

**NİTRİK OKSİDİN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON,  
DİFERENSİYASYON VE AKTİN HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU  
ÜZERİNE ETKİLERİ: RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI**

**DOKTORA TEZİ**

**AHMET SENCER YURTSEVER**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN**

**KASIM-2017**

**NİTRİK OKSİDİN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON,  
DİFERENSIYASYON VE AKTİN HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU  
ÜZERİNE ETKİLERİ: RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI**

**DOKTORA TEZİ**

**AHMET SENCER YURTSEVER**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman  
Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR**

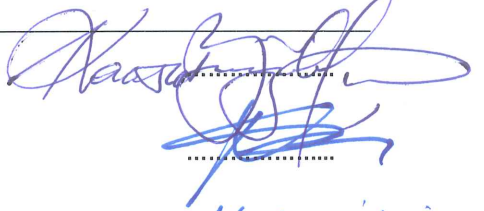




Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE F (ASY) 2009-1 DR no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Bu proje Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından  
TÜBİTAK-SBAG 110S451 no'lu proje olarak desteklenmiştir  
Tez No: 53

**MERSİN  
KASIM-2017**

## ONAY

Ahmet Sencer YURTSEVER tarafından Prof.Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR danışmanlığında hazırlanan "Nitrik oksidin preadipositlerde (3T3-L1) proliferasyon, diferensiyasyon ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkileri: Rho/Rho-kinaz yolağının olası katkısı" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 16. 11.2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans/Doktora/Tıpta Uzmanlık/Sanatta Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR	
Üye	Prof. Dr. Nuran ÖĞÜLENER	
Üye	Prof. Dr. Ata SEÇİLMİŞ	
Üye	Doç. Dr. İsmail ÜN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Rukiye Nalan TİFTİK	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır. 27.12.2017 2017/452

  
Prof.Dr. Banu Coşkun YILMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

17 Kasım 2017/ 17 November 2017

İmza / Signature



Öğrenci Adı ve Soyadı / Student Name and Surname

Ahmet Sencer YURTSEVER

## ÖZET

### NİTRİK OKSİDİN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON, DİFERENSİYASYON VE AKTİN HÜCRE İSKELETİ ORGANİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ: RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ OLASI ROLÜ

Ahmet Sencer Yurtsever tarafından yapılan bu tezde 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu, proliferasyonu ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine nitrik oksidin (NO) sentez/saliverilmesini artıran ajanların ve NO donörlerinin etkisi araştırıldı. Buna ek olarak bu olası etkinin yine preadipositlerin diferensiyasyonunda önemli bir sinyal ileti mekanizması olduğu görünen Rho/Rho-kinaz yoluyla iletilen ilişkisi incelendi.

Çalışmamızda bu amaçla, NO donörleri olarak DETA-NO [2,2'-(Hidroksinitrozohidrazono)bis-etanimin] ve sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) kullanıldı. Buna ek olarak NO sentez ve saliverilmesini artıran lipopolisakkarid ile Rho-kinaz aktivatörü lizofosfatidik asit (LPA) ve trombin'in ve ayrıca Nitrik oksit sentaz (NOS) enzim inhibitörü L-NAME'nin ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginin metil ester) ve Rho-kinaz enzim inhibitörleri Y-27632 ve H-1152'nin preadipositlerin (3T3-L1 hücrelerinin) proliferasyon, diferensiyasyon ve hücre iskeleti aktininin organizasyonu üzerine olan etkilerini araştırdık. Bu amaçla post-konfluent preadipositlere diferensiyasyon protokolünün çeşitli günlerinde (0-2, 2-4, 4-8, 0-8. günler) NO donörleri ve NOS indükleyicileri DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M),  $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M), LPS (10, 100 ng/ml), RhoA aktivatörleri LPA ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M), Trombin (1-5 U/ml), Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ( $10^{-5}$  M), H-1152 ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) uygulandı. Oil red O boyaması yapılarak 3T3-L1 hücrelerinin diferensiyasyonu değerlendirildi. Adiposit proliferasyonunu değerlendirmek için MTT testi, Rho-kinaz enzim ekspresyon ve aktivitesini değerlendirmek için Western blot yöntemi kullanıldı. Griess metodu ile nitrit/nitrat tayini yapıldı ve RhoA aktivitesini ölçmek için G-LISA yöntemleri kullanıldı. Aktin hücre iskeletindeki değişimler ise floresan boyama yöntemi ile değerlendirildi.

NO donörleri DETA-NO ve  $\text{NaNO}_2$ 'in, preadiposit diferensiyasyonu üzerine, uygulandıkları zaman aralıklarında, (0-2, 0-4, 4-8. günlerde) herhangi bir etkisi olmadı. Bununla birlikte iNOS sentezini artırdığı bilinen bakteriyel lipopolisakkarid (LPS), 0-2. Gün dışındaki diğer zaman aralıklarında diferensiyasyonu baskıladı. NOS inhibitörü L-NAME, diferensiyasyonu baskılamakla birlikte LPS ile kombine olarak uygulandığında LPS'nin oluşturduğu supresyonu önlemedi. Rho-kinaz (ROCK) enzim inhibitörü Y-27632, [(R)-(+)-trans-4-(1-Aminoetil)-N-(4-Piridil)sikloheksankarboksamid dihidroklorid] diferensiyasyonu stimüle etti. Rho/ROCK yolağının aktivasyonuna yol açtığı bilinen trombin, 3T3-L1 hücre diferensiyasyonunu suprese etti. Trombin, buna ek olarak Y-27632'nin oluşturduğu diferensiyasyon artışını önledi. Çalışmamızda kullanılan ajanların proliferasyon üzerine etkilerine gelince, Y-27632, 3T3-L1 hücrelerinde proliferasyonu baskıladı. Y-27632'nin LPA ile kombine olarak uygulanması bu etkiyi değiştirmedi.  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME, tek başına proliferasyon üzerine belirgin bir etki oluşturmamakla beraber 0-8 gün boyunca uygulandığında proliferasyonu azalttı. LPS ile L-NAME kombinasyonunun proliferasyon üzerine anlamlı bir etkisi olmadı. L-NAME, daha yüksek konsantrasyonda ( $5 \times 10^{-4}$  M), uygulandığında genellikle proliferasyonu baskıladı ancak 10 ve 100 ng/ml LPS ile kombine edilmesi, proliferasyon üzerine belirgin bir etki göstermedi. Öte yandan, trombin 1-5 U/ml konsantrasyonda, uygulandığında preadiposit proliferasyonunu değiştirmedi. Ancak 0-8. Gün aralığında aynı dozda trombin uygulanması, proliferasyonu stimüle etti. Y-27632, trombin tarafından oluşturulan proliferasyon artışını önledi.

Sonuç olarak 3T3-L1 hücrelerinin gerek proliferasyonunda ve gerekse diferensiyasyonunda nitrik oksit ve Rho/Rho-kinaz yolağının farklı zamanlarında (0-2-4-8. günlerde) farklı etkiler oluşturmaktadır.

Öte yandan, NO donör ve sentez/saliverilme artışı yapan ajanlar ile Rho/ROCK yolağını etkileyen ajanların RhoA ve ROCK aktivasyonu (LIM kinaz fosforilasyonu üzerinden) ile ROCK ve iNOS ekspresyonları üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde, LPS (10 ve 100 ng/ml), ROCK-2

enziminin ekspresyonunu artırdı. NOS inhibitörü L-NAME'nin ön uygulaması bu artışı ortadan kaldırmadı. Çalışmamızda ortaya çıkan ilginç bir nokta L-NAME'in tek başına uygulamasının ROCK ekspresyonunda up-regülasyon oluşturmamasıydı. Öte yandan, NO donörü DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) ROCK-2 ekspresyonları üzerine anlamlı etki göstermedi. LPS, her iki (10, 100 ng/ml) konsantrasyonda da 3T3-L1 hücrelerinde iNOS ekspresyonunu artırdı ve buna ek olarak uygulandıktan sonra 30. dakikada ROCK aktivitesinin bir göstergesi olan LIM kinaz fosforilasyonunda da bir artış oluşturdu. Ancak L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  M) ön uygulaması sonrası LPS uygulandığında, LIM kinaz fosforilasyonunda artış oluşmadı. L-NAME tek başına uygulandığında LIM kinaz fosforilasyonu üzerine etki göstermedi. İlginç olarak  $\text{NaNO}_2$ ,  $10^{-7}$  M konsantrasyonda uygulandığında LIM kinaz fosforilasyonunu arttırdı.

Başka bir deney serisinde ise nitrit/nitrat ölçümleri yapıldı. LPS uygulandığı her iki konsantrasyonda da nitrit/nitrat düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. L-NAME ile LPS'nin kombine uygulaması da nitrit/nitrat düzeylerinde bir değişiklik oluşturmadı. LPA ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulaması nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etki göstermedi. Buna karşın ROCK inhibitörü Y-27632 ( $10^{-5}$  M), 3T3-L1 nitrit/nitrat düzeylerinde anlamlı artışlar oluşturdu.

Elde edilen bulgular, inflamatuvar bir ajan olan LPS'nin iNOS indüksiyonu yaptığını ve bunun yanı sıra ROCK-2 enzim ekspresyonunda up-regülasyon oluşturduğunu ve LPS'nin bu etkisine NO'nun aracılık etmediğini göstermektedir; çünkü, LPS ile oluşturulan ROCK-2 up-regülasyonu L-NAME tarafından önlenmedi. Bunun dışında, DETA-NO, ROCK-2 ekspresyonunda belirgin bir değişiklik oluşturmadı. Sonuç olarak, LPS, ROCK-2 up-regülasyonuna yol açmaktadır ve bu etki olasılıkla NO dışında başka inflamatuvar mediyatör(ler) aracılığı ile olmaktadır.

Trombin ve Lizofosfatidik asit ve 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonunu anlamlı olarak artırdı. Trombin ile indüklenen RhoA aktivasyonunun göstergesi olan RhoA translokasyonu *Clostridium botulinum* ekzoenzimi C-3 tarafından kısmen bloke edildi. İlginç olarak NO donörleri DETA-NO ve  $\text{NaNO}_2$ , RhoA aktivasyonu üzerine herhangi bir etki oluşturmazken NO sentaz inhibitörü L-NAME RhoA translokasyonunda anlamlı artışlar oluşturdu.

NO donör ve sentez/salivericilerinin Aktin hücre iskeleti reorganizasyonu üzerine etkilerine gelince, NO donörleri, DETA-NO,  $\text{NaNO}_2$  ile RhoA aktivatörü LPA, hücre iskeleti aktininde belirgin bir şekil değişikliği oluşturmadı. Ancak NOS inhibitörü L-NAME, preadipositlerin aktininde hücre iskeletinde bir toplanma ve membran şekil değişikliği oluşturmuştur. Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632 uygulaması ise 3T3-L1 hücrelerinde belirgin uzamalar ve şekil değişiklikleri oluşturdu. Öte yandan 0-2. gün zaman aralığında DETA-NO ve  $\text{NaNO}_2$  uygulaması hücre iskeletinde bir değişiklik oluşturmazken LPA aktin hücre iskeletinde toplanmalar ve hücre şekil değişikliği meydana getirdi. DETA-NO ve  $\text{NaNO}_2$ , 0-4. ve 0-8 gün zaman aralığında uygulandığında aktin hücre iskeletinde belirginleşmeler, hücre sınırlarına çekilmeler, stres lifleri ve hücre hacminde artışlar oluşturdu. NOS inhibitörü L-NAME, 0-2, 0-4. ve 0-8. günlerde aktin hücre iskeletine üzerine etki göstermedi. ROCK inhibitörü Y-27632, 0-8. gün zaman aralığında uygulandığında lipid damlacıkların oluşumunu artırdı, bu da Y-27632'nin lipogenez stimüle ettiğini gösterebilir.

Sonuç olarak, 3T3-L1 preadipositlerin hücre iskeleti aktininin morfolojisi üzerine NO ve RhoA/Rho-kinaz yollarının etkiler oluşturduğu açık olarak görülmektedir. Ancak uygulamanın preadiposit diferensiyasyonun hangi günlerinde yapıldığına bağlı olarak bu etkiler değişebilmektedir. Bunun yanı sıra, birçok hücre tipinde de RhoA aktivasyonu oluşturan trombin ve LPA, 3T3-L1 preadipositlerde de RhoA translokasyonuna (aktivasyonuna) neden oldu.

**Anahtar Kelimeler:** Adiposit, Aktin hücre iskeleti, Diferensiyasyon, H-1152, LPA, LPS, Nitrik oksit, Proliferasyon, Rho-kinaz, Trombin, Y-27632.

**Danışman:** Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR, Mersin Üniversitesi, Tıbbi farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF NITRIC OXIDE ON PREADIPOCYTE (3T3-L1) PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, AND REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON: POSSIBLE ROLE OF RHO/RHO-KINASE SIGNALLING

In this thesis dissertation which performed by Ahmet Sencer Yurtsever, it is aimed to investigate possible effects of nitric oxide (NO) donors and the compounds inducing NO synthesis/release on the proliferation, differentiation and reorganization of actin cytoskeleton. Furthermore, we sought any relationship between NO signalling and Rho/Rho-kinase pathway that seems to be essential for pre/adipocytes metabolism.

In this purpose, NO donors and NO generators, DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M),  $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M), bacterial lipopolysaccharide (LPS, 10, 100 ng/ml), RhoA activators including lysophosphatidic acid (LPA,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) and thrombin (1-5 U/ml) as well as Rho-kinase inhibitors, Y-27632 ( $10^{-5}$  M), and H-1152 ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) were treated on 3T3-L1 cells at different time points of differentiation (0-2, 2-4, 4-8, 0-8. days). In order to assess pre/adipocyte proliferation, MTT cell analysis and for differentiation, Oil Red O staining were performed. To evaluate Rho-kinase activity and expression, Western blotting was used. Moreover, the detection of nitrite/nitrate levels and RhoA activity, Griess and G-LISA methods were respectively used. Finally, specific fluorescent staining was employed for the assessment of actin cytoskeleton reorganization.

NO donors, DETA-NO and  $\text{NaNO}_2$ , had no effects on preadipocyte differentiation at different day points tested (0-2<sup>nd</sup>, 0-4<sup>th</sup>, 4-8<sup>th</sup> days). The bacterial lipopolysaccharide known to induce iNOS suppressed the differentiation in general. The NOS inhibitor, L-NAME suppressed the differentiation; while, it did not prevent the suppressive effect of LPS. The Rho-kinase (ROCK) enzyme inhibitor, Y-27632, facilitated the differentiation. Thrombin, which has been reported to activate Rho/ROCK signalling decreased the differentiation. Moreover, it prevented the increase of the differentiation by the ROCK inhibitor, Y-27632. As to the effects of these agents over the preadipocyte proliferation, Y-27632 decreased the rate of proliferation of 3T3-L1 cells. The combination of Y-27632 with LPA did not differentiate this effect.  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME, had no effects of the proliferation at all time points except 0-8<sup>th</sup> day-application in which it suppressed the 3T3-L1 cell growth. The combination of LPS with L-NAME had no substantial changes on the proliferation. The higher concentration of L-NAME ( $5 \times 10^{-4}$  M) generally suppressed the growth but its combination with LPS had no effects. Another compound tested, thrombin also did not alter the growth rate at all time points except 0-8<sup>th</sup> day-application in which it boosted the proliferation, which was attenuated by the ROCK inhibitor, Y-27632.

In conclusion, nitric oxide and Rho/ROCK signalling seem to have differential effects on 3T3-L1 cell growth and differentiation at different application points (0-2<sup>nd</sup>, 0-4<sup>th</sup>, 4-8<sup>th</sup> days)

With regard to the effects of NO donors and generators as well as the agents that manipulate Rho/ROCK pathway on RhoA activation, ROCK expression and the reorganization of actin cytoskeleton, LPS (10, 100 ng/ml) upregulated ROCK-2 protein, which was not prevented by L-NAME pre-treatment. Interestingly, L-NAME alone did upregulate ROCK-2 too. NO donors, DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) did not significantly change the expression. In addition to ROCK-2, LPS also induced iNOS expression not to mention LIM kinase, which shows ROCK activation. However, under the condition in which L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  M) was pre-treated to 3T3-L1 cell, LPS did not upregulate LIM kinase as LPS alone did. L-NAME did not modify the phosphorylation of LIM kinase. Interestingly,  $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$  M) also increased LIM kinase phosphorylation.

In another sets of experiments, nitrite/nitrate level was detected as an index of NO production. LPS, in contrast to the iNOS induction, failed to elevate the nitrite/nitrate level. The combination of L-NAME with LPS did not also induce any changes. LPA ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) also did not

regulate these NO metabolites. However, the ROCK inhibitor, Y-27632 ( $10^{-5}$  M) dramatically elevated nitrite/nitrate level in the medium culturing 3T3-L1 cells.

Taken together, as an inflammatory agent, LPS up-regulated ROCK as well as iNOS. However the induction of iNOS by LPS was not modified in the presence of L-NAME, implying that NO may not be involved. Furthermore an NO donor, DETA-NO did not altered ROCK-2 expression. Overall, some inflammatory agents other than NO might take roles in the up-regulation of ROCK-2.

As to the effects of NO-donors, DETA-NO and  $\text{NaNO}_2$ , on preadipocyte cell shape changes and actin re-organization, either these NO donors or the RhoA activator, LPA induced no substantial changes in cytoskeleton actin re-organization and cell shape changes. In contrast, a NOS inhibitor, L-NAME (applied between 0-2 days) evoked the assembly of actin fibers and cell shape changes. The ROCK inhibitor, Y-27632 produced elongation of preadipocytes and cell shape changes in 3T3-L1 cells. On the other hand, DETA-NO and  $\text{NaNO}_2$ , applied between day 0-2 induced no cell shape changes. LPA elicited an assembly of actin fiber together and cell shape changes. However, both DETA-NO and  $\text{NaNO}_2$  applied for 4 and 8 days, caused a dense collection of actin fiber at the borders of cells, formation of stress fibers and an increase of cell volume. L-NAME, applied on 0-2, 0-4. and 0-8. days had no effects on cell cytoskeleton. The ROCK inhibitor, Y-27632 applied between 0-8 days, facilitated lipogenesis, so increase the appearance of lipid droplet in cells.

In conclusion, it seems that nitric oxide as well as Rho/ROCK signaling cascade may have a role on preadipocyte proliferation, differentiation and cell cytoskeleton. However, it differs based on the stage of preadipocyte differentiation. Moreover, known activator of RhoA in different kind of cell types, LPA and thrombin also induced a substantial increase in RhoA activation in preadipocytes.

**Keywords:** Adipocyte, Actin cytoskeleton, Differentiation, H-1152, LPA, LPS, Nitric oxide, Proliferation, Rho-kinase, Thrombin, Y-27632.

**Advisor:** Prof. Kansu BÜYÜKAFŞAR, Department of Medical Pharmacology, University of Mersin, Mersin.



## TEŞEKKÜR

Farmakoloji alanında eğitime başladığım günden itibaren, derin bilgisi ve engin sabrı ile beni aydınlatan ve doğruyu bulmam için yönlendiren, cesaretim kırıldığında yoluma devam etmem için beni destekleyen danışman hocam Sn. Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a;

Eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan ve verdiği değerli katkılar ile beni destekleyen Anabilim Dalımız öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. İsmail ÜN'e

Doktora eğitimim süresince aynı laboratuvarında birlikte çalıştığım, ihtiyaç duyduğum her anda değerli yardım ve desteklerini hiç çekinmeden veren ve eğitimleri sonrasında başarılarını her zaman takdirle izlediğim değerli arkadaşlarım Doç. Dr. A. Hakan KURT ve Yrd. Doç. Dr. R. Nalan TİFTİK'e;

Eğitimim sırasında yol arkadaşım olan ve değerli yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim Dr. Mehtap PEKTAŞ, Özge GÜLDALI, Dr. Ali BATUŞ, Berrin ÇETİN ve diğer arkadaşlarıma;

Tezimin deneysel çalışmalarının floresan boyama kısmında değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK'e;

Tezime başlamadan önce hücre kültürü ön deneyleri için ihtiyaç duyduğum 3T3-L1 hücrelerini göndererek çok değerli bir yardımda bulunan Prof. Dr. James R. BAMBURG'a;

Yaşamımın her anında yanımda olan ve doktora eğitimim boyunca bana destek olan Annem Nejla YURTSEVER, Babam Ahmet Kemal YURTSEVER ve kardeşlerim Dilek YURTSEVER BORA ve Didem YURTSEVER UĞURLU'ya;

Engin sabır ve koşulsuz büyük destekleri için eşim Dilek YURTSEVER ve kızım Nejla Nehir YURTSEVER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR ve SİMGELER	xix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>6</b>
2.1. Bir Epidemiyoloji Olarak Obezite	6
2.2. Yağ Dokusu	7
2.3. Yağ Dokunun Temel İşlevleri	9
2.4. Yağ Hücrelerinin Sınıflandırılması ve İşlevleri	10
2.5. Endokrin Bir Organ Olarak Yağ Doku	11
2.6. Yağ Doku Kökenli Hormonlar/Adipokinler	12
2.6.1. Leptin	12
2.6.2. Adiponektin	13
2.6.3. Adipolin	14
2.6.4. Visfatin	14
2.6.5. Omentin	14
2.6.6. Resistin	15
2.6.7. TNF- $\alpha$	15
2.6.8. IL-6	16
2.6.9. Retinol Bağlayan Protein-4	16
2.6.10. SFRP5 (Secreted Frizzled Related Protein 5)	16
2.6.11. PEDF (Pigment Epitelyum Kökenli Faktör)	17
2.6.12. Progranulin (PGRN)	17
2.6.13. aP2 (Adiposit Yağ Asidine Bağlanan Protein-2)	18
2.6.14. Apelin	18
2.7. Bir İnflamasyon Kaynağı Olarak Yağ Doku	20
2.8. Metabolik İşlevler Açısından Yağ Doku	21
2.9. Adiposit Diferensiyasyonu	21
2.10. Adiposit Diferensiyasyonunun Pozitifve Negatif Etkileri	22
2.11. 3T3-L1 Preadipositlerinin Diferensiyasyonu Sırasında Gen Ekspresyonu	23
2.12. Adiposit Diferensiyasyonu Evreleri	24
2.12.1. Yönlenme	24
2.12.2. Mitotik Klonal Ekspansiyon	25
2.12.3. Terminal Diferensiyasyon	26
2.13. G Proteinleri	27
2.13.1. Heterotrimerik G Proteinleri	27
2.13.2. Monomerik G Proteinleri	28
2.14. Rho Proteinleri	28
2.15. GTP-GDP Döngüsünün Düzenleyici Proteinleri	31
2.15.1. GAP	31
2.15.2. GEF	31
2.15.3. GDI	31
2.16. RhoA ve Alt Etkileri	32
2.17. Rho/Rho-kinaz Yolu	32

2.18. Aktin Hücre İskeleti	35
2.19. Rho/Rho-kinaz Yolağı ve Aktin Hücre İskeleti Reorganizasyonu	37
2.20. Hücrede Gelişimsel Süreçlerde Rho/Rho-kinaz Yolağının Etkisi	38
2.20.1. Diferensiyasyon ve Proliferasyon	38
2.20.2. Mitoz Bölünme ve Rho/Rho-kinaz Yolağı	39
2.21. LIM-Kinaz	40
2.22. Nitrik Oksit	44
2.22.1. Nitrik Oksidin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	45
2.22.2. Nitrik Oksidin Sentezi	46
2.22.3. Nitrik Oksit Sentaz İzofomları	49
2.22.3.1. eNOS (Endotelial Nitrik Oksit Sentaz, NOS3)	49
2.22.3.2. nNOS (Nöronal Nitrik Oksit Sentaz, NOS1)	50
2.22.3.3. iNOS (İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz, NOS2)	50
2.22.4. Nitrik Oksidin Etki Mekanizması	51
2.22.5. Nitrik Oksidin Yağ Doku ve Enerji Metabolizması Üzerine Etkileri	54
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	57
3.1. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü	57
3.1.1. 3T3-L1 Hücre Hattının Çözdürülmesi ve Ekilmesi	57
3.2. Hücre Sayımı	58
3.3. 3T3-L1 Preadiposit Diferensiyasyon Protokolü	59
3.3.1. Oil Red O Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	60
3.3.2. Oil Red O Boyama Metodu ile Diferensiyasyonun Değerlendirilmesi	60
3.3.3. Diferensiyasyon Deney Serileri	61
3.4. MTT Hücre Proliferasyon Analizi	61
3.4.1. MTT Çalışma Ve Çözücü Solüsyonlarının Hazırlanması	62
3.4.2. MTT Hücre Proliferasyon Analizinin Yapılması	62
3.4.3. Proliferasyon Deney Serileri	63
3.5. RhoA ve ROCK Ekspresyonları	63
3.5.1. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	64
3.5.2. Western Blot Yöntemi	65
3.5.3. ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Değerlendirildiği Deney Serileri	66
3.5.4. iNOS Enzim Ekspresyonlarının Değerlendirildiği Deney Serileri	66
3.5.5. LIM-Kinaz Aktivitesinin Değerlendirildiği Deney Serileri	67
3.6. G-LISA Aktivasyon Analizi	67
3.6.1. Lizis	67
3.6.2. G-LISA Analizi	68
3.6.3. RhoA Translokasyonlarının Değerlendirildiği Deney Serileri	70
3.7. Griess Metodu ile Nitrik Oksit Metabolitlerinin Tayini	70
3.7.1. Nitrit Ölçümü	71
3.7.2. Nitrat Ölçümü	72
3.7.3. Nitrit/Nitrat ölçümü Yapılan Deney Serileri	72
3.8. Aktin Hücre İskeleti Boyanması	72
3.8.1. Aktin Hücre İskeleti Boyanması Yapılan Deney Serileri	73
3.9. İstatistiksel Analiz	74
<b>4. BULGULAR</b>	75
4.1. Proliferasyon Bulguları	75
4.1.1. DETA-NO Uygulamasının Proliferasyon Üzerine Etkisi	75
4.1.1.1. 0-2. Gün	75
4.1.1.2. 0-4. Gün	75
4.1.1.3. 0-8. Gün	76
4.1.2. NaNO <sub>2</sub> Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi	77
4.1.2.1. 0-2. Gün	77
4.1.2.2. 0-4. Gün	78
4.1.2.3. 0-8. Gün	79

4.1.3. Lipopolisakkarid Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	80
4.1.3.1. 0-2. Gün	80
4.1.3.2. 0-4. Gün	81
4.1.3.3. 0-8. Gün	82
4.1.4. Lizofosfatidik Asit Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	83
4.1.4.1. 0-2. Gün	83
4.1.4.2. 0-4. Gün	84
4.1.4.3. 0-8. Gün	85
4.1.5. Trombin Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	86
4.1.5.1. 0-2. Gün	86
4.1.5.2. 0-4. Gün	87
4.1.5.3. 0-8. Gün	88
4.1.6. H-1152 Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi	89
4.1.6.1. 0-2. Gün	89
4.1.6.2. 0-4. Gün	90
4.1.6.3. 0-8. Gün	91
4.2. Diferensiyasyon Bulguları	92
4.2.1. DETA-NO Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi	92
4.2.1.1. 0-2. Gün	92
4.2.1.2. 0-4. Gün	93
4.2.1.3. 4-8. Gün	94
4.2.1.4. 0-8. Gün	95
4.2.2. NANO <sub>2</sub> Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi	96
4.2.2.1. 0-2. Gün	96
4.2.2.2. 0-4. Gün	97
4.2.2.3. 4-8. Gün	98
4.2.2.4. 0-8. Gün	99
4.2.3. Lipopolisakkarid Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	100
4.2.3.1. 0-2. Gün	100
4.2.3.2. 0-4. Gün	101
4.2.3.3. 4-8. Gün	102
4.2.3.4. 0-8. Gün	103
4.2.4. Lizofosfatidik Asit Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	104
4.2.4.1. 0-2. Gün	104
4.2.4.2. 0-4. Gün	105
4.2.4.3. 4-8. Gün	106
4.2.4.4. 0-8. Gün	107
4.2.5. Trombin Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	108
4.2.5.1. 0-2. Gün	108
4.2.5.2. 0-4. Gün	109
4.2.5.3. 4-8. Gün	110
4.2.5.4. 0-8. Gün	111
4.2.6. H-1152 Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi	112
4.2.6.1. 0-2. Gün	112
4.2.6.2. 0-4. Gün	113
4.2.6.3. 4-8. Gün	114
4.2.3.4. 0-8. Gün	115
4.3. Western Blot Bulguları	116

4.3.1. LPS'in Rho-Kinaz (ROCK-2) Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi	116
4.3.1.1. Düşük Konsantrasyonda LPS'nin ROCK-2 Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında ya da Yokluğunda değerlendirilmesi	116
4.3.1.2. Yüksek Konsantrasyonda LPS'nin ROCK-2 Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi ve Bu Etkinin L-NAME Varlığında ya da Yokluğunda değerlendirilmesi	118
4.3.2. Nitrik Oksit Donörü DETA-NO'nun 3T3-L1 Hücrelerinde Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkisi	119
4.3.3. LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi	120
4.3.4. LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	121
4.3.4.1. Düşük konsantrasyonda LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	121
4.3.4.2. Yüksek Konsantrasyonda LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	123
4.3.5. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME Varlığında Bakteriyel Lipopolisakkaridin 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	124
4.3.6. Sodyum Nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	125
4.3.7. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	126
4.4. G-LISA Ölçümleri (RhoA Translokasyonları-Aktivasyonları)	127
4.4.1. Lizofosfatidik Asidin 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi	127
4.4.2. Sodyum Nitritin ( $\text{NaNO}_2$ )'nin 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi	127
4.4.3. DETA-NO'nun 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi	128
4.4.4. L-NAME'nin 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi	129
4.4.5. Trombin ve C3'ün Ayrı Ayrı ve Kombine Uygulanmasının 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi	130
4.5. Nitrit/Nitrat Ölçümleri	131
4.5.1. Lizofosfatidik Asidin (LPA) 3T3-L1 Hücrelerinin Kültür Ortamındaki Nitrit/Nitrat Düzeyleri Üzerine Etkisi	131
4.5.1.1. 0-2. Gün	131
4.5.1.2. 0-4. Gün	132
4.5.1.3. 0-8. Gün	133
4.5.2. L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Bakteriyel Lipopolisakkaridin 3T3-L1 Hücrelerinin Kültür Ortamındaki Nitrit Düzeyleri Üzerine Etkisi	134
4.5.2.1. 0-2. Gün	134
4.5.2.2. 0-4. Gün	134
4.5.2.3. 0-8. Gün	135
4.6. Floresan Boyama Bulguları (Hücre İskeleti Bulguları)	136
4.6.1. Preadipositlerin Aktin Hücre iskeletinin Boyanması (kontrol)	136
4.6.1.1. 0. Gün	136
4.6.1.2. 0-2. Gün	136
4.6.1.3. 0-4. Gün	137
4.6.1.4. 0-8. Gün	138
4.6.2. DETA-NO'nun Preadipositlerin Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi	139
4.6.2.1. 0. Gün	139
4.6.2.2. 0-2. Gün	140
4.6.2.3. 0-4. Gün	141
4.6.2.4. 0-8. Gün	142

4.6.3. NaNO <sub>2</sub> 'nin Preadipositlerin Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi	143
4.6.3.1. 0. Gün	143
4.6.3.2. 0-2. Gün	144
4.6.3.3. 0-4. Gün	145
4.6.3.4. 0-8. Gün	146
4.6.4. LPS Uygulamasının Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	147
4.6.4.1. 0. Gün	147
4.6.4.2. 0-2. Gün	148
4.6.4.3. 0-4. Gün	149
4.6.4.4. 0-8. Gün	150
4.6.5. Lizofosfatidik Asidin Preadipositlerin Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 varlığında ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi	151
4.6.5.1. 0. Gün	151
4.6.5.2. 0-2. Gün	152
4.6.5.3. 0-4. Gün	153
4.6.5.4. 0-8. Gün	154
<b>5. TARTIŞMA</b>	155
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	166
<b>KAYNAKLAR</b>	167
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	213

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Obezite ile ilişkili hastalıklar	7
Şekil 2.2. Adiposit tipleri	11
Şekil 2.3. Yağ dokudan sekrete edilen adipokinler	12
Şekil 2.4. Apelin/APJ etkileşimine karışan yolaklar	20
Şekil 2.5. Adiposit diferensiyasyonunun evreleri	27
Şekil 2.6. İnsan Rho GTPazları	29
Şekil 2.7. Rho GTPaz siklüsü	30
Şekil 2.8. Hareket eden bir hücrede aktin yapısı	36
Şekil 2.9. Aktin hücre iskeleti, hücre siklüs progresyonu ve Rho GTPazların düzenlenmesine karışan proteinler arasındaki işlevsel bağlantılar	40
Şekil 2.10. LIM kinaz enzimlerinin protein yapısı	41
Şekil 2.11. LIMK-1 izoformları	42
Şekil 2.12. LIMK-2 izoformları	42
Şekil 2.13. Kofilin tarafından aktin turnoverinin düzenlenmesi	43
Şekil 2.14. İnsan nNOS, eNOS ve iNOS izoformlarının yapısı	47
Şekil 2.15. NOS enzimi tarafından katalizlenen nitrik oksit sentezi	47
Şekil 2.16. NOS enziminin yapısı ve katalitik mekanizması	48
Şekil 2.17. Tetrahidrobiopterinin (BH <sub>4</sub> ) vasküler hastalıkta eNOS aktivitesini düzenleyici rolü	49
Şekil 2.18. NO ve Hem demirinin etkileşimleri	52
Şekil 2.19. NO tarafından damar tonüsü düzenlenme mekanizmaları	53
Şekil 2.20. Nitrik oksidin düzenleyici, koruyucu ve zararlı biyolojik etkileri	54
Şekil 3.1. Ekildikten sonra flask tabanına tutunan 3T3-L1 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü	58
Şekil 3.2. Countess otomatik hücre sayım cihazı ve slaytının görünümü	59
Şekil 3.3. MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)'nin formazana dönüşümü.	62
Şekil 3.4: Griess metodu ile NO ölçümünün şematize edilmiş gösterimi	71
Şekil 4.1.1.1. 0-2. gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	75
Şekil 4.1.1.2. 0-4. gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	76
Şekil 4.1.1.3. 0-8. gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	77
Şekil 4.1.2.1. 0-2. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	78
Şekil 4.1.2.2. 0-4. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	79
Şekil 4.1.2.3. 0-8. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	80
Şekil 4.1.3.1. 0-2. gün L-NAME varlığında LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	81
Şekil 4.1.3.2. 0-4. gün L-NAME varlığında LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	82
Şekil 4.1.3.3. 0-8. gün L-NAME varlığında LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	83
Şekil 4.1.4.1. 0-2. gün Y-27632 ve LPA uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	84
Şekil 4.1.4.2. 0-4. gün Y-27632 ve LPA uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	85

Şekil 4.1.4.3. 0-8. gün Y-27632 ve LPA uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerin proliferasyonu üzerine etkisi	86
Şekil 4.1.5.1. 0-2. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	87
Şekil 4.1.5.2. 0-4. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	88
Şekil 4.1.5.3. 0-8. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	89
Şekil 4.1.6.1. 0-2. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	90
Şekil 4.1.6.2. 0-4. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	91
Şekil 4.1.6.3. 0-8. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi	92
Şekil 4.2.1.1. 0-2 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	93
Şekil 4.2.1.2. 0-4 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	94
Şekil 4.2.1.3. 4-8 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	95
Şekil 4.2.1.4. 0-8 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	96
Şekil 4.2.2.1. 0-2. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	97
Şekil 4.2.2.2. 0-4. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	98
Şekil 4.2.2.3. 4-8. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	99
Şekil 4.2.2.4. 0-8. gün NaNO <sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	100
Şekil 4.2.3.1. 0-2. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	101
Şekil 4.2.3.2. 0-4. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	102
Şekil 4.2.3.3. 4-8. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	103
Şekil 4.2.3.4. 0-8. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	104
Şekil 4.2.4.1. 0-2. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi	105
Şekil 4.2.4.2. 0-4. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi	106
Şekil 4.2.4.3. 4-8. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi	107
Şekil 4.2.4.4. 0-8. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi	108
Şekil 4.2.5.1. 0-2 gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	109
Şekil 4.2.5.2. 0-4 gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	110
Şekil 4.2.5.3. 4-8 gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	111
Şekil 4.2.5.4. 0-8 gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi	112



Şekil 4.2.6.1. 0-2. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	113
Şekil 4.2.6.2. 0-4. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	114
Şekil 4.2.6.3. 4-8. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	115
Şekil 4.2.6.4. 0-8. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi	116
Şekil 4.3.1.1.A. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda LPS'in (10 ng/ml) Etkisi	117
Şekil 4.3.1.1.B. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda LPS'in (100 ng/ml) Etkisi	118
Şekil 4.3.1.2. $5 \times 10^{-4}$ M L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda LPS'in (100 ng/ml) etkisi	119
Şekil 4.3.2. Nitrik Oksit Donörü DETA-NO'nun 3T3-L1 hücrelerinde Rho-Kinaz enzim ekspresyonları üzerine etkisi	120
Şekil 4.3.3. Bakteriyel Lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzim ekspresyonu üzerine etkisi	121
Şekil 4.3.4.1. 10 ng/ml bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde LIM kinaz aktivitesi üzerine etkisi	122
Şekil 4.3.4.2. 100 ng/ml bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde LIM kinaz aktivitesi üzerine etkisi	123
Şekil 4.3.5. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME varlığında bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde LIM kinaz aktivitesi üzerine etkisi	124
Şekil 4.3.6. Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) uygulamasının 3T3-L1 hücrelerinde LIM kinaz aktivitesi üzerine etkisi	125
Şekil 4.3.7. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME uygulamasının 3T3-L1 hücrelerinde LIM kinaz aktivitesi üzerine etkisi	126
Şekil 4.4.1. Lizofosfatidik asidin RhoA translokasyonu üzerine etkisi.	127
Şekil 4.4.2. Sodyum nitritin ( $\text{NaNO}_2$ ) 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi	128
Şekil 4.4.3. DETA-NO'nun 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi	129
Şekil 4.4.4. L-NAME'in 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi	130
Şekil 4.5.5. Trombin ve C3'ün ayrı ayrı ve kombine uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi	131
Şekil 4.5.1.1 RhoA aktivatörü LPA ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin 0-2. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücre kültüründe nitrit düzeylerine etkisi	132
Şekil 4.5.1.2. RhoA aktivatörü LPA ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin 0-4. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücre kültüründe nitrit düzeylerine etkisi	133
Şekil 4.5.1.3. RhoA aktivatörü LPA ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin 0-8. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücre kültüründe nitrit düzeylerine etkisi	133
Şekil 4.5.2.1. L-NAME ve LPS'in 0-2. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi	134
Şekil 4.5.2.2. L-NAME ve LPS'in 0-4. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi	135
Şekil 4.5.2.3. L-NAME ve LPS'in 0-8. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi	135
Şekil 4.6.1.1. 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent (0. gündeki) aktin hücre iskeletinin görünümü	136
Şekil 4.6.1.2. 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent 2. gündeki aktin hücre iskeletinin görünümü	137

Şekil 4.6.1.3. 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent 4. gündeki aktin hücre iskeletinin görünümü	137
Şekil 4.6.1.4. 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent 8. gündeki aktin hücre iskeletinin görünümü	138
Şekil 4.6.2.1. 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent (0. gündeki) aktin hücre iskeleti üzerine $10^{-7}$ M ve $10^{-5}$ M DETA-NO'nun etkisi	139
Şekil 4.6.2.2. 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-2.günü DETA-NO uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	140
Şekil 4.6.2.3. 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-4.günü DETA-NO ( $10^{-7}$ , $10^{-5}$ M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	141
Şekil 4.6.2.4. 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-8. günü DETA-NO ( $10^{-7}$ , $10^{-5}$ M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	142
Şekil 4.6.3.1. Diferensiyasyon protokolünün 0. günü $\text{NaNO}_2$ 'in ( $10^{-7}$ , $10^{-5}$ M) preadipositlerin aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	143
Şekil 4.6.3.2. 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyon protokolünün 0-2. günü boyunca uygulanan $10^{-7}$ ve $10^{-5}$ M $\text{NaNO}_2$ 'nin etkisi	144
Şekil 4.6.3.3. 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-4. günü $\text{NaNO}_2$ ( $10^{-7}$ ve $10^{-5}$ M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	145
Şekil 4.6.3.4. 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-8. günü $\text{NaNO}_2$ ( $10^{-7}$ ve $10^{-5}$ M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	146
Şekil 4.6.4.1. Diferensiyasyon protokolünün 0. günü LPS ve L-NAME uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	147
Şekil 4.6.4.2. Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri boyunca LPS ve L-NAME'in aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	148
Şekil 4.6.4.3. Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri boyunca LPS ve L-NAME'in aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	149
Şekil 4.6.4.4. Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri boyunca LPS ve L-NAME'in aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	150
Şekil 4.6.5.1. Diferensiyasyon protokolünün 0. günü LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri	151
Şekil 4.6.5.2. Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günü boyunca LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri	152
Şekil 4.6.5.3. Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günü boyunca LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri	153
Şekil 4.6.5.4. Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günü boyunca LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi	154
	142

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ADF	Actin depolymerizing factor
ADIPOQ	Adiponectin, C1Q And Collagen Domain Containing
Akt	Protein kinaz B
ANGPTL2	Angiopoietin-like protein 2
AP-1	Aktive edici protein-1
aP2	Adiposit yağ asidine bağlanan protein-2
APJ	Apelin reseptörü
ATCC	American Type Culture Collection
ATF2	Activating transcription factor 2
ATF3	Activating transcription factor 3
ATP	Adenozin trifosfat
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterin
BKİ	Beden kitle indeksi
BMP-2	Bone morphogenic protein-2
BMP-4	Bone morphogenic protein-4
BSA	Sığır serum albümini
BSF-2	B hücre diferensiyasyon faktörü-2
β <sub>3</sub>	Beta 3 reseptör
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
CaMKIIa	Ca <sup>2+</sup> /kalmmodulin bağımlı kinaz IIa
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1
CS	Calf serum
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
C/EBPα	CCAAT-enhancer-binding protein alfa
C/EBPδ	CCAAT-enhancer-binding protein delta
C/EBPβ	CCAAT-enhancer-binding protein beta
cIMP	İnozin siklik 3,5'-monofosfat
CRP	C reaktif protein
CTRP12	Adipolin (C1q/TNF-related protein-12)
DAG	Diaçilgliserol
DETA-NO	2,2'-(Hidroksinitrozohidrazono)bis-etanimin
dl	Desilitre
dLIMK-1	Drozofila Lim Kinaz-1
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle medyumunu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPI	Difenileniyodonyum klorid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECT2:	Epithelial cell transforming 2
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EP3	Prostaglandin E3 reseptörü
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERM	Ezrin-radiksin-moezin
FABP	Fatty acid binding protein
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FBS	Fetal bovine serum
Fctrp12	Full length CTRP12/tam boy adipolin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMN	Flavin mononükleotid
GAP	GTPase activating protein

gCTRP12	Globüler CTRP12/ globüler adipolin
GDI	Guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Gi	İnhibitör G proteini
GPCR	G protein coupled receptor
GRK-2	G protein eşlenik reseptör kinaz-2
GSNO	S-nitrozoglutasyon
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HIV:	Human immune deficiency virus
HRP	Horseradish peroxidase
H-1152	(S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil) sulfonil]-hekzahidro-1H-1,4-diazepin dihidroklorid
HsCRP	High sensitivity C reactive protein
IBMX	İzobutilmetilksantin
ICAM-1	İntersellüler Adhezyon Molekülü-1
ICAM-2	İntersellüler Adhezyon Molekülü-2
IFN- $\gamma$	İnterferon-gamma
IKK	Inhibitor of kappa B kinase
IL-1 $\beta$	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-6R	İnterlökin-6 reseptörü
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
IL-15	İnterlökin-15
IP <sub>3</sub>	İnozitol-3-fosfat
IP <sub>3</sub> R	inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü
IRS-1	İnsülin reseptör substrat-1
IRS-2	İnsülin reseptör substrat-2
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK1	c-Jun N-terminal kinaz1
K <sup>+</sup>	Potasyum
Kcal	Kilo kalori
kDa	Kilodalton
KLF	Kruppel like factors
L-Arg	L-arginin
LDL	Low density lipoprotein
Lef1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LIMK-1	LIM kinaz-1
LIMK-1s	kısa LIM kinaz 1
LIMK-2	LIM kinaz-2
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginin metil ester
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil L-arginin
L-NIL	N <sup>G</sup> -(1-iminoetil)-L-lizin dihidroklorid
LPA	Lizofosfatidik asit
LPS	Lipopolisakkarid
MAPK	Mitojen ile aktive protein kinaz
MCP-1	Monosit Kemoatraktan protein-1
MDA-MB-231	İnsan meme kanser hücre hattı
mDia	mammalian homolog of Diaphanous
MEK	Map kinaz
MKN45	Gastrik adenokarsinom hücre hattı
$\mu$ m	Mikrometre

$\mu\text{M}$	Mikromol
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MRCK- $\alpha$	Myotonik distrofi kinaz-ilişkili Cdc42-bağlanan kinaz alfa
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
mW	miliWatt
Myf5	Myojenik düzenleyici faktör
MYPT1	Myosin phosphatase1
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADP	Nikotinamid dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid dinükleotid fosfat hidrojen
$\text{NaNO}_2$	Sodyum Nitrit
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger
$\text{NF}\kappa\text{B}$	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS	Normal Goat Serum
NHE	$\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger
nm	Nanometre
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
$\text{NO}_2^-$	Nitrit
$\text{N}_2\text{O}_3$	Dinitrojen trioksit
NOC-5	1-Hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene
NOS	Nitrik oksit sentaz
ONOO-	Peroksinitrit
Pa	Pascal
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör
PAK	p21-aktive protein kinaz
PBS	Phosphate buffered saline
PD 98059	2'-Amino-3'-metoxiflavon
PEDF	Pigment epitelyum kökenli faktör
PGRN	Progranulin
PI3K	Fosfoinozid 3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PKG	Protein kinaz G
PLC	Fosfolipaz C
PRK1	PKC-related kinase
PPAR $\gamma$	Peroksizom proliferatör aktivatör reseptörü gama
Raf1	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1
Rbp4	Retinol Bağlayan Protein-4
RELM	Resistin benzeri molekül
RhoA	Ras homolog family member A (Ras homolog aile üyesi A)
ROCK	Rho kinaz
Rpm	Revolutions per minute/dakikada dönüş sayısı
S1P	Sfingozin-1-fosfat
SAA3	Serum Amiloid A 3
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
SERCA	Sarko endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz
SFRP5	Secreted Frizzled Related Protein 5
sGC	Solubl guanil siklaz
sGMP	Siklik guanozin monofosfat
SiRNA	Small interfering RNA

SNAP	S-nitrozo-N-asetilpenisilamin
SREBP	Sterol response element binding protein/ yanıt elemanı bağlayıcı protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBS-T	Tween-20 içeren Tris baz solüsyonu
Tcf	Transcription factor
TGF- $\beta$	Transforme edici growth faktör beta
tLIMK-2	Testis specific LIM kinase-2
TNF- $\alpha$ :	Tümör nekroz faktör alfa
TX	Triton-X 100
U	Ünite
UCP-1	Uncoupling protein-1
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotel growth faktör
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VLDL	Very low density lipoproteine/ Çok düşük ağırlıklı lipoprotein
W	Watt
Wnt5a	Wingless-Type MMTV integration site family 5a
Y-27632 dihidroklorid	(R)-(+)-trans-4-(1-Aminoetil)-N-(4-Piridil) sikloheksan karboksamid

## GİRİŞ

Obezite organizmanın gıdalar yolu ile aldığı enerjinin, harcadığı enerjiden fazla olması sonucu gelişen ve vücut yağ kitlesinin, yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize kronik bir hastalıktır [1]. Etiyolojisinde birçok faktör rol oynamaktadır. Obeziteye yol açan etkenlerin ve obezitenin gelişiminin nasıl önleneceğinin tam olarak anlaşılabilmesi önemli bir sorun olarak görünmektedir [2]. Dünya genelinde obezite ve eşlik eden metabolik sendrom (bozulmuş glikoz toleransı ve insülin direnci ile birlikte hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, santral obezite ve mikroalbüminüriden en az ikisinin eşlik etmesi) prevalansında artış gözleniyor olmasından ötürü son zamanlarda bir metabolik ve endokrin organ olan yağ dokusuna olan ilgiyi belirgin şekilde arttırmaktadır [3].

Bağ dokusunun özelleşmiş bir tipi olan yağ dokusu yakın zamana kadar genellikle içerdiği yağ asitlerinin organizma tarafından gerektiğinde enerji amacıyla kullanılmak üzere depolandığı bir doku olarak bilinmekteydi. Ancak yağ doku kökenli adipokinlerin ve diğer mediyatörlerin varlığının gösterilmesiyle birlikte yağ dokusu artık sadece bir enerji deposu değil, aynı zamanda aktif endokrin organ olarak kabul edilmektedir [4, 5]. Vücudun kullanacağından fazla enerjinin yağ hücrelerinde depolanması ve salgılanması glukokortikoidler, insülin ve katekolaminler gibi hormonal sinyallerle kontrol edilmektedir. Yağ hücresinden salgılandığı bildirilen ve adipokin olarak adlandırılan çok sayıda madde (leptin, rezistin, TNF- $\alpha$ , adiponektin ve IL-6 vs.) bulunmakta [6, 7] ve yapılan araştırmalar sonucunda bu maddelerin sayısı giderek artmaktadır.

Obezite temel olarak beyaz yağ dokunun yağ kitlesinde artış ile karakterizedir [8]. Günümüzde DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yapılan obezite tanımına göre dünyada 1,7 milyar insan fazla kilolu (vücut kitle indeksi > 25 kg/m<sup>2</sup>) ve bunların 400 milyonu obezdir (Vücut kitle indeksi > 30 kg/m<sup>2</sup>) [9, 10]. Ateroskleroz, insülin direnci, dislipidemi, Tip-2 diyabet, gut, hipoventilasyon, hipertansiyon, safra kesesi hastalığı, uyku apnesi ve osteoartrit gibi birçok patolojik bozukluğun obezite ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [9, 11, 12]. Bunun yanı sıra obezitenin böbrek, endometrium, göğüs, kolon, özofagus ve pankreas kanseri, lösemi, multipl myelom ve non-Hodgkin lenfoma gibi birçok kanser tipinin insidansında artışa yol açtığı gösterilmiştir [13]. Obezite ölüm riskini arttırmakta ve beklenen yaşam süresini kısaltmaktadır [14, 15].

Memelilerde beyaz ve kahverengi olmak üzere iki ayrı tipte yağ doku bulunmaktadır. Beyaz yağ doku temel olarak enerji depolanmasından, kahverengi yağ doku ise enerji harcanmasından sorumludur. Erişkin insanda sadece vücudun belli bölgelerinde çok az miktarda bulunduğu gösterilen kahverengi yağ dokusunun temel işlevi besinler ile alınan enerjiyi kullanarak ısı üretmek ve vücut sıcaklığını belirli bir düzeyde tutmaktır [12] Vücuttaki beyaz yağ dokunun hücresel kompozisyon ve boyutu organizmanın enerji alımı ile harcaması arasındaki

dengeye bağlı olarak yaşam boyu büyük değişimler gösterebilir. Uzun dönemde bireyin enerji alımı enerji harcamasından fazla olduğunda vücuttaki beyaz yağ doku kitlesi, var olan adipositlerin hücre içi lipid birikiminin artışı sonucu büyümesi ve yağ doku stromal vasküler fraksiyonundaki preadiposit (adiposit öncülü hücre) havuzundan diferensiyasyon sonucu oluşan yeni adipositlerin (yağ hücresi) eklenmesi sonucu artar [16].

Adiposit diferensiyasyonu kondrojenik, osteojenik, myojenik ve adipojenik diferensiyasyon (farklılaşma) potansiyeli olan pluripotent mezenseyal kök hücrelerin yönlendirilmesi sonucu olur [17-19]. Son çalışmalarda yetişkin yağ dokudan izole edilen stromal hücrelerden preadipositlerin elde edilebildiği gösterilmiştir [17, 20]. Beyaz yağ doku, yoğun olarak yağ depolanması için farklılaşmış, içi lipid ile dolu ve çevresi kolajen lif ağı ile çevrili hücreler olan adipositleri (yağ hücreleri) içeren gevşek bağ dokusunun özelleşmiş bir tipidir [9, 21]. Olgun adipositlerin yanı sıra beyaz yağ dokuda endotelial hücreler, fibroblastlar, makrofajlar, monositler, preadipositler ve perisitler de bulunmaktadır. Bu hücreler yaygın olarak yağ dokunun stromal vasküler fraksiyonu olarak adlandırılmaktadır [9, 22]. Yağ doku kitlesinin artışı dokuda bulunan adipositlerin boyutunda artış ve *de novo* adiposit diferensiyasyonu (farklılaşması) yolu ile olur [22]. Vücutta bulunan adiposit sayısını belirleyen temel olgu büyük ölçüde fibroblast benzeri preadipositlerden olgun adipositlerin oluştuğu diferensiyasyon sürecidir [23]. Günümüzde yağ doku salgıladığı leptin, adiponektin, resistin, visfatin, anjiyotensin, interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi yağ dokusu kaynaklı faktörler aracılığı ile (adipokinler ya da adipositokinler) birçok fizyolojik işlevi düzenleyen bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir [22]. Yağ doku stromal vasküler fraksiyonundaki birçok hücre immün sistem hücresi olduğundan ötürü yağ doku immün yanıtta da kritik rol oynamaktadır [22]. Ayrıca, yağ dokunun salgıladığı sitokinler aracılığı ile obezitede gözlenen kronik düşük dereceli inflamasyona neden olduğu ve bu inflamatuvar durumun Alzheimer hastalığı, aterosklerotik kalp ve damar hastalığı, insülin direnci, tip 2 diyabet, kanser, romatoid artrit gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir [21]. Bu durumdan ötürü obezitenin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması yeni ilaçların ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Rho ailesi küçük molekül ağırlıklı GTP'azlardan olan RhoA'nın aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynadığı ve bu yolla hücre morfolojisinde değişiklikler, fokal adhezyon ve stres liflerinin oluşumu, sitokinezis, hücre siklus progresyonu, diferensiyasyon gibi hücre iskeleti-bağımlı birçok hücrel işlevi düzenlediği gösterilmiştir [24, 25]. RhoA bu etkileri Rho-kinaz, LIM-kinaz, protein kinaz N gibi alt efektörler aracılığı ile ortaya koymaktadır. Preadipositlerin yetişkin bireylerin yağ dokusunda bulunduğu ve enerji dengesinin durumuna göre olgun adipositlere proliferasyon ve diferensiyasyon olabildiği ortaya konulmuştur [16]. 3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz'ın inhibisyonunun adipogenezini arttırdığı gösterilmiştir [26]. Bununla



birlikte, Rho inhibitör proteini p190RhoGAP knockout farelerde olgun adipositlerin bulunmadığının gösterilmesine ek olarak hem 3T3-L1 ve hem de yabancı tip fare embriyonik fibroblast kültürlerinde Rho-kinaz aktivitesinin aşırı indüksiyonunun adipogenezi inhibe ettiğinin ortaya konulması [27], RhoA'nın adipogenezis açısından önemli bir modülatör olabileceğini göstermektedir. Diğer önemli bir modülatör nitrik oksittir (NO). NO, ikisi yapısal, birisi indüklenebilir olmak üzere 3 farklı nitrik oksit sentaz (NOS) enzim izoformu tarafından sentezlenir. Yağ dokuda eNOS ve iNOS varlığı saptanmış [28, 29] ve iNOS'un abdominal obezitede gözlenen düşük dereceli kronik inflamasyon tarafından indüklendiği gösterilmiştir [30]. Bununla birlikte, nitrik oksidin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışmalarda birbiri ile çelişen sonuçlar bulunmuştur: NO'in sıçan primer kahverengi yağ doku preadipositlerinin ve sıçan beyaz yağ doku preadipositlerinin diferensiyasyonunu stimüle ettiği [31], 3T3-L1 preadipositlerinde ise diferensiyasyonu süprese ettiği gösterilmiştir [32]. Ayrıca, iNOS'ın kronik inflamasyonda adipogenezisi stimüle ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra nitrik oksidin lipolizi stimüle ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [33, 34].

