464:1293-1300.
35. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-846.
36. Gastaldelli A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93:60-65.
37. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:476279.
38. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002;32:14-23.
39. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-461.
40. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-846.
41. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:98-107.
42. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 2011;378:169-181.
43. Tzoulaki I, Molokhia M, Curcin V, et al. Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: retrospective cohort study using UK general practice research database. *BMJ* 2009;339.
44. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365:1333-1346.
45. Alfadhli EM. Gestational diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2015;36:399-406.
46. Feridun K AÇ, Benan K, İlknur İG. Gestasyonel Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisi. *The New J Med* 2009;26:134-138.
47. Available from: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-156Z.html (31.07.2015).

48. Zang MW, Zuccollo A, Hou XY, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 2004;279:47898-47905.
49. Lin CL, Lin JK. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:930-939.
50. Nakajima K, Yamauchi K, Shigematsu S, et al. Selective attenuation of metabolic branch of insulin receptor down-signaling by high glucose in a hepatoma cell line, HepG2 cells. *J Biol Chem* 2000;275:20880-20886.
51. Sun C, Zhang F, Ge X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 2007;6:307-319.
52. Ma X, Zhou F, Chen Y, et al. A polysaccharide from *Grifola frondosa* relieves insulin resistance of HepG2 cell by Akt-GSK-3 pathway. *Glycoconj J* 2014;31:355-363.
53. Liu XH, Dong, Z., Fu, J.M.,. Effects of batenphrine on insulin resistance in HepG2 cells and its mechanism. *Chin J New Drugs* 2008;12:1026-1029.
54. Xie W, Wang W, Su H, et al. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006;143:429-435.
55. Qiu Chen YX, Zongyin Qiu. Establishment of Insulin-resistant HepG2 Cell Model Induced by High Concentration of Insulin. *Chin J Cell Biol* 2005;27:334-338.
56. Cobelli C, Man CD, Sparacino G, et al. Diabetes: Models, Signals, and Control. *IEEE Rev Biomed Eng* 2009;2:54-96.
57. Shilyansky J, Fisher S, Cutz E, Perlman K, Filler RM. Is 95% pancreatectomy the procedure of choice for treatment of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of the neonate? *J Pediatr Surg* 1997;32:342-346.
58. Sullivan SJ, Maki T, Borland KM, et al. Biohybrid Artificial Pancreas - Long-Term Implantation Studies in Diabetic, Pancreatectomized Dogs. *Science* 1991;252:718-721.
59. Bell RH, Hye RJ. Animal-Models of Diabetes-Mellitus - Physiology and Pathology. *J Surg Res* 1983;35:433-460.

60. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J* 1982;208:513-515.
61. Lenzen S, Panten U. Alloxan - History and Mechanism of Action. *Diabetologia* 1988;31:337-342.
62. Elsner M, Gurgul-Convey E, Lenzen S. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* 2006;41:825-834.
63. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-546.
64. Alarcon-Aguilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, et al. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol* 2000;69:207-215.
65. Chen H, Feng R, Guo Y, Sun L, Jiang J. Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma Polygonati Odorati* in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2001;74:225-229.
66. Gruppuso PA, Boylan JM, Posner BI, Faure R, Brautigan DL. Hepatic protein phosphotyrosine phosphatase. Dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors in normal and alloxan diabetic rats. *J Clin Invest* 1990;85:1754-1760.
67. Katsumata K, Katsumata K, Katsumata Y. Protective Effect of Diltiazem Hydrochloride on the Occurrence of Alloxan-Induced or Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Horm Metab Res* 1992;24:508-510.
68. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull* 2006;29:1110-1119.
69. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216-226.
70. Weide LG, Lacy PE. Low-Dose Streptozocin-Induced Autoimmune Diabetes in Islet Transplantation Model. *Diabetes* 1991;40:1157-1162.
71. Cakmak A, Yemisci M, Koksoy C, et al. Statin pre-treatment protects brain against focal cerebral ischemia in diabetic mice. *J Surg Res* 2007;138:254-258.
72. Sitasawad SL, Shewade Y, Bhonde R. Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic state in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol* 2000;73:71-79.