Nitrik oksit ve Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacı ile çeşitli dokularda çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir: Damar düz kasında RhoA'nın inhibe edilmesinin eNOS'ın stimülasyonuna yol açtığı, statinler tarafından RhoA inhibisyonunun eNOS ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmekle beraber, sıçan koroner endotel hücrelerinde nitrik oksidin Rho-kinaz'ın downregülasyonuna aracılık etmediği ortaya konulmuştur [35]. Bunun yanı sıra enterositlerde yapılmış bir çalışmada nitrik oksidin Rho'yu aktive ederek enterosit migrasyonunu inhibe ettiğinin gösterilmesi [36] nitrik oksit ile Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkinin aydınlatılmaya muhtaç bir konu olduğuna işaret etmektedir.

3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz (ROCK) enziminin eksprese edildiği ortaya konulmuştur. Rho-kinaz enziminin Y-27632 tarafından seçici olarak inhibe edilmesinin yağ hücrelerinde lipid birikimini ve adipogenezi arttırdığı saptanmıştır. Rho-kinazın bu etkilerinin olasılıkla adipojenik transkripsiyon faktörlerinin artışı yolu ile olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra Rho-kinaz inhibisyonunun adipojenik diferensiyasyonun geç dönem belirteçlerden biri olan adiponektin ekspresyonunu da artırdığı gösterilmiştir [26]. Yapılan çalışmalarda Rho GTPaz aktivitesinin modüle edilmesinin nöron [37], lenfosit [38], myosit [39] ve keratinositlerde [40] diferensiyasyon süreci üzerine etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada preadipositlerde adipojenik diferensiyasyon süreci için Rho GTPaz aktivitesinin inhibisyonunun gerekli bir faktör olduğu bulunmuştur [26].

Rho-kinazın alt efektörü olan LIM-kinaz'ın iki izoformu bulunmaktadır (LIMK-1, LIMK-2) [41-43]. LIMK-1 ve LIMK-2 enzimlerinin fare dokularında yaygın olarak eksprese edildiği gösterilmiştir [44]. Her iki izoform Rho-kinaz tarafından fosforile edildiklerinde aktin

depolymerize edici faktör olan kofilini fosforile edip inaktive eder ve aktin stres liflerinin ve fokal adezyonların oluşmasını indükler [44-46]. Yakın zamanlarda, LIMK-1 aktivitesinin hücre siklusünde G<sub>2</sub>/M geçişi için gerekli olduğu [47] ve LIMK-1 ekspresyonundaki bozulmaların çeşitli sitokinez bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir [48].

Bunun yanı sıra MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında LIMK-1 kinaz aktivitesinin hücre siklusü sırasında anlamlı olarak değiştiği, en yüksek aktivite artışının profaz ve metafaz evrelerinde olduğu [49] ve mitozun erken evrelerinde  $\gamma$  tubulin ile kolokalize olduğu ortaya konulmuştur [50]. Swiss 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde ROCK-1'in TGF- $\beta$  tarafından aktive edildiği ve bunun sonucunda LIMK-2 aktivasyonunun gerçekleştiği, bunun da kofilin fosforilasyonu ile aktin hücre iskeletini düzenlediği gösterilmiştir [43].

3T3-L1 (fare embriyonik fibroblast) hücre kültüründe ROCK-2 enziminin inhibe edilmesinin adipogenezde artışa neden olduğu gösterilmiştir [26]. Rho inhibitör proteini p190-B RhoGAP knockout farelerde olgun adipositlerin mevcut olmadığı gösterilmiştir. Buna ek olarak p190-B RhoGAP knockout farelerden elde edilen embriyonik fibroblastlarda adipogenez defekti bulunduğu ve bu defektin özgün ROCK inhibitörü uygulaması ile düzeltildiği bulunmuştur [27]. Bunun yanı sıra başka çalışmalarda da Rho-kinaz aktivitesinin aşırı düzeyde indüklenmesinin hem 3T3-L1 ve hem de yabancı tip fare embriyonik fibroblast kültürlerinde adipogenez bozduğunun bulunması, Rho/Rho-kinaz yolağının adipogenezin önemli bir modülatörü olabileceğini göstermektedir [26].

Rho/Rho-kinaz yolağının yanı sıra birçok hücre tipi tarafından üretilen, hücrede çok yaygın bir aralıkta etki gösteren diğer önemli bir sinyal ajanı nitrik oksit (NO) [51-53]. NO kısa ömürlüdür (3-5 saniye), vasküler tonüs kontrolünün yanı sıra inflamatuvar süreçlere ve metabolizma gibi birçok fizyolojik olaylara karışmaktadır. Nitrik oksit hücre tipine bağlı olarak değişen üç farklı NO sentaz (NOS) izoformu tarafından katalizlenen bir enzimatik reaksiyon sonucu sentezlenmektedir [54]. Endotelial NOS (eNOS, NOS3) ve nöronal NOS (nNOS, NOS1) yapısal enzimlerdir ve intrasellüler Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonlarını arttıran uyarılar sonrası küçük miktarlarda NO üretirler. Üçüncü izoform olan indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2) ise Ca<sup>2+</sup>'dan bağımsızdır; sitokinler ve bakteriyel lipopolisakkarid gibi etkenler tarafından indüklenir. iNOS makrofajlar ve diğer birçok çekirdekli hücrelerde eksprese edilmektedir [55]. iNOS'ın indüksiyonu sonucu oluşan nitrik oksit salınımı yapısal NOS izoformlarının indüksiyonuna göre çok daha büyük miktarda ve çok daha uzun sürelidir. iNOS indüksiyonu için gen transkripsiyonu gerektiğinden ötürü etkene maruziyetten saatler sonra başlar ve günler boyunca devam edebilir [56]. Nitrik oksit, çözünür guanilil siklazı aktive ederek sGMP oluşumuna neden olur; sGMP protein kinaz G'yi aktive eder. Nitrik oksidin demire olan afinitesi nedeniyle bir Krebs siklusü enzimi olan akonitaz gibi demir içeren diğer bazı metalloproteinler de nitrik oksidin hedefleri

arasındadır. Nitrik oksit, sitokrom oksidazın inhibisyonu yolu ile mitokondriyal solunumu inhibe eder [57-59].

Farelere nonspesifik NOS inhibitörü N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) uygulamasının ağırlık artışına yol açtığı ve gıda alımını azalttığı gösterildiğinden dolayı nitrik oksidin organizmanın enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [60]. Yapılan çalışmalarda beyaz ve kahverengi yağ dokuda hem eNOS hem iNOS'ın eksprese edildiği gösterilmiştir [28, 29, 61, 62]. Bunun yanı sıra vücut kitle indeksi ve vücut yağ kitlesi ile nitrik oksit metabolitlerinin plazma düzeyleri ile arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir [63-65]. İlginç olarak enfeksiyon ve inflamatuvar hastalıklarda da dolaşımda NO metabolitlerinin düzeyinin arttığı gösterilmiştir [53]. Obez fareler ve Zucker diyabetik sıçanlarında karaciğer, iskelet kası ve beyaz yağ dokusunda iNOS ekspresyonunda artış olduğu bulunmuştur [66-67]. Farelerde iNOS gen silinmesinin aşırı yağlı diyet aracılığı ile indüklenen insülin direncine karşı koruyucu etkisinin olduğunun gösterilmesi, nitrik oksidin insülin direnci gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir [67]. Farelerde NOS inhibitörü L-NAME'in kronik olarak uygulanmasının vücut ağırlığında azalmaya yol açtığı ve bu etkinin yüksek yağ içeren diyet alımında daha belirgin olduğu gösterilmiştir [68]. L-NAME uygulaması yağ hücrelerinin hacmini ve trigliserid birikimini azaltmıştır [68]. Bunun yanı sıra diyabetik hastalarda plazma nitrit düzeyleri orta düzeyde yükselmiştir [69]. iNOS enziminin abdominal obezitede gözlenen düşük dereceli kronik inflamasyon tarafından indüklendiği ortaya konulmuştur [30]. Ayrıca ilginç olarak, endotoksemi sırasında iNOS ekspresyonunun ana kaynağının yağ dokusu olduğu gösterilmiştir [70]. 3T3-L1 hücre kültüründe NO'in yağ dokudan salınan ve monosit migrasyonu, fibrinoliz ve anjiogeneze (yeni damar oluşumu) karışan, viseral yağ birikimini ve bununla ilişkili inflamasyonu etkileyen plazminojen aktivatör inhibitörü ve inflamatuvar bir sitokin olan IL-6 mRNA ekspresyonlarını arttırdığının gösterilmesi NOS aktivitesinin inhibe edilmesinin beyaz yağ dokuda inflamasyonun düzelmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [28].

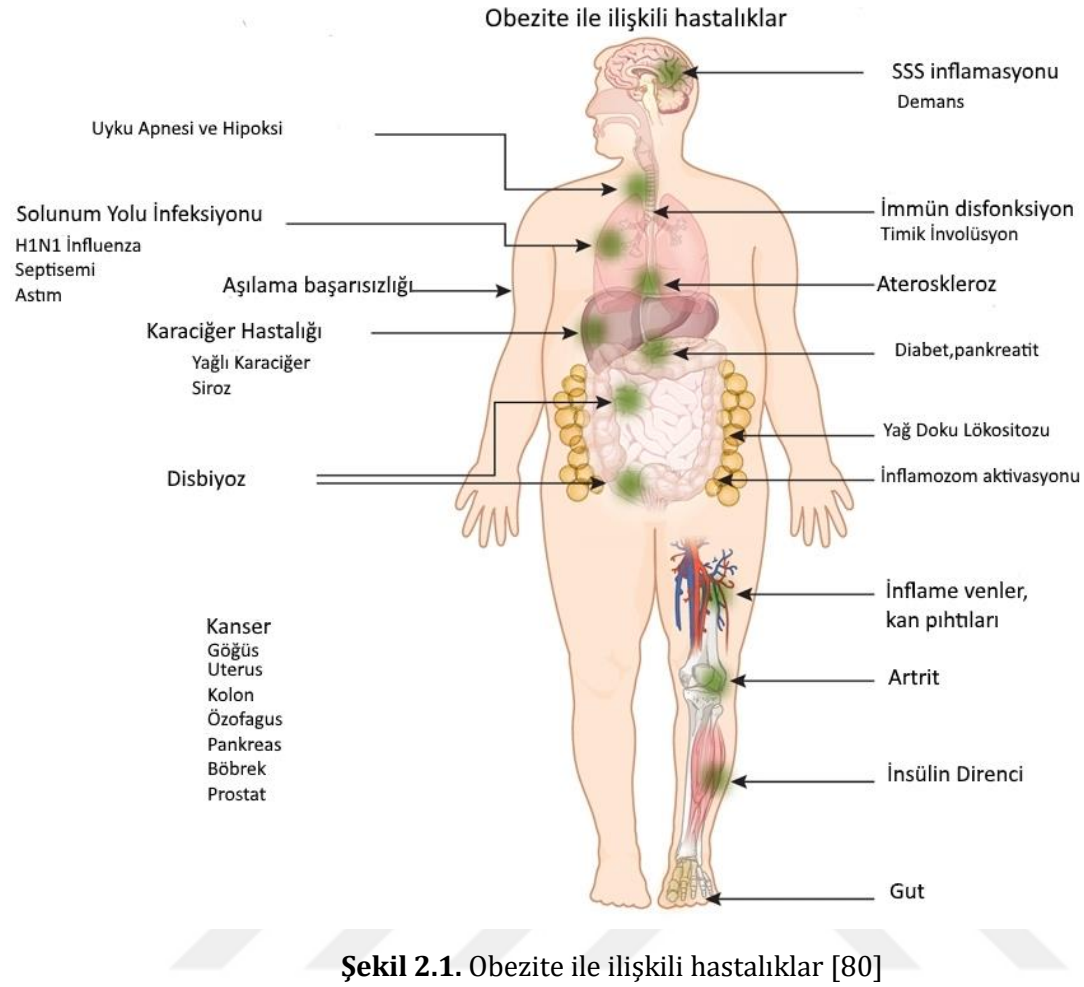
Bu tez çalışmasının amacı, preadiposit öncülü 3T3-L1 hücrelerinde nitrik oksidin diferensiyasyon, proliferasyon ve aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine etkilerini incelemek ve bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının herhangi bir katkısının bulunup bulunmadığını araştırmaktır; zira Rho/ROCK yolağının stimüle edilmesi adiposit diferensiyasyonu engellemektedir. Nitrik oksit, acaba preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisini, vasküler düz kaslarda gösterdiği etkiye benzer şekilde Rho/ROCK yolağını inhibe ederek mi ortaya koymaktadır?

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. Bir Epidemi Olarak Obezite

Enerji alımı enerji harcamasından fazla olduğunda, alınan fazla enerjinin lipid depolarda depolanması sonucu oluşan obezite, son dekadda dünya için bir numaralı sağlık sorunu olan bir epidemi halini almıştır [71, 72]. Günümüzde kişinin normal (18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>), fazla kilolu (25-29,9 kg/m<sup>2</sup>) ya da obez (30 kg/m<sup>2</sup>) olarak ayırımı vücut kitle indeksi tanımına göre yapılmaktadır (kilogram cinsinden vücut ağırlığı/ santimetre cinsinden boy uzunluğunun karesi). Obezitenin yaygınlığı değerlendirildiğinde, Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada 1,9 milyar insan fazla kilolu ve bunların 600 milyonu obezdir. 1980-2014 yılları arasında obezite prevalansı 2 kattan fazla artmıştır [73]. Obezite ölüm riskini arttırmakta ve beklenen yaşam süresini kısaltmaktadır (kadınlar için 5,8 yıl, erkekler için 7,1 yıl) [14, 74]. Son yapılan araştırmalara göre Amerika Birleşik Devletleri'nde her 3 yetişkinden 2si fazla kilolu ya da obez ve 20 yetişkinden biri aşırı obezdir [75]. 2012 yılında 16-19 yaş ergenlerin 1/3 ünün fazla kilolu ya da obez olduğu saptanmıştır [76]. 2013 yılında 5 yaş altı çocukların 42 milyonunun aşırı kilolu ya da obez olduğu gösterilmiştir. Bütünsel olarak dünya nüfusunun %13'ü obezdir [73]. Yakınlarda yapılan bir çalışmada obezite trendi değişmeden devam ederse Amerika'da nüfusun %50'sinin obez olacağı öngörülmüştür [77].

Temel olarak beyaz yağ doku kütlelerinde artış ile karakterize olan obezitenin [8] aralarında alzheimer, ateroskleroz, dislipidemi, gut, hipertansiyon, insülin direnci, Tip-2 diyabet, osteoartrit, safra kesesi hastalığı ve uyku apnesinin de bulunduğu birçok patolojik durum ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [9, 11, 12, 78]. Bunun yanı sıra obezitenin böbrek kanseri, endometrium, göğüs, kolon özofagus ve pankreas kanserleri, lösemi, multipl myelom ve non-Hodgkin lenfoma gibi birçok kanser tipinin insidansında artışa neden olduğu gösterilmiştir [13]. Buna ek olarak obezite, kanser hastalarında mortalite hızını kadınlarda %52, erkeklerde %85 arttırmaktadır [79]. Bütün bu bulguların ışığında obeziteye neden olan moleküler mekanizmaların anlaşılması, bu epideminin önlenmesi için büyük önem taşımaktadır.



## 2.2. Yağ Dokusu

Bağ dokusunun özel bir tipi olan yağ dokusu, büyük oranda bulunan adipositlerin yanı sıra fibroblast, lökosit, makrofaj ve preadiposit gibi birçok hücreden oluşmaktadır. Sağlıklı erişkinlerde yağ dokunun vücut ağırlığına oranı değerlendirildiğinde, erkekler için vücut ağırlığının %15-21'i, kadınlar için ise vücut ağırlığının %25-33'ü yağ dokusundan oluşturmaktadır [81]. Fetusta adipogenez ilk olarak 14. gebelik haftasından sonra beyaz yağ dokusunda görülmeye başlar [82]. Beyaz adipositler lateral plak mezodermdaki myojenik faktör Myf5 negatif mezenşimal kök hücrelerden köken alır [83]. Kahverengi adipositler Myf5 pozitif hücrelerden köken alır [84]. İlginç olarak, beyaz yağ doku içerisinde bulunan bej yağ doku hücreleri Myf5 negatiftir [84]. Beyaz yağ doku gelişimi, mezenşimal kök hücrelerin yeni damar oluşumunun olduğu farklı yerlerde birikimi ile başlar. Mezenşimal kök hücreler kapiller damar ağlarına yakın bölgelerde diferansiye olarak adipositlere dönüşür. İlk olarak oluşan yağ hücresi kümeleri daha sonra damarlar ve yoğun şekilde bir araya gelmiş beyaz adipositlerden oluşan beyaz yağ dokuya dönüşür [85]. Yağ hücrelerinin büyüklük ve sayısında en büyük artış yaşamın ilk 2 yılında görülür [86]. Bu evrede preadipositlerden yağ hücreleri oluşumu yoğunluktadır.

Vücuttaki yağ doku kitlesinin artışı mevcut adipositlerin hacimlerinde ve içerdikleri yağ miktarında artışa ek olarak, yağ doku içerisinde bulunduğu gösterilen fibroblast benzeri preadipositlerin olgun adipositlere diferensiyasyonu (farklılaşması) yolu ile olur [9, 16].

Erişkin bir insanda yağ dokuda varolan adipositlerin sayısı büyük ölçüde diferensiyasyon süreci tarafından belirlenir [23]. Hücresel düzeyde incelendiğinde, kahverengi (multiloküler) ve beyaz (uniloküler) yağ dokusu olmak üzere iki farklı yağ dokusu tipi bulunduğu kabul edilmekle beraber, son çalışmalarda bej (beige/brite) ya da kahverengi-benzeri yağ doku olarak adlandırılan üçüncü bir yağ dokusu tipi tanımlanmıştır [87-89].

Önceleri yalnızca yeni doğanda bulunduğu kabul edilen kahverengi yağ dokunun, yakın zamanda pozitron emisyon tomografi ile yapılan çalışmalarda erişkinde vücutta çeşitli bölgelerde bulunduğu gösterilmiştir [90, 91]. Kahverengi yağ dokusu vücutta özellikle peritiroid bölgede, trake çevresinde, supraklaviküler bölgede, aksiler bölgede, mediastende büyük damarların ve özofagusun çevresinde, perivasküler bölgede, perikard çevresinde, intraskapular aralıkta, sinoatriyal düğümde, solid organların çevresinde ve böbrek üstü bezi çevresinde, intraperitoneal alanda ve inguinal fossada bulunur [92-94]. Yenidoğan bebeğin vücut ağırlığının %2-3'ünü kahverengi yağ dokusu oluşturur. Bebeğin ısı düzenleme mekanizmalarının devreye girmesiyle birlikte kahverengi yağ dokusunun yerini beyaz yağ dokusu alır.

Kahverengi yağ doku, çok sayıda demirden ve UCP-1 (Uncoupling protein-1)'den zengin mitokondri içeren hücreleri sayesinde özellikle yeni doğan bebeklerde ısı dengesinin korunması için önemli bir mekanizma olan adaptif termogenezi (non-shivering thermogenesis) gerçekleştirir [95]. Diğer dokuların açığa çıkardığı enerji miktarı 1mW/mg iken, kahverengi yağ doku maksimum aktivasyon düzeyinde 300-480W/kg enerjiyi ısıya dönüştürebilir [96-99] Soğuğa yanıt olarak gerçekleşen bu süreç, hipoglisemi, yiyecek alımında kısıtlama [100] ya da hipoksi [101] gibi durumlarda inhibe olur. Kahverengi yağ dokuda oldukça yaygın bir kapiller damar ağı mevcuttur. Vücuttaki kahverengi yağ doku miktarı yaşla birlikte azalır [102].

Yiyecek bulunduğu anda alınan fazla enerjinin depolanarak uzun süreli kıtlık dönemlerinde tüketilmesi yolu ile insan ırkının yaşamını devam ettirmesi için evrimsel olarak önemli bir avantaj sağlayan beyaz yağ doku [103], içi lipid ile dolu adipositlere ek olarak çevresinde bulunan ve fibroblastlar, endotelial hücreler, makrofajlar, monositler, perisitler ve preadipositleri içeren stromal vasküler fraksiyondan oluşur [9, 21].

Uzun bir süre boyunca yalnızca inert bir enerji deposu görevi gördüğü düşünülen beyaz yağ doku son yıllarda yapılan araştırmaların da net olarak ortaya çıkardığı gibi salgıladığı çok sayıda adipokin ile endokrin bir organ olarak işlev görmektedir. Yaşam süresince organizmanın enerji alımındaki değişikliklere bağlı olarak beyaz yağ dokuda hem hücre boyut ve içeriğinde ve hem de yağ doku kitlesinin büyüklüğünde büyük değişimler gözlenebilir. Enerji alımı ile harcaması arasındaki denge alım lehine bozulduğunda beyaz yağ doku kitlesi iki temel

mekanizma ile artar. Bu mekanizmalardan ilki hücre içi lipid birikiminin artışı yolu ile mevcut adipositlerin çapının 1000 katına kadar artması ve ikincisi ise yağ doku stromasında bulunan preadipositlerin adipositlere diferensiyasyonu sonucu olgun yağ hücresi sayısının artmasıdır [16]. Erişkin bir insanın yağ hücrelerinin yıllık yenilenme hızı yaklaşık %10'dur [104]. Vücuttaki beyaz yağ hücrelerinin yaklaşık yarısı her 8,3 yılda bir yenilenir [104].

Beyaz yağ dokusu vücuttaki dağılımına göre abdominal ya da viseral yağ (abdomen boşluğunda iç organlar etrafında yerleşmiş olan omental yağ) ve trunkal ya da subkütanöz yağ doku olmak üzere iki ayrı bölümde değerlendirilir [105]. Sağlıklı erişkinlerde total vücut yağının erkekler için %10-20'sini, kadınlar için %5-8'ini oluşturan viseral yağın oranı yaşlılıkla birlikte artar [106]. Deri altı ve viseral yağ doku arasında çeşitli farklılıklar vardır. Anatomik yerleşimi nedeni ile direkt olarak portal vene drene olan viseral yağ dokudan serbest yağ asitlerinin ve adipokinlerin karaciğere direkt olarak geçmesi karaciğerde inflamasyona neden olur. Bu inflamasyon hepatik immün mekanizmaların aktivasyonu yolu ile karaciğerden CRP (c-reaktif protein) gibi inflamatuvar mediatörlerin üretimini indükler [107, 108]. Viseral yağ doku, subkütanöz yağ dokuya göre daha zengin vaskülariteye ve daha yoğun nöral innervasyona sahiptir [109]. Subkütanöz yağ dokuya göre viseral yağ dokuda daha fazla glukokortikoid [110], androjen [111] ve  $\beta_3$  adrenerjik reseptör bulunmaktadır [101].

Adipokinler açısından değerlendirildiğinde de viseral ve subkütanöz yağ doku arasında farklar bulunmaktadır: Anti-diabetik ve anti-aterojenik etkileri bulunan adiponektin subkütanöz yağ dokuda daha fazla bulunurken IL-6, TNF- $\alpha$  [109], CRP [112], anjiyotensinojen [106, 113] ve PAI-1 (Plazminojen aktivatör inhibitör) [114] gibi proaterojenik ve prodiabetik özellikleri olan adipokinler viseral yağ dokudan daha yüksek miktarda salgılanmaktadır [109]. Bunun yanı sıra, viseral yağ doku metabolik açıdan çok daha aktiftir ve daha büyük bir lipolitik aktiviteye sahiptir.

Bej yağ dokusu ilk olarak inguinal bölgedeki beyaz yağ dokudan izole edilmiştir [87]. Mitokondri miktarı beyaz yağ dokuya göre fazladır ve soğuğa yanıt olarak mitokondri miktarı artar. Ancak, uyarımla artan mitokondri miktarı hiçbir zaman kahverengi yağ dokudaki miktara ulaşamaz [115]. Bej yağ doku adaptif termogenez yolu ile ısı regülasyonunda rol oynar.

### 2.3. Yağ Dokunun Temel İşlevleri

1. Alınan enerjinin daha sonra kullanılmak üzere trigliserid halinde depolanması. Yağ doku hidrofobiktir ve oldukça az su içeriği ile daha fazla enerji depolanmasını sağlar. Bu miktar obez olmayan sağlıklı bir erişkin için 200.000-300.000 kcal (Kilo kalori) kadardır.
2. Isı üretimi yolu ile vücut merkez sıcaklığının korunmasının sağlanması. Kahverengi ve bej yağ doku adaptif termogenez yolu ile ısı üretimini sağlar.

3. Beyaz yağ doku iç organların çevresinde, el ve ayak tabanlarında mekanik travmalara karşı koruyucu olarak görev alır.
4. Birçok iç organın çevresini bir tabaka olarak saran yağ doku bu organları hasar görmekten koruyucu görev alır.
5. Deri altı beyaz yağ doku tabakası cilt yolu ile ısı kaybını önler ve ısı yalıtımını sağlar [116].

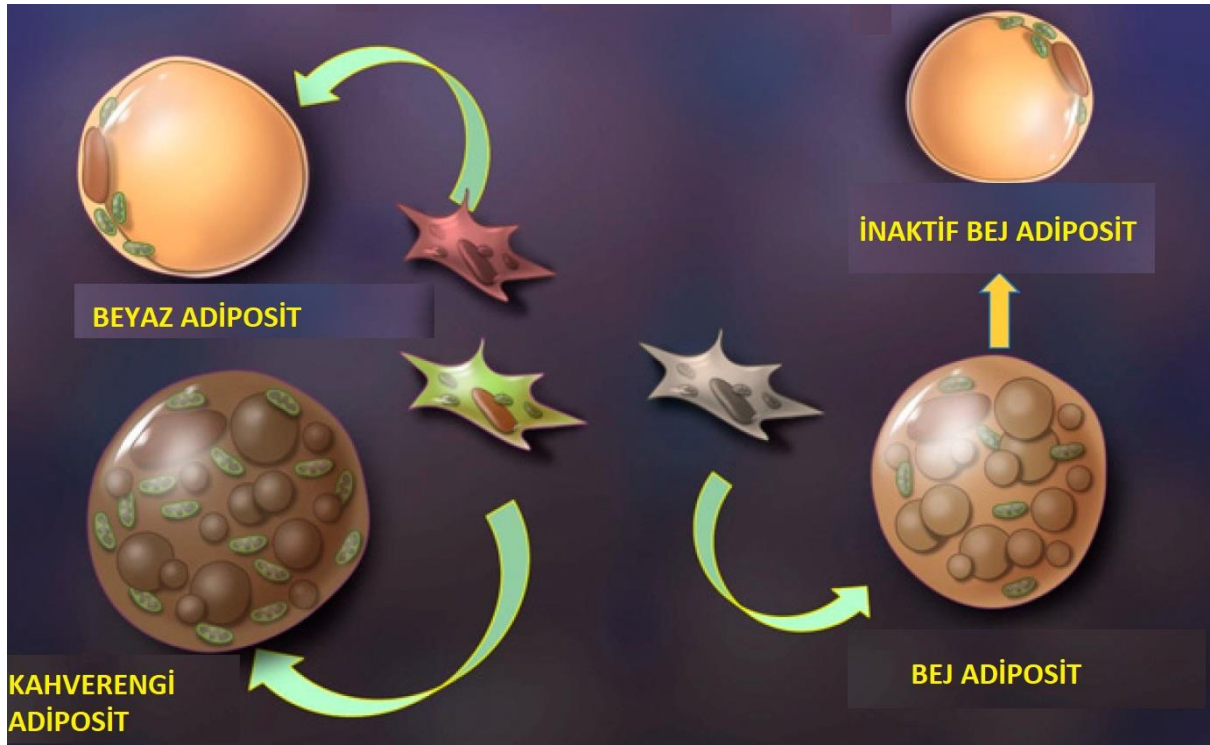
#### **2.4. Yağ Hücrelerinin Sınıflandırılması ve İşlevleri**

Kahverengi yağ hücresi genellikle elipsoid şekillidir, sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacığı içerir (multiloküler) [117]. Kahverengi yağ hücresinin büyüklüğü 15-50  $\mu\text{M}$  arasında değişir [117]. Kahverengi yağ hücreleri çok sayıda demir bakımından zengin mitokondri içerir ve ısı üretimi yolu ile termoregülasyonda görev alması ile beyaz yağ hücrelerinden farklılık gösterir. Kahverengi yağ hücrelerinin mitokondrileri, spesifik bir protein olan çok sayıda UCP-1 (uncoupling protein-1) içerir. UCP-1, mitokondri iç membranına lokalizedir. Yalnızca memelilerde bulunan bu protein sayesinde, kahverengi yağ dokusu mitokondrilerinde elektron transport zincirinde oksidatif metabolizma ATP üretiminden ayrılır. Bu ayrımı nasıl gerçekleştirdiği ile ilgili bazı noktalar henüz net olmamakla birlikte [118, 119], soğuk gibi bir etken nedeni ile ısı üretimi gerektiğinde, yağ dokudaki  $\beta 3$  adrenerjik liflerden salınan adrenalin, lipolizi artırır. Bunun sonucu olarak kahverengi yağ hücre mitokondrisinde miktarı artan serbest yağ asitleri UCP-1'i aktive eder [120-123]. UCP-1 mitokondri iç membranında yerleşik olarak bulunmaktadır. UCP-1 protonların dış membrandan iç mebrana transportuna aracılık eder ve elektron transport zinciri tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradientin oluşturduğu enerjiyi ısı olarak harcar [93, 95, 124-127]

Beyaz yağ hücresi genellikle yuvarlak şekillidir, sitoplazmasında ortada hücrenin hacminin %90'ını kaplayan tek bir büyük lipid damlacığı ve hücrenin bir kenarına lokalize nükleusa sahiptir (uniloküler). Beyaz yağ hücrelerinin çapı 20-200  $\mu\text{M}$  arasındadır. Diyetle alınan enerjinin fazlalığına yanıt olarak beyaz yağ hücresinin boyutları çap olarak 20 kata kadar, hacim olarak ise 1000 kata kadar artabilir [128].

Bej yağ hücreleri yuvarlak şekilli, tek büyük ya da çok sayıda lipid damlacıkları içeren hücrelerdir. Çok sayıda demirden zengin mitokondri içerirler ve soğuğa maruz kalma ya da adrenerjik uyarı gibi stimuluslar ile mitokondri miktarı artabilir [88]. UCP-1 eksprese ederler. Uzun süren soğuğa maruziyet, uzun süreli güç egzersizleri,  $\beta 3$  adrenerjik uyarılar, PPAR $\gamma$  (peroksizom proliferatör aktivatör reseptörü gama) agonistlerinin kullanılması gibi durumlarda beyaz yağ hücrelerinin bej yağ hücrelerine transforme olabildiği gösterilmiştir [129-133].





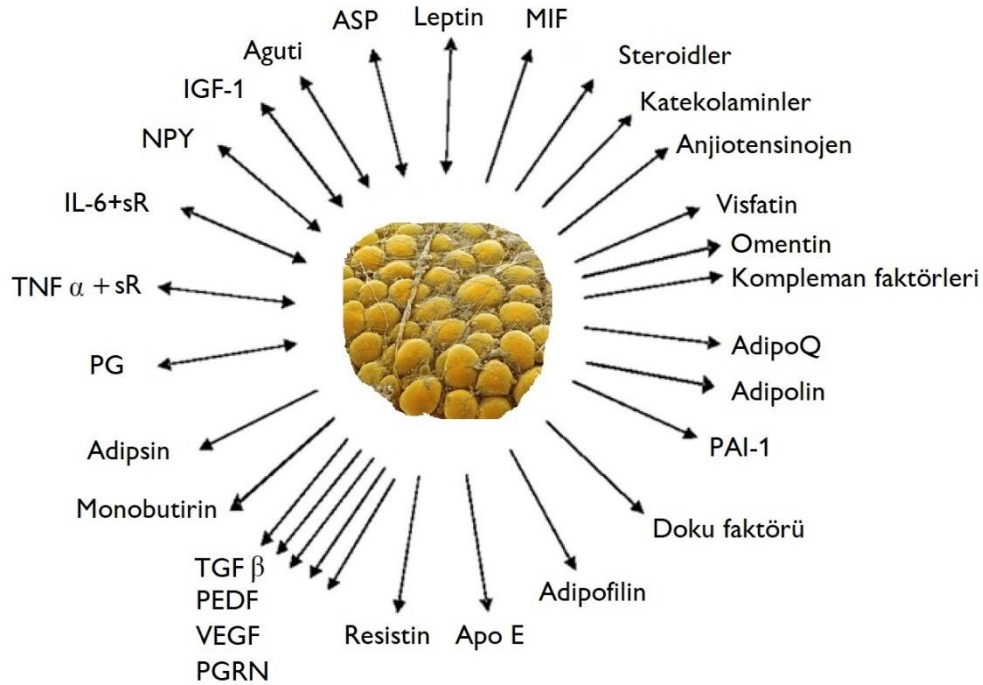
Şekil 2.2. Adiposit tipleri [134]

## 2.5. Endokrin Bir Organ Olarak Yağ Doku

Yağ hücresinden salınan bir hormon olan leptinin 1994 yılında keşfine kadar, alınan ihtiyaç fazlası enerjiyi sonradan kullanılabilir şekilde depolamak ve çevresini sardığı doku ve organları korumak dışında herhangi bir görevi olduğu düşünülmemiş, fazlalığı dışında klinik anlamda dikkate alınmayan yağ doku, giderek artan araştırmaların da net olarak ortaya çıkardığı gibi, salgıladığı adipokin olarak adlandırılan çok sayıda sitokin ya da hormon aracılığı ile metabolik regülasyonun merkezinde yer alan dinamik bir doku [135-138], ya da kimi araştırmacılar tarafından ifade edildiği şekilde bir organdır [117].

Yağ doku salgıladığı immün yanıtla ilişkili TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-15, serum amiloid A proteinleri, monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1), makrofaj inflamatuvar proteinleri, TGF- $\beta$  (transforming growth faktör  $\beta$ ) gibi büyüme faktörleri alternatif komplement yolağı-adipsin gibi adipokinler aracılığı ile bağışıklık sisteminin regülasyonunda rol oynamasının yanı sıra anjiotensinojen ve monobutirin aracılığı ile kan basıncının düzenlenmesini etkiler. Ek olarak, PAI-1 ve doku faktörü aracılığı ile koagülasyon yanıtını düzenler. VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve monobutirin aracılığı ile anjiogeneze, leptin, visfatin, adiponektin resistin aracılığı ile de insülin yanıtına ve glisemik homeostaza etki eder [116]. Bunun yanı sıra yağ doku, içerdiği aromataz aracılığı ile erkek ve menopoz sonrası kadınlarda temel östrojen

kaynağıdır. Yağ dokudan salınan TNF- $\alpha$ , immün sistemdeki rolüne ek olarak insülin bağımlı süreçler olan karbonhidrat homeostazı ve lipid metabolizması üzerine etki gösterir [139]. TNF- $\alpha$  lipogenezi inhibe eder ve lipolizi stimüle eder [116].



**Şekil 2.3.** Yağ dokudan sekrete edilen adipokinler. Yağ doku glukoz ve lipid metabolizması, enerji homeostazı, pro- ve anti-inflamatuar yanıtı düzenleyen ve organizmanın açlık, stress, infeksiyon ve enerji fazlalığı periyodları gibi çeşitli zorlayıcı metabolik durumlara adapte olabilmesini sağlayan bir endokrin sinyal şebekesidir [140].

## 2.6. Yağ doku kökenli hormonlar/Adipokinler

### 2.6.1. Leptin

Leptin hormonu, 1994 yılında ilk olarak keşfedildikten sonra eski Yunancada anlamı ince olan *lepto* sözcüğünden türetilen leptin ismi ile adlandırılmıştır [141, 142]. Başlıca beyaz yağ doku adipositleri tarafından salınan ve *ob* geni tarafından kodlanan leptin, peptid yapıda bir hormondur. Gıda alımını, vücut yağ kompozisyonunu, insülin aktivitesini, termogenezi, anjiogenezi ve immün sistemi modüle eden leptin, diğer dokularda da düşük düzeylerde bulunsa da çoğunlukla yağ dokuda eksprese edilir [143-145]. Yağ doku dışında gastro-intestinal sistemde başlıca midede [146] sentezlenen leptin, bunun yanı sıra derideki fibroblastlar [147], endometriyum [148], hipofiz [149], iskelet kası [150], kemik iliği [151], meme bezleri [152], ovaryum ve testislerde de [153] eksprese edilir. Anoreksinojen bir hormon olan ve dolaşımda serbest ya da proteine bağlı olarak bulunan leptin, beyin üzerine etki göstererek gıda alımını

azaltır ve enerji harcamasını artırır [154]. Bunun yanı sıra, yapılan çeşitli çalışmalarda leptinin pre-puberte ve erken puberte dönemindeki bireylerde yüksek düzeylerde bulunmuş olması bu hormonun puberte başlangıcı açısından da önemli rol oynadığını göstermektedir [155]. Leptin hipotalamustaki reseptörlere bağlanarak etki eder [156]. Organizmadaki leptin düzeyi enerji dengesine, tokluk durumuna ve vücuttaki yağ miktarına bağlı olarak değişir. Obez bireylerde leptin düzeyi ince bireylere göre daha yüksektir. Açlık durumunda düzeyi dramatik olarak düşer ve beslenmeyi takiben hızla artar. İnsülin, glukokortikoidler ve ateş leptin salınımında artışa neden olurken soğuk maruziyeti, testosteron ve noradrenalin leptin salınımını azaltır [155, 157].

### 2.6.2. Adiponektin

Adipositler tarafından en fazla üretilen adipokinlerin başında gelen adiponektin endotel hücreleri, düz kas hücreleri lökosit ve trombositler arasındaki etkileşimi düzenleyici rolü ile dolaşım sistemi homeostazının sürdürülmesinde temel bir öneme sahiptir [158]. Leptinin aksine adiponektin plazma düzeyleri zayıf bireylerde yüksek olarak saptanmıştır ve obezite ve tip2 diabetli insan ve hayvan deneklerde plazma düzeyleri düşer [159-161]. Yapılan araştırmalarda insan adiponektininin abdominal obezite ve metabolik sendrom açısından temel önemde olduğu gösterilmiş olan 3q27 kromozomu üzerinde lokalize ADIPOQ geni tarafından kodlandığı bulunmuştur [162, 163]. 26 kDa uzunlukta bir protein olan adiponektin [164] dolaşımında düşük molekül ağırlıklı trimer [165], orta molekül ağırlıklı heksamer [165, 166] ve 12-18 monomerden oluşan yüksek molekül ağırlıklı multimerler olmak üzere çeşitli multimerik kompleksler halinde bulunur [165, 167]. Plazmadaki yüksek molekül ağırlıklı multimerler insülin duyarlılığı ile ilişkili bulunmuşken, multimerizasyonda bozukluk tip2 diabet ile ilişkilidir [165]. Adiponektinin damar hasarı ve aterogeneze karşı koruyucu işlev gördüğü gösterilmiştir [168]. Bunun yanı sıra antidiabetik ve anti inflamatuvar etkinliği olduğu da ortaya konulmuştur. Vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit üretiminde artış aracılığı ile endotel bağımlı vazodilatasyonu artırdığı [169] gösterilen adiponektin, TNF- $\alpha$  tarafından indüklenen inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar [168]. Hayvan deneylerinde rekombinant adiponektin uygulanmasının obezite ve obezite ile ilişkili bozuklukları düzelttiği gösterilmiştir [170]. Buna ek olarak adiponektinin makrofaj köpük hücrelerinin transformasyonunu önleyerek ve insanlarda aterosklerotik plak oluşumuna katıldıkları gösterilen makrofaj yüzey adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur [171]. Ancak, yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada yüksek adiponektin düzeylerinin stabil iskemik kalp hastalığı olan bireylerde mortalite ve kalp yetmezliği gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [172]. Bu da adiponektin ile obezite ilişkili kardiyak patolojiler arasındaki ilişkinin henüz aydınlatılmaya muhtaç olduğunu göstermektedir.

### 2.6.3. Adipolin

Yeni bulunan bir yağ doku kökenli insülin duyarlaştırıcı adipokin olan adipolin (CTRP12) plazmada iki farklı izoformda bulunur: Tam boy fCTRP12 (40kDa) ve bölünmüş gCTRP12 (25 kDa). Plazmada bulunan başlıca izoform gCTRP12'dir [173]. Adipolin IRS-1, IRS-2 (insülin reseptör substrat), Akt (Protein kinaz B) ve MAPK (Mitojen ile aktive kinaz) gibi insülin sinyal proteinlerinin fosforilasyonunu arttırarak insülin duyarlığında artışa yol açar [173]. Buna ek olarak adipolin plazma düzeyleri ile inflamatuvar bir sitokin olan resistin düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur [173]. Adipolin yağ dokuya makrofaj infiltrasyonunu ve yağ dokudan inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak insülin direnci ve obezitede antiinflamatuvar etki gösterir [174].

### 2.6.4. Visfatin

İlk olarak periferik kandaki lenfositlerdeki ekspresyonu gösterilen ve kolonizasyon arttırıcı faktör olarak tanımlanan visfatin, 2005 yılında visseral yağ dokuda daha yüksek düzeyde eksprese edildiğinin saptanması ile yeni bir adipokin olarak tanımlanmış ve visfatin adını almıştır [175]. Yapılan in vitro çalışmalarda visfatin insülin benzeri bir etki göstererek adiposit ve myositler tarafından glukoz alınımını arttırmış, hepatik glukoz salınımını inhibe etmiş ve adiposit diferensiyasyonunu arttırmıştır [175]. İnsülin benzeri bu etkiler IRS-1 ve IRS-2'nin, insülinin bağlandığından farklı bir bölgeden fosforilasyonu aracılığı ile olur. Tip2 diabet hastalarında visfatin düzeyleri artarken tip1 diabetlilerde düşme eğilimindedir [176, 177].

### 2.6.5. Omentin

İlk olarak galaktofuranoz bağlanan solubl lektin olarak tanımlanan [178] başlıca visseral yağ dokunun stromal vasküler fraksiyonu tarafından üretilen 38–40 kDa protein olan omentin yeni bulunmuş bir adipokindir. Yapılan in vitro çalışmalarda Akt sinyal yolağı aracılığı ile insan adipositleri tarafından glukoz alınımını arttırdığı gösterilen omentin ekspresyonunun obezite ve insülin direncinde azaldığı bulunmuştur [179, 180]. Endotel hücrelerine omentin uygulamasının nitrik oksit aracılıklı vazodilatasyona neden olduğu ve TNF- $\alpha$  nın yol açtığı inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir [181, 182]. Yapılan çalışmalarda omentinin santral oreksojenik etki gösterdiği bulunmuştur [183]. Normal bireylere kıyasla anoreksia nervozada plazma omentin düzeylerinin yüksek iken obezitede daha düşük olduğunun gösterilmesi ve plazma omentin düzeyleri ile BKİ (Beden kitle indeksi) arasındaki negatif korelasyonun ortaya konulması omentinin anti obezojenik etki gösterdiğini düşündürmektedir [184]. Omentinin insanlarda

insülin duyarlılığını arttırıcı etkisini adiponektin upregülasyonu yaparak indirekt yolla gösterdiği düşünülmektedir [185].

### 2.6.6. Resistin

Resistin benzeri moleküller ailesinin (RELM) bir üyesi olan resistin, ratlarda adipositler tarafından sentezlenirken insanlarda immün sistem hücreleri tarafından üretilmektedir. Sağlıklı farelere resistin uygulanmasının glukoz toleransını bozduğunun gösterilmesi ve diyetle indüklenen obezite gelişmiş farelerde resistinin immünolojik olarak nötralize edilmesinin glukoz toleransını ve insülin duyarlılığını arttırdığının bulunması [186], obezitede insülin rezistansına resistinin artmış düzeylerinin yolaçtığını düşündürmektedir [187]. Buna ek olarak, tiazolidindion grubu ilaçlar gibi PPAR- $\gamma$  ligandlarının resistin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir [188]. Resistinin endotel hücrelerinden endotelin-1ve MCP-1 dışında ICAM-1 ve ICAM-2 gibi hücre adhezyon moleküllerinin salınımını da indüklediği [189, 190] ve buna ek olarak aortik düz kas hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [191]. Bütün bu bulgular, resistinin ateroskleroz patogenezinde de rol oynadığını göstermektedir.

### 2.6.7. TNF- $\alpha$

Varlığı ortaya konulan ilk yağ doku kökenli faktör olan ve obezite ile inflamasyon ve diabet oluşumu arasındaki ilk bağlantının kurulmasını sağlayan TNF- $\alpha$ 'nın bir adipokin olarak tanımlanması 1993 yılında Hotamisligil ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [192]. TNF- $\alpha$  26 kDa bir transmembran protein olarak sentezlenir ve bir metalloproteinaz tarafından yıkılarak dolaşıma 17 kDa bir protein olarak salınır [193]. İnsülin rezistansı ve obezite ile insan adipositleri tarafından üretilen TNF- $\alpha$  arasında sağlam bir pozitif korelasyon saptanmış olmasına [194]) karşın daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki obezitede artan TNF- $\alpha$ 'nın primer kaynağı yağ dokuya artan miktarlarda infiltre olan M1 makrofajlardır [195]. IRS1'in fosforilasyonu yolu [196, 197] ile insülinin etkilerini inhibe eden TNF- $\alpha$ , JNK1'in (c-Jun N-terminal kinaz1) aktivasyonuna neden olurken I $\kappa$ B kinaz(IKK)/NF $\kappa$ B yolağını inhibe eder [198]. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın hepatik lipogenezi de stimüle ettiği gösterilmiştir [199]. Yapılan bir çalışmada TNF- $\alpha$ 'nın yağ asidi ile indüklenen sitokin üretimini arttırdığı gösterilmiştir [200]. Obezite ve kanser arasındaki ana bağlantılardan birinin TNF- $\alpha$  olduğu düşünülmektedir [201].

### **2.6.8. IL-6**

İlk olarak 1985 yılında B hücre diferensiyasyon faktörü (BSF-2) olarak tanımlanan Interlökin-6 (IL-6) dolaşımında 22-27 kDa çoklu glikolize formlarda bulunur [202, 203]. IL-6'nın üçte biri yağ doku kökenlidir [203]. Geriye kalan üçte ikilik kısım; astrositler, lenfositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, kemik iliği stroma hücreleri, keratinosit, mezenşimal hücreler, monosit ve çeşitli tümör hücreleri tarafından üretilir. IL-6 yağ dokuda stromal vasküler fraksiyondaki monosit, miyosit ve makrofajlardan salınır (Fain vd, 2004). Visseral yağ dokudan salınan IL-6 miktarı deri altı yağ dokudan salınan IL-6'dan 2-3 kat fazladır [205]. Bir akut faz reaktanı olan IL-6, akut faz yanıtına karışmanın dışında bağışıklık, endometrial dokunun büyümesi, kemik oluşumu, üreme, hipofiz hormonlarının salınması [206, 207], tümör oluşumu, artrit [208] ve yaşlanmada da aktif rol oynar [209, 210]. IL-6 etkilerini hem solubl hem de membrana bağlı formları aktif durumda olan IL-6R reseptörleri aracılığı ile gösterir [211]. Yapılan çalışmalarda IL-6'nın yapısal bir uyku düzenleyici faktör olduğu bulunmuştur. Narkolepsi, uyku apne sendromu gibi durumlarda IL-6 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [212]. Yapılan klinik çalışmalarda artmış serum IL-6 düzeyleri obezite, insülin direnci ve tip 2 diabet ile korele bulunmuştur [213-216]. İnsan deneklere IL-6 infüzyonu hepatik glukoz çıkışında artış ve hiperglisemiye neden olur. Bunun yanı sıra, lipolitik etki gösterir ve dolaşımdaki serbest yağ asidi düzeylerini arttırır [217-219].

### **2.6.9. Retinol Bağlayan Protein-4 (Rbp4)**

Temel olarak karaciğerde üretilen bir retinol transport proteini olan Rbp4 adipositler tarafından da üretilir [220]. İnsanlarda yüksek Rbp4 dolaşım düzeyleri insülin direnci ve obezite ile ilişkili bulunmuştur [221]. Rbp4'ün metabolik sendromun erken dönemlerine karıştığı düşünülmektedir [220, 222]. Rbp4 enjeksiyonları ya da transgenik Rbp4 ekspresyonunun farelerde insülin rezistansına karıştığı gösterilmiştir [223]. Bunun yanı sıra birçok klinik çalışmada tip2 diabet hastalarında Rbp-4' ün yüksek olduğu gösterilmiştir [221, 224, 225].

### **2.6.10. SFRP5 (Secreted Frizzled Related Protein 5)**

Yakın zamanlarda antiinflamatuvar bir adipokin olarak tanımlanan sfrp5'in yağ kütlesi ile sıkı bir korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir. Zayıf farelerde düzeyleri yüksek olarak saptanan sfrp5'in obez farelerde düşük düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir [226]. Bunun yanı sıra obez ve diabetik farelere sfrp5 enjeksiyonu metabolik fonksiyonu düzeltir ve yağ doku inflamasyonunu azaltır. Srp5 Wnt5a sinyal yolağı aracılığı ile yağ doku inflamasyonunun önemli

bir mediatörü olan JNK1 sinyal yolağının [227, 228] aktivasyonunu ortadan kaldırır. Bu yolla, JNK aktivasyonu sonucu oluşan yağ doku inflamasyonunu düzeltir [226].

### **2.6.11. PEDF (Pigment Epitelyum Kökenli Faktör)**

PEDF bir serin proteaz inhibitör(serpin) ailesi üyesidir. Başlangıçta insan retinal pigment epitelyum hücrelerinden salındığı gösterilen bir nörotrofik faktör olarak identifiye edilmiştir [229]. PEDF, retinoblastom tümör hücrelerini diferensiyel non-proliferatif nöronlara dönüştürebildiği bulunan 50 kDa bir glikoproteindir [230]. Bunun yanı sıra, potent bir anjiogenez inhibitörü olan [231] PEDF vasküler endotel growth faktör (VEGF) ve reseptörlerini modüle ederek etki gösterir [232]. Yakın zamanlarda, PEDF'nin adipositler tarafından oldukça yaygın olarak salındığı ve insülin direnci, diyabet ve obeziteye bağlı hastalıkların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [233]. PEDF düzeyleri metabolik sendromlu bireyler ve tip 2 diyabet hastalarında yüksek bulunmuştur. İnflamatuar bir sitokin olan PEDF adiposit lipolizini artırır, mitokondriyal disfonksiyona yol açar ve kas dokuda ve karaciğerde yağ birikimini arttırarak insülin direncine yol açar [234, 235]. PEDF inflammatuar etkilerini bir hücre yüzey reseptörü aracılığı ile gösterir [236]. Yapılan çalışmalarda bu reseptörün yağ ve glukoz homeostazının sürdürülmesi için kilit önemde olan adipoz trigliserit lipaz olduğu gösterilmiştir.

### **2.6.12. Progranulin(PGRN)**

90 kDa glikozile bir peptid olan progranulin, salındığında proteolize olarak granulinlere degrade olur [237]. İnsülin direnci hücre kültürü modellerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında salınımı TNF- $\alpha$  ve deksametazon tarafından indüklenen bir adipokin olduğu bulunmuştur. Obez farelerde kan ve yağ dokudaki düzeyi yüksek bulunmuş olan PGRN, pioglitazon uygulaması ile normal düzeylere iner [238]. PGRNnin IL-6 üzerine etki göstererek yüksek yağlı diyet ile indüklenen insülin direnci ve obeziteye aracılık ettiği gösterilmiştir [238]. PGRN'nin IL-6 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [238]. Bunun yanı sıra obez bireylerde yağ doku kitlesi ile PGRN düzeyleri arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir [239]. PGRN dolaşım düzeylerinin tip2 diyabetli bireylerde anlamlı olarak yüksek olduğu ve IL-6, yüksek duyarlılık C-reaktif protein (HsCRP) ve omental yağ dokuya makrofaj infiltrasyonu ile sıkı korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir [240].

### **2.6.13. aP2 (Adiposit Yağ Asidine Bağlanan Protein-2)**

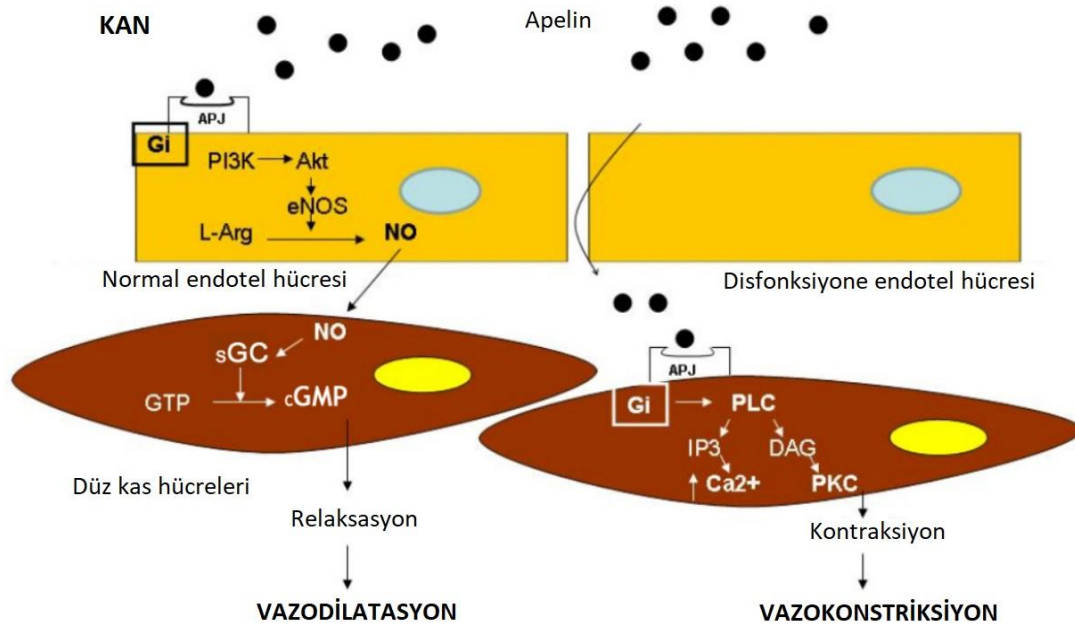
Sitoplazmik yağ asidine bağlanan proteinler (FABP-fatty acid binding protein) ailesinin bir üyesi olan aP2 (adiposit lipid-bağlanan protein 2), 14-15 kDa bir proteindir. FABPlar dokuya spesifik olarak eksprese edilir ve yağ asitlerine bağlanır [241, 242]. Adipositler tarafından salgılanan major FABP üyesi olduğu gösterilen aP2'nin yağ dokudaki makrofajlar tarafından da salındığı gösterilmiştir [243]. Makrofajlarda aP2 ekspresyonunun PPAR agonistleri ve LDL uygulamasının yanı sıra monositlerin makrofajlara diferensiyasyonu tarafından arttırıldığı ve statinler tarafından düşürüldüğü gösterilmiştir [243-246]. Morbid obezitede yağ dokuda görülen hipoksik koşulların simüle edildiği hücre kültürü çalışmalarında adipositlerden aP2 salınımının arttığı gözlenmiştir. Bu deneylerde artmış olan aP2nin glukoz ile stimüle edilen insülin salınımını anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda aP2 eksikliğinin diyet kaynaklı ya da genetik obezitede sistemik glukoz ve lipid metabolizmasını düzelttiği gösterilmiştir [247, 248]. Bunun yanı sıra hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda aterosklerotik plaklardaki makrofajlarda aP2nin yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir [243]. Buna ek olarak deneysel hayvan modellerinde aP2 eksikliğinin ateroskleroz gelişiminde belirgin bir azalmaya yol açtığı ortaya konulmuştur [243]. Bu sonuçlar makrofajlardan salınan aP2'nin ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

### **2.6.14. Apelin**

1998 yılında bir G proteini kenetli reseptör olan APJ'nin (apelin reseptörü) ligandı olarak tanımlanan apelin [249], apelin-36, apelin-17, apelin-13 ve piroglutamat apelin-13'ü de içeren birkaç bioaktif peptitten oluşan 77 aminoasitli bir propeptid olarak salınır [250]. İnsan plazmasında her üç izoformda bulunur [251]. Apelin mayalardan insanlara kadar birçok ökaryot organizmalarda eksprese edilir. 1993 yılında keşfedildikten sonra [252] apelinin keşfine kadar orfan reseptör olarak kabul edilen APJ'e (apelin reseptörü) bağlanarak etki gösterir [249]. Apelin reseptörü ile anjiotensin-1 reseptörü arasında %54 homoloji mevcuttur ancak, anjiotensin-2 apelin reseptörüne bağlanmaz [252]. Apelin ve apelin reseptörünün beyin [253-256], kemik iliği stroması [257], akciğer [258], kalp, büyük ve orta arterlerin intima ve media tabakası [258-260], dalak, ince barsak ve kolon mukozasında [253] eksprese edildiği gösterilmiştir. Obez ve insülin direnci olan bireylerde plazma apelin düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bireylerde apelinin yağ dokudaki adipositlerden yüksek miktarda salındığının gösterilmesi ile birlikte apelin bir adipokin olarak tanımlanmıştır [261]. Apelin kahverengi yağ dokudan da salınmaktadır [262]. Apelinin kahverengi adipositlerin diferensiyasyonunu indüklediği ve beyaz ve bej yağ dokunun kahverengi yağ dokuya dönüşümünü arttırdığı gösterilmiştir [263]. Organizmada çok geniş bir



aralıkta farklı etkiler gösteren apelin ve apelin reseptörleri günümüzde apelinergic sistem olarak adlandırılmaktadır. Apelinin bazı HIV (Human immune deficiency virus) enfeksiyonu türlerine karşı önleyici etki gösterdiği bulunmuştur [264]. Bunun yanı sıra apelinin kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir [265, 266]. Apelinin kan basıncı üzerine etkisini nitrik oksit aracılığıyla bir mekanizma ile oluşturduğu ortaya konulmuştur [266]. Apelin kardiyak kaslar ve kan damarlarının kontraksiyonunu modüle eder [267, 268], su ve gıda alımını düzenler, hipofiz hormonlarının salınımını modüle eder [269]). Yapılan çalışmalarda apelinin enerji metabolizmasını düzenlediği ve sıvı homeostazının düzenlenmesinde etkili olduğu ortaya konulmuştur [269]. Bununla birlikte, apelinin bu bölgelerde oluşturduğu etkiler anjiotensinojene karşıt yöndedir [270-272]. Beyinde sıvı homeostazi için kilit bölgelerde apelin mRNA ekspresyonu gösterilmiştir. Apelin vasopressinerjik nöronlarda bulunan apelin reseptörleri aracılığıyla bu nöronların aktivitesini ve vasopressin salınımını modüle eder [269, 273-276]. Apelinin gebelik ve laktasyon süresince meme bezlerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği ve kolostrum içeriğinde fazla olmak üzere sütle de sekrete edildiği gösterilmiştir [277]. Obezitede yağ doku kitlesinin artışına yol açan nedenlerden birisi olduğu gösterilen hipoksi nedeniyle apelin sekresyonunun arttığı ve yağ dokuda oluşan anjiogenezi indüklediği gösterilmiştir [278, 279]. Apelin kardiyovasküler sistemde hem potent vazodilatatör hem de pozitif inotrop etki gösterir. Yapılan çalışmalarda bu pozitif inotropik etki hem intakt hem yetmezlikteki kalpte ortaya konulmuştur [280-282]. Nanomolar düzeydeki etkinliği ile apelin, bilinen en potent inotropik ajanlardandır. Apelinin oluşturduğu kasılmalar izopreterenolün oluşturduğu kasılmaların %70'ine ulaşır. Apelinin oluşturduğu kasımlara PLC (Fosfolipaz C), PKC (Protein kinaz C), NHE (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>exchanger) ve NCX'in (Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger) aracılık ettiği ortaya konulmuştur [283]. Apelinin damar düz kas hücrelerinde myozin hafif zincir (MLC) fosforilasyonu yolu ile kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir [284].



**Şekil 2.4.** Apelin/APJ etkileşimine karışan yollar. Endotel disfonksiyonu varlığında ya da yokluğunda apelin/APJ etkileşimi sonucu oluşan vazomotor etkilerden sorumlu intrasellüler yollar görülmektedir. DAG- Diaçilgliserol; eNOS- Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz; Gi- İnhibitör G proteini; sGC- Solubl Guanilat Siklaz; GTP- Guanozin trifosfat; cGMP- Siklik Guanozin Monofosfat; IP3- İnositol Trifosfat; L-Arg- L-Arginin; NCX- Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger; NHE- Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger; NO- Nitrik Oksit; PI3K- fosfoinozotid 3-kinaz; PKC- Protein Kinaz C; PLC- fosfolipaz C. [285]

## 2.7. Bir İnflamasyon Kaynağı Olarak Yağ Dokusu

Obez kemirgenlerde TNF- $\alpha$ 'nın yağ dokudan salıverildiğinin [192] ve bu adipokinin nötralizasyonunun insülin direncini ortadan kaldırdığının bulunmasının [286] ardından, obezitenin inflamatuvar boyutu olabileceği düşünölmeye başlanmış ve bunu takiben yapılan çalışmalar bu konsepti doğrulamıştır. Bunun ötesinde, yağ doku kökenli kronik düşük düzeyde inflamasyonun insülin direncine ve metabolik sendroma neden olduğu gösterilmiştir [287]

Yağ dokusu hücresele düzeyde incelendiğinde %50'sinin olgun adipositlerden oluştuğu, geri kalan %50'yi stromal vasköler fraksiyonun oluşturduğu görölmektedir. Stromal vasköler fraksiyon fibroblastlar, preadipositler, immün hücreler, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinden oluşur [83, 288, 289]. Sağlıklı erişkinlerde yağ dokusunda bulunan makrofajların yüzdesi %10 civarındayken, bu oran obez bireylerde %40-50'ye kadar çıkabilir [290]. Visceral yağ dokuda subkütanöz yağ dokuya göre daha fazla miktarda makrofaj infiltrasyonu bulunmaktadır [291]. Yağ dokuda makrofaj artışını başlatan faktörlerden birinin adipositler tarafından salgılanan MCP-1 olduğu gösterilmiştir [292]. Zayıf bireylerde yağ dokusundaki makrofajların büyük kısmı anti-inflamatuvar özellikleri olan M2 fenotipindeki makrofajlardan oluşurken, obez bireylerde makrofajlar ağırlıklı olarak viral ve bakteriyel infeksiyonlara karşı konak savunmasında merkezi rol oynayan ve salgıladıkları sitokinlerle insülin direncini arttıran pro-

inflamatuvar M1 fenotipidir [293]. Bu pro-inflamatuvar makrofajların salgıladıkları sitokinler mitokondrinin fonksiyonlarını inhibe ederek bozulmuş lipolize yol açar, mitokondrial reaktif oksijen radikallerinin artışına ve insülin direncine, dislipidemi ve inflamasyona neden olur [288]. Birçok çalışmada BKİ'nin (beden kitle indeksi) sistemik dolaşımdaki CRP, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, PAI-1, P-selektin, vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1), fibrinojen, angiotensinojen, SAA3 (Serum Amiloid A 3), ve  $\alpha$ 1-asit glikoprotein, ANGPTL2 (angiopoietin-like protein 2); RBP-4 gibi birçok inflamatuvar proteinin dolaşımdaki düzeyleri ile korele olduğu gösterilmiştir [294-297].

## 2.8. Metabolik İşlevler Açısından Yağ Doku

Metabolik işlevler açısından değerlendirildiğinde beyaz yağ dokunun iki temel işlevi bulunmaktadır: Alınan fazla enerjinin depolanması amacı ile yağ asitlerinin sentezi (lipogenez) ve trigliseritlerin mobilizasyonu ve hidrolizi (lipoliz) [298]. Adipositlerde hücrel içeriğin %80-90'ını hücrenin merkezinde yer alan tek büyük lipid dropletinin içinde bulunan trigliseritler oluşturur. Trigliserid sentezi, üç yağ asidinin bir gliserol molekülü ile birleşmesi yoluyla olur. Bu işlem için gereken yağ asitleri ya şilomikron ve VLDL'nin (Çok düşük dansiteli lipoprotein) eksternal uptake ile yağ hücresine alınması yolu ile ya da asetil KoA'dan sentez yolu ile sağlanır. Eksternal uptake ile alınan yağ asitleri ya dolaşımda albümine bağlı olan serbest yağ asidi olarak, ya da trigliseritlerin hidrolizi ile oluşan yağ asitlerinden sağlanır. Yağ dokuda de novo lipogenez insanlarda karaciğere göre daha düşük önemdedir [299]. Bu süreçte oksaloasetat, malat dehidrogenaz tarafından malat'a indirgenirken, asetil-KoA asetil-KoA karboksilaz tarafından malonil-KoA'ya karboksile edilir. Yağ asidi sentezinin aktivasyonu sonucu malonil KoA ve asetil KoA'nın birleşerek palmitik asiti oluşturur. Palmitik asitten de stearik asit oluşur. Palmitik ve stearik asit stearoyl-KoA desaturaz tarafından desature edilerek palmitoleik ve oleik asit oluşur. Bu bileşikler gliserol 3 fosfat ile birleşerek trigliseritler oluşur.

## 2.9. Adiposit Diferensiyasyonu

Obezitenin hücrel düzeyde gelişim mekanizmalarından birinin var olan adipositlerin hacimlerinin artışına ek olarak yağ dokusu stromal vasküler fraksiyonu içerisinde bulunan mezenşimal hücrelerin diferensiyasyona uğrayarak olgun adipositlere dönüşümü olduğu bilinmektedir. Vücuttaki yağ dokusunun artışına yol açan bu mekanizmaya ek olarak kemik iliğinde bulunan mezenşimal hücrelerin de tiazolidindionlar ya da fazla yağ alımı gibi uyarılara yanıt olarak yağ dokuda toplanabildikleri ve adipositlere diferensiyasyon olabildikleri gösterilmiştir [300]. Preadipositlerin diferensiyasyon sürecini oluşturan basamakların net olarak açıklığa

kavuşması, diferensiyasyonun inhibisyonuna ve böylece vücuttaki adiposit sayısının sınırlandırılmasına yardımcı olacak yeni yaklaşımlar geliştirilmesini olası kılacaktır.

Günümüzde adiposit diferensiyasyonunu değerlendirmek amacı ile çeşitli hücre tipleri kullanılmakta olup, bu hücre tipleri potenslerine göre başlıca iki grupta incelenebilir. İlk grup adiposit, myosit ve kondrositlere yönlenebilen pluripotent fibroblast hücre hatlarını (10T1/2, BALB/c-3T3, RCJ3.1 ve CHEF/18 fibroblastları) içerir. Diğer grup ise adipositlere diferensiyasyon yapan yönlendirilmiş fibroblast benzeri preadipositleri (3T3-L1, 3T3-F422A, 1246, Ob1771, TA1, and 30A5 preadipositleri) içerir. Diferensiyasyon çalışmalarında daha sık kullanılan bu ikinci grup hücre hatlarıdır [301]. Bu hatlardan 3T3-L1 ve 3T3-F422A en kapsamlı şekilde tanımlanmış olan ve adipositlerle ilgili diferensiyasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan hücrelerdir [301]. 3T3-L1 ve 3T3-F422A hücre hatları 17-19 günlük Swiss 3T3 fare embriyolarının disagrege edilmesi ve klonlanması ile elde edilen embriyonik fibroblastlardır [301-303]. 3T3-L1 preadipositleri fareye enjekte edildiğinde diferensiyasyon olarak, yağ dokudan ayırt edilemeyen yağ pedleri oluştururlar [304]. 30 yıldan fazla süredir bu hatların tercih edilmesinin nedenlerinden en önemlilerinden birisi, uygun diferensiyasyon indükleyicileri ile standardize bir diferensiyasyon sürecinin ardından yapısal ve biyokimyasal olarak in situ adiposit benzeri homojen olgun adiposit hücre popülasyonu oluşturmalarıdır. Pasajlamalar sonucu hücreler varyasyonlar göstermemeleri ve bunun yanı sıra, uzun dönemli çalışmalarda güvenle kullanılabilirlikleri, çeşitli ajanların lipolitik ve anti-lipolitik etkilerinin değerlendirilmesi için uygun olmaları diğer avantajlarıdır [305].

## **2.10. Adiposit Diferensiyasyonunun Pozitif ve Negatif Etkileri**

Preadipositlerden olgun adipositlerin oluşumu ile sonuçlanan diferensiyasyon, birbirini izleyen net olarak tanımlanmış bir dizi basamaktan oluşan çok iyi organize olmuş bir süreçtir. 3T3-L1 klon hücre hatları ile yapılan deneylerde bu sürecin temel olarak 2 basamaktan oluştuğu ortaya konmuştur: Determinasyon evresi ve terminal diferensiyasyon evresi. Determinasyon evresi temel olarak mezensefalin kök hücrelerin başka hücre tiplerine diferensiyasyon yapabilme yeteneklerini kaybederek preadipositlere dönüştükleri evre olarak tanımlanabilir. Terminal diferensiyasyon evresi ise preadipositlerin çarpıcı bir morfolojik değişim geçirerek yağ hücre yapılarından yuvarlak yapıdaki adipositlere dönüştüğü evredir. Bu evrede hücreler insülin etkisine yanıt verebilme, lipid sentezi, transportu ve depolanabilmesi için gereken hücreler mekanizmaları, adipokin salgılaması gibi temel olgun adiposit özelliklerini kazanırlar [306]. Diferensiyasyon sürecine etkili çeşitli faktörler temel olarak transkripsiyonel ya da ekstraselüler düzeyde etki oluştururlar. Pozitif etkili faktörlerden beyaz yağ hücre diferensiyasyonunun erken aktivatörleri AP-1 (aktive edici protein-1) ailesi transkripsiyon faktörleridir. v-Jun, c-Jun, JunB, JunD, v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2 ve aktivasyon transkripsiyon faktörlerini (ATF2,

ATF3/LRF1 ve B-ATF) içeren geniş bir grup olan AP-1'in aktivasyonu kritik bir adipojenik transkripsiyon faktörü olan PPAR $\gamma$ 'yı indükler [301]. Yapılan çeşitli çalışmalarda diferensiyasyonun başlangıcında bu aileden c-Fos, c-Jun, Fos-B, ve Fra1'in aktive olduğu gösterilmiştir [307]. Diferensiyasyon süreci üzerine pozitif etkili diğer transkripsiyon faktörleri KLF (Kruppel like factors) ailesinin bazı üyeleri (KLF 4, 5, 6 ve 15), C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) ailesi üyeleri, SREBP'dir (sterol yanıt elemanı bağlayıcı protein). KLF5 adiposit diferensiyasyonunun erken aşamalarında aktive olan ve çeşitli çalışmalarda diferensiyasyon için mutlaka gerekli olduğu gösterilen bir proteindir [308]. KLF-4 beyaz yağ doku stromal vasküler fraksiyonundaki preadipositlerde yüksek oranda eksprese edilirken olgun adipositlerde çok düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir [309]. Adiposit diferensiyasyonunun erken aşamalarında KLF-4 mRNA'sının indüklendiği ve SiRNA ile "knockdown" edilmesinin adiposit oluşumunu belirgin düzeyde azalttığı gösterildiğinden, KLF-4'ün diferensiyasyon için kilit proteinlerden biri olduğu düşünülmektedir [310]. C/EBP ailesi  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ve  $\gamma$ 'nın adiposit diferensiyasyonunda organize bir şekilde etki göstererek diferensiyasyonu indükledikleri gösterilmiştir. Diferensiyasyonun çok erken aşamalarında C/EPB $\beta$ , izobutilmetilksantin tarafından ve C/EBP $\delta$ , deksametazon tarafından indüklenir. C/EBP $\alpha$  ise C/EPB $\beta$  ve C/EBP $\delta$ 'nin organize etkisi tarafından aktive edilir [311]. Yapılan çalışmalarda C/EBP $\beta$ ,  $\delta$  ya da  $\alpha$ 'nın inhibisyonunun diferensiyasyonda azalma ile sonuçlandığı görülmüştür [312]. SREBP ailesi proteinlerden beyaz yağ dokuda en fazla eksprese edilen izoform SREBP1-c' dir ve adipogenezde rol oynar [313]. Adipogeneze karıştığı bilinen bir diğer efektör protein grubu STAT (Signal transducer and activator of transcription) ailesidir. Bu proteinlerden STAT 1, 3, 5a, 5b ve 6 adipositlerde eksprese edilir ve 1, 5a ve 5b'nin 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu sırasında yüksek düzeyde eksprese edildiği bulunmuştur [314]. Bunun yanı sıra STAT5a ve 5b protenlerinin aktivasyonunun 3T3-L1 hücrelerinde PPAR $\gamma$  ekspresyonunda artış oluşturduğu gösterilmiştir [315]. Adiposit diferensiyasyonu ile ilgili birçok proteinin varlığı ortaya konulmuşsa da bunlardan en önemlisi, adiposit diferensiyasyonu için gerekli ve yeterli olduğu gösterilen hormon nükleer reseptörleri süperfamilyasının bir üyesi olan PPAR $\gamma$ 'dır [316-318]. PPAR $\gamma$  diferensiyasyonun ana düzenleyicisidir. PPAR $\gamma$ 1 ve PPAR $\gamma$ 2 alt tiplerinden PPAR $\gamma$ 2 yağ hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilir ve adiposit diferensiyasyonunu düzenleyen temel alttip olduğu gösterilmiştir [318, 319]. Yapılan çeşitli çalışmalarda PPAR $\gamma$ 2 nin adiposit diferensiyasyonu ve insülin sensitivitesi için önemli olduğu gösterilmiştir [320, 321]

### **2.11. 3T3-L1 Preadipositlerinin Diferensiyasyonu Sırasında Gen Ekspresyonu**

Diferensiyasyon sürecinin başlangıcında 3T3-L1 preadipositleri konfluent olduğunda diferensiyasyonun erken belirteçleri eksprese edilmeye başlar. Yapılan çalışmalarda temas

inhibisyonu aşamasında ilk olarak ekspresyonunda artış olan genlerin tip VI kolajen ve lipaz genleri olduğu gösterilmiştir [322, 323]. Diferensiyasyonun en erken aşamasında, diferensiyasyon indükleyici deksametazon, insülin, izobutilmetilksantin hücre kültür ortamına eklenmesinden yalnızca 1 saat sonra 3T3-L1 hücrelerinde c-fos, c-jun, junB, c-myc ile C/EBP  $\beta$  ve  $\delta$ 'nın indüklendiği gösterilmiştir [324]. C/EBP  $\beta$  deksametazona yanıt olarak indüklenirken, C/EBP  $\delta$ 'nın izobutilmetilksantin eklenmesi sonrası indüklendiği gösterilmiştir. C/EBP  $\beta$  ve  $\delta$ 'nın diferensiyasyonun 2. gününde başlayan ve 3.-4. gününde maksimum düzeyine ulaşan PPAR $\gamma$ 'nın ekspresyonuna aracılık ettiği düşünülmektedir [325, 326]. C/EBP  $\beta$  ve  $\delta$ 'nın ekspresyonu koordine şekilde diferensiyasyon indükleyici kokteyl uygulanmasından 2 gün sonra başlayan ve 5. günde maksimuma ulaşan C/EBP  $\alpha$ 'nın ekspresyonunu indükler [327, 328].

## 2.12. Adiposit Diferensiyasyonu Evreleri

3T3-L1 ve NIH3T3F42A gibi klonal hücre hatlarında yapılan çalışmalarda adiposit diferensiyasyonu temel olarak iki evrede karakterize edilmiştir:

### 2.12.1. Yönlenme:

Bu aşamada mezenşimal kök hücre yapısal olarak diğer kök hücrelerden ayırt edilemeyen ancak adiposit dışındaki diğer hücelere yönlenme yeteneğini kaybettiği preadiposit halini alır. Hücre kültür ortamındaki hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında kontakt inhibisyon adı verilen bir mekanizma ile hücreler büyüme duraklaması aşamasına geçer. Bu aşamada tüm hücreler G1 fazına girerler [329]. Yağ doku vasküler stromal fraksiyonunda bulunan mezenşimal kök hücrelerin preadipositlere yönlenme aşamasına girmesini tetikleyen faktörün ne olduğu net olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalarda Bmp ve Wnt ailesi proteinlerin bu süreçte kritik rol oynadığı görülmektedir [82]. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada BMP-4'ün (Bone morphogenic protein-4) over kanseri hücre hattında Rho-kinaz aktivasyonu yaptığı gösterilmiştir [330]. Bunun yanı sıra, ROCK inhibitörü Y-27632'nin uygulanmasının BMP-2 (Bone morphogenic protein-2) indüksiyonu yolu ile ektopik kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [331]. Ayrıca, BMP-2 ve BMP-4'ün kök hücrelerin adiposit hattına yönlenmesini indüklediği gösterilmiştir [332-335]. İlginç olarak Wnt ailesi glikoproteinler yönlenme aşamasını indükleyici rollerinin [336] yanı sıra, terminal diferensiyasyon aşamasında inhibitör etki gösterirler [337, 338].

Son çalışmalarda A33 hücrelerinde Wnt sinyal yolağını aktive ettiği gösterilen ve yeni tanımlanmış R-spondin2 ve 3'ün proliferasyon süreci sırasında köken aldıkları C3H10T1/2 kök hücrelerine oranla dramatik olarak upregüle olduğu gösterilmiştir [336]. Bunun yanı sıra, Wnt

sinyal yolağının downstream transkripsiyon faktörleri olan Lef1(Lymphoid enhancer-binding factor 1) ve Tcf nin (transcription factor) ekspresyon düzeylerinin de proliferere A33 hücrelerinde C3H10T1/2 kök hücrelerine göre değiştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, preadipositlerde yüksek miktarda eksprese edilen ve diferensiyasyon süreci sırasında düzeylerinin düştüğü gösterilen WNT10b'nin adiposit diferensiyasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [337]. Bu bulgular ışığında Wnt sinyal yolağı özellikle yönlenme ve proliferasyon olmak üzere adiposit diferensiyasyon sürecinin tüm aşamalarına karışıyor gibi görünmektedir.

### **2.12.2. Mitotik Klonal Ekspansiyon:**

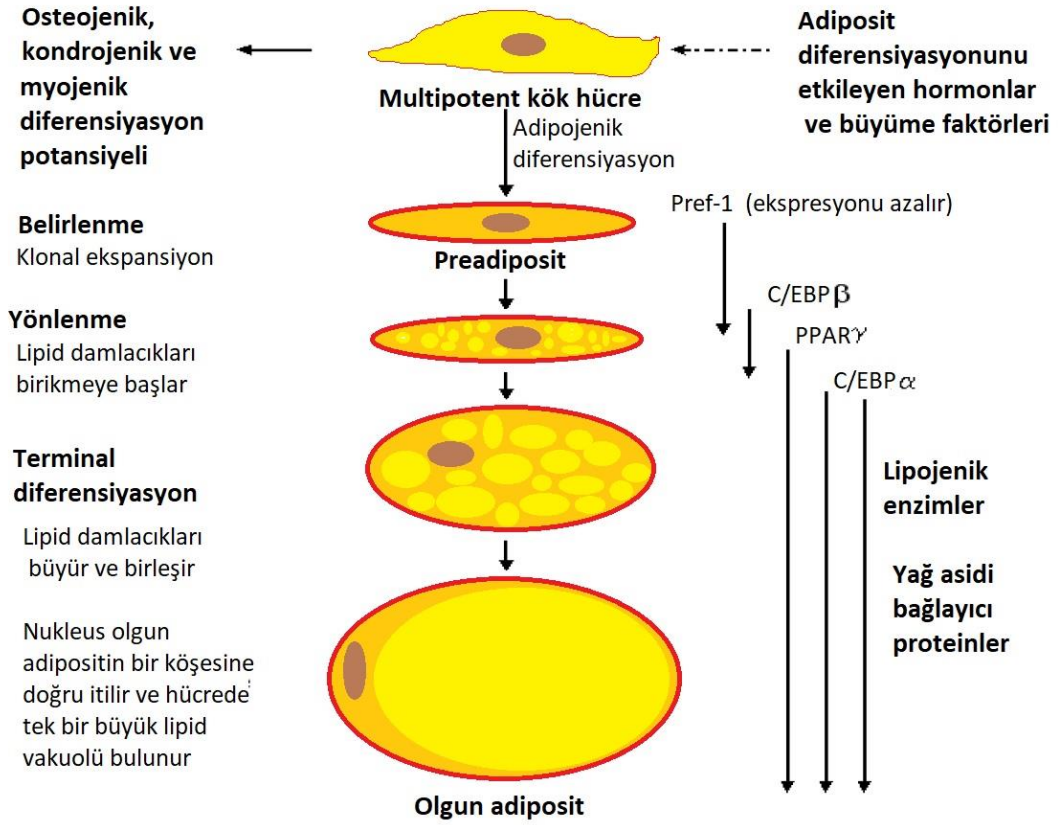
Adiposit diferensiyasyon sürecinin indüklenmesi amacı ile klon hücre hatlarının konflüent olmasının ardından temas inhibisyonu ve preadiposit yönlenmesi olduktan sonra hücre kültür ortamına verilen adiposit diferensiyasyon indükleyicileri tarafından adipogenez indüklenir. Bu aşamadan itibaren preadipositler karmaşık bir süreç sonucunda ardışık olarak aktive olan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkisi ile eşzamanlı olarak tekrar hücre siklusüne girerek iki tur mitotik bölünme gerçekleştirdikleri mitotik klonal ekspansiyon olarak adlandırılan bir evreye ulaşırlar. Klon hücre hatları ile yapılan çalışmalarda mitotik klonal ekspansiyonun varlığı ve diferensiyasyon süreci için gerekliliği gösterilmiş olmakla birlikte, insanlardan elde edilen yağ doku kökenli mezenşimal kök hücrelerin diferensiyasyon sürecinde mitotik klonal ekspansiyona girmediği gösterilmiştir [339]. Bu hücrelere sitozin arabinozid verilerek mitoz bölünmenin inhibe edilmesinin adiposit gelişiminde herhangi bir duraklama ya da azalmaya yol açmaması [329] iki olasılıktan birini akla getirmektedir: Ya mitotik klonal ekspansiyon insan primer yağ doku fibroblastlarının diferensiyasyon süreci için gerekli bir basamak değildir; ya da bu hücreler hâlihazırda insan vücudunda bu aşamayı geçmiş durumda bulunmaktadır [340]. Bunun yanı sıra, 3T3-L1 preadipositlerine selektif hücre permeabl MEK (Map kinaz kinaz) inhibitörü PD 98059 (2'-Amino-3'-metoksiflavon) uygulanmasının preadipositlerin mitotik klonal ekspansiyonunu inhibe etmesine rağmen diferensiyasyon üzerine herhangi bir etki yapmadığı gösterilmiştir [341]. Adipogenezin indüksiyonunun ilk 24 saati içerisinde artmaya başlar ve bununla birlikte eşzamanlı olarak hücreler hücre siklusüne tekrar girerler ve mitotik klonal ekspansiyon durur [342]. Hücre siklusünün G1 fazından S fazına geçiş sırasında C/EBP-β hiperfosforile olur ve ardışık olarak glikojen sentaz kinaz-3-β ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) tarafından aktive edilir. Ardından C/EBP-β' C/EBP-α ve PPAR-γ'nin promoter bölgelerindeki C/EBP düzenleyici elemanlar ile etkileşime girmesi adiposit diferensiyasyonunun kilit transkripsiyon faktörleri olan C/EBP-α ve PPAR-γ'yı indükler [343]. Mitotik klonal ekspansiyon sırasında ilk mitoz döngüsünü indüksiyondan 24-36 saat sonra tamamlanırken ikinci mitoz döngüsü indüksiyondan 48-60 saat sonra tamamlanır. Bu iki mitoz döngüsü sonucunda

hücre sayısı 4 kat kadar artar [342]. Diferensiyasyon için gerekliliği tartışmalı olmasına rağmen, mitotik klonal ekspansiyon olarak adlandırılan evrenin oldukça karmaşık, birbirini eşzamanlı olarak izleyen basamaklardan oluşan ve tüm hücrelerin aynı zamanda hücre döngüsünün belirli aşamalarına girdiği bir süreç olduğu gösterilmiştir [342].

### **2.12.3.Terminal Diferensiyasyon:**

Mitotik klonal ekspansiyon evresinin tamamlanmasının ardından hücreler, terminal diferensiyasyon aşamasına girerler. Bu dönem, preadipositlerin olgun adiposit özelliklerini kazanmaya başladıkları dönemdir. Hücreler, lipid sentez ve depolanması için gereken özelliklerin yanı sıra, insülin etkisi ve adipositokinler ile diğer adiposit-ölgün proteinlerin sentezi için gerekli özellikleri edinmeye başlarlar. Sürecin başlangıcında sitozole dağıntık partiküller olarak hücre içinde biriken lipid damlacıkları boyut olarak büyümeye başlar ve birbirleri ile birleşerek terminal diferensiyasyon evresinin tamamlanması ile hücrenin merkezinde nukleusu ve diğer hücre içi organelleri kenara iten büyük tek bir lipid damlacığı halini alır [306].





**Şekil 5.** Adiposit diferensiyasyonunun evreleri. İçinde adipositlerin de bulunduğu farklı hücelere diferansiye olabilmeye yeteneğindeki multipotent kök hücelere uygun çevresel koşullar sağlandığında bu hücreler preadipositlere dönüşerek mitotik klonal ekspansiyona ve ardından terminal diferensiyasyon sürecine girer. Hücreler boyut olarak büyürken, hücre içinde biriken lipid damlacıkları birleşir ve neredeyse hücrenin tümünü dolduran tek bir lipid damlası oluşur. Bu sürece eşlik eden moleküler olaylar sağda yaklaşık uzunluğunu gösteren oklarla gösterilmiştir [344].

## 2.13. G Proteinleri

Hücre yüzeyindeki reseptöre bütünleşik halde bulunan ve gelen uyarıların reseptörü aktive etmesini takiben sonucu hücre içine aktararak hücre içindeki çeşitli sinyal yollarının aktive olmasını sağlayan G proteinleri başlıca iki sınıfa ayrılır: Heterotrimerik G proteinleri ve monomerik küçük G proteinleri.

### 2.13.1. Heterotrimerik G Proteinleri

Heterotrimerik G proteini aracılıklı sinyal iletim sistemi, hücre membranında yerleşik bir reseptör, buna bütünleşik bir heterotrimerik G proteini ve bir efektörden oluşan kompleks bir moleküler anahtar olarak tanımlanabilir. Bir agonist transmembranal reseptörü uyardığı zaman, reseptör aktive olur ve bu aktivasyon sonucunda oluşan sinyal reseptöre bütünleşik G proteinini

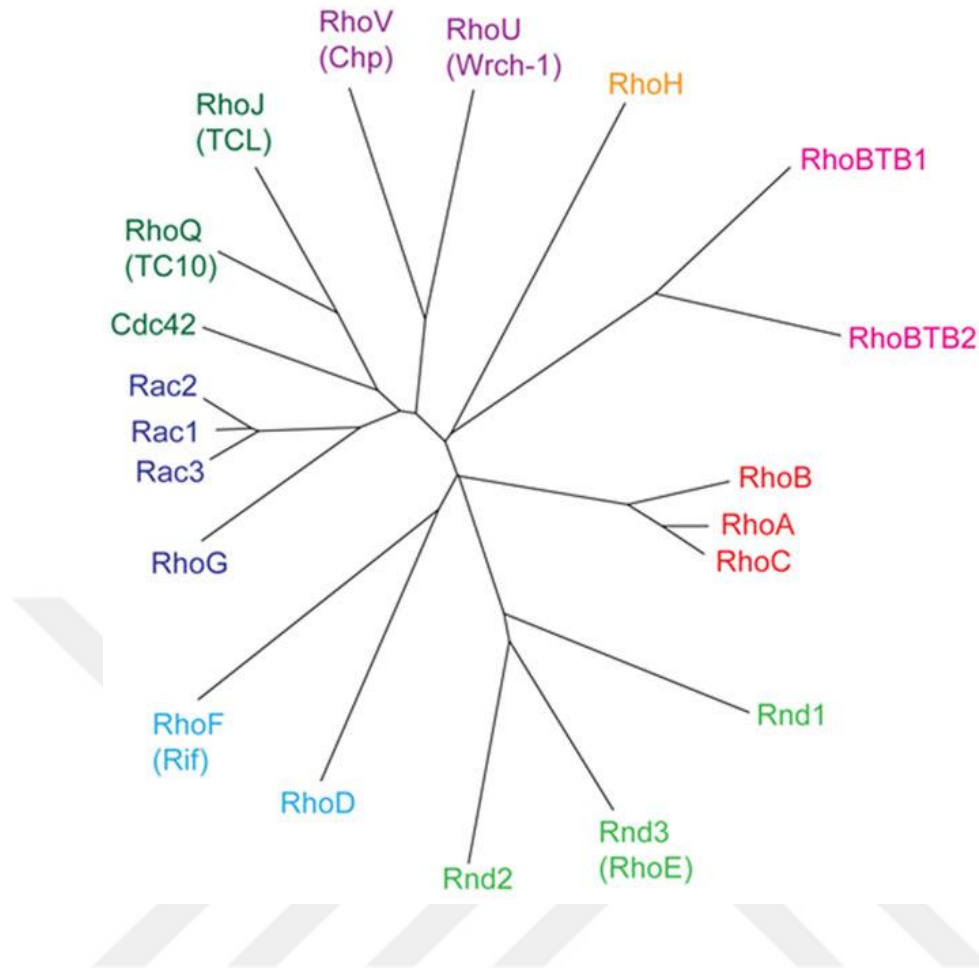
uyarır ve sonrasında efektörü aktive eder. G protein aracılı sinyal iletim sistemi, hücre içine iletilen sinyalin amplifikasyonunu da sağlayarak etkinin güçlenmesine neden olur [345]. Heterotrimerik G proteinleri GTPyi bağlayan ve hidroliz eden bir  $\alpha$  subuniti ve bununla kompleks oluşturan  $\beta$  ve  $\gamma$  subunitlerinden oluşur [346-348].

### 2.13.2. Monomerik G Proteinleri

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda hücre içi sinyalleme yollarında monomerik GTP-bağlı proteinlerin (G proteinleri) önemli role sahip olduğunu gösterilmiştir. Oldukça küçük boyutlu olan monomerik G proteinleri (20-35 kDa) hücre bölünmesi, farklılaşması ve çeşitli hücresel süreçler sırasında hücre iskeletinde oluşan yapı değişimlerinin düzenlenmesi gibi farklı hücresel olaylarda görev alır. Mayalardan insanlara evrimsel olarak en aşağıdaki hücrelerden memelilerdeki hücrelere kadar tüm ökaryot hücrelerde bulunan monomerik G proteinleri 100'den fazla üyesi bulunan bir büyük ailedir [349]. Diğer G proteinleri gibi monomerik G proteinlerinin de GTP'az aktivitesi vardır. Monomerik G proteinleri inaktif (GDP-bağlı) ve aktif (GTP-bağlı) olmak üzere dinamik olarak birbirine dönüşebilen iki ayrı formda bulunabilirler. İnaktif GDP bağlı formun aktif GTP bağlı forma dönüşümü için GDP'nin GTP ile yer değiştirmesi, GEF (Guanin nükleotid değiştirici protein, guanin nükleotid değiştirici faktör) tarafından katalize edilmekteyken, GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun inhibisyonu GDI (Guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü) tarafından katalize edilir. G proteininin aktivasyonunda hız kısıtlayıcı basamağı GDP/GTP dönüşüm reaksiyonu sırasında GDP-bağlı formdan GDP'nin ayrılmasıdır. GEF tarafından katalize edilen bu aşama çok yavaş bir şekilde gerçekleşir. Hücreye bir stimulus geldiğinde GEF aracılığı ile monomerik G proteininin inaktif formdan aktif forma dönüşümü gerçekleşir [350, 351].

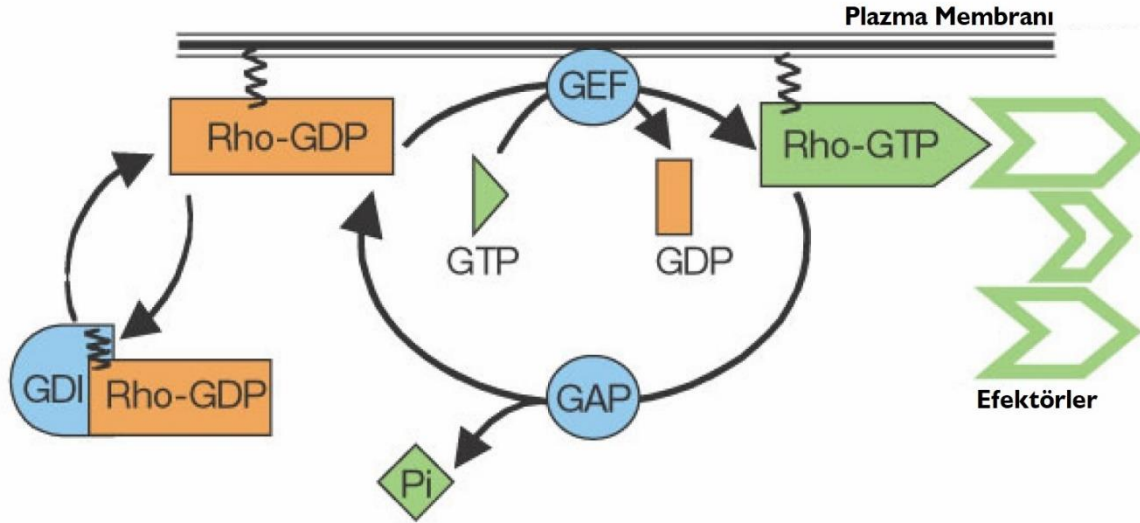
### 2.14. Rho Proteinleri

Çok yaygın bir yelpazedeki hücresel işlevleri düzenledikleri ortaya konulan ve en basit yapıdaki hücrelerden insan hücrelerine kadar tüm ökaryot hücrelerde yaygın olarak eksprese edildikleri gösterilen Rho GTPazlar, 5 major gruptan oluşan (Ras, Rho, Rab, Arf ve Ran) ve 166 üyeden oluşan Ras süperalesinin bir alt grubunu oluşturmaktadır. Rho GTPazlar diğer Ras süperalesi GTPazlardan farklı olarak,  $\alpha$ 3 sarmalı ile  $\beta$ 5 bükümü arasında henüz işlevi tam olarak aydınlatılmamış 10-15 amino asitlik ekstra bir dizi içerirler [352, 353].



**Şekil 2.6.** İnsan Rho GTPazları: 20 insan RhoGTPazı filogenetik ağaçta gösterilmiştir. Rho ailesi sekans homolojisine göre alt ailelere bölünmüştür. Her bir aile farklı bir renkte gösterilmiştir [354].

20-30 kilodalton ağırlığında GTP bağlı proteinler olan Rho GTPazlardan ilk kez RhoA, Ras ile ilişkili genlerin araştırıldığı bir çalışma sırasında 1985 yılında *Aplysia Californica*'dan izole edilmiştir [355]. İnsanlarda 26 civarında farklı proteinden oluşan Rho proteinleri göstermiş oldukları homolojiye göre 6 alt aileye ayrılır: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB ve RhoT/Miro. Rho BTB ve RhoT proteinleri diğer GTPazlardan yapısal, düzenleyici ve işlevsel açıdan çok farklı olduklarından atipik Rho/Rac GTPazlar olarak da adlandırılırlar [356]. RhoA, diğer monomerik G proteinleri gibi aktif bir GTP bağlı form ile inaktif GDP bağlı form arasında sürekli değişerek moleküler bir anahtar gibi işlev görmektedir [345, 357].



**Şekil 2.7. Rho GTPaz siklüsü.** RhoGTPazların Aktif (GTP-bağlı) ve inaktif (GDP-bağlı) durumu arasındaki siklüs. Bu siklüs 3 farklı grup protein tarafından düzenlenir: GEFler (guanin nükleotid exchange faktör) nükleotid değişimini katalizler ve aktivasyona aracılık eder; GAPlar (GTPaz aktive edici protein) GTP hidrolizini stimüle eder, inaktivasyona yol açar ve GDİlar (guanin nükleotid dissosiyasyon inhibitörleri) inaktif GTPazları membranlardan ayırırlar. Tüm Rho GTPazlar C terminal ucundan prenil olur. Bu işlev görmeleri için gereklidir [358].

Rho proteinleri hücre düzeyde morfogenez, hücre polaritesi, hücre farklılaşması, proliferasyonu gibi farklı hücresel işlevlerde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra moleküler düzeyde hücre iskeleti dinamikleri, veziküler transport ve gen ekspresyonuna karıştıkları da gösterilmiştir [359]. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada RhoA'nın kalpte iletim sisteminin gelişiminde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur [360]. Bunun yanı sıra, RhoA'nın aktin stres fiber oluşumu ve fokal adhezyon kurulumunu arttırdığı gösterilmiştir [361]. Bunun yanı sıra Rho proteinlerinin tümör büyüme ve metastazı ile ilişkili çeşitli mekanizmalarda da kilit rol oynadıkları bulunmuştur [362-368].

Rho proteinleri GDP-bağlı durumda iken sitozolde inaktif halde bulunmaktadır ve lizofosfatidik asid (LPA) ve sfingozin-1-fosfat (S1P) gibi ajanlarla stimüle edildiklerinde GTP-bağlı hale geçip aktif forma dönüşürler [369]. Aktive forma dönüşüm gerçekleştiğinde Rho proteinleri hücre membranının iç yüzeyine tutunur ve p21-aktive protein kinazlar (PAK), IQGAP, PAR6 ve p67fox gibi alt efektörleri ile etkileşir [352, 370, 371]. Bunun sonucunda spesifik etkilerin oluşumu gerçekleşir. Rho proteinlerinin membrana tutunması için C-terminal ucuna geranilgeranilpirofosfat ya da farnesilpirofosfat rezidüsü gibi bir lipid zincirinin eklenmesi gereklidir [372-374]. Bu prenil grubu RhoGDI tarafından örtüldüğü zaman Rho GTPazlar sitozole sekestre olurlar [374-376]. Rho GDI bunun yanı sıra spontan GDP-GTP değişimini ve GTPaz aktivitesini de inhibe eder [374]. Diğer Rho proteinlerinin aksine sürekli GTP-bağlı durumda olan ve aktivitesi GEF ya da GAP'lar tarafından kontrol edilmeyen Rnd proteinleri iki farklı mekanizma

ile RhoA yolağını inhibe ederler. Rnd1 ve Rnd3'ün p190GAP'a bağlanıp aktive ederek RhoA aktivitesinde azalmaya yol açmalarının [377] yanı sıra Rnd3(RhoE) ün direkt olarak ROCK'a bağlanarak inhibe ettiği de gösterilmiştir [378].

## **2.15. GTP-GDP Döngüsünün Düzenleyici Proteinleri**

### **2.15.1. GAP:**

Küçük G proteinleri GTPazlar olarak adlandırılrsa da aslında GTP hidroliz hızları oldukça yavaştır (RhoA için 0,039/dakika) [379] ve etkili bir GTP hidrolizi için GAP (gtpase activating protein) proteinlerinin reaksiyona katılması gereklidir [350]. Moleküler ağırlıkları 50-250 kDa arasında değişen GAP'ların temel işlevi GTP hidrolizini hızlandırarak küçük G proteinlerinin aktive durumdan inaktive duruma geçişini sağlamaktır [353]. GAPlar GTP hidroliz hızını birkaç kata kadar arttırmırlar. GAPlar temel olarak GTPaz döngüsünün negatif efektörleri olarak işlev görmelerine karşın, ailenin bazı üyeleri sinyal transdüksiyon molekülleri olarak da etki oluşturmaktadırlar: Ras-spesifik p120GAP'ın aktin hücre iskeleti reorganizasyonu üzerine önemli bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur [380].

### **2.15.2. GEF**

İnaktive durumda GDP'ye bağlı olarak bulunan G proteinlerinin aktivasyonu için sıkı bir şekilde bağlı bulunan GDP nin GTP ile yer değiştirmesi gereklidir ve bu yer değişimi GEF (guanine nucleotide exchange factor) katalize eder. Bunun sonucunda G proteinlerinin GTPye bağlanarak aktive olmaları ve efektör proteinlerle etkileşmeleri artar. RhoGTPazların GTP-GDP döngüsü üzerine etkili GEF sayısının RhoGTPazların yaklaşık 4 katı kadar olduğunun ortaya konulmuş olması, RhoGTPazların multipl RhoGEFler tarafından aktive edilebileceğini düşündürmektedir [381]. RhoA, Rac1 ve Cdc42 yi aktive eden en az 25 RhoGEF olduğu gösterilmiştir [382, 383].

### **2.15.3. GDI**

RhoGDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) rho gtpazların bağlı olduğu GDP ya da GTPden ayrılmasını inhibe ederek hücre içindeki RhoGTPaz havuzunun büyük kısmının inaktive durumda tutulmasını sağlar [384]. Bunun yanı sıra hem intrinsik hem de GAP lar tarafından stimüle edilen GTPaz aktivitesini inhibe eder [385]. Bu iki mekanizma aracılığı ile herhangi bir anda hücrede bulunan Rho proteinlerinin yaklaşık %90-95'inin inaktive durumda olduğu sitoplazmik havuzda tutulmasını sağlar ve hücreye bir stimulus geldiği zaman RhoGTPazların

hızlıca membrana lokalize olarak hızlı bir yanıt oluşmasına katkıda bulunur [381]. Buna ek olarak RhoGDI, tüm RhoGTPazların karboksi terminal ucunda yer alan hidrofobik izoprenil grubunu örterek Rho proteinlerinin daha düzgün katlanmasını böylece stabilize olmasını sağlayarak degradasyonlarını da önler [381]. Hücredeki RhoGDI miktarının yaklaşık olarak hücrede bulunan tüm RhoGTPazların (Rho, Rac, Cdc42 vb) toplam miktarına eşit olduğu ve RhoGDI ile bağlanmak için bu GTPazlar arasında bir kompetisyon olduğu gösterilmiştir [386]. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada RhoGDI ile bağlanmanın önlenmesi durumunda hücre içi Rho protein havuzunun stabil olmadığı ve kolayca proteaz bağımlı yolla degrade olduğu gösterilmiştir [387].

## 2.16. RhoA ve alt efektörleri

Aktive GTP bağlı RhoA hücrede aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, düz kas kasılması, hücre içi trafiğin düzenlenmesini de içeren çok geniş bir yelpazedeki etkilerini çeşitli alt efektörleri ile etkileşerek ortaya çıkarır. Bu alt efektörlerden ortaya konulmuş olanlar Rho-kinaz [388], rhofilin-1 ve rhofilin-2 [389], rhotekin [390], -p140 mDia [391], citron [392], fosfolipaz D, PRK1 (PKC-related kinase-1) ve PRK2 (PKC-related kinase-2) [393] dir. Yakın zamanlarda G protein eşlenik reseptör kinaz-2 (GRK-2) nin de RhoA'nın bir alt efektörü olduğu gösterilmiştir. Aktive RhoA direkt olarak GRK-2'nin katalitik bölgesine bağlanır ve GRK-2'nin Raf1(Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1), MEK1 ve ERK2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase) ile etkileşimini indükler [394]. RhoA'nın alt efektörlerinden en kapsamlı olarak araştırılan Rho-kinazdır (ROCK).

## 2.17. Rho/Rho Kinaz Yolağı

AGC ailesi serin/treonin protein kinazların bir üyesi olan Rho-kinaz (ROCK) enzimi RhoA'nın alt efektörüdür. İlk olarak 1996 yılında keşfedilen [388] Rho-kinaz'ın başlıca iki izoformu bulunmaktadır: ROK $\beta$ / Rho-kinaz  $\beta$  / p160ROCK olarak bilinen ROCK 1, 18. kromozoma lokalizedir ve 1354 amino asit içeren bir proteindir. ROK $\alpha$ / Rho-kinaz  $\alpha$  olarak bilinen ROCK 2 ise, 12. kromozoma lokalizedir ve 1388 amino asit içerir [395]. ROCK 1 ve ROCK 2 enzimlerinin amino asit sekansları %64 özdeştir [396]. Her iki izoformun N-terminal ucunda GTP bağlı RhoA, Rho B ve Rho C'nin bağlandığı Rho-bağlanma alanı (RBA) bulunur [397-400]. Her iki izoform birçok dokuda yaygın olarak eksprese edilse de ROCK 2 beyin ve kas dokuda daha yüksek düzeylerde bulunurken, ROCK 1 akciğer, karaciğer ve testislerde daha yüksek düzeyde eksprese edilir [388, 396]. İki izoform arasında birtakım farklılıklar bulunmaktadır: ROCK 1 özellikle kaspaz 3 tarafından kırılırken ROCK 2 granzim B tarafından kırılmaktadır [401-403]. RhoE ROCK 1'e bağlanır, ROCK 2'ye bağlanmaz. MYPT1'e yalnızca ROCK 2 bağlanır [404, 405]. Bunun yanı

sıra ROCK 2'nin PH-C1 bölgesinin fosfatidil inositol trifosfat (3,4,5) ve fosfatidil inositol bifosfata (4, 5) sıkıca bağlanırken ROCK 1 PH-C1 bölgesi bağlanmaz [406]. Yapılan çalışmalarda stres fiberlerinin oluşumu için ROCK 1'in, fagositoz ve hücre kontraksiyonu için ise ROCK 2'nin gerekli olduğu gösterilmiştir [405, 406].

Rho-kinaz yolağının düz kas hücrelerinde  $Ca^{2+}$  duyarlılığı, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre adezyonu, hücresel kontraksiyon gibi fizyolojik olayların yanısıra, anjina, glokom, hipertansiyon, inflamasyon, kanser invazyonu, oksidatif stres, preeklampsi, vasküler remodelling gibi patolojik olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir [407, 408]. Bunun yanı sıra, yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda bu yolağın pulmoner hipertansiyon ve serebrovasküler hastalıklarda da etkin olduğu ortaya konulmuştur [409]. Rho-kinaz yolağı adducin, ERM (ezrin-radiksin-moezin), LIM kinaz, MLCP (myosin light chain phosphatase) ve  $Na^+/H^+$ exchanger (NHE)' in [395, 410, 411] serin-treonin fosforilasyonu aracılığı ile hücre kontraksiyonunu düzenler.

Başta düz kas olmak üzere kontraktil dokularda kontraksiyon oluşumu için hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyelerinin yaşamsal önemde olduğu çok iyi bilinmektedir. Düz kaslarda kasılmayı başlatan temel uyaran sitoplazmik serbest  $Ca^{2+}$  düzeylerindeki artıştır. İntrasellüler  $Ca^{2+}$  seviyesindeki artış,  $Ca^{2+}$ 'un kalmoduline bağlanmasını artırır. Düz kas hücrelerine gelen spesifik bir stimulusa yanıt olarak düzeyi artan hücre içi  $Ca^{2+}$ , kalmodulin ile birleşerek kompleks oluşturur. Oluşan  $Ca^{2+}$ -kalmodulin kompleksi MLCK'i (myosin light chain kinase-miyozin hafif zincir kinaz) aktive ederek myozin hafif zincir fosforilasyonu sonucunda düz kas kasılmasını başlatan temel aktivatördür. Hücre membranındaki heterotrimerik G-proteini eşlenik reseptörlere noradrenalin, anjiotensin II, endotelin gibi agonistlerin bağlanması sonucunda oluşan sinyalin  $G_{q/11}$  tipi G proteinine aktarılması fosfolipaz C'nin aktivasyonuna yol açar. Fosfolipaz C hücre membranında bulunan fosfatidil inositol 4,5-difosfatın hidrolizini sağlar ve bunun sonucunda diaçilgliserol (DAG) ve inozitol-3-fosfat ( $IP_3$ ) meydana gelir. Ortaya çıkan DAG, protein kinaz C'nin aktivasyonu yolu ile kalsiyum duyarlaşmasını da içeren bazı hücresel etkilere neden olurken, oluşan  $IP_3$  membrandan sitoplazmaya diffüze olur ve sarkoplazmik retikulumdaki  $IP_3$  reseptör kanalına bağlanıp sarkoplazmik retikulumdan  $Ca^{2+}$ salınmasını sağlayarak hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeylerini artırır. Buna ek olarak oluşan DAG da PKC (protein kinaz C) yi aktive eder ve L tipi  $Ca^{2+}$  kanalları aracılığı ile hücre dışından  $Ca^{2+}$  girişi yolu ile hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeylerinin artışına katkıda bulunur. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu kritik değere ulaştıkça myozin hafif zincir kinaz enziminin (MLCK) aktivasyonu gerçekleşir. MLCK, myozin hafif zincirin (MLC) serin 19 rezidüsünden fosforilasyonunu sağlar. MLC nin fosforilasyonu, aktin ve myozin II arasındaki etkileşimi promote eder ve kasılmayı indükler.

Ancak, düz kas kasılmasının regülasyonunda etkili tek faktörün hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyleri olmadığı, bunun yanı sıra başka düzenleyici mekanizmaların da var olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan araştırmalarda fenilefrin ya da karbakol gibi agonistler aracılığı ile düz kaslarda

oluşturulan maksimum kasılmaların ortama yüksek konsantrasyonda  $K^+$  eklenmesi sonucu oluşan depolarizasyon aracılığı ile indüklenen maksimum kasılmalardan daha fazla olduğunun gözlenmesi ve  $Ca^{2+}$  indikatörleri (örneğin aequorin) kullanılarak düz kas hücresinin intrasitoplazmik  $Ca^{2+}$  düzeylerinin anlık olarak ölçüldüğü çalışmalarda hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeylerinin myozin hafif zincir fosforilasyon derecesi ve buna bağlı kontraksiyon gücü ile her zaman korelasyon göstermediğinin ortaya konulması [412, 413] sonucu düz kaslarda kasılmaya aracılık eden başka mekanizmaların olabileceği savı ortaya atılmıştır.