73. Grover JK, Vats V, Rathi SS, Dawar R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 2001;76:233-238.
74. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *In Vivo* 2009;23(2):245-258.
75. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res* 2007;125:451-472.
76. Bates SH, Kulkarni RN, Seifert M, Myers MG. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:169-178.
77. Durham HA, Truett GE. Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats. *Am J Physiol* 2006;290:652-658.
78. Pick A, Clark J, Kubstrup C, et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 1998;47:358-364.
79. Cobelli C. Diabetes: Models, Signals and Control. 13th Imeko Tc1-Tc7 Joint Symposium 2010;238.
80. Silva APS, Guimaraes DED, Mizurini DM, et al. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids* 2006;41:535-541.
81. Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:873-893.
82. Marullo L, Moustafa JSE, Prokopenko I. Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Glycaemic Traits. *Curr Diab Rep* 2014;14:551.
83. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1249-1253.
84. Dauksas E, Venskutonis PR, Sivik B. Comparison of oil from *Nigella damascena* seed recovered by pressing, conventional solvent extraction and carbon dioxide extraction. *J Food Sci* 2002;67:1021-1024.
85. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1749-1770.

86. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, et al. Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention. *Planta Medica* 2008;74:1560-1569.
87. Baytop T. Geçmişte ve Bugün Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1999;s 550.
88. Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, et al. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutr Res* 2005;25:673-680.
89. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, et al. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci* 2005;79:219-223.
90. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of langerhans by *Nigella sativa* L. in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Tohoku J Exp Med* 2003;201:213-219.
91. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec* 2004;279A:685-691.
92. Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic beta-cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes* 2010;2:256-266.
93. Al-Enazi MM. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice. *Pak J Biol Sci* 2007;10:3115-3119.
94. ElKhoely A, Hafez HF, Ashmawy AM, et al. Chemopreventive and therapeutic potentials of thymoquinone in HepG2 cells: mechanistic perspectives. *J Nat Med* 2015;69:313-323.
95. Xu DS, Ma Y, Zhao BL, et al. Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B pathways in human cholangiocarcinomas both in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2014;31:2063-2070.
96. Sakalar C, Yuruk M, Kaya T, et al. Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Mol Cell Biochem* 2013;383:243-251.

97. Talib WH, Abukhader MM. Combinatorial Effects of Thymoquinone on the Anticancer Activity and Hepatotoxicity of the Prodrug CB 1954. *Sci Pharm* 2013;81:519-530.
98. El-Mahdy MA, Zhu QZ, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer* 2005;117:409-417.
99. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908-7916.
100. van Ryn J, Trummlitz G, Pairet M. COX-2 selectivity and inflammatory processes. *Curr Med Chem* 2000;7:1145-1161.
101. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004;19:431-436.
102. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett* 2003;143:133-143.
103. Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytother Res* 2007;21:895-897.
104. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1749-1770.
105. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, et al. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biol Pharm Bull* 2001;24:307-310.
106. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology* 2000;143:219-226.
107. Khattab MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res* 2007;21:410-414.
108. Galaly SR, Ahmed OM, Mahmoud AM. Thymoquinone and curcumin prevent gentamicin-induced liver injury by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Physiol Pharmacol* 2014;65:823-832.
109. Mansour MA. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sci* 2000;66:2583-2591.

110. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res* 2009;23:1295-1298.
111. Jaswal A, Sinha N, Bhadauria M, Shrivastava S, Shukla S. Therapeutic potential of thymoquinone against anti-tuberculosis drugs induced liver damage. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:779-786.
112. Majdalawieh AF, Fayyad MW. Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *Int Immunopharmacol* 2015;28:295-304.
113. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res* 1998;18:1527-1532.
114. Badr G, Lefevre EA, Mohany M. Thymoquinone Inhibits the CXCL12-Induced Chemotaxis of Multiple Myeloma Cells and Increases Their Susceptibility to Fas-Mediated Apoptosis. *PLoS One* 2011;6:e23741.
115. Das S, Dey KK, Dey G, et al. Antineoplastic and Apoptotic Potential of Traditional Medicines Thymoquinone and Diosgenin in Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 2012;7:e46641.
116. Yi TF, Cho SG, Yi ZF, et al. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1789-1796.
117. Arafa ESA, Zhu QZ, Shah ZI, et al. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutat Res* 2011;706:28-35.
118. Hussain AR, Ahmed M, Ahmed S, et al. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radic Biol Med* 2011;50:978-987.
119. Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Exp Biol Med* 2010;235:751-760.

120. Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, et al. Effects of Thymoquinone in the Expression of Mucin 4 in Pancreatic Cancer Cells: Implications for the Development of Novel Cancer Therapies. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1419-1431.
121. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India* 2007;55:19-25.
122. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.
123. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283:1544-1548.
124. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cellular Biol* 2004;24:5434-5446.
125. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 2001;276:47944-47949.
126. Friedman JE, Ishizuka T, Liu S, et al. Reduced insulin receptor signaling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Phys-Endoc Metabol* 1997;273:1014-1023.
127. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:85-96.
128. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, et al. Structure of the Insulin-Receptor Substrate Irs-1 Defines a Unique Signal Transduction Protein. *Nature* 1991;352:73-77.
129. Sun XJ, Wang LM, Zhang YT, et al. Role of Irs-2 in Insulin and Cytokine Signaling. *Nature* 1995;377:173-177.
130. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997;272:11439-11443.
131. Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, et al. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 1998;273:10726-10732.

132. Cai DS, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee JS, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 2003;278:25323-25330.
133. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, et al. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 2000;407:202-207.
134. Lehr S, Kotzka J, Herkner A, et al. Identification of major tyrosine phosphorylation sites in the human insulin receptor substrate Gab-1 by insulin receptor kinase in vitro. *Biochemistry* 2000;39:10898-10907.
135. Gustafson TA, He WM, Craparo A, Schaub CD, Oneill TJ. Phosphotyrosine-Dependent Interaction of Shc and Insulin-Receptor Substrate-1 with the Npey Motif of the Insulin-Receptor Via a Novel Non-Sh2 Domain. *Mol Cell Biol* 1995;15:2500-2508.
136. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999;103:931-943.
137. Myers MG, Jr., Mendez R, Shi P, et al. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:26908-26914.
138. Algenstaedt PM, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:23696-23702.
139. Fei ZL, Dambrosio C, Li SW, Surmacz E, Baserga R. Association of Insulin-Receptor Substrate-1 with Simian-Virus-40 Large T-Antigen. *Molecular and Cellular Biology* 1995;15:4232-4239.
140. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005;2005:pe4.
141. Bouzakri K, Roques M, Gual P, et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1319-1325.

142. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 2004;166:213-223.
143. Miller BS, Shankavaram UT, Horney MJ, et al. Activation of cJun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase by insulin. *Biochemistry* 1996;35:8769-8775.
144. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:183-190.
145. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002;420:333-336.
146. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000;275:9047-9054.
147. Craparo A, Freund R, Gustafson TA. 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem* 1997;272:11663-11669.
148. Bard-Chapeau EA, Hevener AL, Long S, et al. Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat Med* 2005;11:567-571.
149. Hirashima Y, Tsuruzoe K, Kodama S, et al. Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol* 2003;179:253-266.
150. Rui LY, Yuan MS, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002;277:42394-42398.
151. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, et al. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000;6:77-86.
152. Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative Pathway of Insulin Signaling in Mice with Targeted Disruption of the Irs-1 Gene. *Nature* 1994;372:186-190.
153. Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, et al. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest* 2004;114:917-927.

154. Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, et al. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necln. *Nat Cell Biol* 2005;7:601-U622.
155. Sesti G, Federici M, Hribal ML, et al. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *Faseb Journal* 2001;15:2099-2111.
156. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900-904.
157. Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21:2521-2532.
158. Huang C, Thirone ACP, Huang XD, Klip A. Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in L6 myotubes. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:19426-19435.
159. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:718-727.
160. Sun XJ, Pons S, Wang LM, et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol* 1997;11:251-262.
161. Miura A, Sajan MP, Standaert ML, et al. Insulin substrates 1 and 2 are corequired for activation of atypical protein kinase C and Cbl-dependent phosphatidylinositol 3-kinase during insulin action in immortalized brown adipocytes. *Biochemistry* 2004;43:15503-15509.
162. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 2001;21:26-38.
163. Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Biol Chem* 1998;273:11548-11555.
164. Ogihara T, Shin BC, Anai M, et al. Insulin receptor substrate (IRS)-2 is dephosphorylated more rapidly than IRS-1 via its association with phosphatidylinositol 3-kinase in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 1997;272:12868-12873.

165. Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, van Obberghen E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 1996;271:5980-5983.
166. Kozma SC, Thomas G. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* 2002;24:65-71.
167. Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, et al. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol Cell Biol* 2005;25:1135-1145.
168. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-1274.
169. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098-1101.
170. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57:945-957.
171. American Type Culture Collection A. Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx> (31.07.2015).
172. O'Neil RG, Wu L, Mullani N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol* 2005;7:388-392.
173. Zou CH, Wang YJ, Shen ZF. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods* 2005;64:207-215.
174. Melstrom LG, Salabat MR, Ding XZ, et al. Apigenin inhibits the GLUT-1 glucose transporter and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2008;37:426-431.
175. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol* 2012;83:443-451.
176. Farah KM, Shimizu Y, Shiina T, et al. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci* 2005;79:219-223.
177. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2009;85:830-834.

178. Attoub S, Sperandio O, Raza H, et al. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundam Clin Pharmacol* 2013;27:557-569.
179. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52:812-817.
180. Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000;67:291-300.
181. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005;45(5):828-833.
182. Sell H, Kaiser U, Eckel J. Expression of chemokine receptors in insulin-resistant human skeletal muscle cells. *Horm Metab Res* 2007;39:244-249.
183. Chen WS, Peng XD, Wang Y, et al. Leptin deficiency and beta-cell dysfunction underlie type 2 diabetes in compound Akt knockout mice. *Mol Cell Biol* 2009;29:3151-3162.
184. Dummler B, Tschopp O, Hynx D, et al. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* 2006;26:8042-8051.
185. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 1998;47:1281-1286.
186. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 2010;25:119-129.
187. Suzuki R, Lee K, Jing E, et al. Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab* 2010;12:567-579.
188. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-1131.
189. Fort PE, Losiewicz MK, Reiter CE, et al. Differential roles of hyperglycemia and hypoinsulinemia in diabetes induced retinal cell death: evidence for retinal insulin resistance. *PLoS One* 2011;6:e26498.

190. Brondani LA, Assmann TS, Duarte GC, et al. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2012;56:215-225.
191. Azzu V, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci* 2010;35:298-307.
192. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44:946-965.
193. Kiec-Wilk B, Wybranska I, Malczewska-Malec M, et al. Correlation of the -3826A >G polymorphism in the promoter of the uncoupling protein 1 gene with obesity and metabolic disorders in obese families from southern Poland. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:477-490.
194. Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E, et al. Association of -3826 G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* 2000;43:242-244.
195. Fukuyama K, Ohara T, Hirota Y, et al. Association of the -112A>C polymorphism of the uncoupling protein 1 gene with insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:1212-1216.
196. Li B, Nolte LA, Ju JS, et al. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nat Med* 2000;6:1115-1120.
197. Fritah A, Steel JH, Parker N, et al. Absence of RIP140 Reveals a Pathway Regulating glut4-Dependent Glucose Uptake in Oxidative Skeletal Muscle through UCP1-Mediated Activation of AMPK. *PLoS One* 2012;7:e32520.
198. Huang ZH, Reardon CA, Getz GS, Maeda N, Mazzone T. Selective suppression of adipose tissue apoE expression impacts systemic metabolic phenotype and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res* 2015;56:215-226.
199. Myers MG, Jr., White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:615-658.
200. Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994;372:186-190.

201. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994;372:182-186.
202. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900-904.
203. Alvarez-Perez JC, Rosa TC, Casinelli GP, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates hyperglycemia and corrects beta-cell mass in IRS2-deficient mice. *Mol Endocrinol* 2014;28:2038-2048.
204. Hashimoto S, Kubota N, Sato H, et al. Insulin receptor substrate-2 (Irs2) in endothelial cells plays a crucial role in insulin secretion. *Diabetes* 2015;64:876-886.
205. Oliveira JM, Rebuffat SA, Gasa R, Gomis R. Targeting type 2 diabetes: lessons from a knockout model of insulin receptor substrate 2. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:613-620.
206. Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends in Endocrinol Metab* 2011;22:394-403.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sedat SEZEN

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi ve Yeri: 24.08.1990, Eminönü/İstanbul

Medeni Durumu: Bekar

e-posta: sedat.sezen@ymail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
38039, Melikgazi/Kayseri

EĞİTİM

Derece Tarihi	Kurum	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lisans Yandal	Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2012
Önlisans	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2012
Lise	İstanbul Şehremini Lisesi	2007

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012-Halen	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce (2012-KPDS: 83,75)

YAYINLAR

A. SCI,SSCI,AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. İzgi K, Iskender B, Jauch J, **Sezen S**, Cakir M, Charpentier M, Canatan H., and Sakalar C,. " Myrtucommulone-A Induces both Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cancer Cells", J Biochem Molecular Toxicology, DOI: 10.1002/jbt.21716,2015.

B.HAKEMLİ KONGRE / SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. İskender İzgi B., Şakalar Ç., İzgi K., Turan A. , **Sezen S.**, Aksu H., Cakir M., Kurt B., Canatan H., "The Combination Of Thymoquinone And Paclitaxel Shows Anti-Tumor Activity Both In Vitro And In Vivo Through The Modulation Of Genes Involved In Apoptosis, Cell Cycle, Tumor Suppression And Growth Factor-Cytokine Activity", EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, no.OP-02, pp.43-43

2. İzgi K., İskender İzgi B., Jauch J., **Sezen S.**, Çakir M. , Charpentier M., Canatan H., and Sakalar C., "Myrtucommulone-A Induces Both Extrinsic And Intrinsic Apoptotic Pathways In Cancer Cells. ", EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, no.OP-04, pp.45-45

3. Turan A. , Şakalar Ç., Kaya S., Aksu H., Çakir M. , Kurt B., **Sezen S.**, Canatan H., "Production Of A Monoclonal Antibody Specific For Amhr2 For The Use In Ovarian Cancer Immunotherapy ", EACR-sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 18-19 Mayıs 2015, no.PP-018, pp.75-75

4. İzgi K., İskender B., Şakalar Ç., Arslanhan A., **Sezen S.**, Canatan H., "Uroplakin 3A Proteininden Türetilen Antijenik Peptidin İki Farklı Adjuvanla İmmün Cevap Yanıtlarının Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi", Aşı Bilimi Kongresi, İzmir, Türkiye, 28-30 Nisan 2015, SB-14, pp-29.

5. Turan A. , Şakalar Ç., Kaya S., Aksu H., Çakir M. , Kurt B., **Sezen S.**, Canatan H., "Over Kanserde Üretilen AMHR2'nin Ekstrasellüler Bir Pepridini Hedef Alan Bir Monoklonal Kanser İmmünterapide Kullanılmak Üzere Üretilmesi", Aşı Bilimi Kongresi, İzmir, Türkiye, 28-30 Nisan 2015, SB-15, pp-30.