Düz kas kasılmasının düzeyinin MLC fosforilasyonu derecesi tarafından belirlendiği genel olarak kabul gören bir olgudur. MLC fosforilasyonu düz kaslarda kontraksiyona neden olurken, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinin azalması MLC defosforilasyonuna yol açar ve bu da gevšemeye neden olur. Düz kas hücresinde agonistler tarafından oluşturulan reseptör aracılı kasılma yanıtları ile hücre içi kalsiyum düzeylerinin eşzamanlı olarak ölçüldüğü çalışmalar, hücre içi kalsiyum düzeylerinin düşmesine ve MLCK aktivitesinin azalmasına karşın fosforile MLC düzeylerinin yüksek olarak saptanmasının nedeninin kalsiyum duyarlılığının artması olduğunu ve bu yolla başlamış olan kontraksiyonların sürdürülebildiğini göstermiştir [369, 414-416]. Ayrıca, bu çalışmalarda hücre içinde  $Ca^{2+}$  düzeylerinin eşit bulunmasına karşın agonistlerce oluşturulan reseptör aracılı kasılmalar sırasında fosforile MLC düzeylerinin, depolarizasyon ile oluşturulan kasılmalar sırasında ölçülen MLC düzeylerinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ortaya konulan bu fenomen kalsiyum duyarlaşması (calcium sensitization) olarak adlandırılmıştır.

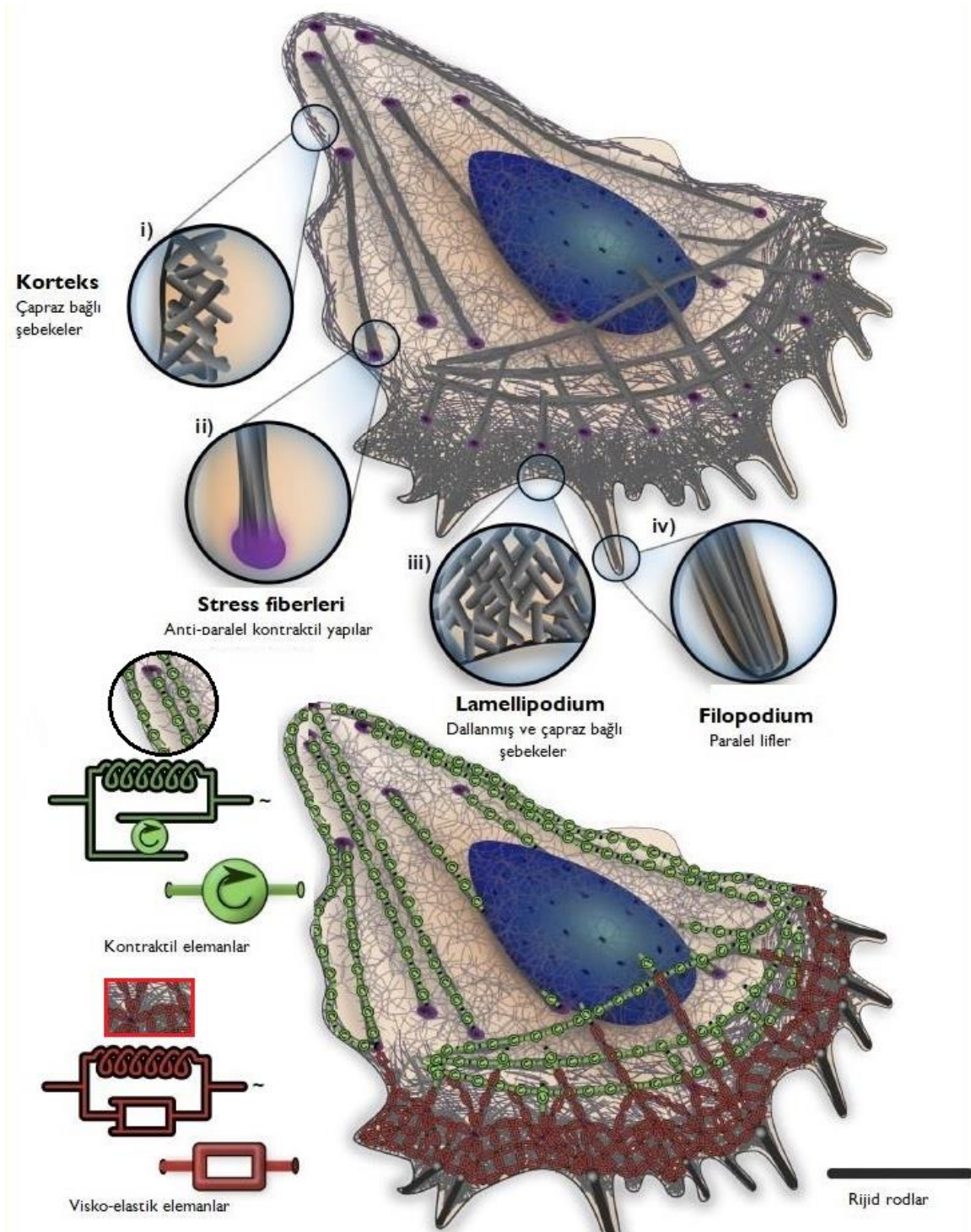
Düz kas hücrelerinde kalsiyum duyarlaşmasına karışan yollardan belki de en önemlisi, Rho/Rho-kinaz yolağıdır [417]. Buna ek olarak kalsiyum duyarlaşması üzerine etkili başka yollar bulunduğuda gösterilmiştir (fosfatidilinozitol-3 kinaz, protein kinaz C ve tirozin kinaz yolları). Ancak, yukarıda anılan kalsiyum duyarlaşmasının ortaya çıkışında etkili tüm yollar ya myozin hafif zincirin direk fosforilasyonu ve/veya myozin fosfataz enzim inhibisyonu aracılığı ile fosforile olmuş myozin hafif zincir düzeylerinin artışına yol açarak  $Ca^{2+}$  ile başlatılmış kasılma, hücre göçü, hücreşel şekil değışikliği vs. gibi hücre iskeleti aktini aracılığı ile gerçekleştirilen olayların sürdürülmesini sağlarlar [418]. Myozin fosfataz inhibisyonu, hücre içinde fosforile myozin hafif zincir düzeylerinin kümülatif olarak artışına aracılık etmektedir.

Düz kas hücrelerinde agonistler tarafından oluşturulan kasılmalara aracılık ettiği gösterilen kalsiyum duyarlılığından küçük G proteini RhoA'nın sorumlu olduğu ve myozin fosfataz aktivitesinin inhibisyonu aracılığı ile etki oluşturduğu ortaya konulmuştur. RhoA, bu etkiyi downstream efektörü olan Rho-kinaz enzimi aracılığı ile oluşturmaktadır.



## 2.18. Aktin hücre iskeleti

Hücrelerin yaşam döngüsü boyunca hücre içi transport, hücre şeklinin korunması ya da hareket sırasında şekil değişikliği, hücre bölünmesi, hücre polaritesi gibi hücrenin diferensiyasyonunu ve gelişimini etkileyen fizyolojik süreçlerin gerçekleşmesi, birbiri ile bağlantılı filamentöz polimer şebekesi ve düzenleyici proteinlerden oluşan aktin hücre iskeleti üzerinde gerçekleşen değişiklikler sayesinde mümkün olur. Hücre iskeleti birçok intrasitoplazmik protein ve organelin çok organize bir şekilde aktivasyonu aracılığı ile hücre içeriğinin üç boyutlu planda organize olmasını, dış çevre ile hem kimyasal hem de fiziksel olarak bağlantıda olmasının yanı sıra, hücrenin hareket edebilmesine ve şekil değiştirebilmesine aracılık eden gücü sağlar. İskelet sözcüğü statik ve değişmeyen bir yapıyı çağrıştırmasına karşın, hücre iskeleti değişmez ve statik bir yapı değil, aksine koşullara oldukça ileri düzeyde adapte olabilen ve yapısındaki polimer ve düzenleyici proteinlerin sürekli değişen kompozisyonları dolayısı ile dinamik bir yapıdır. Hücre membranının iç yüzeyini kaplayan ve korteks olarak adlandırılan ince bir aktin tabakası mevcuttur. Bu aktin tabakası hücre biçiminin korunma ve sürdürülmesi açısından önemlidir [419].



**Şekil 2.8.** Hareket eden bir hücrede aktin yapısı. A: Hücrede işaret edilen farklı yapıların şematik gösterimi: i) hücre korteksi ii) Birkontraktıl fiber olan stress fiberi iii) lamellipodia iv) filopodia. Büyütülen bölgeler hücrenin farklı bölümlerindeki yapısal farklılıkların altını çizmektedir. B: Aktin yapısının ve mekanik profilinin görünümü. Kırmızı kareler aktin şebekesini simgeleyen şok absorbe edicilerdir. Yeşil daireler myozin motor aktivitesinin oluşturduğu aktif yaylardır [419]

Hücre iskeletini oluşturan polimerler temel olarak üçe ayrılır: Aktin filamentler, ara filamentler ve mikrotübüller. Bu üç tip polimer hücrenin deformasyona karşı koyabilmesini

mümkün kılar ve hücreye dışarıdan uygulanan kuvvetlere karşı reorganizasyona uğrayarak hücrenin adaptasyonunun gerçekleşmesinin yanı sıra hücre içeriğinin organizasyonunu ve hücre içindeki bölümlerin bütünlüğünün korunması ve sürdürülmesini sağlar. Nukleusun hücre içinde bulunduğu konumda tutulması bu üç polimerin yalnız ya da birlikte nukleus üzerine güç uygulaması sayesinde olur [420, 421].

Aktin filamentleri globular aktin (G-aktin) monomerlerinin lineer bir konformasyonda polimerize olarak filamentöz aktine dönüşümü (F-aktin) sonucu oluşur [422]. Aktin hızlı bir şekilde polimerize olup, ardından yine hızlı bir şekilde monomerize olabilir. Aktin filamentlerine eklenen her bir aktin monomeri için 1 aktin-bağlı ATP hidrolize edilir. Hücrede total ATP turnoverinin %40'ı aktin polimerizasyonu için harcanır [423]. 30-100 µm uzunluğa ulaşabilen ve fizyolojik konsantrasyonlarda (5-20 mg/ml), bozunum basıncı 100-1000 Pa olan viskoelastik şebekeler oluşturabilen aktin filamentlerin çapı 7-10 nm dir [424-427].

Adlarının düşündürdüğü gibi ara filamentler aktin filamentlerden kalın, mikrotübüllerden incedir. Yaklaşık 10 nm çapında olan ara filamentler, hücre membranından nukleusa kadar uzanacak uzunluktadırlar. In vitro çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda viskoelastik şebekeler oluşturdukları gösterilen ara filamanlar hücrenin mekanik dayanıklılığını sağlarlar [428-430]. Beş ayrı sınıfa ayrılan (desmin, keratinler, laminin, nörofilamentler ve vimentin) ara filamentler yaklaşık 40 farklı subunit proteininden oluşur. Ara filamentler ekstrasellüler matriksle bağlantılıdır ve sitoplazmada nukleusu çevreler [431].

Yapısı  $\alpha$  ve  $\beta$  tübülün heterodimerlerinden oluşan mikrotübüller bu üç polimerin en sertidir ve oluşum ve bozunumu çok karmaşık süreçler içerir. Mikrotübüller 5 mm uzunluğa kadar ulaşabilir ve bu da tek bir mikrotübülün genellikle baskılayıcı yükler altında bükülmesi olarak bulunmasına rağmen hücrenin uzunluğu boyunca uzanabilmesine olanak tanır [432, 433]. Mikrotübüller hücre büyümesi, veziküler transport ve mitoz gibi fizyolojik süreçlerde kilit rol oynayan hücre içi yapılardır. Mikrotübüllerin polimerizasyon ve depolarizasyonu sırasında, polimerin  $\alpha/\beta$  heterodimerlerinin  $\beta$  subunitinde GTP hidrolizi olur [431, 434].

## 2.19. Rho/Rho-kinaz Yolağı ve Aktin Hücre İskeleti Reorganizasyonu

Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde kilit öneme sahip sinyal yollarından birisi Rho/Rho-kinaz yolağıdır. Rho-kinaz enzimi myozin hafif zincir fosforilasyonunun yanı sıra alt efektörleri olan LIM-kinaz ve kofilin aracılığı ile aktin hücre iskeleti remodellingi üzerine etki gösterir. RhoA, bunun yanı sıra diğer bir alt efektörü olan mDia [391] aracılığı ile de aktin hücre iskeleti üzerine etki göstermektedir. mDia aktin kümelenmesini ve polimerizasyonunu arttırarak uzun düz aktin filamentlerinin oluşumunu indükler. [435, 436] ROCK ise miyozini aktive ederek antiparalel düz aktin filamentleri arasında çapraz bağların oluşumunu sağlar [437].

Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada MKN45 gastrik adenokarsinom hücrelerinin motilitesinin düzenlenmesinde kilit rol oynayan mikrotübüllerin, hücre iskeleti reorganizasyonu ve ameboid hareketin ortaya çıkmasını sağlayan oluşum ve bozunumundaki değişimlerde Rho/Rho-kinaz yolağının aktivitesindeki artışın etkili olduğu ortaya konulmuştur [438].

Akciğer kanseri, meme kanseri, gliom, over kanseri ve oral skuamöz hücreli kanser gibi birçok kanser türünde kofilin ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir [439-443]. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda artmış LIMK-1 ekspresyonunun birçok farklı tümör tipinin invazyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, LIMK-1 ekspresyonundaki azalmanın invazyon yeteneğinde azalma ile korele olduğu, artmış ekspresyonun ise tümörlerin invazyon yeteneğini arttırdığı ortaya konulmuştur [444-447].

Artmış LIMK-1 ekspresyonunun hücre motilitesi üzerine etkilerinin kofilin ekspresyonundaki artış tarafından tersine çevrildiği göz önüne alındığında LIMK-1 ve kofilin ekspresyonları arasındaki dengenin yani başka bir deyişle LIMK-1/kofilin oranının hücresel yanıtların belirleyicisi olduğu ve aktin dinamiklerindeki küçük değişimlerin bile tümör hücrelerinin invazyonu üzerine etkili olduğu açıktır [440, 447]. Yapılan çalışmalarda Rho/Rho-kinaz yolağının, LIMK aktivitesinin regülasyonunun yanı sıra, MLC'nin defosforilasyonunun MLCP inhibisyonu ile bloke edilmesinin dışında MLC'nin direkt olarak ROCK tarafından fosforile edilmesi ile de aktin hücre iskeleti reorganizasyonu ve stres fiberlerinin oluşumu yolu ile hücre migrasyonu üzerine etki gösterdiği bilinmektedir [448-450].

## **2.20. Hücre Gelişim Süreçlerine Rho/Rho-kinaz Yolağının Etkisi**

### **2.20.1. Diferensiyasyon ve Proliferasyon**

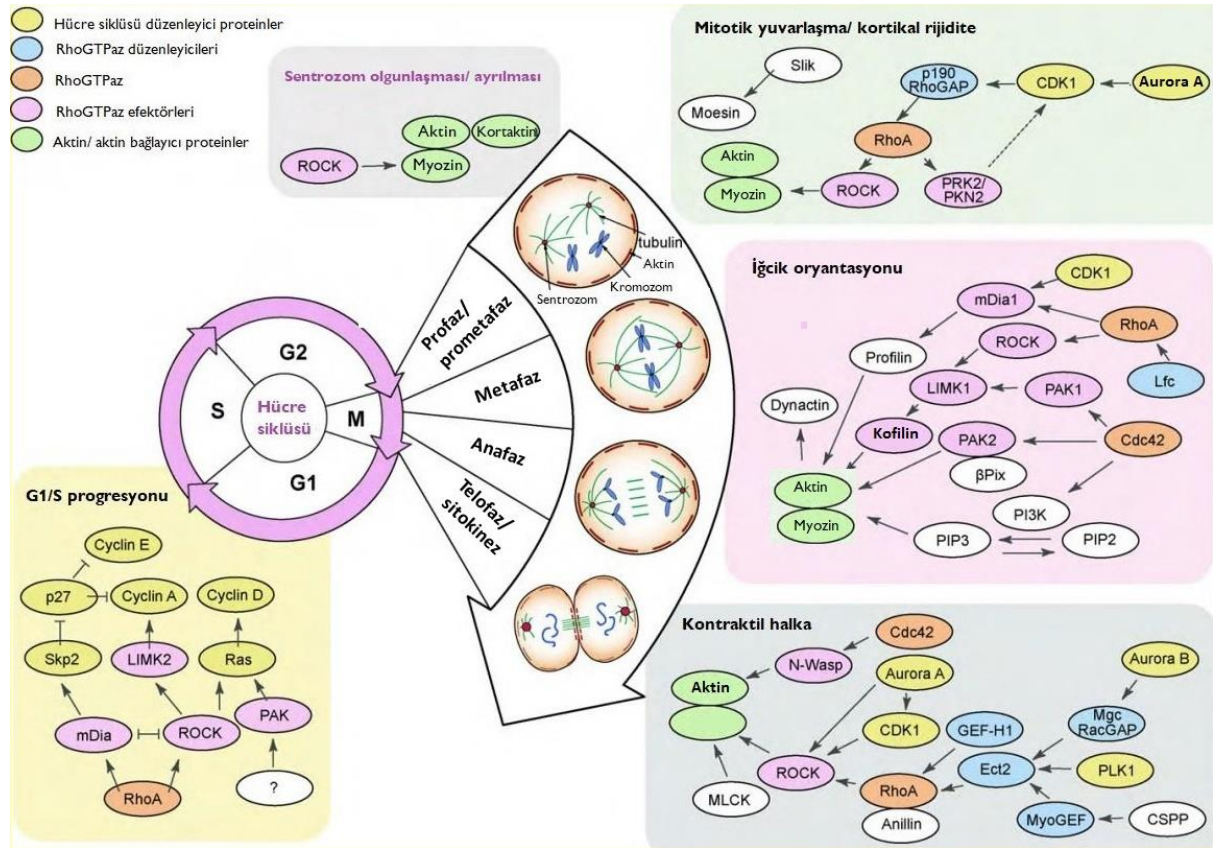
Yapılan çalışmalarda Rho/Rho-kinaz yolağının hücre proliferasyonu ve/veya diferensiyasyonu üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, hücre tipine göre elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Kültüre keratinositlere ROCK inhibitörü Y-27632 uygulanması keratinosit hücre kültüründe diferensiyasyonu inhibe eder ve proliferasyonu indüklerken [40], kültüre CCE fare embriyonik kök hücrelerinde ROCK enzimlerinin hücrelerin diferensiyasyonunu inhibe ederek hücrelerin undiferensiyasyon durumunda kalmasını ve kolonize olmasını indükler [451].

Adiposit diferensiyasyonu sırasında hücrede adiposit spesifik genlerin up-regülasyonundan önce aktin sentezinde ve aktin reorganizasyonunda azalmayı da içeren hücre şekil değişiklikleri olduğu gösterilmiştir [452, 453]. Yapılan bir çalışmada insan mezenşimal kök hücrelerinde aktin reorganizasyonundaki değişikliklerin adipogenezde rol oynadığı bulunmuştur [454].

## 2.20.2. Mitoz bölünme ve Rho/Rho-kinaz Yolağı

Hücre siklüsünün son evresi olan mitoz bölünme birbirini izleyen 6 aşamadan oluşur: profaz, prometafaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez. RhoA'nın mitoz bölünme sırasında cyclin D1 ya da p21 WAF1 gibi özellikle hücre siklüsünde G1/S geçişine karışan genlerin regülasyonu yolu ile hücre siklüsü üzerine etki gösterdikleri bulunmuştur [455]. Mitoz bölünmenin her aşamasında Rho/Rho-kinaz yolağının etkili olduğu ortaya konulmuştur: Mitoza giriş sırasında RhoA aktivitesinin arttığı ve hücre korteksinde lokalize olduğu gösterilmiştir [456-459]. NIH 3T3 fibroblast hücre kültüründe ROCK aktivasyonunun cyclin A ve cyclin D1 düzeylerinde artışa yol açarken p27 düzeylerinde düşüşe yol açtığı gösterilmiştir [460]. Hücrede mitoz bölünmenin başlangıcında kortikal retraksiyona Rho/Rho-kinaz yolağının aracılık ettiği gösterilmiştir. Mitoz başlangıcındaki bu Rho/Rho-kinaz aktivasyonunun P190RhoGAP-A'nın Cdk1 tarafından fosforilasyonu sonucunda olduğu düşünülmektedir [457]. Mitotik iğ oluşumu ve mikrotübüllerin kinetokorlara tutunması için aracılık eden yollardan birisinin GEF-H1/RhoA/mDia1 yolağı olduğu gösterilmiştir [461, 462]. Mitozun geç evresinde ise aktin hücre iskeleti üzerine etkileri ile kontraktıl halka oluşumunu düzenlediği ortaya konulmuştur [463, 464]. Bölünmekte olan *Xenopus* embriyolarına RhoA inhibitörü C3 ekzoenzim enjeksiyonu yapılması hücrelerde kontraktıl halka oluşumunu ve bölünmeyi önlemiştir [465, 466]. Kültüre rat böbrek epitelyum hücreleri ve fare T lenfoma hücrelerine RhoA inhibitörü C3 ekzoenzim uygulanmasının sitokinezi tümüyle bloke ettiği gösterilmiştir [467, 468]. Mitoz bölünme sırasında LIMK-1 aktivitesinin arttığının ortaya konulması [469] ile birlikte fosforile LIMK-1'in mitotik iğ çevresinde yoğunlaştığının gösterilmesi [470], Rho/Rho-kinaz yolağının mitoz bölünme sırasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Bir GEF olan ECT2 (Epithelial cell transforming 2) bölünme yarığında RhoA'nın lokalize olmasını ve aktivasyonunu sağlar [471]. Bütün bu bulgular ışığında hücre bölünmesinde etkili önemli yollardan birisinin Rho/Rho-kinaz yolağı olduğu söylenebilir.

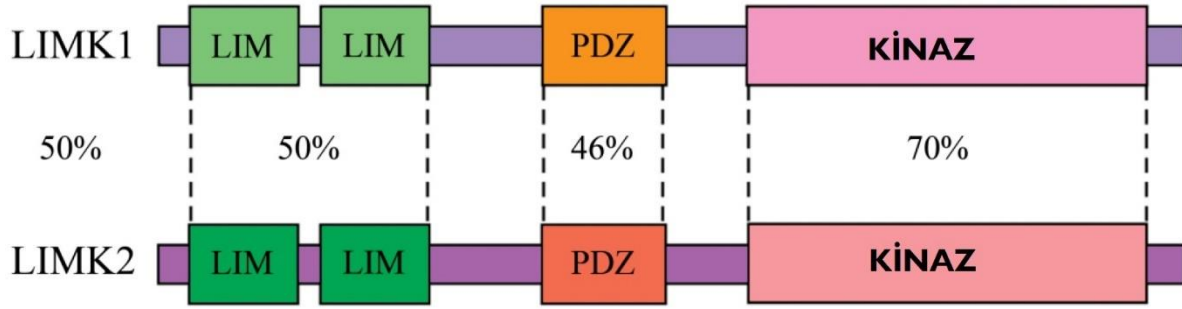




**Şekil 2.9.** Aktin hücre iskeleti, hücre siklus progresyonu ve Rho GTPazların düzenlenmesine karışan proteinler arasındaki işlevsel bağlantılar. Farklı proteinlerin aktiviteleri ve hücre siklusunun farklı aşamalarında birbirlerini nasıl etkiledikleri özetlenmiştir [472]

## 2.21. LIM-Kinaz

Hücre iskeleti aktininin organizasyonunda kilit rol oynayan ve embriyonik ve adult dokularda yaygın olarak eksprese edilen proteinlerden olan LIM-kinazlar, serin/protein kinazlar ailesinin üyesidirler. LIM-kinazlar yapısında iki adet N-terminal LIMbölgesi (Lin-11, Isl-1 ve Mec-3 proteinlerinden oluşan bölge), bir santral PDZ (**PSD-95**: Post sinaptik dansite protein, **DLG**: Drosophila disk büyük tümör supresör proteini ve **ZO-1**: Zonula occludens-1 protein) bölgesi ve bir C-terminal kinaz bölgesi içerirler. LIM bölgelerinin protein-protein etkileşimleri ve hücre yerleşiminde rol oynadığı düşünülmektedir [473-475]. PDZ bölgesi ise protein etkileşimlerine yardımcı olur ve protein komplekslerinde bulunmaktadır [476, 477]. N-terminal LIM bölgeleri enzimin kinaz bölgesi ile direkt etkileşim yolu ile LIMK kinaz aktivitesi üzerine inhibitör etki gösterir [478]. LIM bölgeleri ya enzimin kinaz bölgesini inaktif durumda tutar ya da katalitik bölgeleri ve substrat bağlanma bölgelerini maskeleyerek substratların enzime bağlanmasını önler. 1994 yılında keşfedilen LIMK-1 ve 1995 yılında keşfedilen LIMK-2 olmak üzere iki farklı LIM-Kinaz enzimi saptanmıştır [479, 480]. Bu enzimlerden LIMK-1 akciğer, beyin, mide ve testiste yaygın olarak eksprese edilir [44, 481].



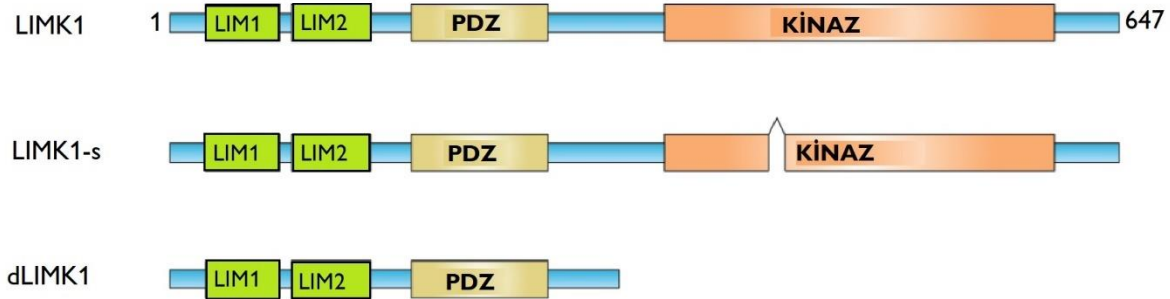
**Şekil 2.10.** LIM kinaz enzimlerinin protein yapısı. LIM kinaz proteinleri iki LIM bölgesi içerir. LIMK-1 ve LIMK-2'nin bölgesel dizilimi ve her iki izoform arasındaki özdeşlik yüzdeleri belirtilmiştir [482].

LIMK-1 ve LIMK-2'nin hücre içi lokalizasyonları belirgin şekilde farklıdır [44, 481]. LIMK-1 temel olarak fokal adhezyonlara lokalize iken LIMK-2 endozomlara lokalize gibi görünmektedir. Bu da LIMK-2'nin aktin hücre iskeleti üzerine düzenleyici etkilerine ek olarak LIMK-1'den farklı hücre fonksiyonları olabileceğini düşündürmektedir [483]. LIMK-1 primer olarak sitoplazmada bulunmaktadır ancak nükleusa da transport edilir. Sitoplazmada LIMK-1 mikrotübüllerle, fokal adhezyonlarda aktin ile ve lamellipodiada stres fiberleri ile birlikte bulunur. Mitotik hücrelerde LIMK-1 erken telofaza kadar sentrozomlarda, geç telofazda ise mitotik yarıktadır [484].

LIMK-1 ve LIMK-2'nin aktivasyon lupunda düzenleyici fosforilasyon bölgeleri bulunmaktadır. LIMK-1 in düzenleyici fosforilasyon bölgesi Thr508 ve LIMK-2 için Thr 505 rezidüleridir. ROCK, LIM-kinaz-1'i Thr508 rezidüsünden, LIM-kinaz-2'yi ise Thr 505 rezidüsünden fosforilleyerek aktive eder [42, 485]. Cdc42'nin alt efektörü olan MRCK- $\alpha$  (Myotonik distrofi kinaz-ilişkili Cdc42-bağlanan kinaz alfa) LIM-kinaz 1'i Thr 508 rezidüsünden LIM-kinaz 2'yi ise Thr 505 rezidüsünden fosforile eder [45]. Rac ve Cdc42 nin alt efektörü olan PAK1 ve PAK4 (p21-aktive kinaz) LIM-kinaz 1'i Thr-508'den fosforile ederek aktive eder [486, 487].

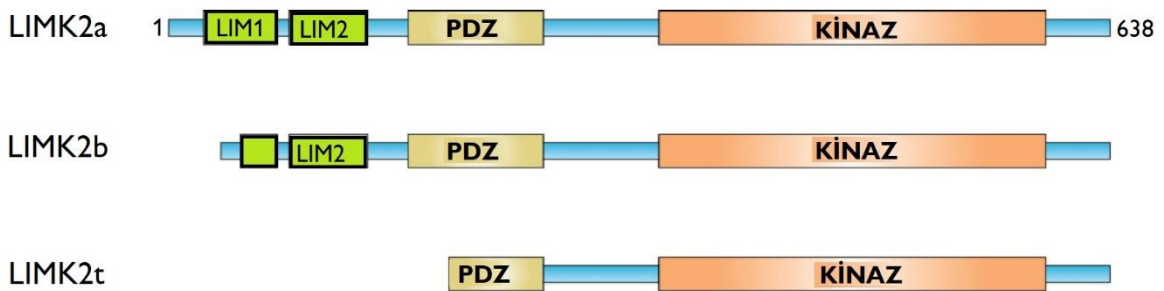
LIMK-1 enziminin 3 formu bulunmaktadır. Bunlardan ilki tam uzunluktaki yaygın bulunan LIMK-1 dir. Diğer iki izoformdan LIMK-1s'in (LIMK1 short/ kısa LIMK1) yapısında kinaz bölgesinin ortasında ayrı bir eksona lokalize 60 nükleotidlik bir sekans bulunmaktadır ve ATP bağlama bölgesinin modifikasyonundan ötürü kinaz aktivitesini kaybetmiştir. Bu izoform bu

nedence LIMK-1 enziminin dominant negatif formu olarak etki gösterir [493]. Diğer izoform olan dLIMK1 ise kinaz aktivitesini tümüyle kaybetmiştir [493].



**Şekil 2.11.** LIMK-1 İzoformları. 647 amino aside sahip bir protein olan LIMK-1a, iki N-terminal LIM bölgesi, bir PDZ bölgesi ve bir C-terminal kinaz bölgesi içerir. Dominant negatif form olan LIMK1-s proteininin ATP bağlanma bölgesindeki 20 amino asitlik bir sekans eksiktir. Tümüyle inaktif olan dLIMK1 izoformunun kinaz bölgesi yoktur [493].

LIMK-2'nin üç işlevsel izoformu vardır: N terminal sekansların alternatif birleşimi ile oluşan LIMK-2a, LIMK-2b ve testise-özgün tLIMK-2 [488-491]. 70 kDa bir protein olan LIMK-1' in alternatif birleşimi sonucu daha kısa izoformu olan 45 kDa LIMK (-) oluşur. LIMK (-) nin katalitik olarak inaktif olduğu dışında bilinen pek fazla şey yoktur [492].



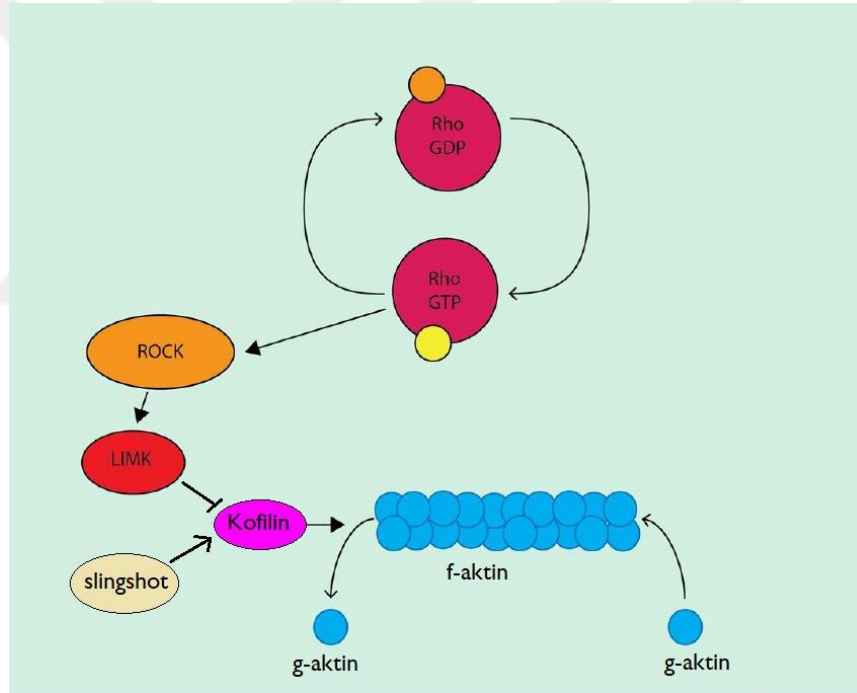
**Şekil 2.12.** LIMK-2 İzoformları. 638-amino asitli bir protein olan LIMK-2a, iki N-terminal LIM bölgesi, bir PDZ bölgesi ve bir C-terminal kinaz bölgesi içerir. LIMK-2b bir tam ve bir yarım LIM bölgesi ve özgün bir N-terminal sekans içerir. Testis spesifik LIMK-2t, dallanmış bir PDZ bölgesi ve bir kinaz bölgesi içerir. Yukarıdakilere ek olarak izole edilmiş ama henüz karakterize edilememiş iki LIMK-2 izoformu daha olduğu bildirilmiştir [493].



LIM-Kinazların dağılımı dokuya göre değişiklik gösterir. LIMK-1'in en yüksek düzeyde eksprese edildiği dokular beyin, spinal korddur kalpte de orta düzeyde eksprese edilir. LIMK-2a birçok dokuda yaygın olarak eksprese edilirken LIMK-2b başlıca beyinde, tLIMK-2 ise spermatojenik hücrelerde eksprese edilmektedir [491].

LIM-kinazların substratı aktin depolimerize edici ve ayırıcı faktör olan kofilindir [494]. Kofilin LIM-kinazlar tarafından Ser-3 rezidüsünden fosforile edilerek inaktive edilir ve böylece F-aktin oranının artmasına yol açar [495-498]. Böylece hücrel aktin filamentlerinin birikimi ve stabilizasyonu yolu ile aktin hücre iskeletinin stabilizasyonu sağlanır [494, 499].

ADF/Kofilin proteinlerinin üç formu vardır: Destrin olarak da adlandırılan ADF, kofilin-1 ve kofilin-2. Bu proteinlerden kofilin-1 kas dışı dokularda eksprese edilmekteyken kas dokuda en yaygın eksprese edilen izoform kofilin-2dir. ADF/kofilin proteinleri ADF homoloji bölgesi adı verilen ve monomerik ve filamentöz aktin ile etkileşimde rol alan işlevsel bir bölge içerirler [500].



**Şekil 2.13.** Kofilin tarafından aktin turnoverinin düzenlenmesi. Aktin depolimerize edici faktör (ADF)/kofilin aktin filamentlerine bağlanır ve kırar. ADF/Kofilin aktivitesi LIM-kinaz (LIMK) ve slingshot fosfataz tarafından düzenlenir. LIMK tarafından fosforilasyon ADF/Kofilini inaktive ederken slingshot fosfataz tarafından defosforilasyon kofilini aktive eder [501].

Hücreyi strese sokan ısı şoku, ATP depleasyonu, DMSO uygulaması, sitokalazin D uygulaması gibi durumlarda ya da sitozolik G aktin miktarı çok arttığında kofilin-1'in aktinin nukleusa translokasyonuna yolaçtığı ve nukleusta aktinin çubuk benzeri şekil almasını sağladığı gösterilmiştir [502-505]. Biyolojik işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, aktin polimerizasyonu

sırasında kullanılan ATP miktarı çok fazla olduğundan, bu mekanizmanın hücrenin enerji harcamasını azaltmak için kullanıldığı düşünülmektedir [506].

LIM-kinazların hücre yapısı ve motilitesini modüle ettikleri kortikal sitoplazma ve fokal adhezyonlardan mitoz bölünme ve sitokinezi düzenledikleri sentrozom ve nukleusa transloke oldukları bulunmuştur [483]. Kanser invazyonu ile LIM-kinaz ekspresyonu arasında ilişki bulunduğunu düşündüren bulgular mevcuttur. Göğüs, akciğer, cilt, karaciğer ve prostat kanserini de içeren çeşitli kanser türlerinde LIM-kinazların overeksprese edildiği gösterilmiştir [444, 445]. Buna ek olarak göğüs kanseri ya da hepatoma kanser hücre hatlarında LIMK-1 aktivitesindeki downregülasyonun tümör hücrelerinin invazivliğini azalttığı gösterilmiştir [507]. Ayrıca, çeşitli tümör hücre hatlarında LIM-kinaz overekspresyonunun tümör hücrelerinin motilitesi ile sıkı bir şekilde korele olduğu ve Artmış LIM-kinaz ekspresyonunun kemik metastazlarında artışa yol açtığı ortaya konulmuştur [508].

LIM-kinazların hücre siklusü progresyonunda rol oynadığı ortaya konulmuştur. LIMK-1 ekspresyonundaki azalmanın hem normal meme hücre hatları hem de prostat ve meme kanser hücrelerini G2/M evresinde arrestine yol açarak hücre proliferasyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Hücre siklusünün prometafaz ve metafaz evrelerinde LIMK-1'in hiperfosforile olduğu ve telofaz evresinde bazal düzeylere gerilediği bulunmuştur [49]. Buna ek olarak LIMK-1 aktivitesinin interfaz sırasında düşük olduğu ve mitoz bölünme sırasında pik yaptığı gösterilmiştir [509]. İnsan hücre hatlarında LIMK-1 inhibisyonunun hücre korteksinde alışılmamış kofilin lokalizasyonuna, kortikal aktin instabilitesine ve düzensiz ve yanlış yerleşimli mitotik iğ oluşumuna ve anafaza geçişte gecikmeye neden olduğu bulunmuştur [469]. LIMK aracılıklı kofilin fosforilasyonu aralarında kemotaksis, akson yönelmesi, angiogenez ve tümör invazyonunun da bulunduğu birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kilit rol oynar [508, 510-513]. LIMK-1'in sinir sistemi gelişiminde rol oynadığını düşündüren bulgular mevcuttur. LIMK-1 gen silinmesinin görsel uzaysal algıda bozukluk ile karakterize olan Williams Sendromuna neden olduğu bulunmuştur. LIMK-1 in ektopik ekspresyonunun kofilin fosforilasyonunu artışına yol açarak nöronal büyüme konisi motilitesini ve uzamasını suprese ettiği gösterilmiştir [514]. Lamellipodia ve filopodia gibi membranal yapılarıdaki aktinin dinamik kurulum ve bozunum süreçlerinde kısmen LIMK-1 rol oynamaktadır. Bu da LIMK-1 aracılıklı hücre motilite artışının ve invazyonun temel mekanizması gibi görünmektedir [508, 510, 515].

## 2.22. Nitrik Oksit

Renksiz, neredeyse kokusuz bir gaz olan nitrik oksidin tarihçesi 1847 yılında Ascanio Sobrero tarafından nitrogliserinin keşfi ile başlar. Başlangıçta başağrısı için reçete edilen nitrogliserin, daha sonra angina pectoris için reçete edilmeye başlanmıştır. Angina pectoristeki

etkisinin mekanizması 1970' lere kadar net olarak ortaya konulamayan nitrogliserinin guanilat siklazı aktive ederek etki gösterdiği Ferid Murad tarafından gösterilmiştir [516]. İlk olarak 1772 yılında Joseph Priestley tarafından izole edilen ve "nitroz hava" olarak tanımlanan [517] nitrik oksidin organizmada çok geniş bir aralıkta oynadığı rol günümüze varıncaya değin ortaya konulamamıştır. 1978 yılında bir yanlılık sonucu insan fizyolojisine dair bildiklerimiz açısından bir dönüm noktası olarak adlandırılabilir sürecin sonucunda 1980 yılında Furchgott ve Zavadski tarafından keşfedilen [518] endotel kökenli gevşetici faktörün (EDRF) nitrik oksit olduğu savı 1987 yılında farklı araştırma ekiplerindeki Ignarro ve Moncada tarafından ortaya atılmıştır [519, 520]. Bu tarihe kadar yalnızca toksik bir gaz ve bir hava kirliliği etmeni olarak bilinen nitrik oksit, çığır açıcı bu noktadan itibaren önemli bir mediatör olarak kabul edilmeye başlanmıştır. 1992 yılında yılın molekülü seçilen nitrik oksidin keşfi nedeni ile 1998 yılında Furchgott, Ignarro, ve Murad Nobel Tıp/fizyoloji ödülüne layık görülmüşlerdir.

### 2.22.1. Nitrik Oksidin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Standart koşullar altında renksiz bir gaz olan nitrik oksit moleküler yapısında son yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron içeren yüksüz bir serbest radikaldir. Suda eser miktarda çözünür. Nitrik oksit doğada bulunan en küçük 10 stabil molekülden birisidir [521]. Nitrik oksit, yapısında eşlenmemiş elektron içeren diğer serbest radikaller veya hem demiri gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girer. Paramanyetik özelliktedir ve termodinamik olarak unstabildir [522]. Nitrik oksit, moleküler çapı küçük olduğundan ötürü bilinen en hızlı diffüze olabilen moleküllerdendir. Suda [523, 524] ya da beyin gibi intakt dokudaki [525] diffüzyon sabiti yaklaşık 3300-3800 mm<sup>2</sup>/sn dir. Nitrik oksidin koefisient katsayısı oksijenden 1,4 kat büyüktür ve birkaç saniye içinde salındığı yerden 100µm uzaklığa kadar difüze olarak etki gösterir [525, 526]. Nitrik oksidin yarı ömrü dilüsyon oranına ve ortamda oksijen varlığına göre değişiklik göstermektedir. Nitrik oksidin sudaki doymuş çözeltisindeki (2mM) yarı ömrü 1 saniyenin altındadır. Fizyolojik konsantrasyonlar ise bundan yaklaşık 1000-200.000 kat daha dilüedir (İskemik inmede beyinde ölçülen 6 µM düzeyi ile guanilat siklazı aktive etmek için gereken konsantrasyon olan 5 nM aralığında). Bu konsantrasyonlarda ortamdaki nitrik oksit miktarı çok daha az olacağından iki nitrik oksit molekülünün karşılaşması ve nitrik diokside dönüşümü çok yavaş bir hızda olacaktır. Bu nedenle guanilat siklazı aktive etmek için gerekli fizyolojik konsantrasyon olan 5 nM konsantrasyonda nitrik oksidin yarı ömrü 70 saate ulaşacaktır [522]. Ancak, oksijenle olan reaksiyon sonucunda nitrojen dioksit oluşumu in vivo olarak anlamlı miktarda değildir. Çünkü dolaşıma salınan nitrik oksit hızlı bir şekilde eritrositlerdeki oksihemoglobin tarafından bağlanarak ortamdaki uzaklaştırılacaktır. Ortamda 15 g/dl hemoglobin (dolaşımdaki hemoglobin miktarı) varlığında nitrik oksidin yarı ömrü çok kısadır ve

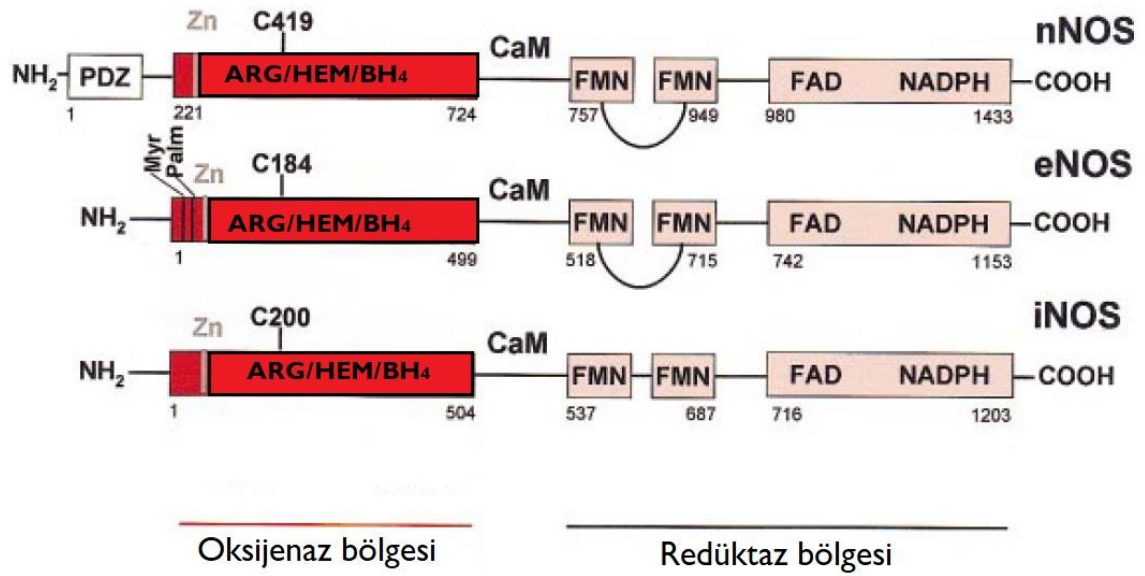
2 milisaniyenin altındadır [527]. Bununla birlikte, S-nitrozoglutatyon gibi düşük molekül ağırlıklı S-nitrozotioller, nitrozil-metal kompleksleri ve S-nitrozile proteinler ya spontan olarak ya da B ve T lenfositlerde bulunan enzimlerce katalizlenen reaksiyonlarla ortama NO salıveren uzun mesafeli taşıyıcılar olarak işlev gördüklerinden ötürü, NO aktivitesi mesafe ile kısıtlanmış durumda değildir [528-530].

### 2.22.2. Nitrik Oksidin Sentezi

Hücre tipine bağlı olarak NO, üç farklı NO sentaz (NOS) izoformu tarafından katalizlenen bir enzimatik reaksiyonla sentezlenir [54]. NOS hem hidroksilasyon hem de NADPH redüksiyonunu katalizleyebilen tek memeli enzimi olması nedeni ile eşsizdir [531]. Nöronal NOS (nNOS, NOS1) ve endotelial NOS (eNOS, NOS3) yapısal ve intrasellüler  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarını arttıran uyarılardan sonra küçük miktarlarda (pikomolar düzeyde) NO üretirler. Bu izoformlar tarafından NO üretimi kalmodulin tarafından regüle edilmektedir [53, 532, 533].

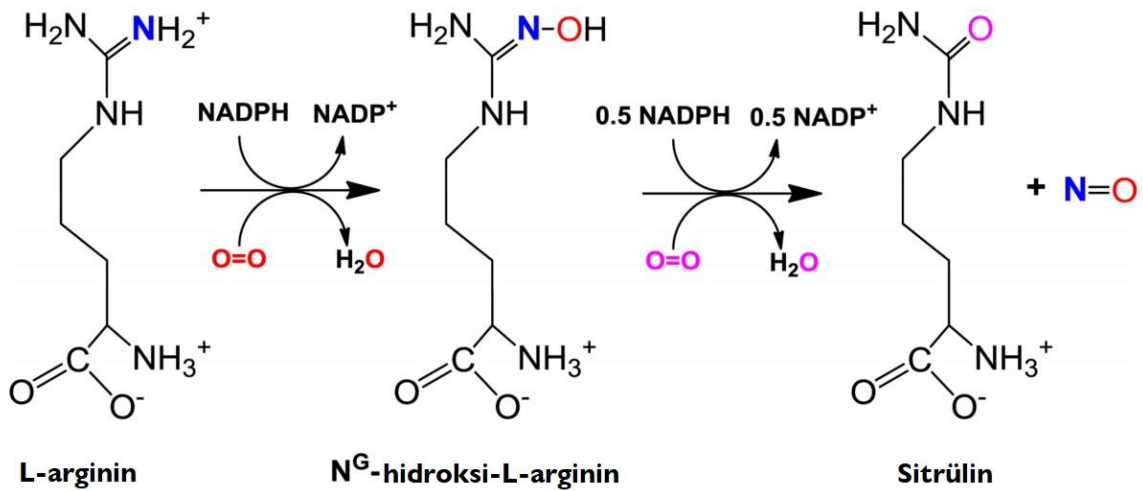
Üçüncü izoform olan indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2) ise  $Ca^{2+}$ 'dan bağımsızdır; sitokinler ve bakteriyel lipopolisakkarid gibi etkenlerce indüksiyon sonrası makrofajlar ve diğer birçok çekirdekli hücreler tarafından eksprese edilir [55]. iNOS'ın indüksiyonu yapısal NOS izoformlarının indüksiyonuna göre çok daha büyük miktarda ve çok daha uzun süreli nitrik oksit salınımına neden olur. iNOS indüksiyonu gen transkripsiyonunu gerektirdiğinden, etkene maruziyetten saatler sonra başlar ve günlerce devam edebilir [56].

Her üç NOS izoformu hem sitokrom P-450 redüktaz ile hem birbirileri ile %55-60 homoloji gösterir [534]. Bununla birlikte üç izoform arasında bazı yapısal farklılıklar vardır. eNOS'un amino terminal ucu enzimin membrana lokalizasyonunda önemli rol oynayan N-mristoylasyon için bir konsensus bölgesi içerir. eNOS buna ek olarak palmitoylasyona da uğramaktadır. Bu da iNOS ve nNOS sitozolik olarak bulunmaktayken eNOS'un membranal olarak bulunmasını destekleyen bulgulardandır. Buna ek olarak nNOS amino terminal ucunda nNOSun hücre içi lokalizasyonunda rol oynayan bir PDZ bölgesi içerdiğinden ötürü daha uzundur [535].



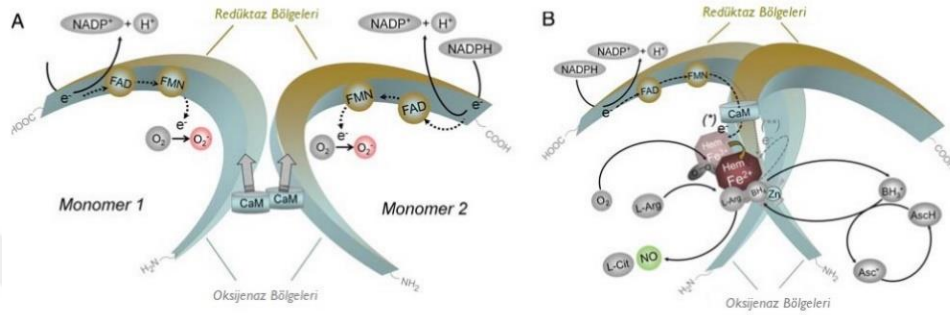
**Şekil 2.14.** İnsan nNOS, eNOS ve iNOS izoformlarının yapısı. Oksijenaz, redüktaz ve PDZ bölgeleri dolu kutular olarak işaretlenmiştir ve her bölgenin başlangıç ve bitişindeki amino asit rezidüsünün numarası gösterilmiştir [536].

Nitrik oksit NOS enzimlerince katalizlenen bir reaksiyonla L-argininin guanidino azotunun oksidasyonu sonucu oluşur [534, 537]. Bu reaksiyonun sonucunda nitrik oksit ve L-sitrülin oluşur.



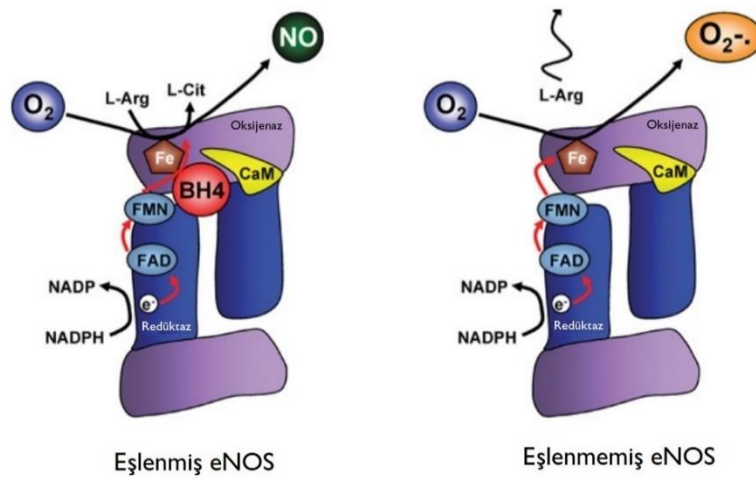
**Şekil 2.15.** NOS enzimi tarafından katalizlenen nitrik oksit sentezi [538].

Monomerler halinde bulunan NOS enzimleri dimerize olarak katalitik olarak aktif hale geçerler. NOS enzimleri nitrik oksit sentezi için moleküler oksijen, NADPH (Nikotinamid dinükleotid fosfat hidrojen), FAD (Flavin adenin dinükleotid), FMN (Flavin mononükleotid) ve hem demir grupları gibi substratlar kullanır ve kofaktör olarak enzime homodimer olarak bağlanan kalmomodulin ve tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) varlığına gerek duyar [534].



**Şekil 2.16.** NOS enziminin yapısı ve katalitik mekanizması. **A.** NOS monomerleri NADPH'den FAD ve FMN'ye elektron transfer edebilir, sınırlı miktarda oksijeni süperoksite redükte edebilir, kalmodulene bağlanabilir ancak BH<sub>4</sub> ve L-arginine bağlanamaz ve nitrik oksit üretimini katalize edemez [539, 540]. **B.** Hem varlığında NOS monomerleri birleşerek işlevsel dimerleri oluşturur. Hem grubu, elektronların bir monomerdeki flavinlerden diğer monomerdeki heme bölgeleri arası transferi için esansiyeldir [541].

Bu sentez reaksiyonu yeterli oksijen ve ko-faktör bulunması durumunda gerçekleşir. NADPH proton donörü olarak işlev görürken BH<sub>4</sub> hem-dioksi ara ürüne elektron verir [542]. NOS enzimleri elektronları NADPH, flavinler FAD ve FMN yolu ile karboksiterminal redüktaz bölgesinden amino-terminal oksijenaz bölgesindeki heme transfer eder. Ortamda yeterli miktarda ko-faktör ve oksijen bulunmaması durumunda eşlenmiş elektron süperoksit iyonu sentezine yönlendirir [534, 537].



**Şekil 2.17.** Tetrahidrobiopterinin (BH<sub>4</sub>) vasküler hastalıkta eNOS aktivitesini düzenleyici rolü. Sol taraf: Sağlıklı endotel görülmektedir. BH<sub>4</sub> yeterli miktarda bulunmaktadır. Elektron transferi sonucunda NO oluşur. Sağ taraf: BH<sub>4</sub> sınırlı olduğunda elektron transferi L-Arginin oksidasyonu ile kenetsizleşir, demir-dioksijen kompleksi ayrılır ve oksijenaz bölgesinde süperoksit anyonu oluşur [543].

### 2.22.3. Nitrik Oksit Sentaz İzofomları

#### 2.22.3.1. eNOS (Endotelial nitrik oksit sentaz, NOS3)

136 kDa bir protein olan eNOS en yaygın olarak kardiyovasküler sistemde endotel hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Buna ek olarak kardiyak myositler, trombositler, bazı nöronlar (özellikle hipokampal piramidal hücreler), böbrek tübüler epitelyum hücreleri ve plasenta sinsityotroblastlarında da eksprese edildiği gösterilmiştir [544, 545]. eNOS tarafından NO sentezi Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin tarafından regüle edilir ve hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu arttığında kalmodulinin enzime bağlanması artarak pulsatil tarzda NO sentezi gerçekleşir [546]. Bunun yanı sıra, kayma gerilimi (shear stress) hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunda artışa yol açmadan da eNOS'u aktive eder. Bu aktivasyonun enzimin fosforilasyonu yolu ile olduğu gösterilmiştir [547, 548]. eNOS fosforilasyonu farklı serin, treonin ya da tirozin rezidülerinden olabilir. Akt tarafından Serin 1177 fosforilasyonu eNOS'un Ca<sup>2+</sup> duyarlılığını artırır, elektronların redüktaz bölgesindeki akışını stimüle eder [549]. Akt tarafından fosforilasyon yolu ile aktivasyon mekanizması östrojen, VEGF (vasküler endotelial growth faktör) ve insülin tarafından eNOS aktivasyonuna aracılık etmektedir [549, 550]. Bunun dışında, bradikinin ile indüklenen eNOS fosforilasyonu CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin bağımlı protein kinaz II) aracılığıyla olurken, kayma gerilimi PKA (protein kinaz A) aracılığı ile Serin 1177 fosforilasyonuna yol açar. eNOS kaveolaya lokalizedir, hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki artışa yanıt olarak hücre içine migrate olur [551]. eNOS' un endotelial



hücrelerde kaveolin-1, kardiyak myositlerde kaveolin-3 ile kolokalize olduğu gösterilmiştir. Kaveolin-1 eNOS'un aktivitesini suprese eder ve inaktive durumda tutar [552, 553]. Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu arttıran uyarılar sonucu kaveolin-1  $Ca^{2+}$ /kalmmodulin ile yer değiştirir ve eNOS aktive olur [54, 552].

eNOS tarafından üretilen NO yaygın bir aralıktaki çeşitli etkilere sahiptir: Vazodilatasyona yol açar, platelet aggregasyonunu [554] ve plateletlerin endotele adhezyonunu [555] inhibe eder, düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu bloke eder. NO, buna ek olarak hem anjiogenezde ve hem de endotel permeabilitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar [556]. eNOS kaynaklı NO bunun yanı sıra adhezyon molekülerinin salınımını inhibe eder [557-560].

### **2.22.3.2. nNOS (nöronal nitrik oksit sentaz, NOS1)**

Yapısal bir enzim olan nNOS, 160 kDa bir proteindir. İlk olarak saflaştırılan NOS enzimidir [561, 562]. nNOS beyin ve periferik sinir sisteminde en yaygın bulunan izoformdur. eNOS'un aksine nNOS membrana tutunmaz [548]. nNOS iskelet kaslarında da yüksek miktarda eksprese edilir [535]. Beyin ve iskelet kaslarına ek olarak nNOS spinal kord, sempatik ganglionlar, sürrenal bezler, böbrek makula densa hücreleri, pankreas islet hücreleri ve vasküler düz kaslarda da eksprese edilir [563]. nNOS, hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyindeki artışa bağlı olarak kalmmodulin tarafından aktive edilir [561]. nNOS, CaMKIIa ( $Ca^{2+}$ /kalmmodulin bağımlı kinaz IIa) tarafından serin 847 rezidüsünden fosforile edilerek inhibe edilir [564, 565]. Önceden Akt tarafından fosforile edilmediği düşünülen nNOS'un Akt tarafından serin-1412 rezidüsünden fosforile edildiği ortaya konulmuştur [566]. Serin-1412 rezidüsünden fosforilasyon NOS aktivitesinde hızlı bir artışa yol açar. Bu fosforilasyonun enzimin  $Ca^{2+}$ /kalmmodulin duyarlılığında artış aracılığı ile aktivitesini arttırdığı ortaya konulmuştur [567]. nNOS'un öğrenme, bellek, nörogenez ve uzun dönem potansiyasyon gibi süreçlere aracılık ettiği gösterilmiştir [568-572].

### **2.22.3.3. iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz, NOS2)**

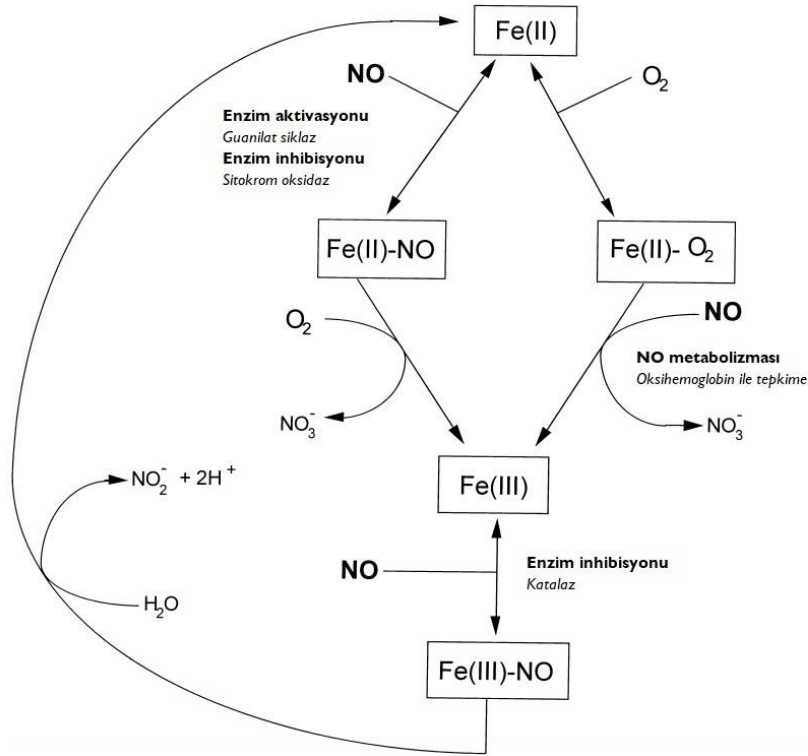
131 kDa bir protein olan iNOS, 1153 amino asit içerir. İlk kez aktive olmuş rat makrofajlarından elde edilerek saflaştırılmıştır [573, 574]. İnsanda ilk olarak hepatositlerden saflaştırılmıştır [575]. Yapısal olarak eksprese edilmediği; LPS, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , interleukin-1 (IL-1) gibi uyaranlara karşı konağın bir savunma cevabı olarak yüksek miktarlarda eksprese edildiği kabul edilmektedir. İmmün yanıtı takiben makrofaj, monosit, epitelyum hücresi, endotel hücresi, astrosit, fibroblast, keratinosit ve nötrofiller tarafından eksprese edilir [576]. Bununla birlikte yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda herhangi bir uyaran tarafından indüksiyon olmaksızın insan hava yolu epiteli ve böbrek gibi bazı dokularda yapısal olarak



eksprese edildiği ortaya konulmuştur [577, 578]. Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundaki artıştan bağımsız olarak eksprese edilir. iNOS bir kere eksprese edildiğinde degrade edilinceye kadar büyük miktarlarda NO salınımına devam eder. Bilinen ilk postranslasyonel iNOS regülasyon mekanizmalarından birisi transforme edici growth faktör tarafından NO üretiminin supresyonudur. Bu yolla iNOS'un degradasyonu arttırılır [579]. Bunun dışında proteazom degradasyon yolağı da iNOS degradasyonunda rol oynar [580].

#### **2.22.4. Nitrik Oksidin Etki Mekanizması**

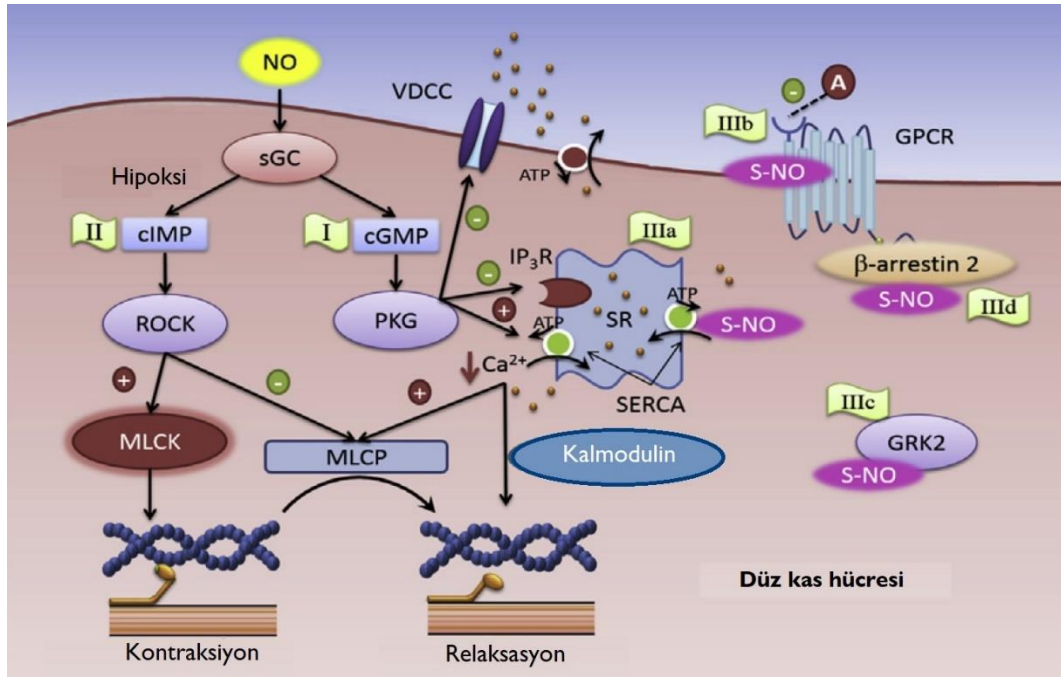
Nitrik oksidin etkileri direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı gruba bölünebilir. Direkt etkiler nitrik oksidin hedef proteinlerle etkileşimini içerir. Nitrik oksit yapısındaki eşlenmemiş elektron aracılığı ile geçiş metalleri ile hızla reaksiyona girer. Organizmada en çok bulunan ve nitrik oksidin en çok etkileştiği geçiş metali demirdir. Nitrik oksidin yapısında demir içeren proteinlerdeki demir ile reaksiyonu gibi bazı metallerle olan reaksiyonu sonucunda stabil metal-nitrozil kompleksleri oluşur [581]. Nitrik oksidin yapısında ferröz demir içeren çözümlü guanilil siklaz [582] ile etkileşimi nitrik oksit-metal reaksiyonu sonucu metal-nitrozil kompleksi oluşumunun organizmadaki en yaygın örneğidir. Nitrik oksit bunun dışında ferröz demir içeren sitokrom oksidaz [57, 583] ve ferrik hem içeren katalaz [584] ile de etkileşmektedir. Nitrik oksit, sitokrom oksidazın inhibisyonu yolu ile mitokondriyal solunumu inhibe eder [585]. Nitrik oksidin demire olan afinitesi nedeniyle bir trikarboksilik asit siklusu enzimi olan akonitaz gibi demir-sülfür içeren diğer bazı metalloproteinler de nitrik oksidin hedefleri arasındadır [586, 587].



**Şekil 2.18.** NO ve Hem demirinin etkileşimleri [588].

Nitrik oksit, çözünür major reseptörü olan sitozolik guanilil siklazı aktive ederek sGMP oluşumuna neden olur; sGMP protein kinaz G'yi aktive eder [53, 537]. Çözünebilir guanil siklaz bir 80 kDa  $\alpha$  subuniti ve bir 70 kDa  $\beta$  subunitinden oluşan bir heterodimerdir [589].  $\beta$  subunitinin 105 histidin rezidüsüne bağlı bir ferröz hem prostetik grubu bulunmaktadır. Nitrik oksit ferröz hem demirine bağlandığında demirin histidin 105 ile bağlantısı kopar ve çözünür guanil siklazın hem tarafından inhibisyonu sona ererek katalitik olarak aktive olur [590]. Çözünür guanilil siklaz aktivasyonu sonucu hücre içinde sGMP (siklik guanozin monofosfat) artışı oluşur. sGMP artışı sitozolik  $\text{Ca}^{2+}$ 'un sarkoplazmik retikulumu geri alınımını arttırıp  $\text{Ca}^{2+}$ 'un hücre dışına atılımını ve kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının açılmasını sağlayan protein kinaz G (PKG) enzimini aktive eder [591-595]. PKG aktivasyonu ile oluşan olaylar dizisi sonucunda intrasellüler  $\text{Ca}^{2+}$  düzeyi düşer, MLCK tarafından myozin fosforilasyonu sonlanır ve düz kas gevşemesi gerçekleşir [596-599]. Nitrik oksit sGC (solubl guanil siklaz) aktivasyonundan bağımsız olarak başka etkiler gösterir: Sarko endoplazmik retikulum Kalsiyum ATPazı (SERCA) stimüle ederek hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonunu düşürür ve düz kas gevşemesine yol açar. Buna ek olarak nitrik oksidin dönüşümü sonucu oluşan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) S-glutatyolasyon aracılığı ile direkt olarak SERCA aktivitesini indükler [600]. Nitrik oksit, S-nitrozilasyon aracılığı ile GPCR (G protein

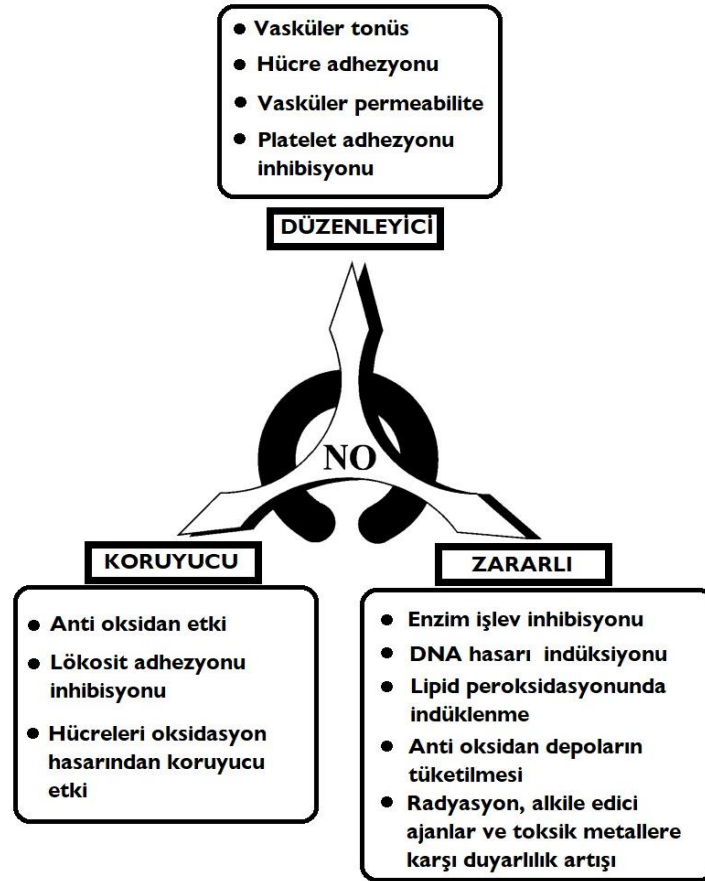
coupled receptor) ekspresyon ve işlevleri üzerine etki göstererek vasküler tonüsü düzenlemektedir [601, 602].



**Şekil 2.19.** NO tarafından damar tonüsü düzenlenme mekanizmaları. **I:** Çözünbilir guanilil siklaz (sGC) stimülasyonu ile sGMP oluşumunun indüksiyonu. sGMP, voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarından  $Ca^{2+}$  içe akışını ve inositol 1,4,5-trifosfat reseptöründen (IP3R)  $Ca^{2+}$  salınımını inhibe eden PKG'yi aktive eder. PKG SERCA'ı indükleyerek sitozolik  $Ca^{2+}$ 'un sarkoplazmik retikulumu (SR) geri alımını artırır. Sitosolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu düşer, kalmodulin inaktive olur ve MLCK aktivasyonu ortadan kalkar.  $Ca^{2+}$  depleksiyonu MLCP aktivitesini de artırır. Aktin-myozin çapraz bağları koparak düz kas gevşemesi oluşur. **II:** Hipoksik koşullarda sGC, sGMP yerine, Rho-kinazı aktive eden ve MLCP inhibisyonu ile kontraksiyona yol açan inozin siklik 3,5'-monofosfat (cAMP) üretir. **III:** NO tarafından protein S-nitrozilasyonu. **IIIa:** S-nitrozilasyon SERCA aktivitesini artırır  $Ca^{2+}$  depleksiyonunu arttırarak gevşemeyi indükler. **IIIb:** direkt olarak NO tarafından GPCR S-nitrozilasyonu. **IIIc:** G protein-eşlenik reseptör kinaz 2 (GRK2)nin S-nitrozilasyonu  $\beta$ -adrenoseptörlerin internalizasyon ve desensitizasyonunu önler. **IIId:**  $\beta$  arrestin 2 S-nitrozilasyonu reseptör internalizasyonunu arttırır [603].

Nitrik oksit tarafından oluşturulan indirekt etkiler nitrik oksidin  $O_2$  ya da süperoksit ( $O_2^-$ ) ile etkileşimi sonucu oluşan reaktif nitrojen oksit türevleri aracılığı ile oluşur. Organizmada en yaygın olarak üretilen reaktif nitrojen oksit türleri, oksidatif ve nitrozatif strese neden oldukları gösterilen dinitrojen trioksit ( $N_2O_3$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) [604]. İnflamasyon gibi durumlarda, iNOS indüksiyonu sonucu oluşan aşırı miktardaki nitrik oksit okside ya da nitroze olarak reaktif nitrojen oksitleri oluşturur [604]. Ortamda hemoproteinlerin varlığı durumunda nitrik oksit hızla hem grubu ile reaksiyona gireceğinden, bu reaktif oksitlerin oluşumu çok yavaş olacaktır ancak membranlar gibi hidrofobik ortamlarda oksidasyon ya da nitrozasyon reaksiyonlarının normalin 1000 katına kadar hızlandığı gösterilmiştir [605]. Bu reaksiyonlar

sonucu oluşan ürünlerden birisi olan  $N_2O_3$ , hedef proteinlerle etkileşimi sonucu karsinojen nitrozaminlerin oluşumuna neden olduğu gösterilen potent bir nitrozatif ajandır [606].  $N_2O_3$ , nitrik oksidin oto-oksidasyonu ile oluşur.



Şekil 2.20. Nitrik oksidin düzenleyici, koruyucu ve zararlı biyolojik etkileri [607]

### 2.22.5. Nitrik oksidin yağ doku ve enerji metabolizması üzerine etkileri

Hipoksik koşullar gibi hücrel stres durumlarında mitokondriyal bir enzim olan sitokrom oksidaza bağlanarak mitokondriyal solunumu inhibe ettiği gösterilen [57] nitrik oksidin mitokondriyal solunumun kontrolü üzerinden hücrel enerji tüketimini düzenlediği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada nonspesifik NOS inhibitörü L-NAME uygulamasının farelerde ağırlık artışı ve gıda alımını azalttığı gösterildiğinden ötürü organizmanın enerji dengesinin düzenlenmesinde nitrik oksidin önemli rol oynadığı düşünülmektedir [60]. eNOS ve iNOS'un hem beyaz hem de kahverengi yağ dokuda eksprese edildiği bulunmuştur [28, 29, 61, 62]. Bunun yanı sıra beden kitle indeksi ve yağ kitlesi ile nitrik oksit metabolitlerinin plazma düzeyleri arasında korelasyon bulunduğu ortaya konulmuştur [63-65]. İlginç olarak infeksiyon

ve inflamatuvar hastalıklarda da kan NO metabolitlerinin düzeyi artmaktadır [608-610]. Obez fareler ve Zucker diyabetik sıçanlarında karaciğer, iskelet kası ve beyaz yağ dokusunda iNOS ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [66, 67]. Farelerde iNOS gen silinmesinin fazla yağlı diyetle indüklenen insülin direncine karşı koruyucu etkisinin olduğunu gösterilmesi, nitrik oksidin insülin direnci gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir [67]. Farelere kronik olarak NOS inhibitörü L-NAME uygulanmasının vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Vücut ağırlığındaki bu azalma yüksek yağ içeren diyet ile beslenme durumunda daha anlamlı bulunmuştur [68]. L-NAME uygulanması yağ hücrelerinin hacminde ve yağ hücrelerinde trigliserit birikiminde azalmaya yol açmıştır [68]. Bunun yanı sıra diyabetik hastalarda plazma nitrit düzeyleri orta düzeyde yükselmiştir [611]. Visseral obezitede saptanan düşük dereceli kronik inflamasyonun iNOS enziminin indüksiyonuna yol açtığı ortaya konulmuştur [30]. Ayrıca ilginç olarak, endotoksemi sırasında iNOS ekspresyonunun ana kaynağının yağ dokusu olduğu gösterilmiştir [70]. 3T3-L1 hücre kültüründe NO'nun yağ dokudan salınan ve monosit migrasyonu, fibrinoliz ve angiogeneze (yeni damar oluşumu) karışan, viseral yağ birikimini ve bununla ilişkili inflamasyonu etkileyen plazminojen aktivatör inhibitörü ve inflamatuvar bir sitokin olan IL-6 mRNA ekspresyonlarını arttırdığının gösterilmesi NOS aktivitesinin inhibe edilmesinin beyaz yağ dokuda inflamasyonu düzeltebileceğini düşündürmektedir [28].

Bununla birlikte, adiposit diferensiyasyonu üzerine NO etkileri ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. NO'nun in vitro olarak sıçan kahverengi adipositlerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve adipojenik marker genler olan PPAR $\gamma$  ve UCP-1 ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir [52, 612]. NO'nun primer sıçan kahverengi yağ doku preadipositlerinin ve sıçan beyaz yağ doku preadipositlerinin diferensiyasyonunu stimüle ettiği [31], 3T3-L1 preadipositlerinde ise diferensiyasyonu süprese ettiği gösterilmiştir [32]. Ayrıca, iNOS enziminin kronik inflamasyonda adipogenezisi stimüle ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra nitrik oksidin lipolizi stimüle ettiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [33, 34]. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu sırasında eNOS ekspresyonunda artış bulunmuştur [613].

Kardiovasküler sistemde vazodilatör, antiagregan ve antiproliferatif rolleriyle nitrik oksidin, bu sistemde vazokonstriksiyon ve vasküler düz kas proliferasyonuna aracılık eden Rho/Rho-kinaz yolağının fizyolojik antagonisti olduğu düşünülmektedir [614, 615]. Ancak endotoksemi, kronik inflamasyon (obezite günümüzde artık kronik bir inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmektedir) ve diyabet gibi patolojik şartlarda yüksek konsantrasyonlarda salıverilen NO ile söz konusu yolak arasındaki ilişkinin detayları çok net bilinmemektedir. Kısa süreli çalışmalarda NO'nun Rho inaktivasyonu üzerinden Rho/Rho-kinaz yolağını baskıladığına ilişkin literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının inhibe edilmesi, NO'nun fizyolojik etkilerini güçlendirmektedir. Örneğin

vasküler düz kasta Rho inhibisyonunun eNOS'ı stimüle ettiği [616], statinler tarafından Rho inhibisyonunun eNOS ekspresyonunu arttırdığı [617] gösterilmiştir. Yakın zamanlarda Ksenopus embriyolarında yapılan bir çalışmada nitrik oksidin RhoA aktivitesini, sGMP'nin yanısıra, RhoA'nın yapısında bulunan sistein rezidülerinin S-nitrozilasyonu yolu ile de önlediği gösterilmiştir [618]. Ancak NO ile Rho/ROCK arasındaki "cross-talk" olayının mikrovasküler damar yataklarında (sıçan mezenterik ve sıçan koroner damar yataklarında) çok yaygın olmadığı, bizim laboratuvarımızda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [35, 619].

Farelerin spinal kordunda prostaglandin E3 reseptörü (EP3) agonisti ONO-AE-248 tarafından indüklenen nitrik oksit oluşumu, spesifik Rho-kinaz inhibitörü H-1152 tarafından tümüyle ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir [620]. İlginç olarak, nitrik oksidin RhoA'yı aktive ederek enterosit migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [36]. Sıçan primer nöral kültürlerinde nitrik oksit donörü, NOC-5 uygulamasının kofilin fosforilasyonunu belirgin olarak arttırdığı bulunmuştur [621]. Rho-kinaz'ın alt efektörü LIMK tarafından fosforile edildiği bilinen aktin destabilize edici faktör kofilin fosforilasyonundaki bu anlamlı artışın nitrik oksit tarafından protein kinaz G yolu ile RhoA'nın aktivasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür [621]. Bu bulgu nitrik oksidin aktin hücre iskeleti düzenlenmesi üzerine etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

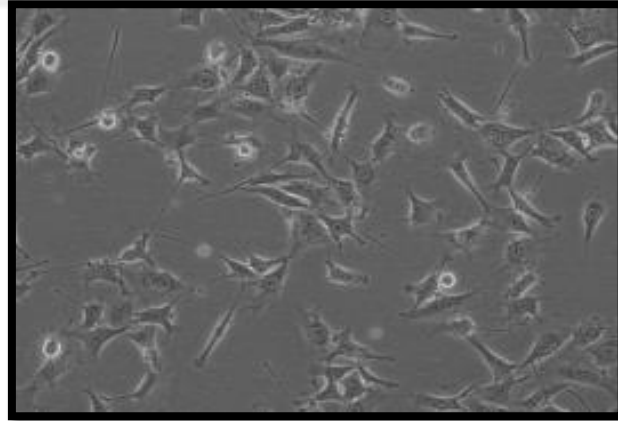
#### **3.1. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü:**

Adiposit diferensiyasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda kullanılan klon hücre hatları temel olarak iki grupta incelenebilir: Pluripotent fibroblastlar (Balb/c 3T3, 1246, RCJ3.1 ve CHEF/18) ve unipotent preadipositler (3T3-L1, 3T3-F442A, Ob1771). Unipotent preadipositler determinasyon aşamasından sonra yalnızca adipositlere diferensiyasyon olabildiklerinden ötürü, preadipositlerin adipositlere diferensiyasyonu ile ilgili çalışmalar için ideal hücre hatlarıdır. Bu hücre hatlarından en yaygın olarak kullanılan fare embriyonik fibroblastları olan 3T3-L1 hücre hattıdır. 3T3-L1 hücreleri fibroblast morfolojisine sahiptir. Hücre kültürü ortamında konfluent hale geçince spontan olarak büyüme duraklaması evresine geçerler ve bu aşamada standardize edilmiş bir protokolü takip ederek uygun indükleyiciler ile adipositlere diferensiyasyon olurlar. İmmortal klon hücre hatlarıdır. Hücre kültürü laboratuvarında uygun koşullarda hücre özelliklerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın sayısız pasajlamalar yapılabilir. Adiposit diferensiyasyonu ile ilgili olarak yapılan bu çalışmada 3T3-L1 hücre hattı kullanıldı. 3T3-L1 hücreleri Amerikan Tıp Hücre Koleksiyonundan (ATCC-CL-173) 1 ml vial içerisinde dondurulmuş olarak satın alındı. CO<sub>2</sub> konsantrasyonu %5 olan inkübatörde 37°C ortam sıcaklığındaki hücre kültürü besi ortamında 25 ml flask içerisinde pH değeri 7,0-7,4 olan %10 fetal sığır serumu, %1 Penisilin, %1 Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunda (DMEM) pasajlandı.

##### **3.1.1. 3T3-L1 Hücre Hattının Çözdürülmesi ve Ekilmesi:**

ATCC'den (American Type Culture Collection) 1 ml vial içerisinde dondurulmuş olarak gelen 3T3-L1 hücrelerinin 37°C'de sıcak su banyosu içerisinde 1-2 dk. içinde çözülmesi sağlandı. Çözülen hücreler 15 ml hacmindeki tüpe konularak üzerine daha önce ATCC tarafından verilen kitapçıktaki talimatlara uygun olarak hazırlanan ve 37°C sıcaklığa gelmesi sağlanan komplete medyum [%10 buzağı serumu, %1 glutamin, %1 Penisilin/streptomisin içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum (DMEM)] ile 15 ml'ye tamamlanarak kapağı kapatıldı. Ardından, içinde hücre solüsyonunun bulunduğu tüp santrifüj cihazına konularak 37°C sıcaklıkta 1800 g'de 10 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün üst kısmındaki süpernatant döküldü. Altta kalan pelletin üzerine 4-6 ml hacminde taze hazırlanmış komplete medyum eklenerek bir pipet yardımı ile hücrelerin homojen bir şekilde karışması sağlandı. Ardından hücreler içinde 4 ml civarında komplete medyum bulunan 25 ml hacmindeki flaslara ekim yapılarak inkübatöre kaldırıldı.

İnkübatördeki hücrelerin medyumu gün aşırı değiştirildi. Medyum değişimi sırasında flasklar inverted mikroskopta incelenerek ekimi yapılan hücrelerin flask içerisinde ulaştığı yoğunluk değerlendirildi. Hücrelerin büyüme duraklaması evresine geçmelerinin önlenmesi için yoğunluğu flask tabanının %70-80'ine ulaştığı anda daha fazla konfluent olmasına izin verilmedi. Bu aşamada hücrelere tripsinizasyon yapıldı. Flasklar, medyumun uzaklaştırılması için PBS tamponu ile yıkanarak üzerine 1-1,5 ml kadar tripsin eklendi. Flasklar hafif hafif sallanarak tripsinin flask tabanına iyice yayılması sağlandı ve 5 dakika süre ile 37°C inkübatörde inkübe edildi. 5 dk. sonra flasklar inverted mikroskop altında incelenerek hücrelerin flaskın tabanından ayrılıp ayrılmadıkları değerlendirildi. Hücrelerin flask tabanından tümüyle ayrıldığından emin olunduktan sonra pipetaj yapılarak hücreler 15 ml'lik tüpe aktarıldı. Tüpdeki hücrelerin üzeri PBS tamponu ile 13-14 ml hacme tamamlandı ve 37°C sıcaklıkta 1800 g'de 10 dk. süresince santrifüjlendi. Santrifüjden alınan tüpdeki süpernatant döküldü. Ardından tüpün dibindeki pelletin üzeri komplete medyum ile tamamlandı ve 1:3 oranında pasaj yapıldı. Pasajlama sonrası flasklardaki hücrelerin medyumları yine gün aşırı değiştirildi. Hücreler %70-80 konfluent olduklarında tripsinizasyon yapılarak pasajlandı. Pasaj işlemi sırasında hücre sayımı yapılarak adiposit diferensiyasyon deneyleri için gereken hücre miktarı dışındaki hücreler 1 ml hacminde viallere konularak -80°C derin dondurucuda dondurularak ileride kullanılmak üzere saklandı.



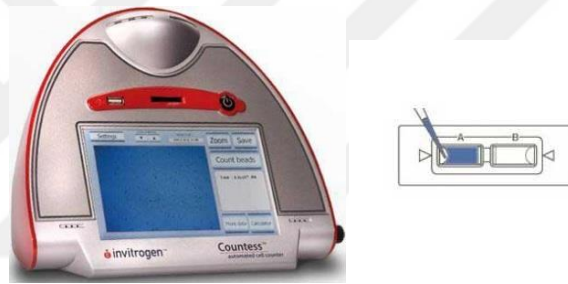
**Şekil 3.1.** Ekildikten sonra flask tabanına tutunan 3T3-L1 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü. 3T3-L1 hücreleri ilk ekildiklerinde fibroblast halindedirler ve diferensiyasyon medyumuna (IBMX, insülin ve deksametazon) maruz bırakıldıktan sonra zaman içinde olgun adipositlere diferensiyasyon olurlar.

### 3.2. Hücre Sayımı:

Deney serilerinde her kuyucuk/flask/petriye eşit sayıda hücre ekilmesini sağlamak için ekim öncesi hücre sayımı yapıldı. Bu amaçla standart tripan mavisi boyama tekniğini kullanarak



hücre sayımı yapan, hücre popülasyonundaki canlı/ölü hücre sayısını saptayan otomatik bir sayım cihazı olan Countess otomatik hücre sayım cihazı kullanıldı. Sayım aşamasında önce flasklardaki hücreler tripsin ile kaldırıldı, ardından hücreler 50 ml hacimdeki tüpe toplandı ve üzerleri PBS ile 50 ml hacme tamamlandı. Ardından hücreler 1800 g de 10 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüj cihazından alınan tüpteki süpernanant atıldı ve dipteki pelletin üzeri komplete medyum ile tamamlandı. Pastör pipeti ile dikkatlice pipetaj yapılarak hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Ardından hassas otomatik pipet ile tüpteki hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve tripan blue solüsyonundan alınan 10 µl tripan blue ile iyice karıştırıldı. Daha sonra yine hassas otomatik pipetle bu karışımdan 10 µl alınarak Countess hücre sayım cihazında hücre sayımı yapmak amacı ile kullanılan ve üzerinde iki sayım kuyucuğu bulunan tek kullanımlık slaytlardaki özel yuvaya bırakıldı. Slayt Countess hücre sayım cihazına takılarak otomatik olarak sayım yapıldı. Her sayım işlemi iki kez tekrar edilerek bulunan hücre sayısının ortalaması alındı.



**Şekil 3.2.** Countess otomatik hücre sayım cihazı ve slaytının görünümü.

### 3.3. 3T3-L1 Preadiposit Diferensiyasyon Protokolü:

Hücre sayımı yapıldıktan sonra deney serileri için gereken hücre miktarı hesaplanarak 24 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işlemi sırasında tüpteki hücre süspansiyonuna belirli aralıklarla sürekli dikkatlice pipetaj yapılarak süspansiyonun homojen olması sağlandı. Her bir kuyucuktaki hücre süspansiyonları komplete medyum [%10 buzağı serumu (calf serum /CS), %1 Penisilin/streptomisin ve %1 glutamin içeren DMEM] ile 1 ml hacme tamamlandı. Medyum değişimi gūnaşırı yapıldı. Bu sırada hücrelerin flasklarda ulaştıkları yoğunluk inverted mikroskopta izlendi. Hücrelerin tam konfluent oldukları gün -2. gün kabul edildi. Hücreler buzağı serumu içeren komplete medyumda 2 gün daha bekletildi. Postkonfluent 2. gün diferensiyasyon protokolünün 0. günü olarak kabul edildi. Deney protokolünün 0. gününde adiposit diferensiyasyonunun indüklenmesi amacı ile kuyucuklardaki hücrelere 0,25 µM deksametazon, 0,5 mM izobutilmetilksantin (IBMX) 1µM insülin içeren %10

FBS/DMEM (fetal sıgır serumu/Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumu) uygulandı (0-2. gün). 2 gün sonra kuyucuklardaki hücrelere 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM uygulandı (2-4. gün). Deney protokolünün 4. günü kuyucuklara %10 FBS içeren komplete medyum konuldu. Günaşırı medyum değışimi yapılarak inkübasyon 8. güne kadar sürdürüldü (4-8. gün). Diferensiyasyon protokolünün 8. gününde deney sonlandırılarak kuyucuklardaki hücrelere Oil Red O boyama yapılarak adiposit diferensiyasyonu değeriendirildi.

### **3.3.1. Oil Red O Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması:**

0,7 gr Oil red O tartılarak 200 ml izopropanol içerisinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon 1 gece boyunca +4°C sıcaklıkta bekletildi. Ertesi gün 0,22 µm membran filtresinden geçirilerek elde edilen stok solüsyonu +4°C'de bekletildi. Oil Red O stok solüsyonu boyama işleminde kullanılacağı zaman 6 birim stok solüsyon 4 birim dH<sub>2</sub>O ile karıştırıldı ve 20 dakika süresince oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,22 µm membran filtresinden geçirilerek kullanıldı.

### **3.3.2. Oil Red O boyama ile adiposit diferensiyasyonunun değeriendirilmesi:**

Adiposit diferensiyasyon protokolünün 8. gününde deney sonlandırıldı. Kuyucuklardaki hücrelerin medyumları boşaltılarak üzerine %10'luk formalin eklendi ve 5 dakika süresince bekletildi. Ardından kuyucuklardaki formalin boşaltılarak taze formalin ile değeriştirildi. Hücreler oda sıcaklığında formalin içerisinde 1 saat süreyle inkübe edildi. Kuyucuklardaki formalin tümüyle boşaltıldıktan sonra kuyucuklar %60'lık izopropanol ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kuyucuklardaki tüm formalin dikkatlice boşaltıldı ve pleytler iyice kurutuldu. Ardından her kuyucuğa daha önce hazırlanmış olan Oil Red O çalışma solüsyonundan 200 µl konuldu. Hücreler 10 dakika süresince Oil red O çalışma solüsyonunda inkübe edildi. Ardından Oil Red O çalışma solüsyonu hızlıca kuyucuklardan uzaklaştırılarak kuyucuklar 4 kez ddH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Bu aşamada pleytler inverted mikroskoba konularak görüntülendi. Bunun ardından kuyucuklardaki su boşaltıldı ve iyice kurutuldu. Kuyucuklardaki boyanmış olan yağ hücrelerinden Oil Red O çalışma solüsyonunu açığa çıkarmak için kuyucuklara %100 izopropanol konuldu. Pleytler 10 dakika süresince döner çalkalayıcıda 1000 rpm hızda, oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde birkaç kez pipetaj yapılarak açığa çıkmış olan izopropanolun homojen bir şekilde karışması sağlandı. Ardından her kuyucuktan 200 µl sıvı alınarak 96'lık eliza pleytlere transfer edildi. Pleytler ELISA okuyucu cihaza yerleştirilerek 490 nm optik adsorbansta ölçüm yapıldı.

### 3.3.3. Diferensiyasyon Deney Serileri

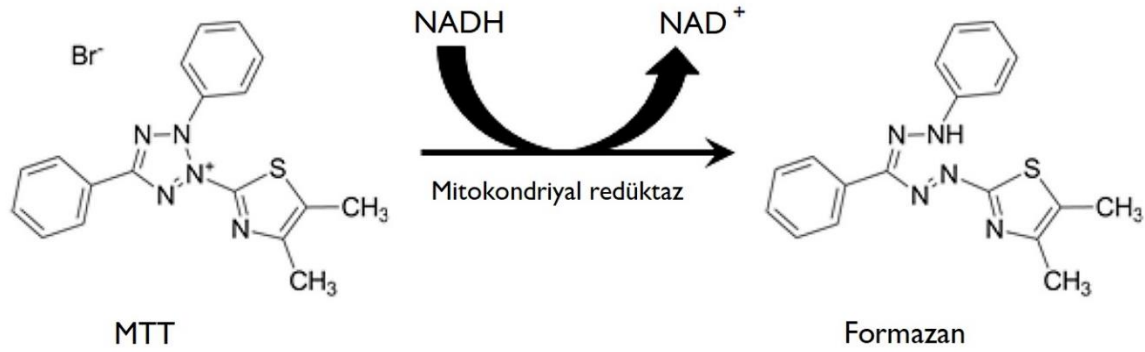
Diferensiyasyonun değerlendirildiği deney serilerinde efektör ve inhibitörler tek başlarına ya da kombine olarak diferensiyasyon sürecinin 0-2., 0-4., 4-8. ve 0-8. günleri boyunca uygulandı. Belirtilen zaman aralıkları bitiminden itibaren diferensiyasyon sürecinin 8. gününe kadar hücre kültür ortamı gün aşırı olarak yenilendi ve 8. gün hücreler harvest edilerek Oil Red O boyaması yapıldı. Kontrol gruplarına deney süresi boyunca aynı hacimde distile su ya da aynı hacim ve oranda dimetil sülfoksit içeren solüsyonlar uygulandı. Diferensiyasyon deney serileri aşağıdaki gibidir:

- Nitrik oksit donasyonu yapan DETA-NO (DETA-NO (2,2'-[Hidroksinitrozohidrazono] bis-etanimin,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) ve sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ,  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M) tek başına uygulandığı gruplar (n=4)
- iNOS indükleyicisi lipopolisakkaridin (LPS, 10 ve 100 ng/ml) NOS inhibitörü L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil esteri,  $2 \times 10^{-4}$  M ve  $5 \times 10^{-4}$  M) varlığında ya da yokluğunda uygulandığı gruplar (n=4)
- RhoA aktivatörü lizofosfatidik asit ((1-Oleoyl-*sn*-gliserol 3-fosfat sodyum tuzu, LPA,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) ve trombinin (1 ve 5 U/ml) ROCK inhibitörü Y-27632'nin ((*R*)-(+)-*trans*-4-(1-aminoethyl)-N-(4-Pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride monohydrate,  $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda uygulandığı gruplar (n=4)
- Selektif ROCK inhibitörü H-1152'nin ((*S*)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-isokinolinil) sulfonil] homopiperazin,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) tek başına uygulandığı gruplar (n=4)

### 3.4. MTT Hücre Proliferasyon Analizi

Günümüzde hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi amacı ile çeşitli farklı metodlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında hem uygulaması kolay hem sonuçları doyurucu ve hem de yüksek hızlı analizlere izin verebilen yöntemlerden birisi, MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) hücre proliferasyon analizidir. Bu analiz yönteminin temel prensibi kültüre canlı hücrelerin standart kültür koşullarında belli bir süre boyunca dengeli bir hücre kültür medyumunu içerisinde çözülmüş MTT ile 1-4 saat arası bir sürede inkübasyonu sonrası hücre içine penetre olan MTT'nin hücre içinde mitokondrilerdeki mitokondriyal redüktazlar tarafından mor renkli bir formazan tuzuna çevrilmesidir. MTT'nin mitokondriyal redüktazlar tarafından metabolize edilmesi ile ortaya çıkan formazan tuzunun oluşturduğu sinyal kolorimetrik ya da floresan metod ile ELISA reader ile 570 nm dalga boyunda okuma yapılarak değerlendirilir [622]. Hücrelere penetre olan MTT hücreler öldüğünde formazana dönüşmeyeceğinden ötürü, hücrelerin oluşturduğu formazan miktarı ölçülerek hücre popülasyonundaki hücrelerin

yaşamsallığı değerlendirilebilir. Bunun yanı sıra, hücreler proliferasyon ortamındaki hücre miktarı arttığında daha çok miktarda MTT hücre içinde formazan tuzuna çevrileceğinden ötürü ELISA reader ile yapılan okumada oluşan formazan sinyali de artacaktır. Bu da MTT analizi ile hücre proliferasyonunun değerlendirilmesini sağlar.



**Şekil 3.3.** MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)'nin formazana dönüşümü. Pozitif yüklü bir molekül olan MTT kolayca hücrelere penetre olur. Hücre içinde mitokondrilerde bulunan mitokondriyal redüktaz enzimleri aracılığı ile formazan tuzuna çevrilir [623].

### 3.4.1. MTT Çalışma Ve Çözücü Solüsyonlarının Hazırlanması

MTT, deneyden önceki gün final konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde pH 7.4 olan PBS içinde çözüldü. Ardından 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek ışıktan korunmuş bir şişeye alındı ve +4°C sıcaklıkta buzdolabında saklandı. Deneyde oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için kullanılacak solüsyon, absolu izopropil alkolün 0,04 M HCl eklenerek asidifiye edilmesi ile hazırlandı. Deney günü buzdolabından çıkarılan stok solüsyondan final konsantrasyon 0,5 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çalışma solüsyonu oda sıcaklığına gelene kadar ışık almayan bir ortamda bekletildi.

### 3.4.2. MTT Hücre Proliferasyon Analizinin Yapılması

MTT proliferasyon analizinin başlangıcında hücre kültürü laboratuvarında inkübatördeki 24 kuyucuklu pleytler dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve hafifçe yana doğru eğilerek kuyucuklardaki tüm medyum hücrelerin kuyucuk zemininden kalkmaması için azami dikkat gösterilerek

boşaltıldı. Ardından, içerdiği fenol red'in pembe-kırmızı rengi nedeni ile deney sonuçlarında hataya yol açmaması için kuyucuklarda kalmış olabilecek medyum, 37°C sıcaklıktaki fenol red içermeyen RPMI 1640 ile dikkatlice yıkandı. Ardından kuyucuklara dikkatlice filtre edilmiş 0.5mg/ml konsantrasyondaki MTT solüsyonundan medyumdaki MTT oranı %15 olacak şekilde eklendi ve pleytler tekrar inkübatöre konularak 37°C'de 3 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun bitiminde pleytler inkübatörden alındı ve kuyucuklarda bulunan medyum hücre içine penetre olmamış ve değişmemiş MTT'nin ortamdan alınması için dikkatle boşaltıldı. Ardından, MTT'nin mitokondriyal redüktazlarca metabolize edilmesi sonucu oluşmuş olan formazan kristalleri 1 ml asidifiye edilmiş izopropil alkol (absolü izopropil alkol içerisinde 0.04 M HCl) eklenerek çözüldü. Formazan kristallerinin tümüyle çözüldüğünden emin olmak için solüsyon üniform bir renk alana kadar birkaç kez pipetaj yapıldı. Ardından herbir kuyucuktan 200 µl alınarak 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine yerleştirildi ve 570 nm adsorbansta ELISA okuyucusunda okundu. Negatif kontrol olarak hücresiz pleytlere aynı yolla uygulanmış MTT'nin adsorbansı ölçüldü.

### 3.4.3. Proliferasyon Deney Serileri

Proliferasyonun değerlendirildiği deney serilerinde efektör ve inhibitörler tek başlarına ya da kombine olarak diferensiyasyon sürecinin 0-2., 0-4., ve 0-8. günleri boyunca uygulandı. Her bir deney grubu için, belirlenen zaman aralığının bitiminde deney sonlandırılarak MTT proliferasyon analizi yapıldı. Kontrol gruplarına deney süresi boyunca aynı hacimde distile su ya da aynı hacim ve oranda dimetil sülfoksit içeren solüsyonlar uygulandı. Proliferasyon deney serileri aşağıdaki gibidir:

- Nitrik oksit donasyonu yapan DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) ve NaNO<sub>2</sub>'in ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M) tek başına uygulandığı gruplar (n=4)
- iNOS indükleyicisi LPS'in (10 ve 100 ng/ml) NOS inhibitörü L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  M ve  $5 \times 10^{-4}$  M) varlığında ya da yokluğunda uygulandığı gruplar (n=4)
- RhoA aktivatörü LPA ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) ve trombinin (1 ve 5 U/ml) ROCK inhibitörü Y-27632'nin ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda uygulandığı gruplar (n=4)
- Selektif ROCK inhibitörü H-1152'nin ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) tek başına uygulandığı gruplar (n=4)

### 3.5. Rho A ve ROCK-2 Ekspresyonları:

RhoA-ROCK ekspresyonunun değerlendirildiği deney serisi için 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flasklarına ekim yapıldı. Adiposit diferensiyasyonu üzerine etkileri test edilen ajanların uygulandığı deney gruplarında diferensiyasyon protokolünün önceden belirlenmiş günlerinde

deney sonlandırıldı. Test edilen ajanların ROCK-2 enzim ekspresyonları üzerine etkisini değerlendirmek için protein-protein etkileşimlerini değerlendirmek amacı ile yaygın olarak kullanılan bir teknik olan Western-Blot yöntemi kullanıldı. Western blot yapılacak olan deney gruplarında uygulama sonrasında 3T3-L1 hücrelerinin bulunduğu 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklardaki medyum 1 ml hacmindeki ependorf tüplere alındı. Flasklar bir kez dikkatlice PBS ile yıkandı ve ardından hücreleri lize etmek için flasklara RIPA lizis tamponu (25mM Tris•HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoksikolat, %0,1 SDS) eklendi ve +4°C'de 5 dakika süresince inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kazıma işlemi yapılarak flasklardaki tüm hücreler alındı. Flasklardan elde edilen homojenatlar 1 ml hacmindeki 200 g'de +4 °C'de 10 dakika süresince santrifüj edildi. Ardından alttaki pelleti kaldırmamaya dikkat ederek süpernatant ependorf tüplere alındı. Her tüpteki süpernatanttan 10 µl alınarak Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanıldı. Kalan proteinler ise Western-blot yönteminde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

### **3.5.1. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini:**

Coomassie Blue G250 boyasının proteinlere bağlanmasına dayanan hızlı ve oldukça duyarlı olan Bradford yöntemi ile protein tayini biyolojik örneklerdeki protein dışı komponentler ve yaygın olarak kullanılan reagentler ile etkileşiminin oldukça az olması nedeni ile protein çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Boya solüsyonu içerisinde üç farklı yüklü boya formu bulunmaktadır. Bunlardan daha katyonik yüklü kırmızı form 470 nm ve yeşil form 650 nm dalgaboyunda maksimum absorbands vermektedir. Proteine bağlanan asıl form olan daha anyonik yüklü mavi boya ise 590 nm dalga boyunda maksimum absorbandsa ulaşır. Metod, proteine bağlanmış olan mavi iyonik formdaki boya miktarının 595 nm dalga boyundaki absorbandsının ölçülmesi yolu ile protein miktarının hesaplanmasını sağlar. Boya proteinlerin arginin ve lizin rezidülerine bağlanmaktadır. Bu nedenle boyanın homojenatlardaki farklı proteinlere karşı yanıtının farklı olması metodun tek temel dezavantajı olsa da yapılan tüm modifikasyonlar duyarlılığın azalmasına neden olmuştur. Bu nedenle halen protein ölçümü için yaygın olarak kullanılan yöntem Bradford tarafından tanımlanan orijinal metoddur [624]. Western blotting hızlı, etkili ve tekrarlanabilir bir metoddur. Özellikle çok az miktardaki proteinlerin saptanması amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Akrilamid jellerdeki ulaşılması ve analizi zor olan proteinlerin membranlara transfer edilerek stabilize edilmesini ve etkin bir şekilde analiz edilebilmesini sağlar.

Protein ölçümü için önce 1 mg/ml sığır serum albumini (BSA) solüsyonu deney standardı olarak kullanılmak üzere hazırlandı. Standartlar her bir konsantrasyon değeri için ikişer ependorf tüpü olmak üzere 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl BSA konsantrasyonunda hazırlandı. Ependorf

tüplerindeki solüsyonların üzeri distile su eklenerek 100'er µl'ye tamamlandı. Ölçümü yapılacak olan örnekler de yine aynı şekilde çift olarak hazırlandı ve distile su eklenerek 100'er µl'ye tamamlandı. Ardından standart ve örneklerin üzerine 1'er ml bradford solüsyonu eklendi. Tüm tüplerdeki solüsyonlar vortekslenerek homojen bir şekilde karışması sağlandı. Tüm standart ve örneklerden 200 µl alınarak 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine konuldu. Ardından örnekler 595 (620) nm dalgaboyuna ayarlanmış olan ELISA okuyucuda köre karşı okutuldu. Daha sonra elde edilen absorbansların her örnek için ayrı ayrı ortalamaları alınarak µl deki protein miktarları Graphpad Prism programı kullanılarak belirlendi.

### 3.5.2. Western-Blot Yöntemi:

Protein blotlama olarak da adlandırılan western blot metodu elektroforez işlemi sonrası sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) çözünmüş olan proteinlerin bir elektrik akımı yardımı ile absorban bir membrana transferidir [625, 626]. Hızlı ve etkili bir metod olan western blotting, özellikle çok az miktarda bulunan proteinlerin kantitasyonu için uygun olması, poliakrilamid jelde ulaşılması güç olan proteinlerin membrana transferi sonrası kolay bir şekilde analizine izin vermesi ve tekrarlanabilirliği dolayısı ile protein analizi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [627].

Diferensiyasyon protokolünün farklı günlerinde uygulanan test ajanlarının ROCK-2 protein ekspresyonlarına etkisinin değerlendirileceği deney gruplarında 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen homojenatlar poliakrilamid jelde hazırlanan kuyucuklara yüklenecek miktarları hesaplanıp buna göre alınan miktarı Laemmli protein yükleme tamponu (0,5 M Tris HCl pH 6.8 solüsyonu 0,125 M, 0,14 M %10 SDS, %20 gliserol, 0,2 mM 2-merkaptoetanol, 0,03 mM bromofenol blue) ile 1/3 oranlarında karıştırılıp vortekslendikten sonra 5'er dakika süresince kaynatıldı. Eşit miktarlarda protein önceden hazırlanmış olan %8-12'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid (SDS-PAGE) jel üzerindeki kuyucuklara yüklenerek elektroforez yapıldı ve yüklenen örneklerdeki farklı büyüklükteki proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Poliakrilamid jel üzerinde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan proteinler elektrik akımı altında gece boyunca +4°C sıcaklıkta blotlama yapılarak nitroselüloz bir membrana transferi gerçekleştirildi. Blot işleminin bitiminin ardından transblot cihazından çıkarılan membranlar önceden hazırlanarak filtre edilmiş %2'lik Tween-20 ve yağsız süt tozu içeren Tris solüsyonu (TBS-T) ile 1 saat süresince dairesel çalkalayıcıda düşük hızda çalkalanarak bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu sayede membranların protein bulunmayan bölümlerine özgün olmayan bir yolla protein bağlanması sağlandı. Bu özgün olmayan bağlanma ile protein yapıda olan primer antikörün bir sonraki aşamada membrana bağlanması engellenerek deneyin doğruluğu arttırılmış oldu. Membranlar bir saat süresince bloklama

işlemine tabi tutulduktan sonra 3 kez 10'ar dakika süresince dairesel çalkalayıcıda düşük hızda TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Bu sayede membrana yapışmamış olan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı. Her yıkama sonrası solüsyon dökülerek yenilendi. Yıkama işlemi bittikten sonra membranlar 1:2,000 dilüsyonda hazırlanmış olan ROCK enzimine özgü ROCK-2 (ROK $\alpha$ ) primer antikor ile 2 saat süresince +4°C sıcaklıkta dairesel çalkalayıcıda düşük hızda çalkalanarak inkübe edildi. Bu yolla primer antikorların membranda bağlanmış durumda bulunan hedef proteinleri olan ROCK-2 enzimine bağlanması sağlandı. Primer antikor ile inkübasyon bitiminde tüm antikor alınarak membranlar bir kez dikkatlice TBS-T solüsyonu ile çalkalandı. Bu işlem sonrasında da membranlar TBS-T solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika süresince yıkanarak bağlanmamış durumdaki primer antikorun uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar bu kez HRP (*horseradish peroxidase*) bağlı sekonder antikor ile (1:2,000 dilüsyonda) bir saat inkübe edildi ve böylece primer antikorlara sekonder antikorun bağlanması sağlandı. Sekonder antikor ile inkübasyon bitiminde tüm antikor alınarak membranlar bir kez dikkatlice TBS-T solüsyonu ile çalkalandı. Bunun ardından membranlar tekrar 3 kez 10'ar dakika süresince TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Bu sayede bağlanmamış olan sekonder antikor uzaklaştırıldı. Daha sonra membranlar ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit görüntüleme solüsyonu ile 10 dakika süresince karanlık odada inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde görüntüleme solüsyonu alınarak membranlar arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek streç film ile kaplandı ve karanlık odada çeşitli sürelerde medikal röntgen filme basılarak görüntülendi.

### 3.5.3. ROCK-2 Enzim Ekspresyonlarının Değerlendirildiği Deney Serileri

Western blot yöntemi ile ROCK-2 ekspresyonlarının değerlendirildiği deney serilerinde NO donörü ve iNOS indükleyicisi test ajanları diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında tek başına ya da kombine olarak uygulandı. Ardından deney protokolünün 8. gününde hücreler harvest edilerek Western blot deneylerinde kullanıldı. Deney serileri aşağıdaki gibidir:

- LPS'in (10, 100 ng/ml) NOS inhibitörü L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M) varlığında ya da yokluğunda uygulandığı gruplar (n=3)
- Nitrik oksit donörü DETA-NO'un ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) uygulandığı gruplar (n=3)

### 3.5.4. iNOS Enzim Ekspresyonlarının Değerlendirildiği Deney Serileri

Western blot yöntemi ile iNOS ekspresyonlarının değerlendirildiği deney serilerinde LPS (10, 100 ng/ml) diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında tek başına uygulandı.



Ardından deney protokolünün 8. gününde hücreler hasat edilerek Western blot deneylerinde kullanıldı.

### 3.5.5. LIM-Kinaz Aktivitesinin Değerlendirildiği Deney Serileri

Rho-kinaz tarafından fosforile edilerek aktive olan ve ROCK aktivitesinin göstergesi olan LIM-kinaz fosforilasyonunun Western blot yöntemi ile değerlendirildiği deney serilerinde efektör ve inhibitörler diferensiyasyon protokolünün 0. günü belirlenmiş zaman aralıklarında (0, 5., 15., 30. dakika) hücre kültür ortamına tek başına ya da kombine olarak uygulandı. Belirlenmiş zaman aralığının bitiminde hücreler hızlıca buz üzerinde hasat edilerek western blot deneylerinde kullanıldı. Bu deneylerdeki deney serileri aşağıdaki gibidir:

- LPS'in (10, 100 ng/ml) tek başına ya da L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  M) ile kombine olarak uygulandığı gruplar (n=3)
- L-NAME'in ( $2 \times 10^{-4}$ M) tek başına uygulandığı grup (n=3)
- $\text{NaNO}_2$ 'in ( $10^{-7}$  M) tek başına uygulandığı grup (n=3)

### 3.6. G-LISA RhoA Aktivasyon Analizi

#### 3.6.1. Lizis:

Deneyden bir gün önce G-Lisa RhoA aktivasyon analizi kitinin içinde bulunan malzemeler üreticinin talimatlarına göre hazırlandı ve deney için gereken ancak üretici tarafından temin edilmeyen malzemeler temin edilerek hazırlandı. Deney günü inkübatörden çıkarılan hücre kültür pleytleri buz üzerine konularak medyumları alındı ve buz soğukluğunda PBS solüsyonu ile yıkandı. Bu aşamada pleytler yaklaşık 1 dakika buz üzerinde tutuldu. Ardından pleytlerdeki tüm PBS'nin alınabilmesi amacı ile pleytler buzdan ayrılmadan olabildiğince dik vaziyete getirildi. Pleytlerin tabanındaki hücrelerin kalkmamasına özen göstererek tüm PBS dikkatlice aspire edildi. Ardından pleytlerdeki her bir kuyucuğa 140 µl buz soğukluğunda lizis tamponu konularak hücreler buz üzerinde lize edildi ve pleytler yine buzdan ayrılmadan hafifçe eğilerek hücre kazıyıcı ile toplandı.

Kazıma işlemi sonrasında her kuyucuktan toplanan lizatların 20şer µl'si önceden etiketlenerek hazırlanmış tüplere konularak protein miktar tayini için ayrıldı. G-lisa RhoA aktivasyon analizi için her kuyucuktan alınan 100 µl lizat yine buz üzerinde önceden etiketlenerek hazırlanmış olan 0,5 ml hacmindeki tüplere transfer edildi. G-lisa RhoA aktivasyon analizi için ayrılan lizatlar hemen çalışma alanında hazır bulundurulmuş sıvı nitrojene daldırılarak donduruldu. Sıvı nitrojenden alınan lizatlar hemen  $-86^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuya aktarıldı. Protein

miktar tayini için 96 kuyucuklu bir ELISA pleytindeki kuyucuklara 10 µl lizat ya da lizis tamponu (blank olarak) konuldu ve her kuyucuğa 290 µl Precision Red™ Advanced Protein Assay Reagent eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Ardından pleyt ELISA okuyucu cihaza konularak köre karşı 600 nm dalga boyunda absorbands değerleri okundu. Elde edilen sonuçlar 3,75 ile çarpılarak her bir kuyucuktaki lizat için protein konsantrasyonu (mg/ml) saptandı. Ardından özdeş protein konsantrasyonlarına ulaşmak için örneklere eklenmesi gereken lizis tamponu miktarının hesaplanması amacı ile aşağıdaki denklem kullanıldı:

$$\frac{A-B}{B} \times (A'nın hacmi) = \mu l$$

*Denklemden A konsantrasyonun yüksek olduğu lizatın konsantrasyonu (mg/ml) ve B en dilüe örneğin konsantrasyonudur (mg/ml)*

Tüm lizatlarda eşit konsantrasyonda protein bulunması için her tüpe eklenmesi gereken lizis tamponu miktarı belirlendikten sonra G-lisa analizi deneyine başlandı.

### **3.6.2. G-LISA Analizi:**

Deney başlangıcında buz üzerinde 60 µl lizis tamponu etiketli bir mikro tübe alındı ve üzerine 60 µl buz soğukluğunda bağlanma tamponu eklendi, 3-5 saniye süresince vortekslendikten sonra eliza reader okuması sırasında blank olarak kullanılmak üzere buza gömülerek bekletildi. 12 µl Rho kontrol proteini Eliza okuması için örnekleri eliza pleyte yerleştirmeden hemen önce etiketli bir mikro tübe alındı ve üstüne hızlıca 48 µl buz soğukluğunda lizis tamponu ve 60 µl bağlanma tamponu eklendi. 3-5 saniye vortekslendikten sonra buza gömüldü ve eliza okuması sırasında pozitif kontrol olarak kullanıldı. Çalışılması planlanan gruplara yetecek sayıda G-LISA stribi paketinden çıkarıldı ve bu amaçla hazırlanmış olan strip tutucu pleyte yerleştirilerek buza gömüldü. Daha sonra G-LISA pleyt kuyucuklarının tabanında bulunan tozun çözündürülmesi için üzerine buz soğukluğunda 100 µl ultra saf distile su eklendi. Hücre lizatları -80°C derin dondurucudan çıkarıldı. Donmuş durumdaki hücre lizatları oda sıcaklığındaki su banyosuna alınarak çözündürüldükten sonra hızlıca buz üstüne alındı. Önceden yapılan hesaplama göre lizatlardaki protein konsantrasyonunun eşitlenebilmesi için her örneğe gereken miktarlarda lizis tamponu eklendi. Ardından 3-5 saniye süresince vortekslenerek homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra buza gömüldü. Bu lizatlardan 40 µl alınarak önceden etiketlenerek hazırlanmış olan buz soğukluğundaki boş mikrosantrifüj

tüplerine konuldu. Her tüpe eşit hacimde bağlanma tamponu eklendikten sonra 3-5 saniye süresince vortekslenerek tekrar buz üstüne konuldu.

G-LISA striplerinin bulunduğu pleyt ters çevrilip döküldü ve içinde hiç sıvı kalmaması için bir tezgâha yerleştirilmiş bir kâğıt havlu rulosuna 5-7 kez sertçe vurularak kuyucuklardaki tüm distile suyun boşalması sağlandı (deneyin tüm aşamalarında kuyucukların iyi boşalmamış olmasından ötürü sonuçlar arasında büyük farklılıklar olmasını engellemek için stripler hep aynı şekilde boşaltıldı). Bunun ardından pleyt tekrar buz üstüne alındı. Her kuyucuğa hızlıca 50 µl hücre lizatı konuldu. Pleyttteki iki kuyucuğa sadece 50 µl blank kontrol solüsyonu konuldu. Diğer iki kuyucuğa ise sadece 50 µl RhoA pozitif kontrol solüsyonu konuldu. Pleyt hızlıca 4°C sıcaklıktaki soğuk orbital mikropleyt çalkalayıcıya yerleştirilerek 400 rpm hızda 30 dakika süresince çalkalanarak inkübe edildi. Bu sırada inkübasyon devam ederken pleyttteki strip miktarına göre gereken miktarda antikor solüsyonu hazırlamak için RhoA primer antikor antikor dilüsyon tamponu ile 1/250 oranında dilüe edildi (her 8 kuyucuklu strip için gereken hacim 500 µl idi). 30 dakika sonra pleyt mikropleyt çalkalayıcıdan alınarak içindeki solüsyon boşaltıldı. Pleyt iki kez yıkama tamponu ile yıkandı ve tezgâha konularak pleyttteki kuyucuklara çok kanallı bir pipet aracılığıyla hızlıca oda sıcaklığındaki 200 µl antijen sunum tamponu eklendi. Pleyt oda sıcaklığında 2 dakika süresince inkübe edildi. Bunun ardından pleyttteki solüsyon boşaltıldı ve hızlıca üç kez oda sıcaklığındaki 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından her kuyucuğa 50 µl dilüe anti-RhoA primer antikor konuldu ve pleyt oda sıcaklığında mikropleyt çalkalayıcıda 45 dakika süresince 400 rpm hızda çalkalanarak inkübe edildi.

Primer antikor ile inkübasyon sırasında pleytler için gereken miktarda sekonder antikor solüsyonu hazırlamak için HRP ile işaretli sekonder antikor, antikor dilüsyon tamponu ile 1/62,5 oranında dilüe edildi (her 8'li strip için gereken antikor solüsyonu miktarı 500 µl idi). Inkübasyonun bitiminde pleyt boşaltılarak hızlıca üç kez 200 µl oda sıcaklığındaki yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 50 µl dilüe sekonder antikor eklendi ve mikropleyt çalkalayıcıya konularak 45 dakika süresince oda sıcaklığında 400 rpm hızda çalkalanarak inkübe edildi. Sekonder antikor inkübasyonu sırasında pleyt için gereken miktarda HRP solüsyonu hazırlamak için HRP deteksiyon reajan solüsyonu A ve B -80°C derin dondurucudan alınarak oda sıcaklığındaki su banyosunda çözülmesi sağlandı. Sekonder antikor inkübasyonunun bitiminden hemen önce her iki solüsyon eşit miktarda karıştırılarak HRP solüsyonu hazırlandı. Sekonder antikor ile inkübasyon bitiminde pleyt boşaltılarak oda sıcaklığındaki 200 µl yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Yıkama bitiminde her kuyucuğa 50 µl HRP solüsyonu eklendi ve 37°C sıcaklıkta 15 dakika süresince inkübe edildi. Inkübasyon sonrası kuyucuklara 50 µl HRP stop solüsyonu eklendi ve eliza okuyucuda 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

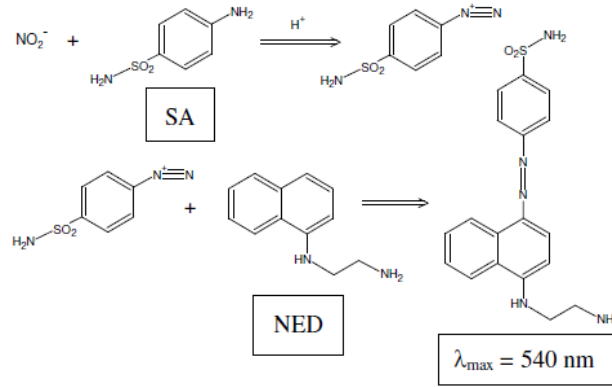
### 3.6.3 RhoA Translokasyonlarının Değerlendirildiği Deney Serileri

G-LISA RhoA aktivasyon analizi yapılan deney serilerinde efektör ve inhibitörler diferensiyasyon protokolünün 0. günü belirlenmiş zaman aralıklarında (0, 5., 15., 30. dakika) hücre kültür ortamına tek başına ya da kombine olarak uygulandı. Belirlenmiş zaman aralığının bitiminde hücreler hızlıca buz üzerinde hasat edilerek G-LISA RhoA aktivasyon analizi yapıldı. RhoA translokasyonlarının değerlendirildiği deney serileri aşağıdaki gibidir:

- $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M, n=3) uygulanan gruplar (n=3)
- DETA-NO ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M, n=3) uygulanan gruplar (n=3)
- L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M, n=3) uygulanan gruplar (n=3)
- LPA ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M, n=3) uygulanan gruplar (n=3)
- Trombin (1 ve 5 U/ml) ve RhoA inhibitörü C3 ekzoenzim ( $2 \mu\text{ml}$ ) tek başına ya da kombine olarak uygulandığı gruplar (n=3)

### 3.7. Griess Metodu ile Nitrik Oksit Metabolitlerinin Tayini

Organizmada üretilen nitrik oksidin nitrit ve nitrata metabolize olması basamaklı bir reaksiyon zinciri ile olur. Plazma ve diğer sıvılarda NO neredeyse tümüyle nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) metabolize olur. Griess yöntemi, nitrik oksidin en çok oluşan iki metabolitinin (nitrit ve nitrat) ölçümüne dayalı bir ölçümdür. İlk defa 1879 yılında tanımlanan ve basitliği nedeni ile plazma, serum, idrar, tükürük ve hücre kültür medyumunu içeren örneklerde analiz için yaygın bir şekilde kullanılan Griess metodunda nitrit önce asidik ortamda sulfanilamid gibi bir diazotize edici ajanla muamele edilerek geçici bir diazonyum tuzu oluşur. Ardından bu ara ürün bir eşleyici ajan olan N-naftil-etilendiamin ile reaksiyona girerek stabil bir azo bileşiği oluşur. Oluşan bileşiğin yoğun mor rengi griess metodu ile nitrit ölçümünün 540 nm optik absorbansta  $0,5 \mu\text{M}$  kadar düşük düzeyde yüksek hassasiyetle yapılabilmesini sağlar.



**Şekil 3.4:** Griess metodu ile NO ölçümünün şematize edilmiş gösterimi [632].

Nitrit/nitrat ölçümü için planlanan deney gruplarında 3T3-L1 hücreleri 6 kuyucuklu pleytlere her kuyucukta 80.000 hücre olacak şekilde ekildi. Daha sonra kuyucuklardaki hücreler tam konfluent oluncaya kadar %10 buzağı serumu içeren komplete medyumda inkübe edildi. Kuyucuklardaki hücrelerin tam konfluent olduğu gün-2. gün kabul edilerek hücreler iki gün süreyle %10 buzağı serumu içeren komplete medyumda inkübe edildi. Hücreler tam konfluent olduktan sonraki 2. gün diferensiyasyon protokolünün 0. günü kabul edildi. Bu noktada medyum değişimi yapıldı ve kuyucuklara 0,5 mM IBMX, 0,25  $\mu\text{M}$  dexametazon ve 1  $\mu\text{M}$  insülin içeren %10 FBS/DMEM verilerek 2 gün boyunca diferensiyasyon indüklendi. Ardından 2 gün süresince (2-4. gün) hücreler insülin içeren %10 FBS/DMEM içerisinde inkübe edildi. Diferensiyasyon protokolünün 4. gününden 8'inci gününe kadar hücreler %10 FBS/DMEM de inkübe edildi. İnkübatördeki hücrelerin medyumunu gūnaşırı değiştirildi. Nitrik oksit ölçümü için belirlenen günlerde kuyucuklardan alınan medyum önceden etiketlenmiş 1,5 ml hacmindeki viallere alındı ve nitrik oksit ölçümü yapılana kadar  $-20^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki derin dondurucuda saklandı.

Nitrik oksit ölçüm deneyinden bir gün önce nitrik oksit ölçüm kitinde bulunan malzemeler üreticinin talimatlarına göre hazırlandı, kitte bulunmayan ancak deney için gerekli malzemeler temin edildi.

### 3.7.1. Nitrit Ölçümü:

Deney yapılacağı zaman örnekler  $-20^\circ\text{C}$  derin dondurucudan çıkarılarak çözüldü. Nitrit ölçümü için bir eliza pleytinin yan yana ilk iki kuyucuğuna 200  $\mu\text{l}$  1x reajan dilüenti eklendi. Ardından 50 $\mu\text{l}$  nitrit standardı 1-7 yan yana kuyucuklara duplike olarak eklendi. 50  $\mu\text{l}$  1x reajan dilüenti sıfır standart olarak yan yana iki kuyucuğa eklendi. Ardından sırayla kuyucuklara 50  $\mu\text{l}$  örnek eklendi. Blank kuyucukları dışındaki diğer tüm kuyucuklara 50  $\mu\text{l}$  Griess reajanı I eklendi.

Ardından blank dışındaki tüm kuyucuklara 50 µl Griess reajanı II eklendi ve iyice karıştırıldı. Pleyt oda sıcaklığında 10 dakika süresince inkübe edildi ve eliza okuyucuda 540 nm dalga boyunda absorbanası ölçüldü.

### 3.7.2. Nitrat Ölçümü:

Nitrat ölçümü için bir eliza pleytinin yan yana ilk iki kuyucuğuna 200 µl reajan dilüenti eklendi. 50 µl nitrat standardı 1-6 yan yana kuyucuklara duplike olarak eklendi. 50 µl 1x reagent dilüent yan yana kuyucuklara sıfır standart olarak eklendi. Ardından sırayla kuyucuklara 50 µl örnek eklendi. Tüm standart ve örneklere 25 µl dilüe NADH eklendi. Tüm standart ve örnek kuyucuklarına 25 µl dilüe nitrat redüktaz solüsyonu eklendi. Pleytin üstü kapatıldı ve 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Blank dışındaki tüm kuyucuklara 50 µl Griess reajanı eklendi. Ardından blank dışında tüm kuyucuklara 50 µl Griess II reajanı eklendi ve iyice karıştırıldı. Pleyt oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve eliza okuyucuda 540 nm dalga boyunda absorbanası ölçüldü.

### 3.7.3. Nitrit/Nitrat ölçümü Yapılan Deney Serileri

Nitrit/nitrat ölçümü yapılan deney serilerinde efektör ve inhibitörler diferensiyasyon protokolünün belirlenmiş zaman aralıkları boyunca (0-2., 0-4., 0-8. günleri arasında) hücre kültür ortamına uygulandı ve belirlenmiş zaman aralığının bitiminde hücre kültür medyumunda nitrit/nitrat ölçümü yapıldı. Bu amaçla oluşturulan deney serileri aşağıdaki gibidir:

- iNOS indükleyici bakteriyel lipopolisakkarid (10 ve 100 ng/ml) ve NOS inhibitörü L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M) tek başına ya da kombine olarak uygulandığı gruplar (n=4)
- RhoA aktivatörü LPA ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) ve ROCK inhibitörü Y-27632 ( $10^{-5}$  M) tek başına ya da kombine olarak hücre kültür ortamına uygulandığı gruplar (n=4)

### 3.8. Aktin Hücre İskeleti Boyanması

Deneyden önce Oregon green 488 phalloidin üreticinin talimatına göre dilüe edildi ve viallere alınarak -20°C sıcaklıktaki derin dondurucuya konuldu. Fiksasyon için gereken %4'lük formaldehid solüsyonu hazırlandı. Deney günü, hücre iskeleti boyanması için 24 kuyucuklu pleytlere ekilmiş olan hücreler inkübatörden çıkarıldı ve dikkatlice bir kez 2-3 dakika süresince oda sıcaklığında PBS (Phosphate Buffered Saline/fosfatla tamponlanmış tuzlu su) ile yıkandı. Ardından kuyucuklardaki tüm PBS bir pipetle dikkatlice alındı ve kuyucuklara önce 1 dakika süresince 250 µl %4 formaldehit + %0,1 TX (triton-X 100) solüsyonu konuldu ve süre bitiminde

dikkatlice boşaltılarak kuyucuklara bu kez 250 µl %4 formaldehit solüsyonu konuldu ve 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin bitiminde formaldehit boşaltılarak hücreler 3 kez 2-3 dakika PBS ile yıkandı. PBS boşaltıldıktan sonra kuyucuklara 250 µl %0,25 TX içeren PBS konularak 10 dakika süresince inkübe edildi ve hücrelerin permeabilize olması sağlandı. Solüsyon boşaltıldı ve kuyucuklara PBS içerisinde %5 BSA (Bovine Serum Albumin), %5 NGS (Normal Goat Serum) ve %0,25 TX içeren bloklama solüsyonu eklenerek 20 dakika süresince oda sıcaklığında bloklama yapıldı.

Bloklamanın bitiminden hemen önce -20°C sıcaklıktaki derin dondurucudan çıkarılan Oregon green phalloidin ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılmış ve boyama yapılacak kuyucuk sayısına göre gereken miktar önceden hesaplanarak hazırlanmış %0,5 BSA, %5 NGS, %0,25 TX içeren PBS solüsyonuna 1/50 (hacim/hacim) oranında eklenerek hazırlanan boyama solüsyonundan her kuyucuğa 250 µl konuldu ve oda sıcaklığında, ışıktan koruyarak 20 dakika süresince inkübasyon yapıldı. Bu aşamanın ardından, pleytleri olabildiğince ışıktan koruyarak 2-3 kez 2-3 dakika süre ile PBS solüsyonu ile yıkama yapıldı.

Yıkamanın bitmesinin ardından pleytler Nikon Eclipse TS 100 invert mikroskopta ve floresan ataçmanına üreticinin kılavuzuna göre Oregon green 488 phalloidin için kullanımı önerilen FITC (Fluorescein isothiocyanate) floresan filtre kübü (eksitasyon: 496, emisyon: 524 nm dalga boyu) takılarak 40 X büyütmede görüntülendi ve fotoğraflandı.

### **3.8.1. Aktin Hücre İskeleti Boyaması Yapılan Deney Serileri**

Aktin hücre iskeleti organizasyonundaki değişiklikleri değerlendirmek amacı ile aktin hücre iskeleti boyaması yapılan deney serilerinde efektör ve inhibitörler diferensiyasyon protokolünün belirlenmiş zaman aralıkları boyunca (0. gün ve 0-2., 0-4., 0-8. günleri arasında) hücre kültür ortamına uygulandı. Belirlenmiş zaman aralığının bitiminde hücreler Oregon Green Phalloidin ile boyanarak floresan mikroskop altında görüntülendi. Bu amaçla oluşturulan deney serileri aşağıdaki gibidir:

- DETA-NO ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M, n=4) uygulaması yapılan gruplar
- $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M, n=4) uygulaması yapılan gruplar
- LPS (10 ve 100 ng/ml) ve L-NAME'in ( $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M, n=4) tek başına ya da kombine olarak uygulandığı gruplar
- LPA ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M) ve Y-27632'nin ( $10^{-5}$  M) tek başına ya da kombine olarak uygulandığı gruplar

### 3.9. İstatistiksel Analiz:

Diferensiyasyon, proliferasyon, nitrit/nitrat tayinleri ve RhoA aktivasyonu (G-LISA) kolorimetrik olarak değerlendirildi ve veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Western Blot tekniği ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programından faydalanıldı. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA'yı takiben Dunnet veya Bonferroni *post- hoc* testi kullanıldı.  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.





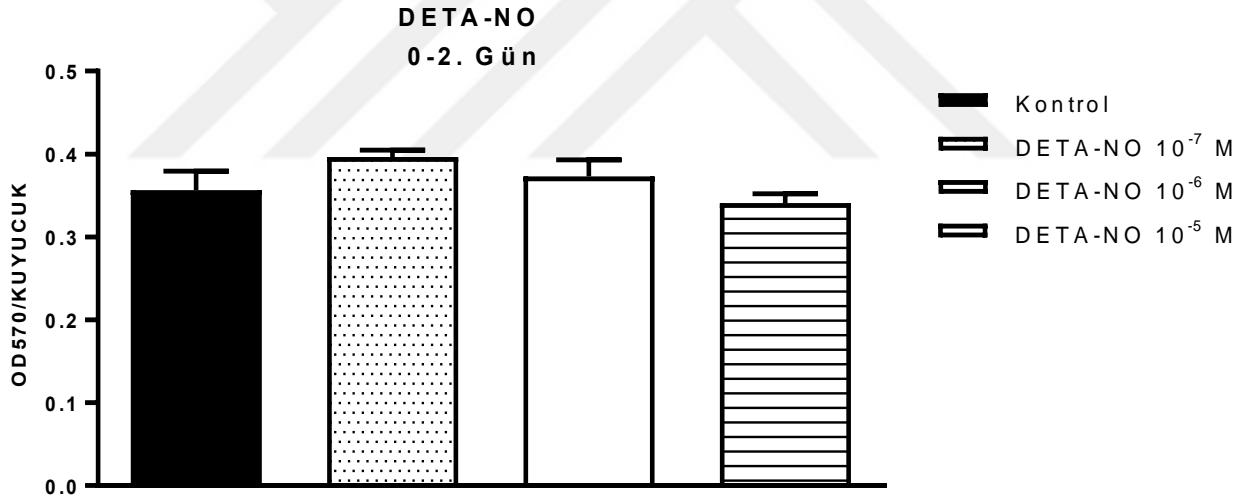
## 4. BULGULAR

### 4.1. Proliferasyon Bulguları

#### 4.1.1. DETA-NO Uygulamasının Proliferasyon Üzerine Etkisi

##### 4.1.1.1. 0-2. Gün:

Hücre kültür ortamına DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında 3T3-L1 hücre kültür ortamına DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulaması yapıldı. Ardından deney protokolünün 2. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. DETA-NO, 0-2 gün boyunca uygulanan konsantrasyonlarda proliferasyon üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.1.1.1).

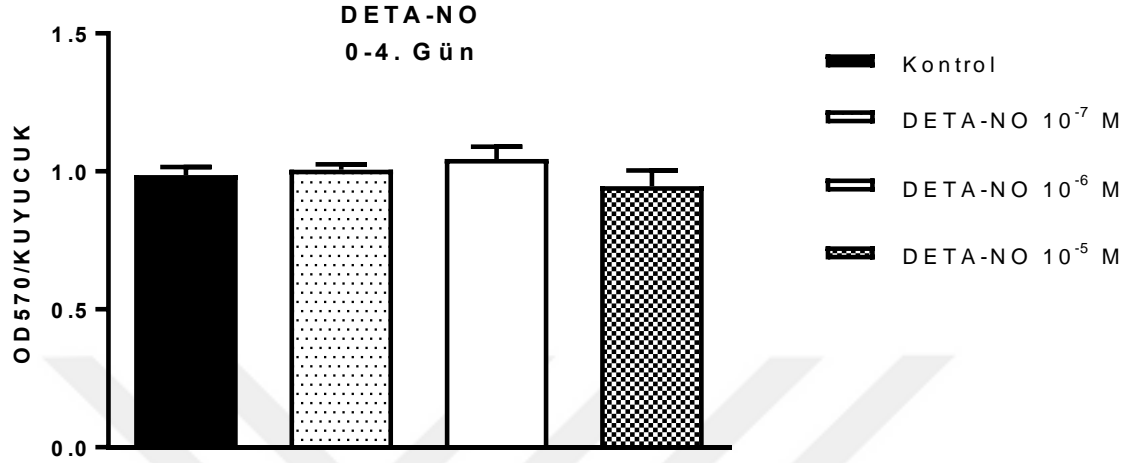


**Şekil 4.1.1.1.** 0-2. gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-2. günü DETA-NO  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

##### 4.1.1.2. 0-4. Gün:

Hücre kültür ortamına DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon protokolünün 0-4. günü süresince DETA-

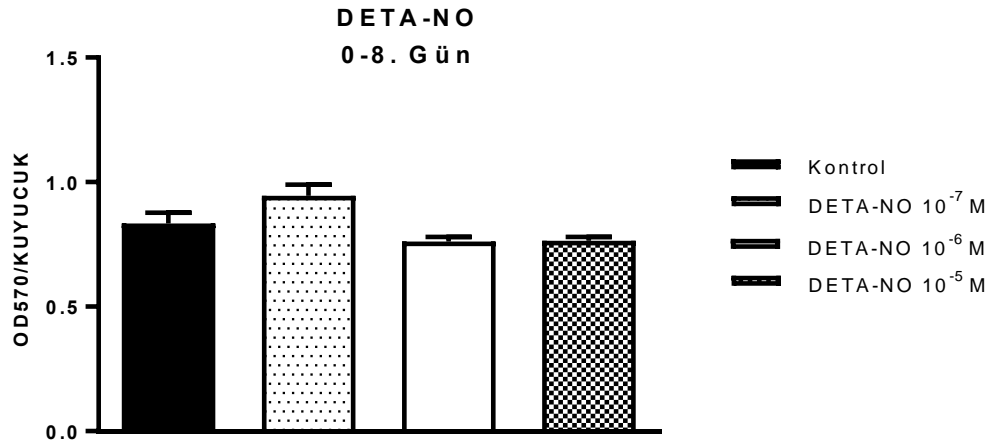
NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 4. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. DETA-NO, 0-2 gün boyunca uygulanan konsantrasyonlarda proliferasyon üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.1.1.2.).



**Şekil 4.1.1.2.** 0-4. Gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-4. günü DETA-NO  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından deney protokolünün 4. günü DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.1.3. 0-8. Gün:

Hücre kültür ortamına DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü süresince DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 8. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. DETA-NO, uygulanan konsantrasyonlarda proliferasyon üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.1.1.3.).

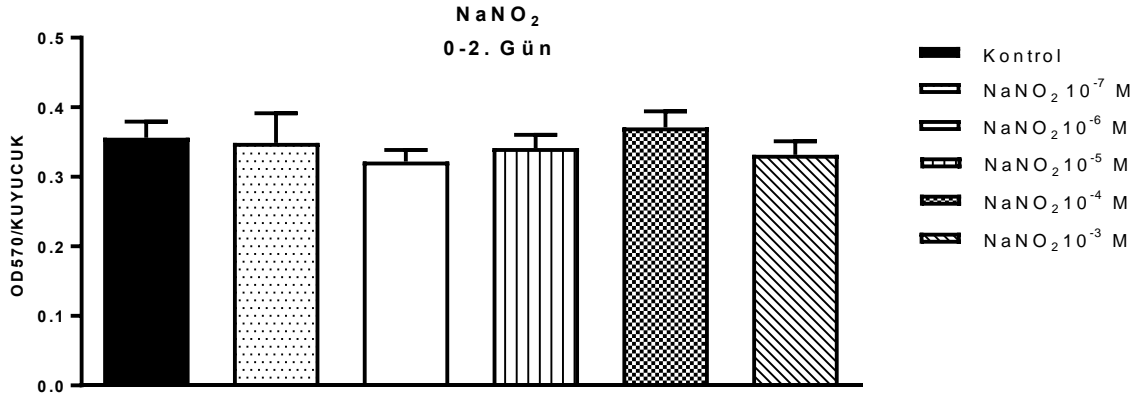


**Şekil 4.1.1.3.** 0-8. Gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolünün 0-8. günü hücre kültür ortamına DETA-NO 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından 8. gün DETA-NO uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.2. NaNO<sub>2</sub> Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi

##### 4.1.2.1. 0-2. Gün:

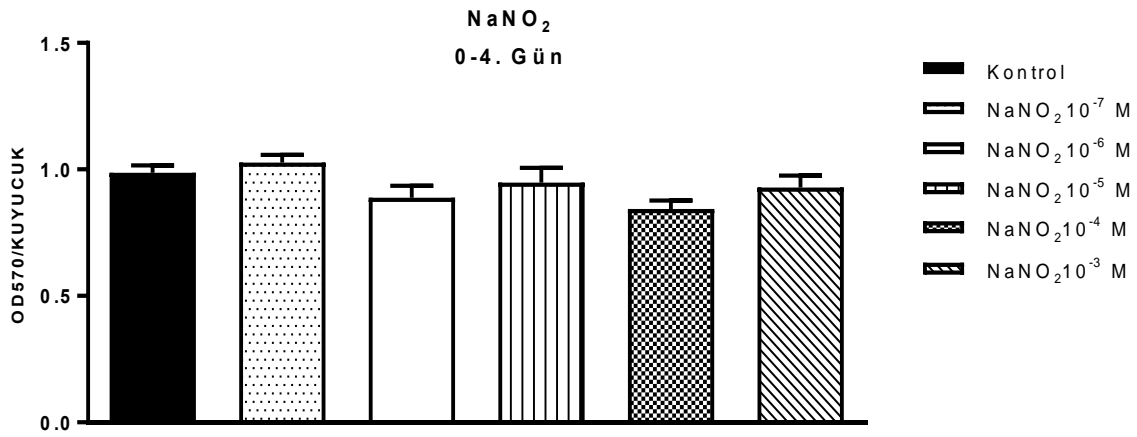
Hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon sürecinin 0-2. günlerinde NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M) uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 2. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. Sodyum nitrit, uygulanan hiçbir konsantrasyonda preadiposit proliferasyonunu etkilemedi (Şekil 4.1.2.1.).



**Şekil 4.1.2.1.** 0-2. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-2. günü arasında NaNO<sub>2</sub> 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından deney protokolünün 2. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.2.2. 0-4. Gün:

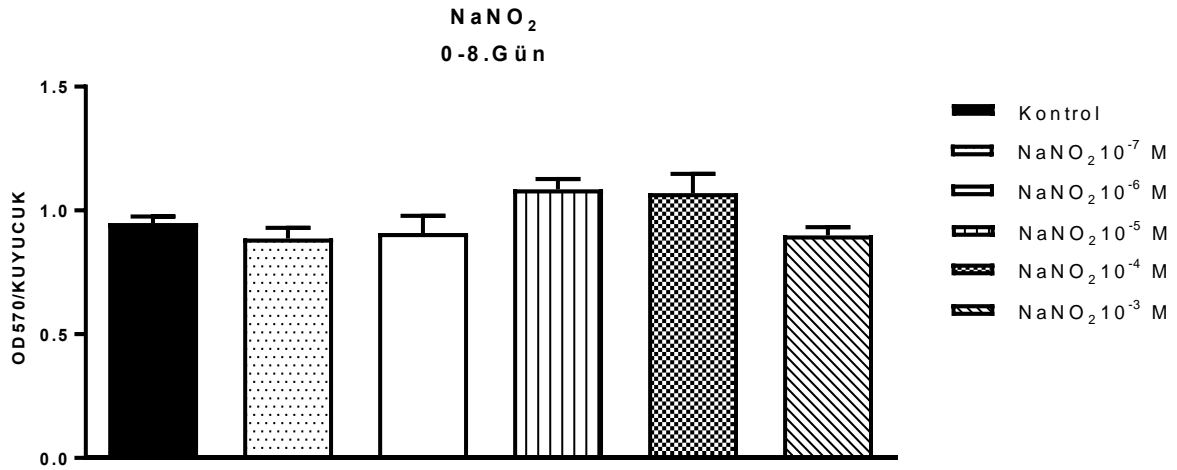
Hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü süresince NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M) uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 4. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. Test edilen hiçbir konsantrasyonda sodyum nitrit preadiposit proliferasyonunu etkilemedi (Şekil 4.1.2.2.).



**Şekil 4.1.2.2.** 0-4. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolünün 0-4. günleri boyunca hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından deney protokolünün 4. günü NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.2.3. 0-8. Gün:

Hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü süresince NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> M) uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 8. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. Test edilen hiçbir konsantrasyonda sodyum nitrit preadiposit proliferasyonunu etkilemedi (Şekil 4.1.2.3.).

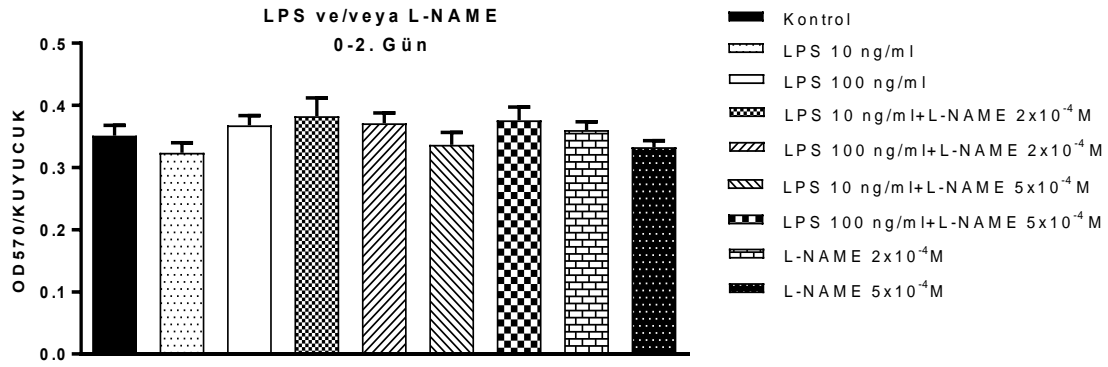


**Şekil 4.1.2.3.** 0-8. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-8. günü NaNO<sub>2</sub> 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından deney protokolünün 8. günü NaNO<sub>2</sub> uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.3. Lipopolisakkarid Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.1.3.1. 0-2. Gün:

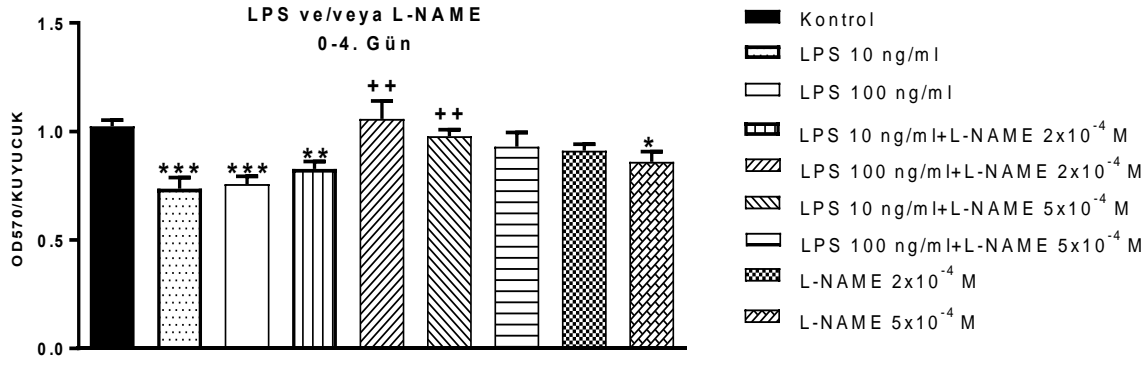
Lipopolisakkarid uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak hücre kültür ortamına diferensiyasyon sürecinin 0-2. günü lipopolisakkarid (10, 100 ng/ml) uygulaması yapıldı. LPS'nin etkisi L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. MTT proliferasyon analizi sonucunda LPS, preadiposit proliferasyonunu L-NAME varlığında ya da yokluğunda etkilemedi. Diğer taraftan tek başına L-NAME'in de proliferasyon üzerine anlamlı bir etkisi görülmedi. (Şekil 4.1.3.1).



**Şekil 4.1.3.1.** 0-2. gün L-NAME varlığında LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 deney protokolünün 0-2. günü preadiposit hücre kültüründe birer gruba tek başına LPS (10, 100 ng/ml) uygulandı. Birer gruba L-NAME 2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonda uygulandı ve bunu takiben hücrelere lipopolisakkarid 10, 100 ng/ml konsantrasyonda uygulandı (n=4). Birer gruba sadece L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) uygulandı. Ardından, bu uygulamaların adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 2. günü yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Uygulama proliferasyon üzerine herhangi bir etki göstermedi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.3.2. 0-4. Gün:

Lipopolisakkarid uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak hücre kültür ortamına diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü lipopolisakkarid (10, 100 ng/ml) uygulaması yapıldı. LPS'nin etkisi L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi Protokolün 4. günü deney sonlandırılarak MTT proliferasyon analizi yapıldı. LPS hem 10 ng/ml hem de 100 ng/ml konsantrasyonda proliferasyonu anlamlı olarak süprese etti. L-NAME'in ( $2 \times 10^{-4}$  M) düşük konsantrasyonda LPS (10 ng/ml) ile kombinasyonu proliferasyondaki süpresyonu ortadan kaldırmazken, kombine uygulama yapılan diğer gruplarda proliferasyonda LPS tarafından oluşturulan süpresyonu ortadan kaldırdı. Preadipositlerin tek başına L-NAME ( $5 \times 10^{-4}$  M) ile preinkübasyonu proliferasyonu süprese etti. Buna karşın,  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME proliferasyonda bir miktar azalmaya neden olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Şekil 4.1.3.2.).

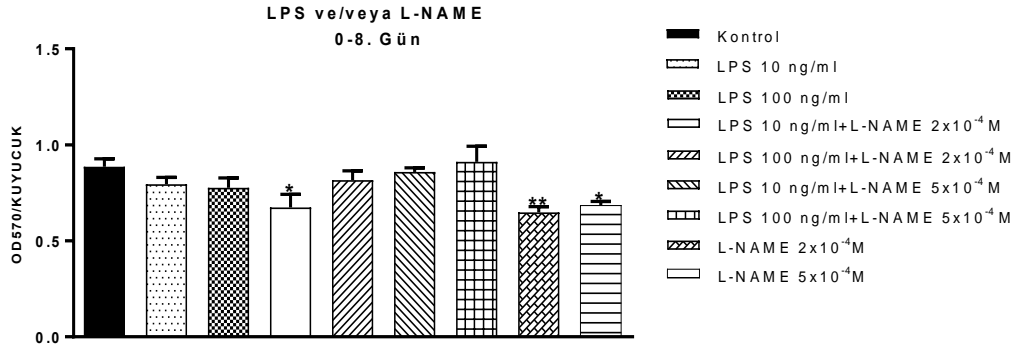


**Şekil 4.1.3.2.** 0-4. gün L-NAME varlığında LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. Deney protokolünün 0-4. günleri boyunca birer gruba tek başına LPS (10, 100 ng/ml) uygulandı. Birer gruba L-NAME 2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonda uygulandı ve bunun ardından hücrelere lipopolisakkarid 10, 100 ng/ml konsantrasyonda uygulandı (n=4). Birer gruba sadece L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) uygulandı. Ardından, bu uygulamanın adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 4. günü yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  (kontrolle karşı anlamlılık); ++:  $P < 0.01$ , (tek başına LPS uygulamasına göre anlamlılık).

#### 4.1.3.3. 0-8. Gün:

LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına lipopolisakkarid (10, 100 ng/ml) uygulaması yapıldı. LPS'nin etkisi L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Protokolün 8. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. LPS tek başına uygulandığında her iki konsantrasyonda da proliferasyon üzerine etki göstermezken düşük doz LPS (10 ng/ml) ile L-NAME'nin kombinasyonu proliferasyonu süprese etti. Buna karşılık yüksek doz LPS (100 ng/ml) ile L-NAME'in (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) kombine edilmesi preadiposit proliferasyonunu değiştirmedir. Bunun yanı sıra preadipositlerin tek başına L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M) ile preinkübasyonu, proliferasyonu süprese etti (Şekil 4.1.3.3).



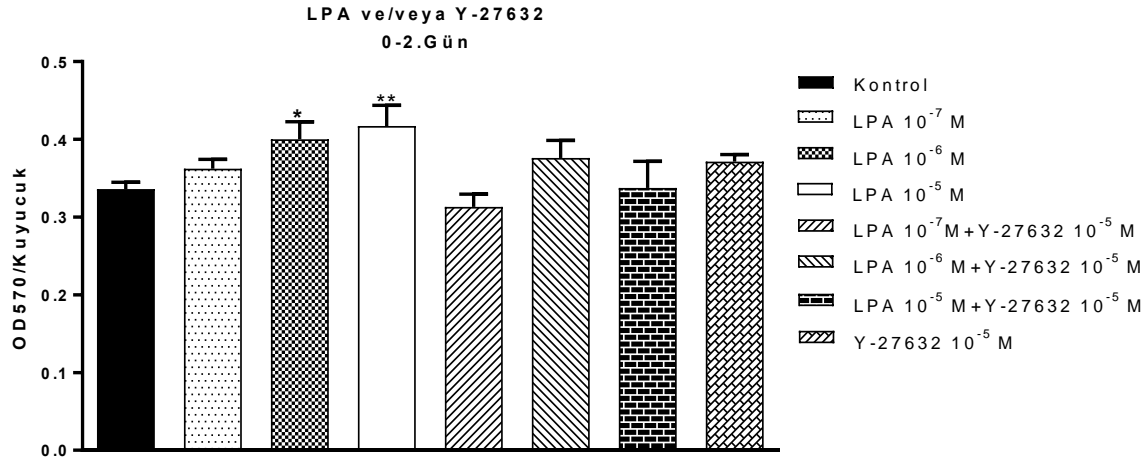


**Şekil 4.1.3.3.** 0-8. gün L-NAME varlığında LPS uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-8. günü birer gruba tek başına LPS (10, 100 ng/ml) uygulandı. Birer gruba L-NAME 2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonda uygulandı ve bunu takiben hücre kültür ortamına lipopolisakkarid 10, 100 ng/ml konsantrasyonda uygulandı (n=4). Birer gruba ise tek başına L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) uygulandı. Ardından, bu uygulamanın adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 8. günü yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

#### 4.1.4. Lizofosfatidik Asit Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.1.4.1. 0-2. Gün:

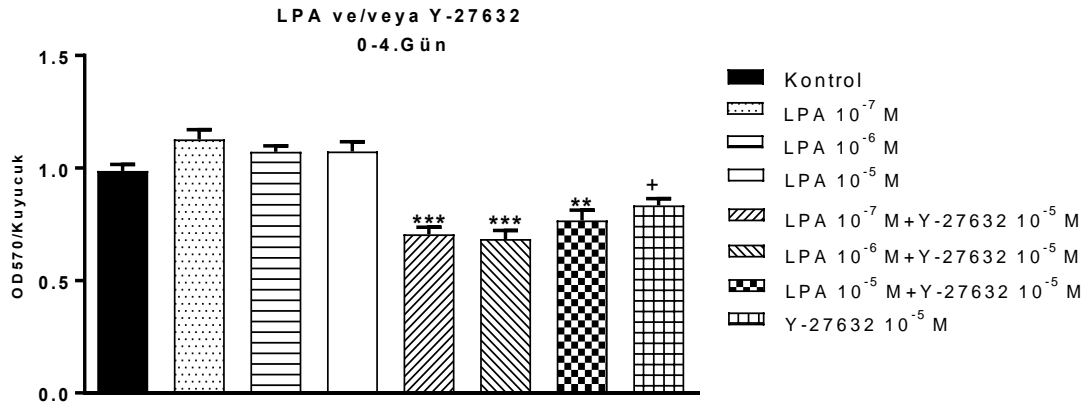
Lizofosfatidik asit uygulamasının ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-2. gününde hücre kültür ortamına lizofosfatidik asit uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 2. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. LPA, tek başına  $10^{-6}$  ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandığında proliferasyonu anlamlı olarak arttırdı. Bu anlamlılık Y-27632'nin LPA ile kombine edilmesi ile ortadan kalktı. Y-27632'nin tek başına uygulanması preadiposit proliferasyonunu etkilemedi. (Şekil 4.1.4.1.).



**Şekil 4.1.4.1.** 0-2. gün LPA ve Y-27632 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerin proliferasyonu üzerine etkisi. Deney protokolünün 0-2. günü birer gruba LPA tek başına  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı. Y-27632 ( $10^{-5}$  M) 3 ayrı deney grubuna uygulandı ve bunu takiben bu gruplardaki hücelere artan konsantrasyonlarda lizofosfatidik asit ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulaması yapıldı (n=4). Bir gruba da Y-27632 ( $10^{-5}$  M) tek başına uygulandı. Ardından, bu uygulamanın adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 2. günü yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

#### 4.1.4.2. 0-4. Gün:

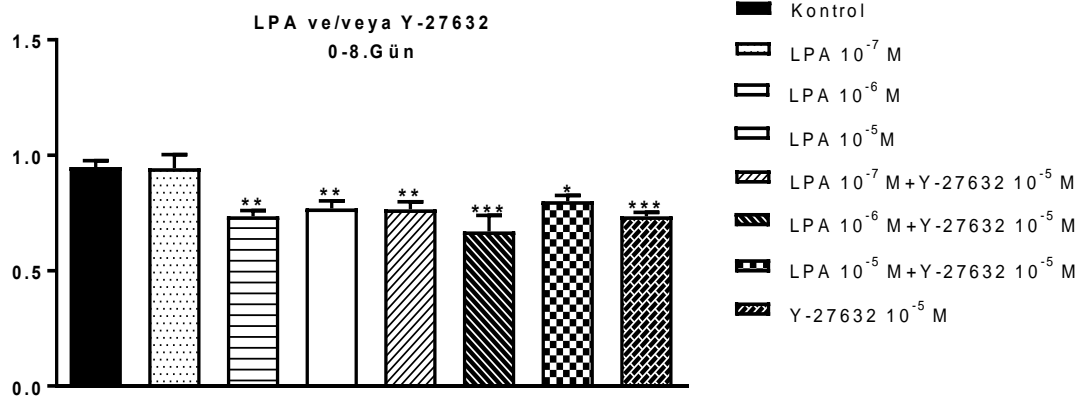
LPA uygulamasının ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-4. gününde hücre kültür ortamına LPA uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 4. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. LPA, uygulanan konsantrasyonlarda preadiposit proliferasyonunu arttırmakla birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Y-27632'nin tek başına uygulanması preadiposit proliferasyonunu suprese etti. Ayrıca, Y-27632'nin farklı dozlarda LPA ile kombine edilmesi de preadiposit proliferasyonunu anlamlı olarak baskıladı (Şekil 4.1.4.2.).



**Şekil 4.1.4.2.** 0-4. gün LPA ve Y-27632 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerin proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-4. günleri boyunca birer gruba tek başına LPA 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı. Birer gruba ise önce Y-27632 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı ve bunun ardından hücrelere lizofosfatidik asit 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba tek başına 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda Y-27632 uygulaması yapıldı. Ardından, bu uygulamaların adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 4. günü yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi. \*\*: *P*<0.01, \*\*\*: *P*<0.001 (LPA'nın tek başına uygulanmasına göre anlamlılık).

#### 4.1.4.3. 0-8. Gün:

Lizofosfatidik asit uygulamasının (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. gününde hücre kültür ortamına lizofosfatidik asit uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. Hem LPA ve hem de Y-27632 tek başına uygulandığında preadiposit proliferasyonunu süprese etti. Ancak, Y-27632'nin farklı dozlarda LPA ile kombine edilmesi, preadiposit proliferasyonu üzerine LPA tarafından oluşturulan etkide anlamlı bir değişikliğe yol açmadı (Şekil 4.1.4.3.).

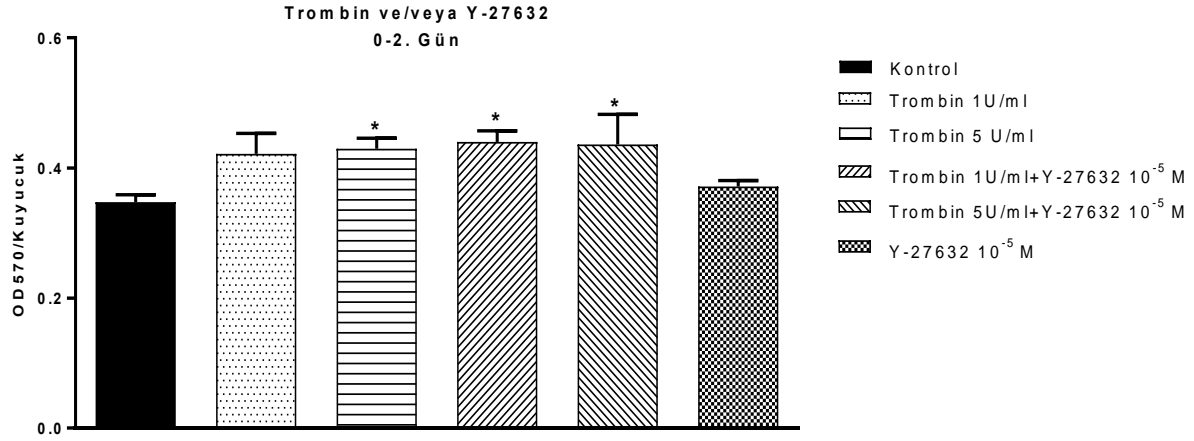


**Şekil 4.1.4.3.** 0-8. gün Y-27632 ve LPA uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerin proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-8. günü birer gruba LPA tek başına  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı. Birer gruba ise önce Y-27632  $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı ve bunu takiben hücrelere lizofosfatidik asit  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba sadece  $10^{-5}$  M konsantrasyonda Y-27632 uygulaması yapıldı. Ardından, bu uygulamaların adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 8. günü MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  (kontrolle karşı anlamlılık).

#### 4.1.5. Trombin Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.1.5.1. 0-2. Gün:

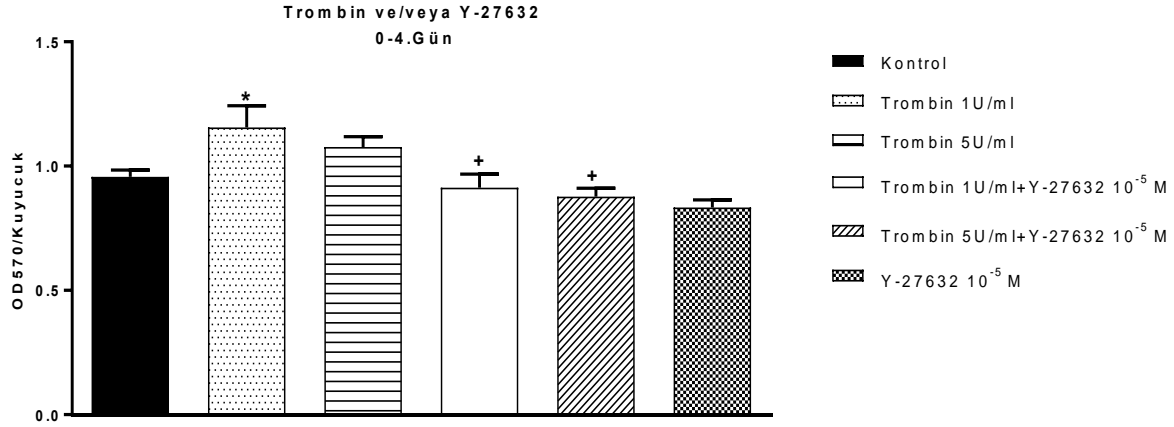
Trombin uygulamasının (1-5 U/ml) adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-2. gününde hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 2. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. Trombin tek başına uygulandığında 1U/ml konsantrasyonda proliferasyonu arttırmakla beraber, bu artış anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte tek başına 5U/ml konsantrasyonda uygulandığında preadiposit proliferasyonu arttı ve 1, 5 U/ml konsantrasyonda trombin Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ile kombine edildiğinde proliferasyondaki artış değişmedi. Y-27632 ( $10^{-5}$  M) tek başına uygulandığında proliferasyon üzerine etki göstermedi (Şekil 4.1.5.1.).



**Şekil 4.1.5.1.** 0-2. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolünün 0-2. günü trombin bir gruba tek başına 1U/ml başka bir gruba 5 U/ml konsantrasyonda uygulandı. Birer grupta Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapıldı ve ardından kuyucuklara trombin 1-5 U/ml konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba da sadece Y-27632 ( $10^{-5}$  M) uygulaması yapıldı. Ardından, bu uygulamaların adiposit proliferasyonu üzerine etkisi deney protokolünün 2. günü yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.5.2. 0-4. Gün:

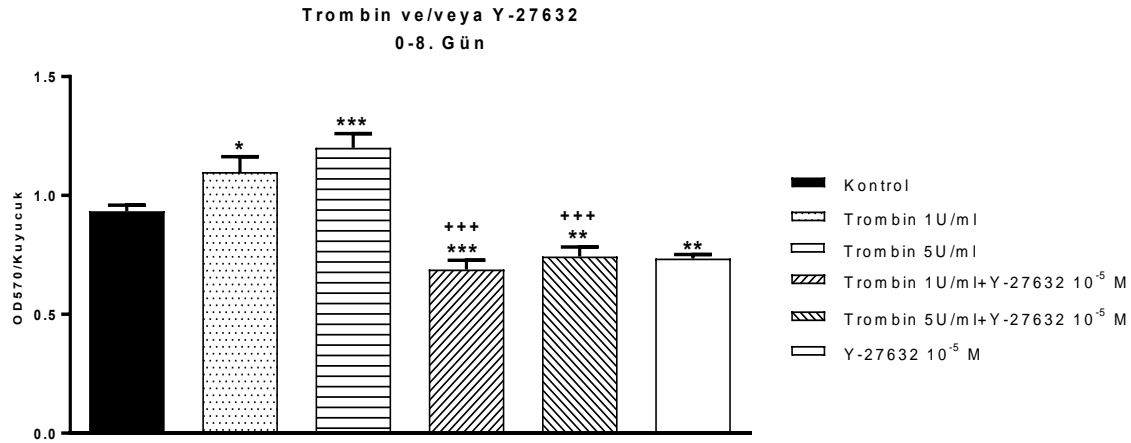
Trombin uygulamasının (1-5 U/ml) preadiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü boyunca hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 4. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. Trombin, 1U/ml konsantrasyonda uygulandığında proliferasyonu anlamlı olarak arttırdı. 5U/ml konsantrasyonda ise proliferasyonda artış olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ile preinkübasyon yapılması proliferasyondaki artışı tersine çevirdi (Şekil 4.1.5.2.).



**Şekil 4.1.5.2.** 0-4. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolünün 0-4. günü birer gruba tek başına trombin (1-5 U/ml) uygulandı. Birer grupta Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapıldı ve ardından kuyucuklara trombin 1-5 U/ml konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba tek başına Y-27632 ( $10^{-5}$  M) uygulaması yapıldı. Ardından, bu uygulamanın adiposit proliferasyonu üzerine etkisi 4. gün yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$  (kontrole karşı anlamlılık), +:  $P < 0.05$  (Tek başına trombin uygulanan gruba göre anlamlılık).

#### 4.1.5.3. 0-8. Gün:

Trombin uygulamasının (1-5 U/ml) adiposit proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirmek amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak proliferasyon değerlendirildi. 1 ve 5 U/ml konsantrasyonda trombin preadiposit proliferasyonunu stimüle etti. Buna karşılık bu artış Y-27632 varlığında tersine döndü (Şekil 4.1.5.3.).

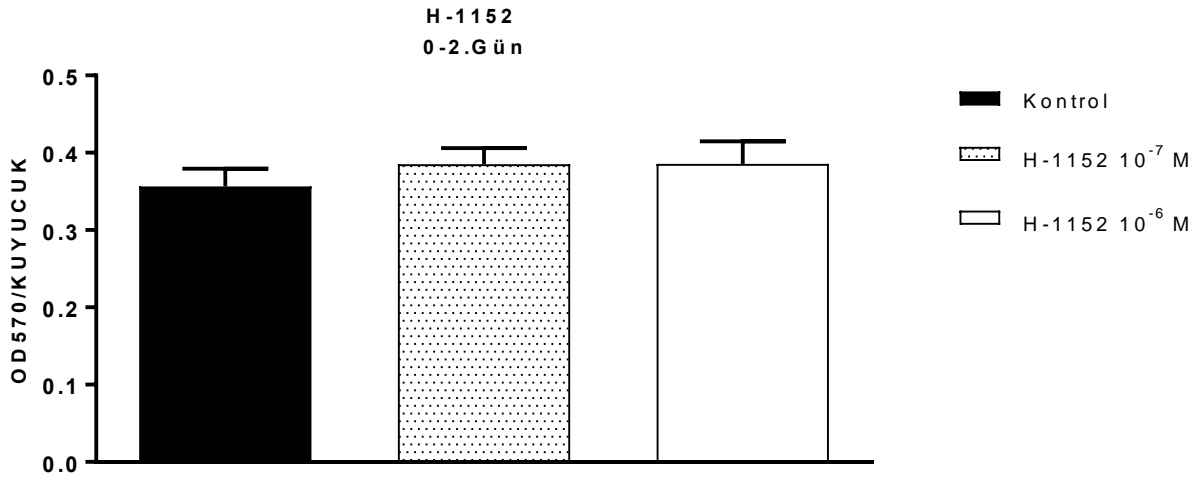


**Şekil 4.1.5.3.** 0-8. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolünün 0-8. günü trombin bir gruba tek başına 1U/ml başka bir gruba 5 U/ml konsantrasyonda uygulandı. Birer grupta Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapıldı ve ardından kuyucuklara trombin 1-5 U/ml konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba da sadece Y-27632 ( $10^{-5}$  M) uygulaması yapıldı. Ardından, bu uygulamanın adiposit proliferasyonu üzerine etkisi 8. gün yapılan MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  (kontrolle göre anlamlılık); +:  $P < 0.001$  (tek başına trombin uygulamasına göre anlamlılık).

#### 4.1.6. H-1152 Uygulamasının Adiposit Proliferasyonu Üzerine Etkisi

##### 4.1.6.1. 0-2. Gün:

Hücre kültür ortamına H-1152 ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon sürecinin 0-2. günü arasında H-1152 uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 2. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. Test edilen hiçbir konsantrasyonda H-1152 preadiposit proliferasyonunu etkilemedi (Şekil 4.1.6.1.).

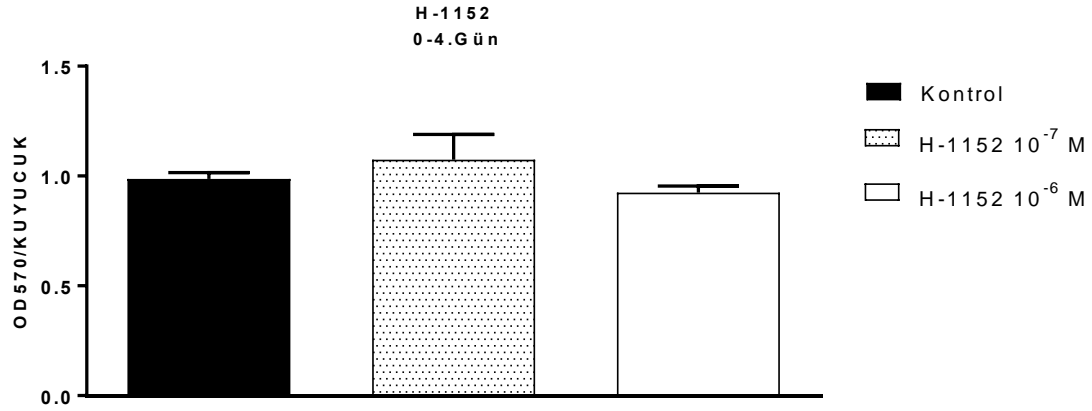


**Şekil 4.1.6.1.** 0-2. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 2. günü H-1152 10<sup>-7</sup>-10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Ardından H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.6.2. 0-4.Gün:

Hücre kültür ortamına H-1152 (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M) uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile ilk olarak diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü süresince H-1152 uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 4. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. Test edilen hiçbir konsantrasyonda H-1152 preadiposit proliferasyonunu etkilemedi (Şekil 4.1.6.2).

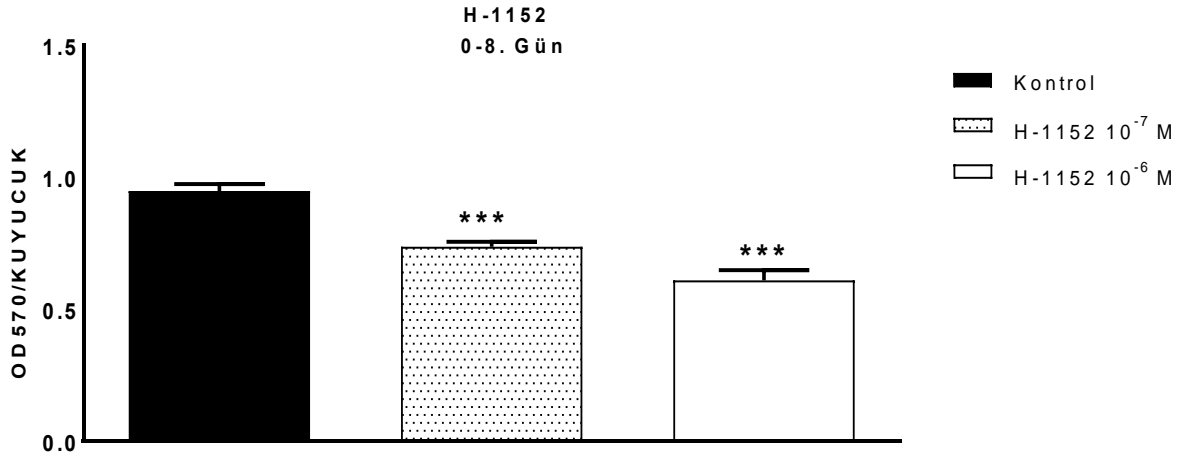




**Şekil 4.1.6.2.** 0-4. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. H-1152 ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-4. günü hücre kültür ortamına uygulandı (n=4). Ardından 4. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi MTT proliferasyon analizi yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.1.6.3. 0-8. Gün:

Hücre kültür ortamına H-1152 ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü süresince H-1152 uygulaması yapılan hücrelere deney protokolünün 8. günü MTT proliferasyon analizi yapılarak proliferasyon değerlendirildi. Test edilen her iki konsantrasyonda H-1152 preadiposit proliferasyonunu anlamlı olarak süprese etti (Şekil 4.1.6.3).



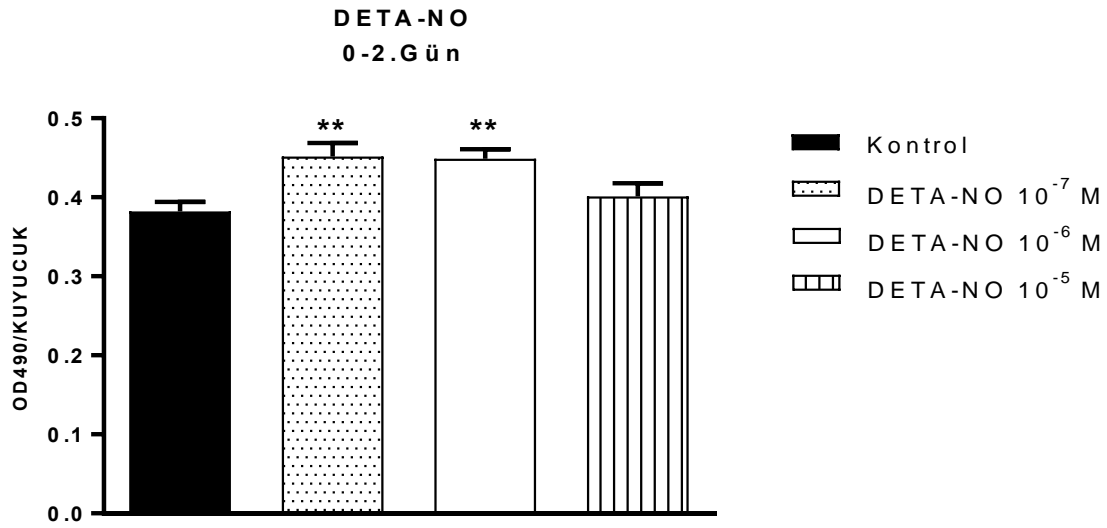
**Şekil 4.1.6.3.** 0-8. gün H-1152 uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-8. günü H-1152(10<sup>-7</sup>-10<sup>-6</sup> M) uygulandı (n=4). Ardından adiposit proliferasyonu. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*\*\*:  $P < 0,001$

## 4.2. Diferensiyasyon Bulguları

### 4.2.1. DETA-NO Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi

#### 4.2.1.1. 0-2. Gün:

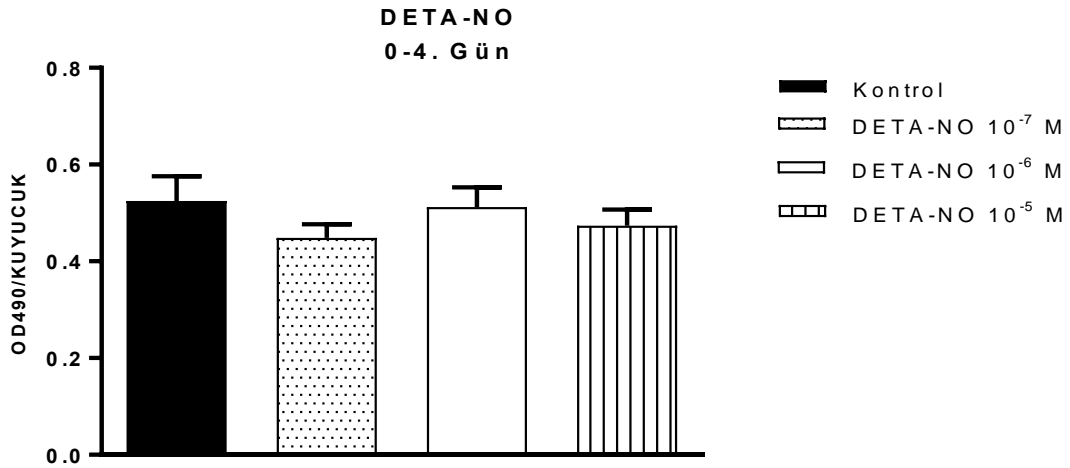
Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında hücre kültür ortamına DETA-NO (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla 0-2. günler arasında DETA-NO uygulaması yapılan deney serilerinde diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı. DETA-NO, hücre kültür ortamına 10<sup>-5</sup> M değil ama 10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda uygulandığında preadiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak arttırdı (Şekil 4.2.1.1).



**Şekil 4.2.1.1.** 0-2 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, DETA-NO deney protokolü boyunca 0-2. günler arasında kuyucuklara 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=11). Bunun ardından DETA-NO'nun adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *P* <0.05 anlamlı kabul edildi. \*\* *P* <0.01.

#### 4.2.1.2. 0-4. Gün:

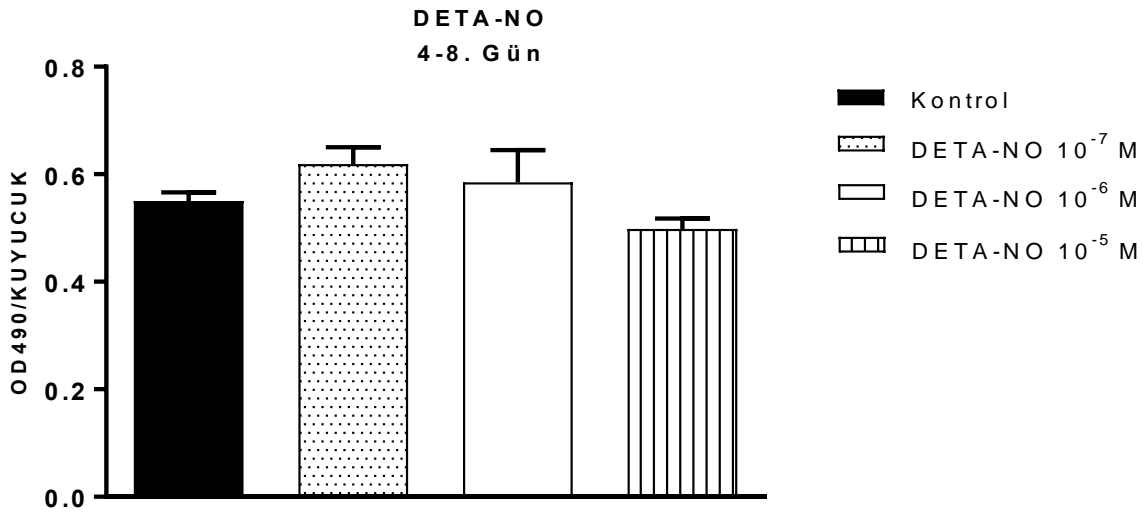
Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri arasında hücre kültür ortamına DETA-NO (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla 0-4. günler arasında DETA-NO uygulaması yapılan deney serilerinde diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. DETA-NO, uygulanan konsantrasyonlarda preadiposit diferensiyasyonu üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.2.1.2).



**Şekil 4.2.1.2** 0-4 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara DETA-NO deney protokolü boyunca 0-4. günler arasında 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Takiben DETA-NO'nun adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.1.3. 4-8. Gün:

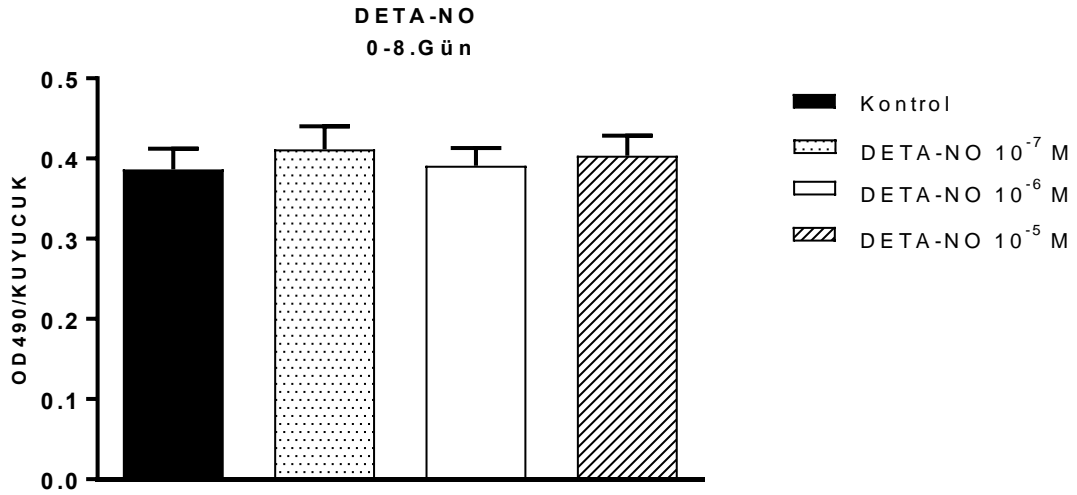
Diferensiyasyon protokolünün 4-8. günleri arasında hücre kültür ortamına DETA-NO (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla 4-8. günler arasında DETA-NO uygulaması yapılan deney serilerinde diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. DETA-NO, uygulanan konsantrasyonlarda preadiposit diferensiyasyonu üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.2.1.3).



**Şekil 4.2.1.3.** 4-8 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. DETA-NO 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe kuyucuklara deney protokolü boyunca 4-8. günler arasında  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Takiben DETA-NO'nun adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.1.4. 0-8. Gün:

Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında hücre kültür ortamına DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla diferensiyasyon sürecinin 0-8. günleri arasında DETA-NO uygulaması yapılan deney serilerinde diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. DETA-NO, uygulanan konsantrasyonlarda preadiposit diferensiyasyonu üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.2.1.4).

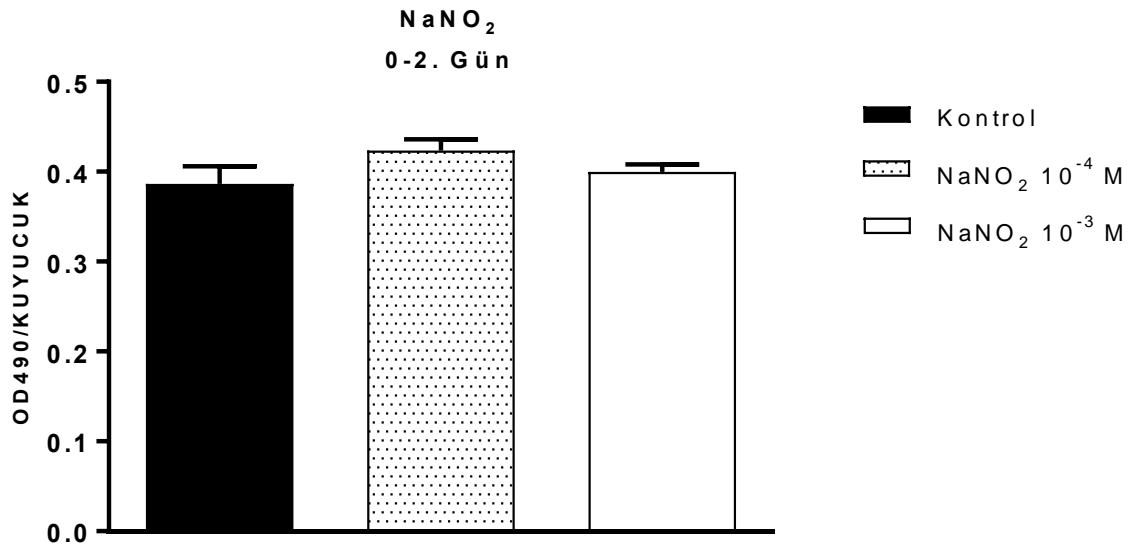


**Şekil 4.2.1.4.** 0-8 gün DETA-NO uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, DETA-NO deney protokolü boyunca 0-8. günler arasında kuyucuklara 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Bunun ardından DETA-NO'nun adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyaması yapılarak değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi

#### 4.2.2. NaNO<sub>2</sub> Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi

##### 4.2.2.1. 0-2. Gün:

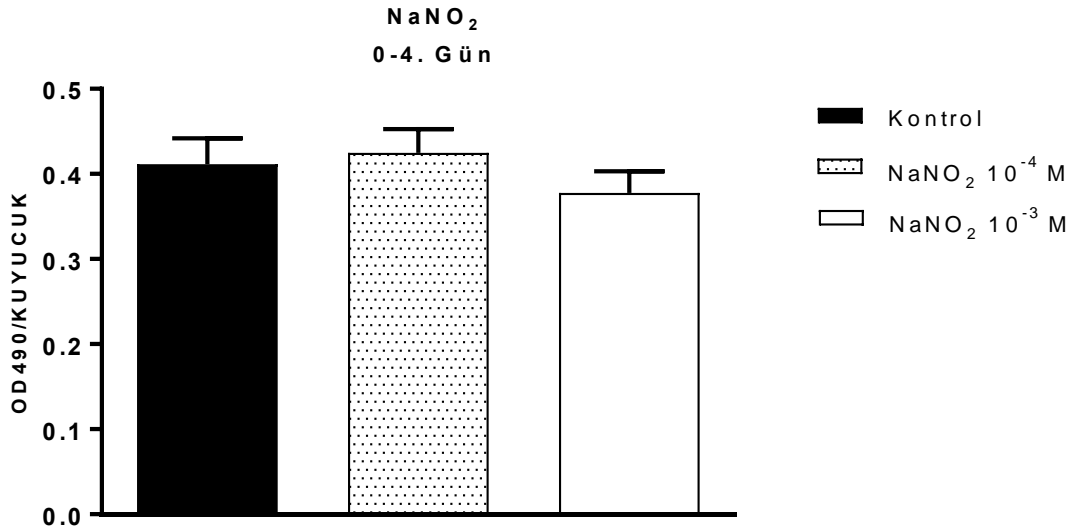
Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> (sodyum nitrit) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda NaNO<sub>2</sub> diferensiyasyon üzerine anlamlı etki göstermedi (Şekil 4.2.2.1).



**Şekil 4.2.2.1.** 0-2. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara NaNO<sub>2</sub> deney protokolü boyunca 0-2. günler arasında 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Takiben NaNO<sub>2</sub>'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.2.2. 0-4. Gün:

Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri arasında hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> (sodyum nitrit) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri arasında NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. NaNO<sub>2</sub>, uygulanan konsantrasyonlarda diferensiyasyon üzerine anlamlı etki göstermedi (Şekil 4.2.2.2.).

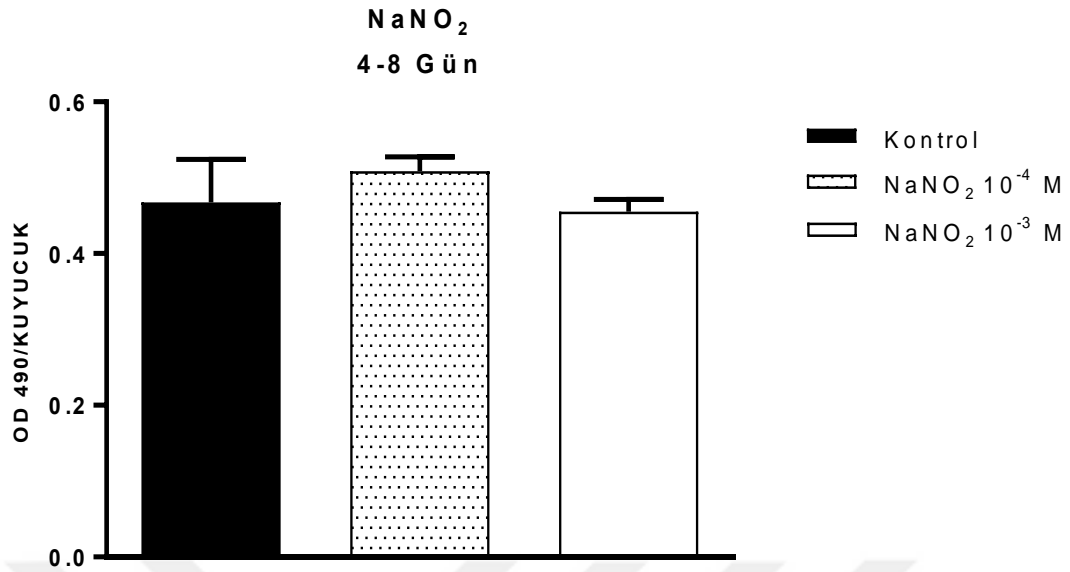


**Şekil 4.2.2.2.** 0-4. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. NaNO<sub>2</sub>, 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolü boyunca 0-4. günler arasında 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Ardından NaNO<sub>2</sub>'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.2.3. 4-8. Gün:

4-8. gün arasında hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> (sodyum nitrit) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 4-8. günleri arasında NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda NaNO<sub>2</sub> diferensiyasyon üzerine anlamlı etki göstermedi (Şekil 4.2.2.3).

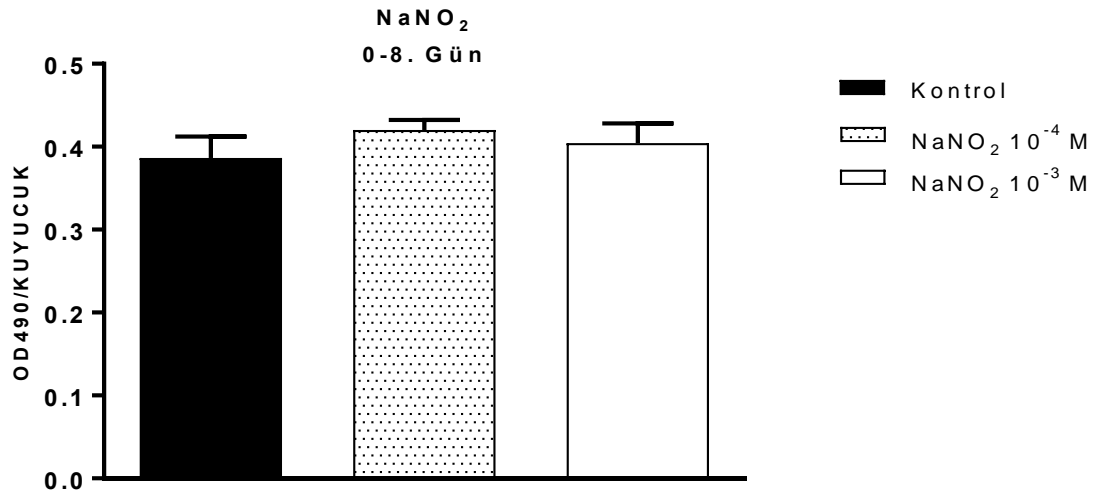




**Şekil 4.2.2.3.** 4-8. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara NaNO<sub>2</sub> deney protokolü boyunca 4-8. günler arasında 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Takiben NaNO<sub>2</sub>'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.2.4. 0-8. Gün:

Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında hücre kültür ortamına NaNO<sub>2</sub> (sodyum nitrit) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda NaNO<sub>2</sub> diferensiyasyon üzerine anlamlı etki göstermedi (Şekil 4.2.2.4).

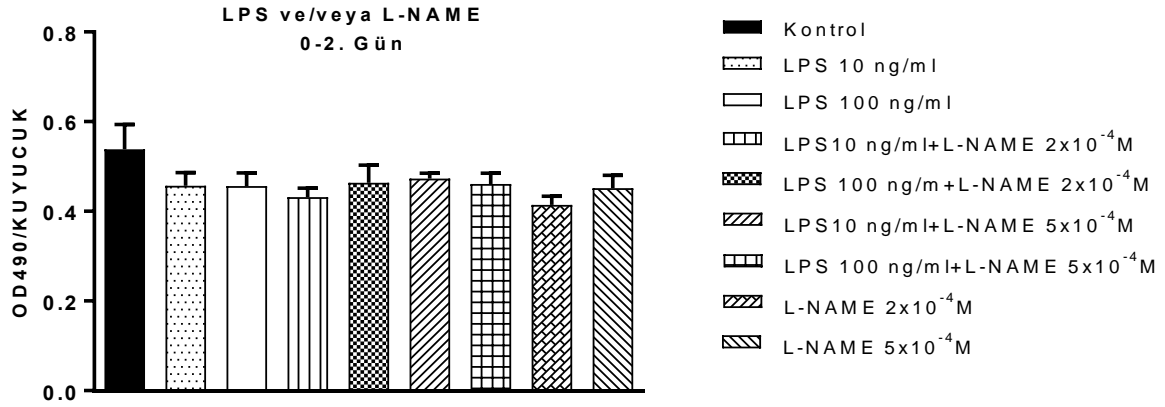


**Şekil 4.2.2.4.** 0-8. gün NaNO<sub>2</sub> uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. NaNO<sub>2</sub> deney protokolü boyunca kuyucuklara 0-8. günler arasında 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=8). Ardından NaNO<sub>2</sub>'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi.

### 4.2.3. Lipopolisakkarid Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

#### 4.2.3.1. 0-2. Gün:

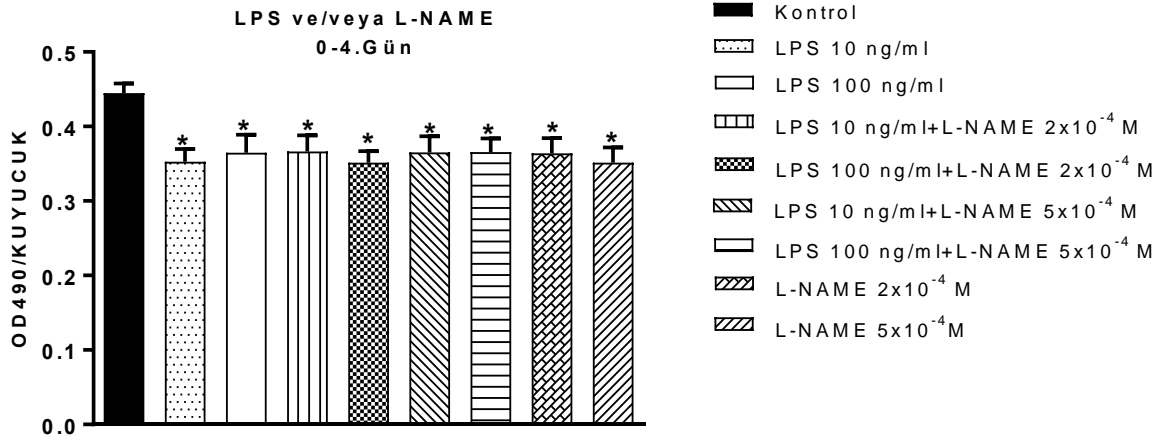
Lipopolisakkarid uygulamasının (LPS, 10, 100 ng/ml, n=4) preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-2. gününde hücre kültür ortamına LPS uygulaması yapıldı. LPS'in etkisi L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. LPS uygulanan konsantrasyonlarda diferensiyasyon üzerine etki göstermedi. L-NAME ne tek başına ne de kombine uygulamada etki göstermedi (Şekil 4.2.3.1).



**Şekil 4.2.3.1** 0-2. Gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-2'nci günleri arasında birer gruba 10, 100 ng/ml LPS uygulandı. Birer gruba L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) ön uygulaması yapıldı ve ardından LPS (10, 100 ng/ml, n=4) uygulandı. Birer gruba ise 2 ve 5x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonda L-NAME uygulandı. Ardından 8'inci gün Oil Red-O boyama yöntemi ile LPS'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.3.2. 0-4. Gün:

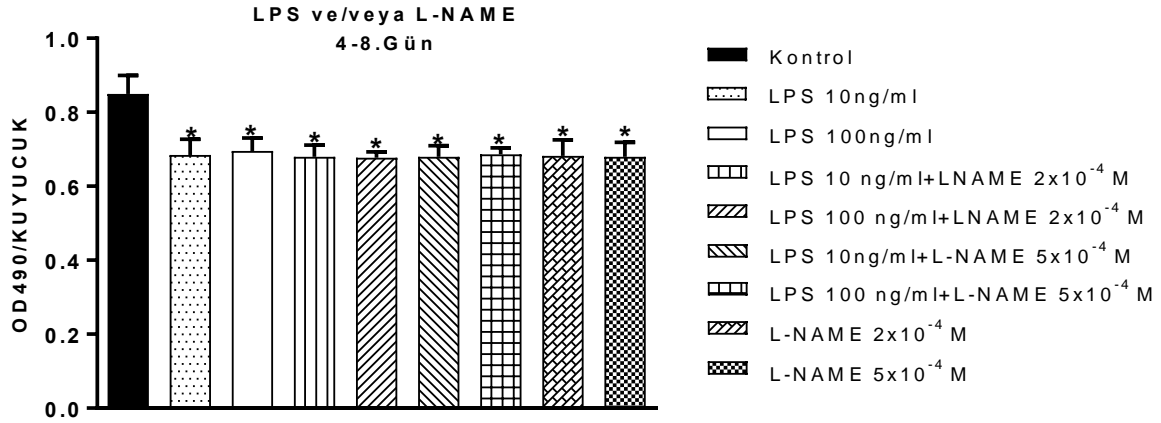
Lipopolisakkarid uygulamasının (LPS, 10, 100 ng/ml, n=4) preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü süresince hücre kültür ortamına LPS uygulaması yapıldı. LPS'in etkisi L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Diferensiyasyon sürecinin 0-4'üncü günleri arasında hücre kültür ortamına LPS uygulanması adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı, L-NAME ön uygulaması bu etkiyi değiştirmede (Şekil 4.2.3.2.).



**Şekil 4.2.3.2.** 0-4. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. LPS birer grupta 3T3-L1 hücrelerine deney protokolünün 0-4'üncü günleri arasında 10, 100 ng/ml uygulandı. Birer gruba L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) ön uygulaması yapıldı ve ardından LPS (10, 100 ng/ml, n=4) uygulandı. Birer gruba ise 2 ve 5x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonda L-NAME uygulandı. Ardından bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı. \*: P<0.05

#### 4.2.3.3. 4-8. Gün:

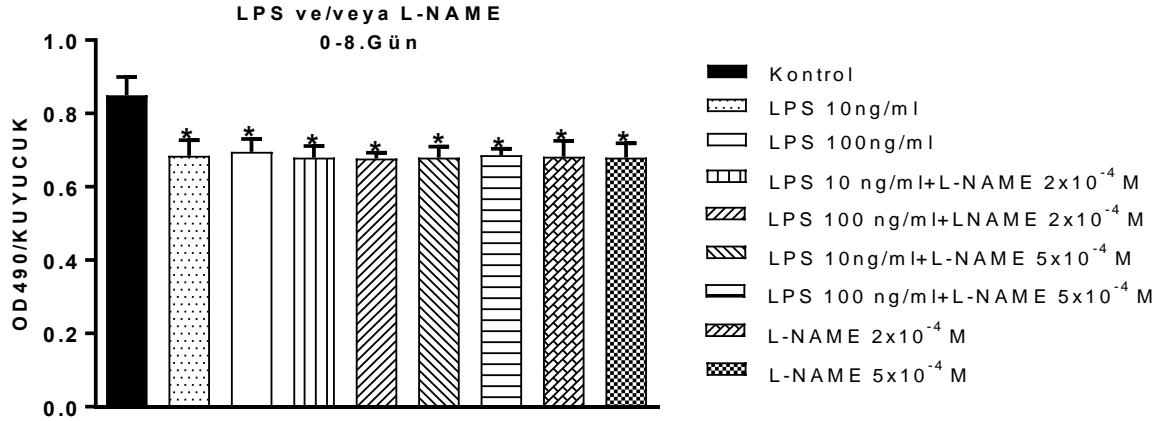
LPS uygulamasının (10, 100 ng/ml, n=4) preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 4-8. günü süresince hücre kültür ortamına LPS uygulaması yapıldı. LPS'in etkisi L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Diferensiyasyon sürecinin 4-8'inci günleri arasında hücre kültür ortamına LPS uygulanması adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı, L-NAME ön uygulaması bu etkiyi değiştirmede (Şekil 4.2.3.3.).



**Şekil 4.2.3.3.** 4-8. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolü boyunca 4-8'inci günler arasında birer gruba 10, 100 ng/ml LPS uygulandı. Birer gruba L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) ön uygulaması yapıldı ve ardından LPS (10, 100 ng/ml, n=4) uygulandı. Birer gruba ise 2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonda L-NAME uygulandı. Ardından bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı. \*:  $P < 0.05$ .

#### 4.2.3.4. 0-8. Gün:

LPS uygulamasının (10, 100 ng/ml) preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına LPS uygulaması yapıldı. LPS'in etkisi L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Diferensiyasyon sürecinin 0-8'inci günleri arasında LPS uygulaması adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı, L-NAME ön uygulaması bu etkiyi değiştirmede (Şekil 4.2.3.4.).



**Şekil 4.2.3.4.** 0-8. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda lipopolisakkarid uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi. Deney protokolü boyunca 0-8'inci günler arasında birer gruba tek başına 10, 100 ng/ml LPS uygulandı. Birer gruba L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M) ön uygulaması yapıldı ve ardından LPS (10, 100 ng/ml, n=4) uygulandı. Birer gruba ise 2 ve 5x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonda L-NAME uygulandı. Ardından bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi. \*: *P*<0.05

#### 4.2.4. Lizofosfatidik Asit Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.2.4.1. 0-2. Gün:

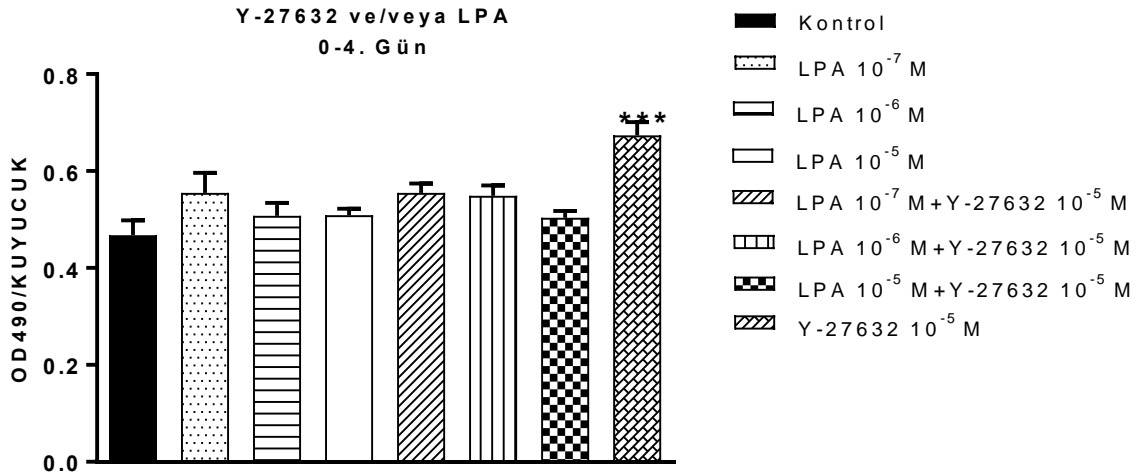
Lizofosfatidik asit (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-2. günü boyunca hücre kültür ortamına LPA uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. LPA, uygulandığı tüm konsantrasyonlarda diferensiyasyonu anlamlı düzeyde azalttı. Y-27632 tek başına uygulandığında diferensiyasyonu arttırmakla birlikte, bu artış anlamlı kabul edilmedi. LPA'nın Y-27632 ile kombine uygulanması LPA'nın etkisini değiştirmede (Şekil 4.2.4.1).



**Şekil 4.2.4.1** 0-2. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara deney protokolünün 0-2. günü birer gruba yalnız başına  $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M konsantrasyonda LPA uygulandı. Birer gruba Y-27632  $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı ve bunu takiben hücrelere LPA  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba ise tek başına  $10^{-5}$  M konsantrasyonda Y-27632 uygulaması yapıldı. Ardından 8'inci gün Oil Red-O boyama yöntemi ile LPA'nın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.001$  (kontrolle karşı anlamlılık).

#### 4.2.4.2. 0-4. Gün:

Lizofosfatidik asit ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü boyunca hücre kültür ortamına LPA uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Y-27632 tek başına uygulandığında diferensiyasyonu belirgin olarak arttırdı. LPA uygulaması bu artışı ortadan kaldırdı (Şekil 4.2.4.2.).

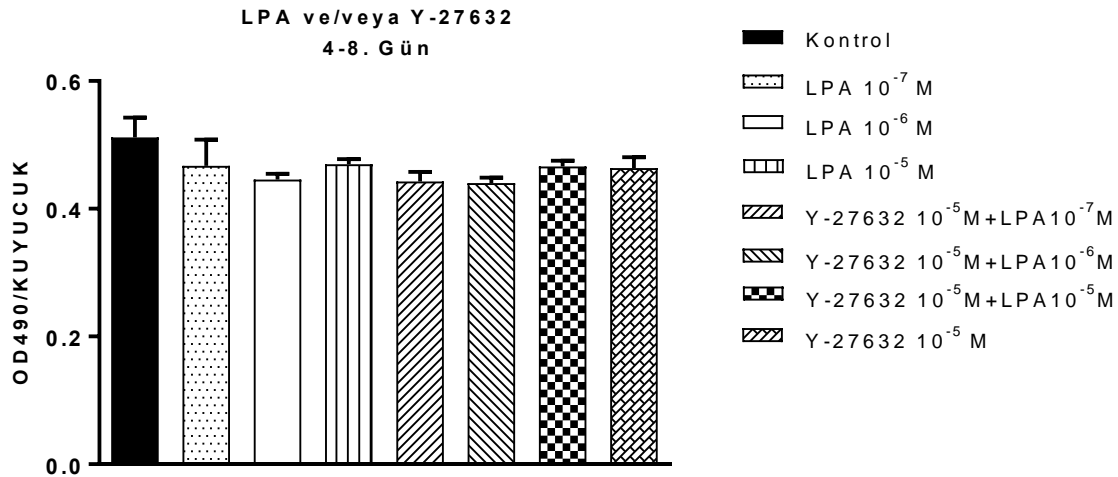


**Şekil 4.2.4.2.** 0-4. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. LPA, 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-4'üncü günü birer gruba yalnız başına  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı. Birer gruba Y-27632  $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı ve bunu takiben hücelere LPA  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba ise  $10^{-5}$  M konsantrasyonda Y-27632 uygulaması yapıldı. Ardından 8'inci gün Oil Red-O boyama yöntemi ile LPA'nın Y-27632 varlığında ya da yokluğunda adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni ve Dunnet testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. +:  $P < 0.05$  (Y-27632'ye göre anlamlılık), +:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  (kontrolle göre anlamlılık).

#### 4.2.4.3. 4-8. Gün:

Lizofosfatidik asit ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 4-8. günü boyunca hücre kültür ortamına LPA uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması ile adiposit diferensiyasyonu analiz edildi. Y-27632 uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi olmadı. LPA hem tek başına uygulandığında hem de Y-27632 ön uygulaması yapılmış hücelere uygulandığında herhangi bir etki gözlenmedi (Şekil 4.2.4.3.).

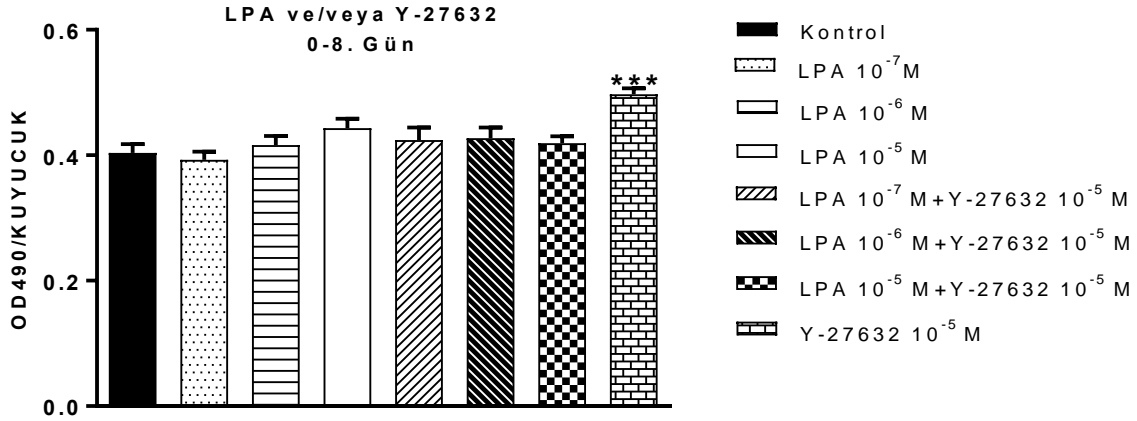




**Şekil 4.2.4.3** 4-8. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 4-8'inci günleri arasında birer gruba tek başına 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda LPA uygulandı. Birer gruba 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda Y-27632 ön uygulaması yapıldı ve bunu takiben hücrelere LPA 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir gruba ise tek başına 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda Y-27632 uygulaması yapıldı. Ardından 8'inci gün Oil Red-O boyama yöntemi ile LPA'nın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.4.4. 0-8. Gün:

Lizofosfatidik asit (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına LPA uygulaması yapıldı. LPA'nın etkisi Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Ardından diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. LPA test edilen bütün konsantrasyonlarda diferensiyasyonu arttırıcı yönde etki oluşturuyor olmasına rağmen bu artışlar istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı. Buna karşılık Y-27632 tek başına uygulandığında diferensiyasyonu belirgin olarak arttırdı. LPA ile Y-27632'nin kombinasyonu diferensiyasyonda anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.2.4.4.).

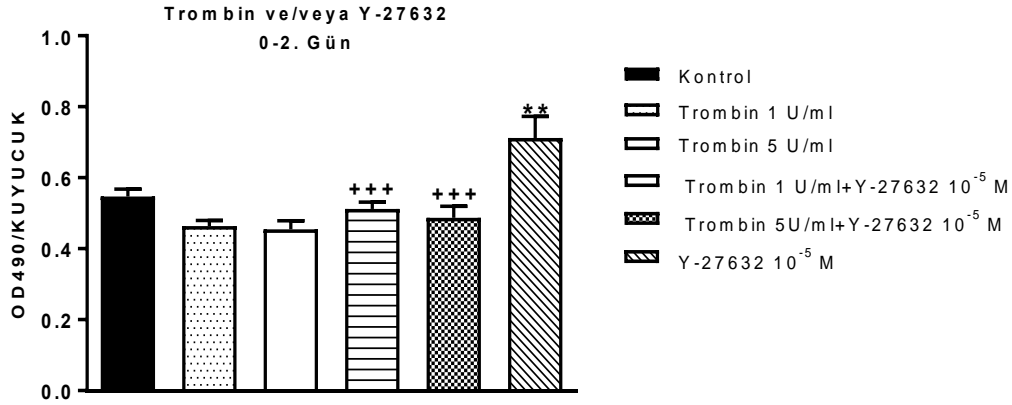


**Şekil 4.2.4.4.** 0-8. gün Y-27632 varlığında ya da yokluğunda LPA uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-8. günü birer gruba yalnız başına LPA 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı. Birer gruba ise Y-27632 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı ve ardından hücrelere LPA 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bir diğer gruba 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda Y-27632 uygulaması yapıldı. Ardından 8'inci gün Oil Red-O boyama yöntemi ile LPA'nın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*\*\*:  $P < 0.001$  (kontrole göre anlamlılık).

#### 4.2.5. Trombin Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi ve bu Etkinin Y-27632 Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.2.5.1. 0-2 Gün:

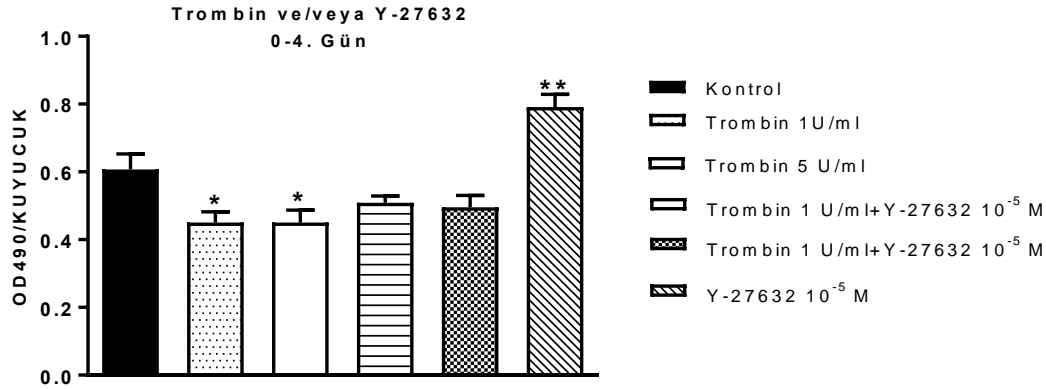
Trombin (1 ve 5 U/ml) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-2. günü boyunca hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) varlığında ya da yokluğunda test edildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması ile adiposit diferensiyasyonu değerlendirildi. Trombin tek başına uygulandığında etki oluşmazken, Y-27632 uygulaması adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak arttırdı. Trombin uygulaması Y-27632'nin etkisini ortadan kaldırdı (Şekil 4.2.5.1).



**Şekil 4.2.5.1.** 0-2. gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolü boyunca 0-2'nci günler arasında birer gruba trombin (1, 5 U/ml, n=4) uygulandı. Birer grupta ise Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapılmış 3T3-L1 hücrelerine trombin (1, 5 U/ml, n=4) uygulandı. Bir başka gruba da Y-27632 ( $10^{-5}$  M) konsantrasyonda uygulandı. Ardından trombin uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnet ya da Bonferroni *post hoc* testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*\*:  $P < 0.01$  (Kontrolle karşı anlamlılık), +++:  $P < 0.001$  (Y-27632 uygulanan hücreler ile Y-27632 ön uygulamasının ardından trombin uygulaması yapılmış hücreler arasında istatistiksel analiz sonucunda bulunan anlamlılık).

#### 4.2.5.2. 0-4. Gün:

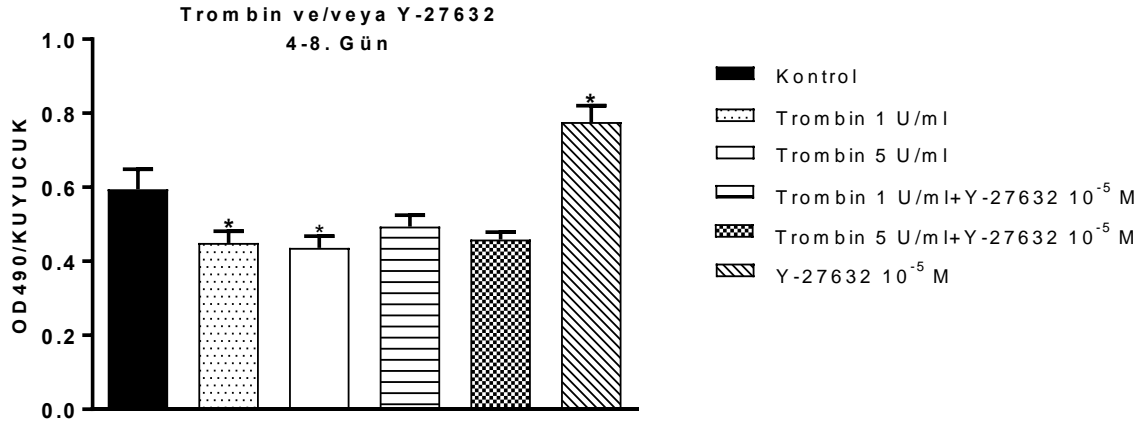
Trombin (1 ve 5 U/ml) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-4. günü boyunca hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda test edildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması ile adiposit diferensiyasyonu değerlendirildi. Trombin tek başına uygulandığında adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı. Y-27632'nin tek başına uygulanması adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak arttırdı. Trombin ile Y-27632 kombinasyonu, tek başına Y-27632 ile arttırılan diferensiyasyonu baskıladı (Şekil 4.2.5.2.).



**Şekil 4.2.5.2.** 0-4. gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. Trombin (1-5 U/ml, n=4) 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolü boyunca 0-4'üncü günler arasında birer gruba tek başına uygulandı. Birer gruba ise Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapıldı ve ardından trombin (1, 5 U/ml, n=4) uygulandı. Bir gruba da Y-27632 ( $10^{-5}$  M) konsantrasyonda uygulandı. Ardından Y-27632 varlığında ya da yokluğunda trombin uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnet ya da Bonferroni *post hoc* testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (kontrolle karşı anlamlılık), +:  $P < 0.001$  (Y-27632 uygulanan hücreler ile Y-27632 ön uygulamasının ardından trombin uygulaması yapılmış hücreler arasında istatistiksel analiz sonucunda bulunan anlamlılık).

#### 4.2.5.3. 4-8. Gün:

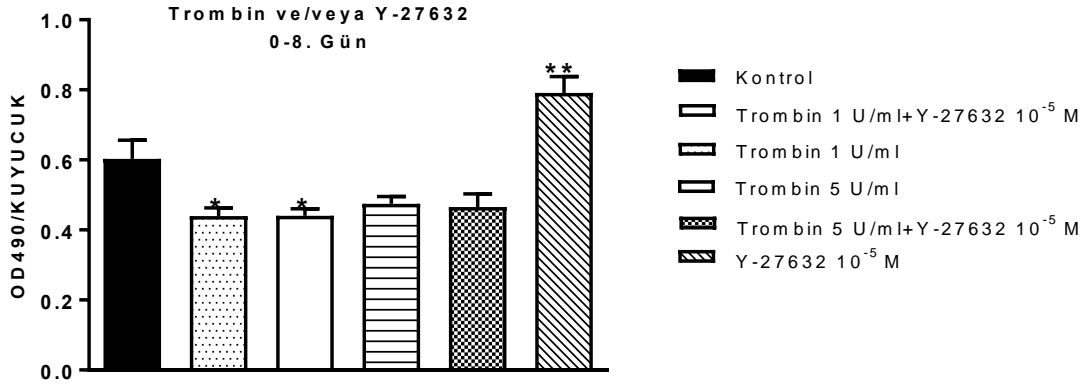
Trombin (1 ve 5 U/ml) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 4-8. günü boyunca hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda test edildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması ile adiposit diferensiyasyonu değerlendirildi. Trombin tek başına uygulandığında adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı. Y-27632'nin tek başına uygulanması adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak arttırdı. Y-27632 ve trombinin birlikte uygulandığı deney serilerinde trombin tarafından Rho/Rho-kinaz yolağının aktive edilmesi sonucu diferensiyasyonda gözlenen anlamlı azalmayı ortadan kaldırdı (Şekil 4.2.5.3.).



**Şekil 4.2.5.3.** 4-8. gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, deney protokolü boyunca 4-8'inci günler arasında birer gruba tek başına trombin (1-5 U/ml, n=4) uygulandı. Birer grupta ise Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapılmış 3T3-L1 hücrelerine trombin (1, 5 U/ml, n=4) uygulandı. Bir gruba da Y-27632 ( $10^{-5}$  M) konsantrasyonda uygulandı. Ardından bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi 8. gün yapılan Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Dunnet ve Bonferroni *post hoc* testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ , (kontrolle karşı anlamlılık); +:  $P < 0.001$  (Y-27632 uygulanan hücreler ile Y-27632 ön uygulamasının ardından trombin uygulaması yapılmış hücreler arasında istatistiksel analiz sonucunda bulunan anlamlılık).

#### 4.2.5.4. 0-8. Gün:

Trombin (1 ve 5 U/ml) uygulamasının preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına trombin uygulaması yapıldı. Trombinin etkisi Y-27632 ( $10^{-5}$  M) varlığında ya da yokluğunda test edildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması ile adiposit diferensiyasyonu değerlendirildi. Trombin adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı. Y-27632 trombin ile kombine uygulandığında trombin tarafından oluşturulan süpresyondaki anlamlılık ortadan kalktı. Y-27632, tek başına uygulandığında diferensiyasyonu anlamlı olarak arttırdı. (Şekil 4.2.5.4).

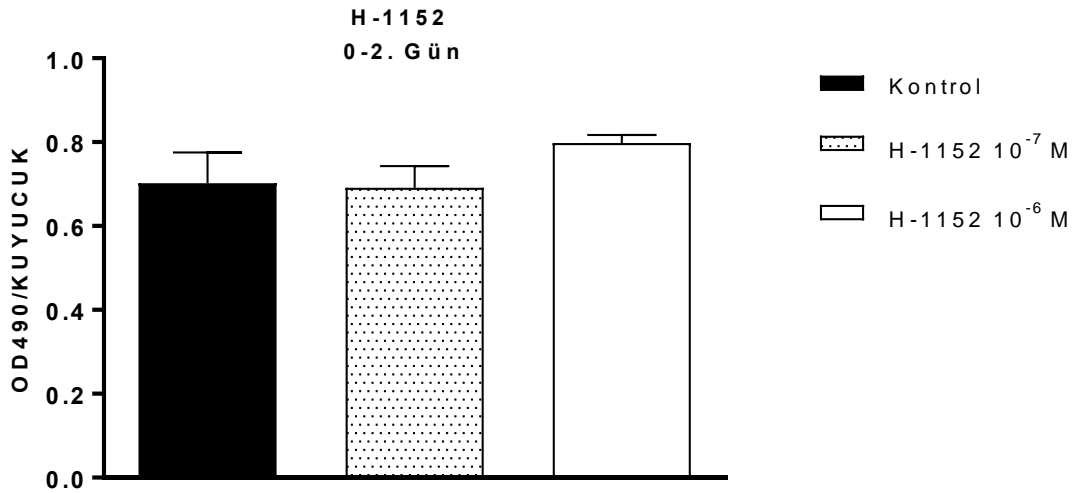


**Şekil 4.2.5.4.** 0-8. gün Y-27632 varlığında trombin uygulamasının adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi. Deney protokolü boyunca 0-8'inci günler arasında birer gruba trombin (1, 5 U/ml, n=4) uygulandı. Birer gruba Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) ön uygulaması yapıldı ve ardından trombin (1, 5 U/ml, n=4) uygulandı. Bir başka gruba da Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) konsantrasyonda uygulandı. Ardından bu uygulamanın adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Dunnet ve Bonferroni *post hoc* testleri kullanıldı.  $P<0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ (kontrolle karşı anlamlılık); +:  $P<0.001$  (Y-27632 uygulanan hücreler ile Y-27632 ön uygulamasının ardından trombin uygulaması yapılmış hücreler arasında istatistiksel analiz sonucunda bulunan anlamlılık).

#### 4.2.6. H-1152 Uygulamasının Diferensiyasyon Üzerine Etkisi

##### 4.2.6.1. 0-2. Gün:

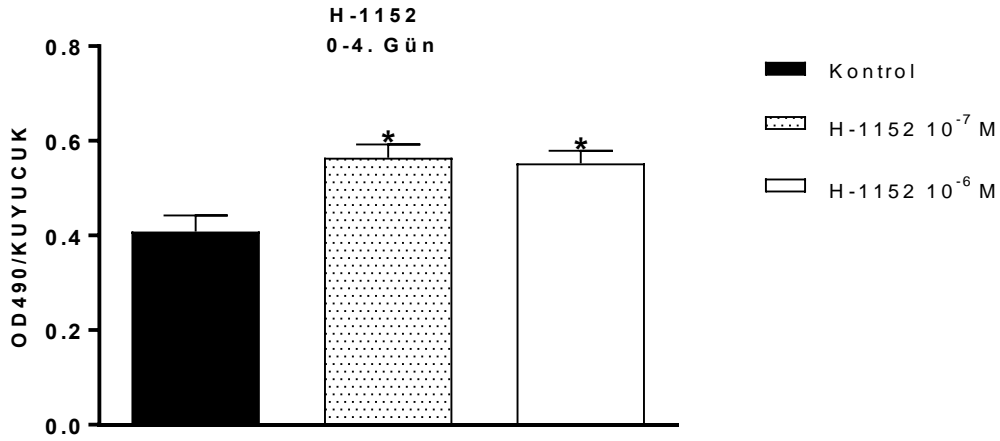
Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında hücre kültür ortamına selektif ROCK inhibitörü H-1152 (S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil) sulfonil]-hekzahidro-1H-1,4-diazepin dihidroklorid) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında H-1152 (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. H-1152, uygulanan her iki konsantrasyonda da 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil4.2.6.1.).



**Şekil 4.2.6.1.** 0-2. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara H-1152 deney protokolü boyunca 0-2. günler arasında  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Takiben H-1152'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.6.2. 0-4. Gün:

Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri arasında hücre kültür ortamına selektif ROCK inhibitörü H-1152 (S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil) sulfonil]-hekzahidro-1H-1,4-diazepin dihidroklorid) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri arasında H-1152 ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. H-1152'nin diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri arasında uygulanması 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonunu anlamlı olarak arttırdı (Şekil 4.2.6.2.).

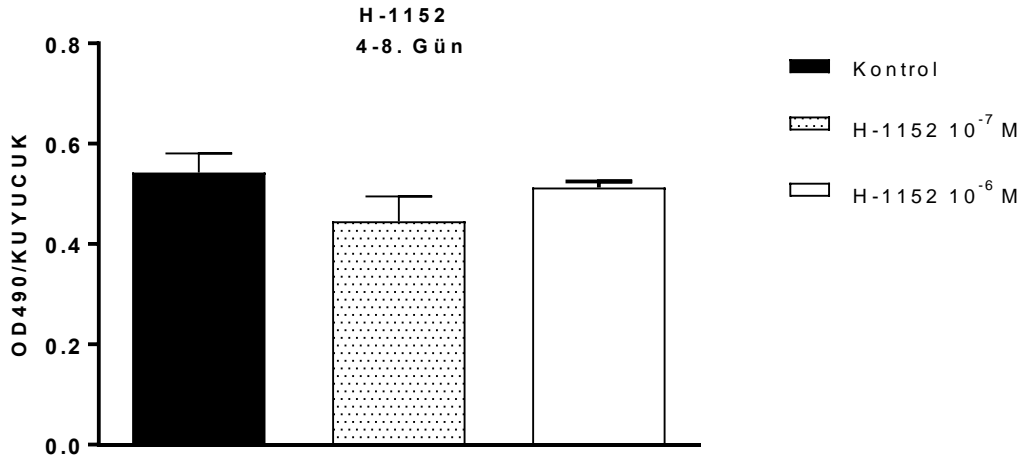


**Şekil 4.2.6.2.** 0-4. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. H-1152 deney protokolü boyunca 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe kuyucuklara 0-4. günler arasında 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Takiben H-1152'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$  (kontrolle göre anlamlılık).

#### 4.2.6.3. 4-8. Gün:

Diferensiyasyon protokolünün 4-8. günleri arasında hücre kültür ortamına selektif ROCK inhibitörü H-1152 (S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil) sulfonil]-hekzahidro-1H-1,4-diazepin dihidroklorid) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 4-8. günleri arasında H-1152 (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. H-1152, uygulanan her iki konsantrasyonda da 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil 4.2.6.3.).

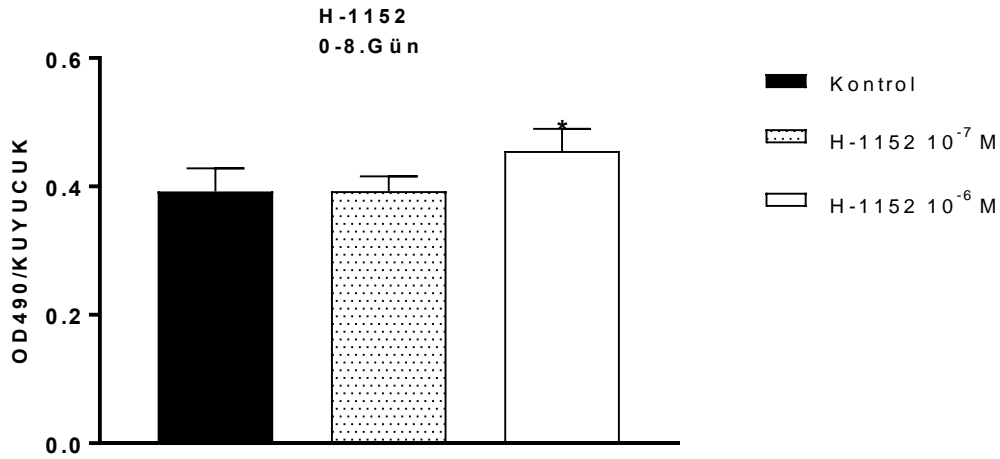




**Şekil 4.2.6.3.** 4-8. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, kuyucuklara H-1152 deney protokolü boyunca 4-8. günler arasında 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Takiben H-1152'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.2.6.4. 0-8. Gün:

Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında hücre kültür ortamına selektif ROCK inhibitörü H-1152 (S)-(+)-2-Metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil) sulfonil]-hekzahidro-1H-1,4-diazepin dihidroklorid) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. Bu amaçla hücrelere diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında H-1152 (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M) uygulandı. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Oil Red O boyaması yapıldı ve diferensiyasyon değerlendirildi. H-1152'nin diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri arasında 10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda uygulanması 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonunu anlamlı olarak arttırdı (Şekil 4.2.6.4.).



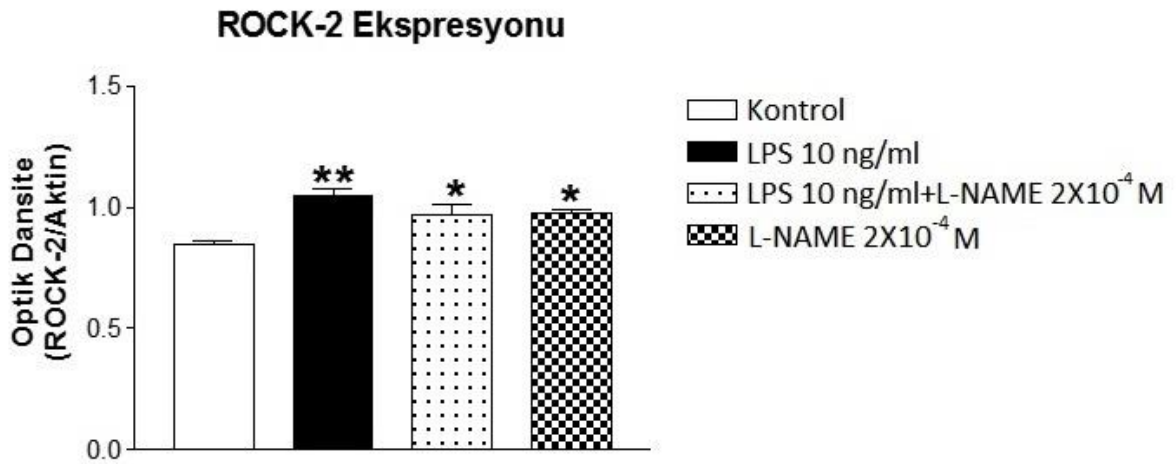
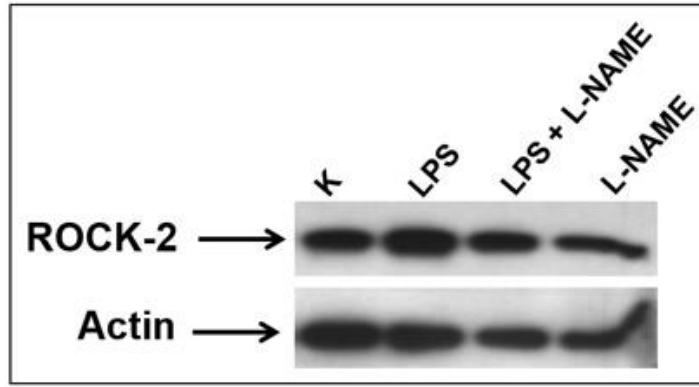
**Şekil 4.2.6.4.** 0-8. gün H-1152 uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferensiyasyonu üzerine etkisi. H-1152, 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe kuyucuklara deney protokolü boyunca 0-8. günler arasında 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda uygulandı (n=4). Bunu takiben H-1152'nin adiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi Oil Red-O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$  (kontrolle göre anlamlılık).

### 4.3. Western-Blot Bulguları

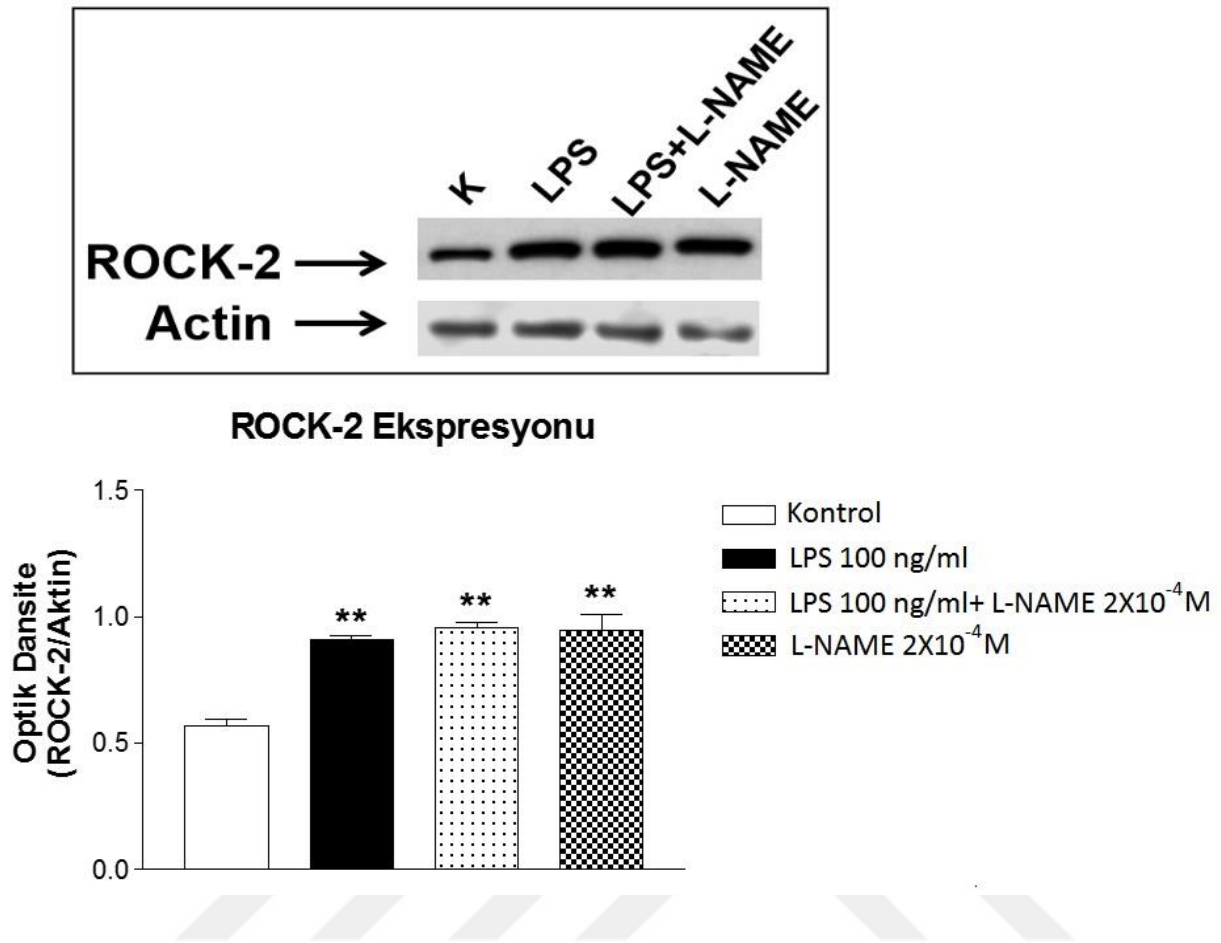
#### 4.3.1. LPS'in Rho-Kinaz (ROCK-2) Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi:

##### 4.3.1.1. Düşük Konsantrasyonda LPS'nin ROCK-2 Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi ve Bu Etkinin L-NAME Varlığında ya da Yokluğunda değerlendirilmesi

LPS uygulamasının (10, 100 ng/ml) 3T3-L1 diferensiyasyon sürecinde Rho-kinaz (ROCK) enzim ekspresyonları üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına LPS uygulaması yapıldı. LPS'in etkisi L-NAME (2x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda değerlendirildi. Diferensiyasyon protokolünün 8. günü deney sonlandırılarak Western blot yapıldı. LPS 10 ng/ml konsantrasyonda uygulandığında Rho-kinaz (ROCK-2) enzim düzeyinde belirgin bir artış oluşturdu (Şekil 4.3.1.1). LPS (10 ng/ml) ile kombine olarak uygulanan non-spesifik nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü L-NAME (2x10<sup>-4</sup> M), LPS'nin ROCK-2 enzim ekspresyonu üzerine olan etkisini değiştirmede. Tek başına L-NAME uygulaması da ROCK-2 ekspresyonunda anlamlı bir artış oluşturdu (Şekil 4.3.1.1.A). Benzer şekilde daha yüksek konsantrasyonda uygulanan LPS (100 ng/ml) de ROCK-2 ekspresyonunu anlamlı olarak artırırken yine L-NAME, bu artış üzerine etkisiz bulundu. Ayrıca L-NAME tek başına ROCK-2 ekspresyonunda bir değişiklik yapmadı (Şekil 4.3.1.B).



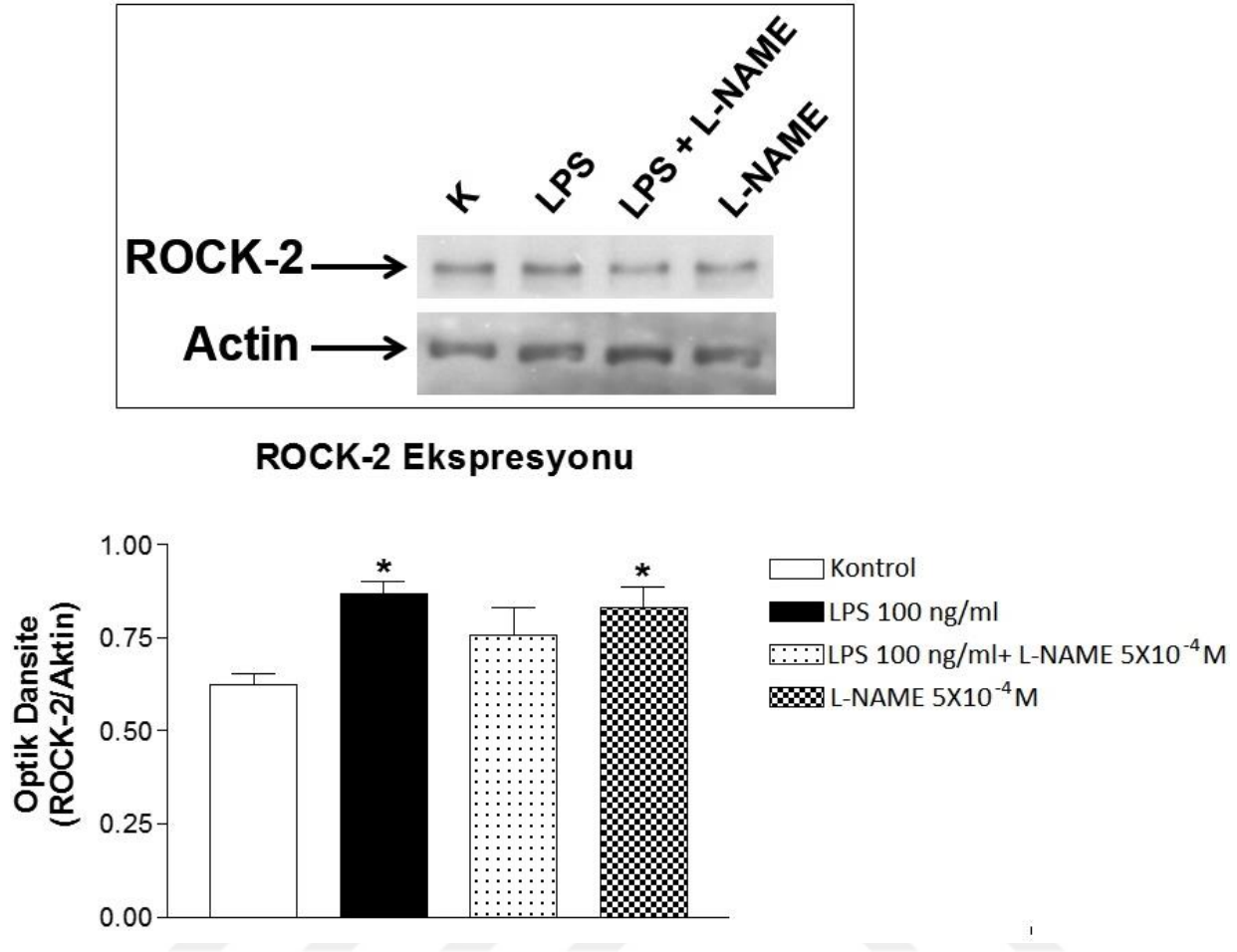
**Şekil 4.3.1.1.A.** 2x10<sup>-4</sup>M L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS'in (10 ng/ml) 3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz enzim ekspresyonları üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post-konfluent 2. günden (diferensiyasyon protokolünün 0. günü) itibaren 8 gün boyunca nitrik oksit sentaz inhibitörü NG-nitro-L-arginin (2x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda bakteriyel lipopolisakarite (10 ng/ml) maruz bırakıldı. Daha sonra hücreler buz üzerinde hasat edilip lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik ROCK-2 antikoru (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışımaya radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için ANOVA ve *post hoc* test olarak Dunnet testi uygulandı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi. \*: *P*<0.05 (kontrolle göre anlamlılık).



**Şekil 4.3.1.1.B.** 2x10<sup>-4</sup>M L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS'in (100 ng/ml) 3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz enzim ekspresyonları üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post-konfluent 2. günden (diferensiyasyon protokolünün 0. günü) itibaren 8 gün boyunca nitrik oksit sentaz inhibitörü NG-nitro-L-arginin (2x10<sup>-4</sup> M) varlığında ya da yokluğunda bakteriyel lipopolisakkarite (100 ng/ml) maruz bırakıldı. Daha sonra hücreler buz üzerinde hasat edilip lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik ROCK-2 antikoruna (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışımaya radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için ANOVA ve *post hoc* test olarak Dunnett testi uygulandı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*\*:  $P < 0.01$  (kontrolle göre anlamlılık).

#### 4.3.1.2. Yüksek Konsantrasyonda LPS'nin ROCK-2 Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi ve Bu Etkinin L-NAME Varlığında ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

ROCK ekspresyonu üzerine LPS'nin oluşturduğu artışı ortadan kaldırmak için uygulanan L-NAME'in konsantrasyonunun olası yetersizliği ihtimaline karşı 3T3-L1 hücre kültür ortamına uygulanan 100 ng/ml LPS'in ortamda 5x10<sup>-4</sup> M L-NAME varlığında ya da yokluğundaki etkileri değerlendirildi. L-NAME, daha yüksek konsantrasyonda uygulanmasına rağmen hala LPS ile indüklenen ROCK-2 up-regulasyonunu değiştirmede (Şekil 4.3.1.2).

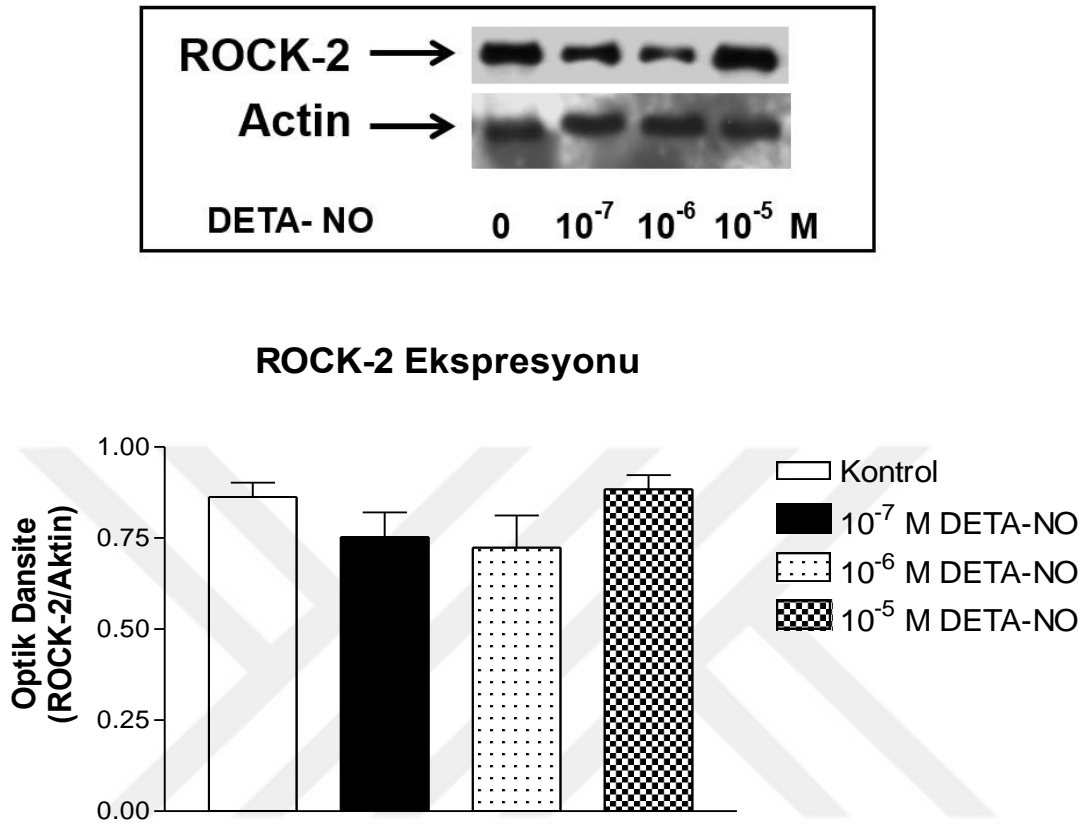


**Şekil 4.3.1.2.** 5x10<sup>-4</sup> M L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda LPS'in (100 ng/ml) etkisi. 3T3-L1 hücreleri post-konfluent 2. günden (diferensiyasyon protokolünün 0. günü) itibaren 8 gün boyunca 5x10<sup>-4</sup> M L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS'e (100 ng/ml) maruz bırakıldı. Daha sonra hücreler buz üzerinde hasat edilip lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik ROCK-2 antikoru (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışımaya radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için ANOVA ve *post hoc* test olarak Dunnet testi uygulandı. *P*<0.05 anlamlı kabul edildi \*: *P*<0.05 (kontrolle göre anlamlılık).

#### 4.3.2. Nitrik Oksit Donörü DETA-NO'nun 3T3-L1 Hücrelerinde Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkisi

NO donörü DETA-NO 'nun 3T3-L1 preadipositlerinde Rho-kinaz enzim ekspresyonları üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile DETA-NO 8 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) uygulandı ve ardından Western blot metodu ile Rho-kinaz enzim ekspresyonları

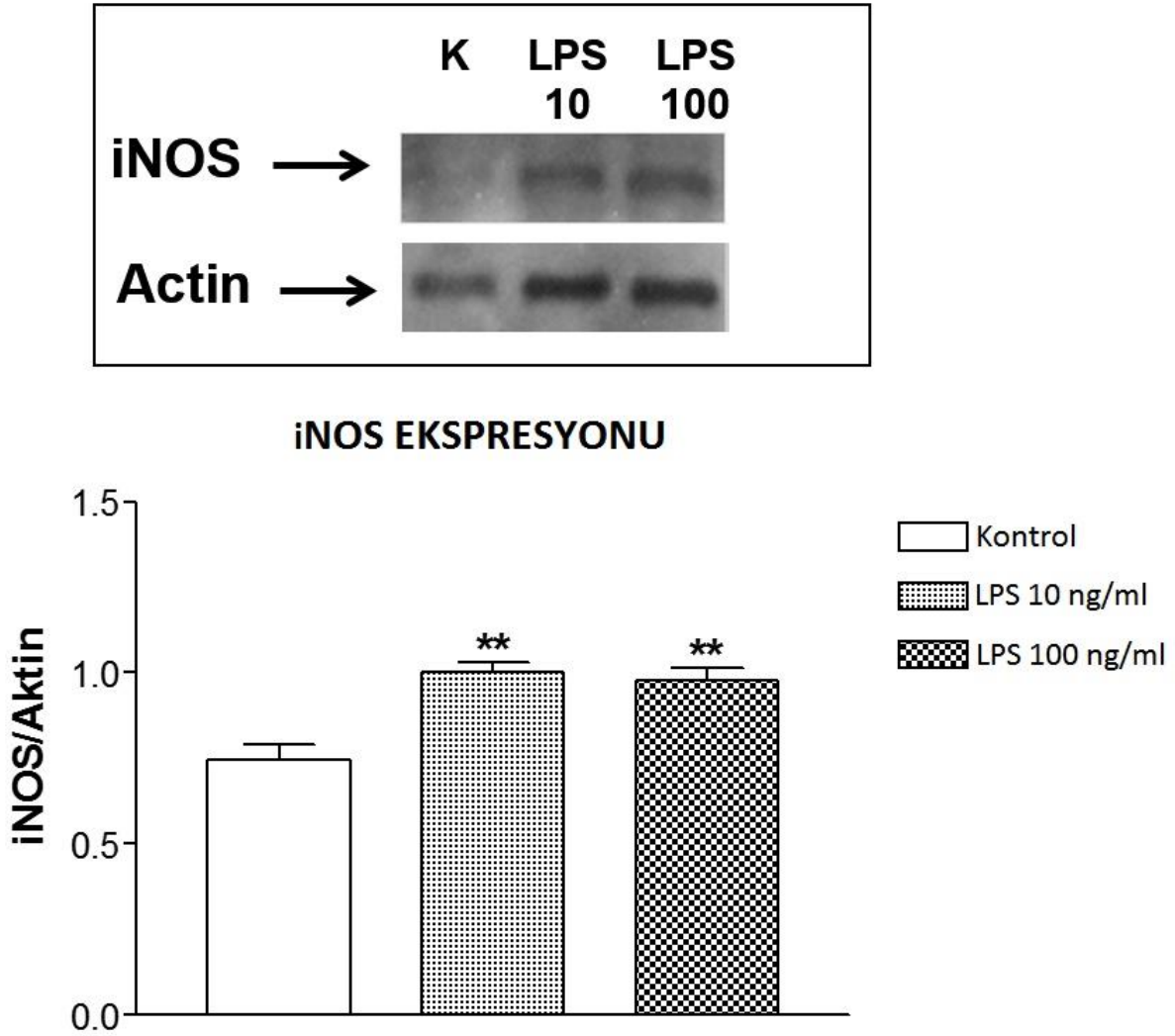
analiz edildi. 0-8. günler arasında DETA-NO uygulaması 3T3-L1 hücrelerinde ROCK-2 ekspresyonlarında anlamlı bir değişiklik yapmadı (Şekil 4.3.2.).



**Şekil 4.3.2.** Nitrik oksit donörü DETA-NO'nun 3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz enzim ekspresyonları üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post-konfluent 2. günde uygulanarak 8 gün boyunca bir nitrik oksit donörü DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) ile muamele edildi. Daha sonra hücreler buz üzerinde hasat edilip lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik ROCK-2 antikoru (1:500) muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışımaya radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için ANOVA ve *post hoc* test olarak Dunnet testi uygulanmıştır.

#### 4.3.3. LPS Uygulamasının 3T3-L1 hücrelerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi

8 gün boyunca uygulanan bakteriyel lipopolisakkarit (10, 100 ng/ml) 3T3-L1 hücrelerinde iNOS ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdı. Bu artış konsantrasyon-bağımlı değildi (Şekil 4.3.3).



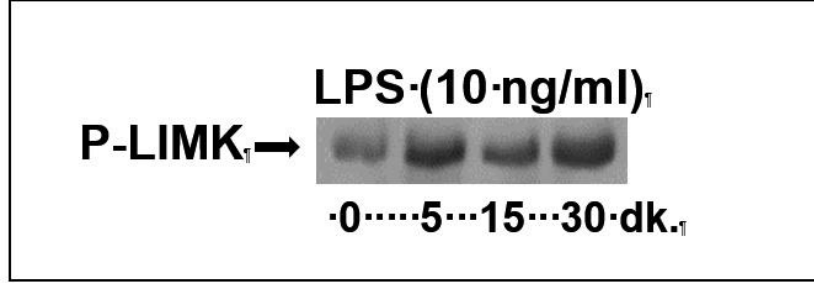
**Şekil 4.3.3** Bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS-2) enzim ekspresyonları üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post-konfluent 2. günde uygulanarak 8 gün boyunca bakteriyel lipopolisakkarite (10 ng/ml ve 100 ng/ml) maruz bırakıldı. Daha sonra hücreler buz üzerinde hasat edilip lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik iNOS antikoru ile (1:500) muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışına radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. \*\*:  $P < 0.01$ , İstatistiksel analiz için ANOVA ve *post hoc* test olarak Dunnet testi uygulanmıştır.

#### 4.3.4. LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

##### 4.3.4.1. Düşük konsantrasyonda LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

3T3-L1 hücre kültür ortamına bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) uygulanmasının farklı zaman dilimlerinde LIM kinaz fosforilasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. 3T3-L1 hücrelerinin

LPS'ye (10 ng/ml) maruz bırakılması, 5. ve 15. dakikalarda LIMK fosforilasyonunu değiştirmezen, 30. dakikada anlamlı olarak LIMK fosforilasyonunu artırdı. Bu artış 30. dakikada ortadan kalktı (Şekil 4.3.4.1.).

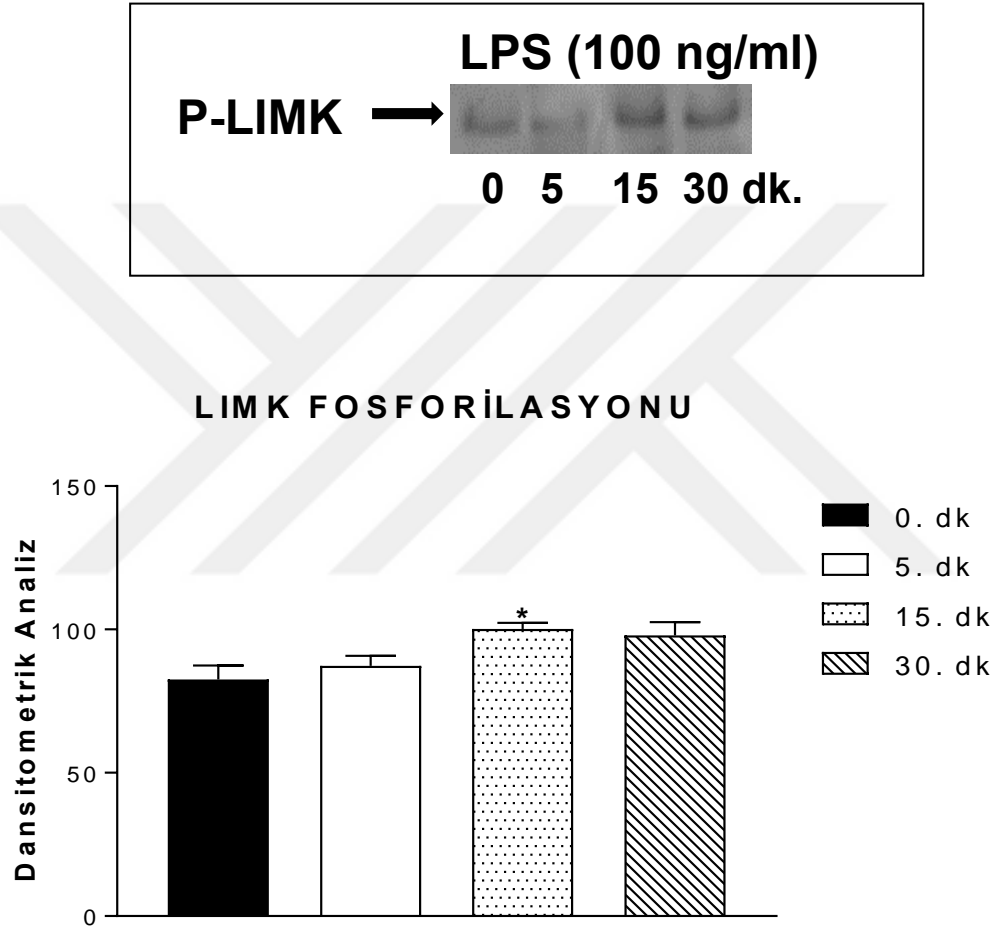


**Şekil 4.3.4.1.** 10 ng/ml bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde LIM Kinaz aktivitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post konfluent 2. günde LPS'ye (10 ng/ml) farklı zaman aralıklarında (0, 5, 15, 30 dk) maruz bırakıldı ve her bir zaman aralığının bitiminde hücreler buz üzerinde hızlıca fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile hasat edildi. Ardından yine fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik pLIMK antikoru (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışımaya radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi uygulandı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$ .



#### 4.3.4.2. Yüksek Konsantrasyonda LPS Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

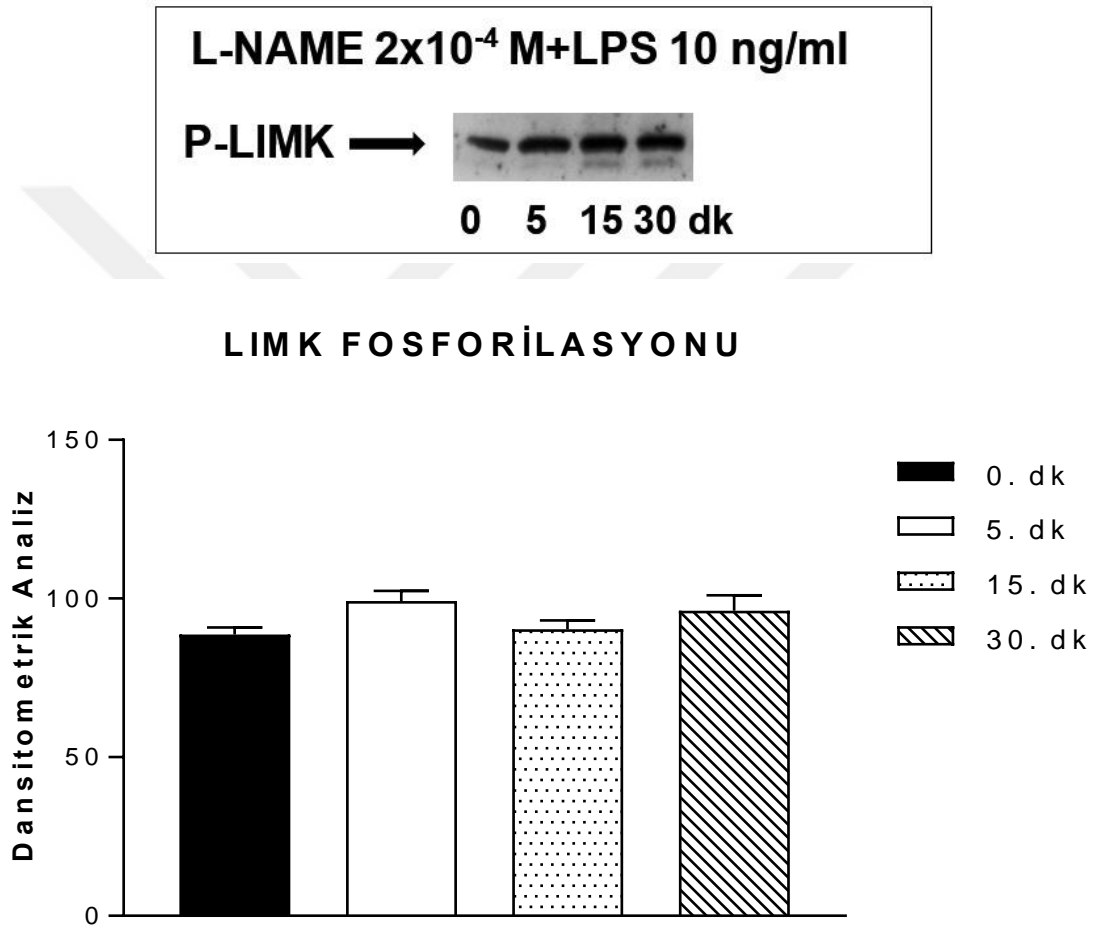
3T3-L1 hücre kültür ortamına bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) uygulanmasının farklı zaman dilimlerinde LIM kinaz fosforilasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. 3T3-L1 hücrelerinin LPS'ye (100 ng/ml) maruz bırakılması 5. dakikada bir değişiklik yapmazken, 15. dakikada anlamlı olarak LIMK fosforilasyonunu artırdı. Bu artış 30. dakikada ortadan kalktı. (Şekil 4.3.4.2).



**Şekil 4.3.4.2.** 100 ng/ml bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde LIM Kinaz aktivitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post konfluent 2. günde LPS'ye (10 ng/ml) farklı zaman aralıklarında (0, 5, 15, 30 dk) maruz bırakıldı ve her bir zaman aralığının bitiminde hücreler buz üzerinde hızlıca fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile hasat edildi. Ardından yine fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik pLIMK antikoru (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışına radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*:  $P < 0.05$

#### 4.3.5. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME Varlığında Bakteriyel Lipopolisakkaridin 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

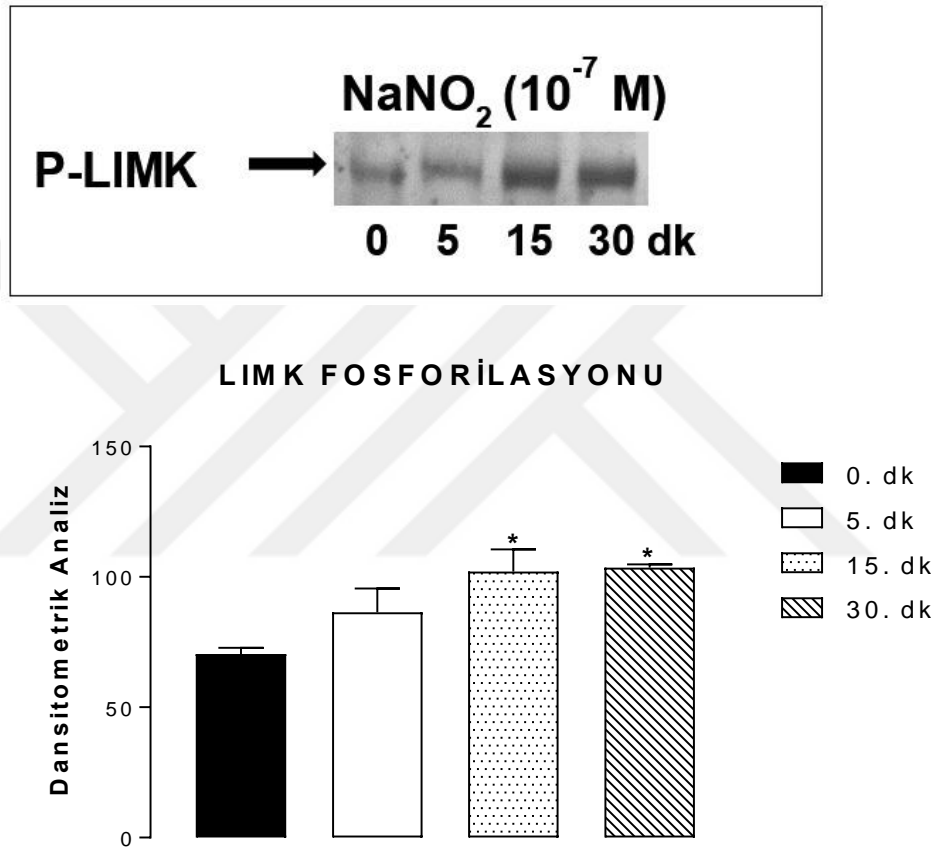
3T3-L1 hücrelerinin  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME ile preinkübasyonundan sonra (30 dk.) bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) uygulanmasının farklı zaman dilimlerinde LIM kinaz fosforilasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. 3T3-L1 hücrelerinin L-NAME sonrası LPS'ye (10 ng/ml) maruz bırakılması test edilen hiçbir zaman diliminde LIMK fosforilasyonunu değiştirmede (Şekil 4.3.5.).



**Şekil 4.3.5.**  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME varlığında bakteriyel lipopolisakkaridin 3T3-L1 hücrelerinde LIM Kinaz aktivitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post konfluent 2. günde LPS'ye (10 ng/ml) farklı zaman aralıklarında (0, 5, 15, 30 dk) maruz bırakıldı ve her bir zaman aralığının bitiminde hücreler buz üzerinde hızlıca fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile hasat edildi. Ardından yine fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik pLIMK antikoru (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışına radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

#### 4.3.6. Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

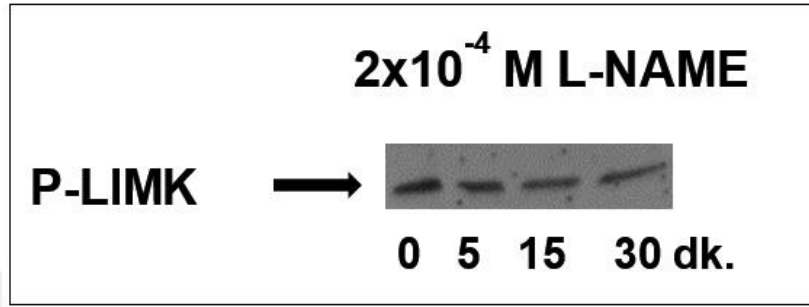
3T3-L1 hücre kültür ortamına Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) uygulamasının farklı zaman dilimlerinde LIM kinaz fosforilasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. 3T3-L1 hücrelerine  $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$  M) uygulaması, 5. dakikada LIM kinaz fosforilasyonunda bir değişiklik oluşturmazken 15 ve 30. dakikalarda anlamlı olarak artırdı (Şekil 4.3.6.).



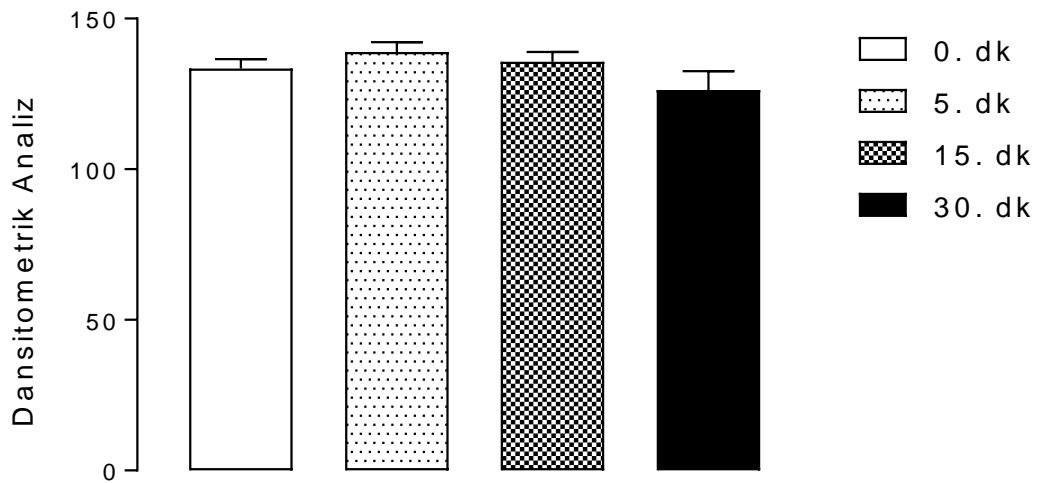
**Şekil 4.3.6.** Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) uygulamasının 3T3-L1 hücrelerinde LIM Kinaz aktivitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post konfluent 2. günde LPS'ye (10 ng/ml) farklı zaman aralıklarında (0, 5, 15, 30 dk) maruz bırakıldı ve her bir zaman aralığının bitiminde hücreler buz üzerinde hızlıca fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile hasat edildi. Ardından yine fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik pLIMK antikoru (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışımaya radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

#### 4.3.7. $2 \times 10^{-4}$ M L-NAME Uygulamasının 3T3-L1 Hücrelerinde LIM Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tek başına  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME preinkübasyonunun farklı zaman dilimlerinde LIM kinaz fosforilasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. 3T3-L1 hücrelerinin 5, 15 ve 30 dk. boyunca L-NAME ile inkübe edilmesi, LIMK fosforilasyonunu değiştirmedir.



#### LIMK FOSFORİLASYONU

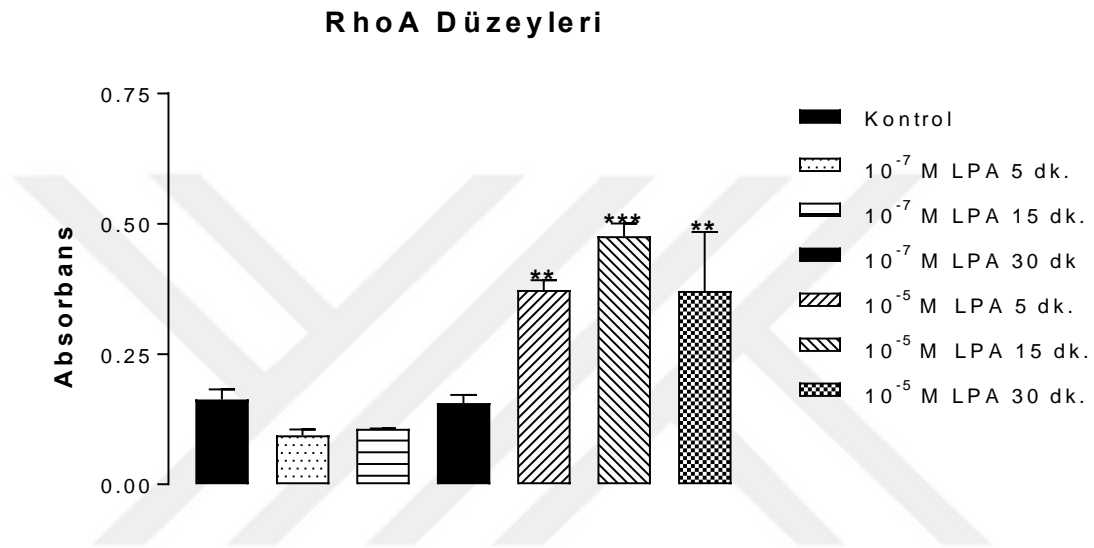


**Şekil 4.3.7.**  $2 \times 10^{-4}$  M L-NAME uygulamasının 3T3-L1 hücrelerinde LIM Kinaz aktivitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücreleri post konfluent 2. günde LPS'ye (10 ng/ml) farklı zaman aralıklarında (0, 5, 15, 30 dk) maruz bırakıldı ve her bir zaman aralığının bitiminde hücreler buz üzerinde hızlıca fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile hasat edildi. Ardından yine fosfataz inhibitörü eklenmiş lizis tamponu ile homojenize edildi. Eşit miktarda proteinler %10'luk SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunu takiben PVDF membrana aktarılan proteinler spesifik pLIMK antikoruna (1:500) ile muamele edildikten sonra uygun bir HRP-konjüge sekonder antikora maruz bırakıldı. Elde edilen ışın radyolojik filmlere aktarıldı ve görüntülenen bantlar Scion İmage programı ile analiz edildi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

#### 4.4. G-LISA Ölçümleri (RhoA Translokasyonları-Aktivasyonları)

##### 4.4.1. Lizofosfatidik asidin 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi

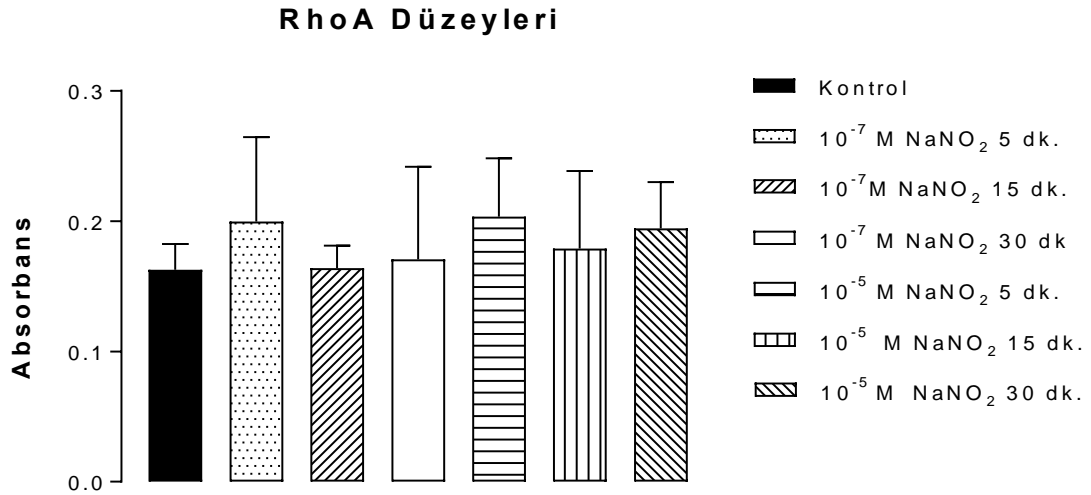
3T3-L1 hücre kültür ortamına  $10^{-7}$  M konsantrasyonda uygulanan lizofosfatidik asit (LPA), 5. 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) değiştirmezken  $10^{-5}$  M konsantrasyondaki LPA uygulaması, RhoA aktivitesini belirgin bir şekilde artırdı. (şekil 4.4.1).



**şekil 4.4.1.** Lizofosfatidik asidin RhoA translokasyonu üzerine etkisi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi. \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

##### 4.4.2. Sodyum Nitritin ( $\text{NaNO}_2$ ) 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi

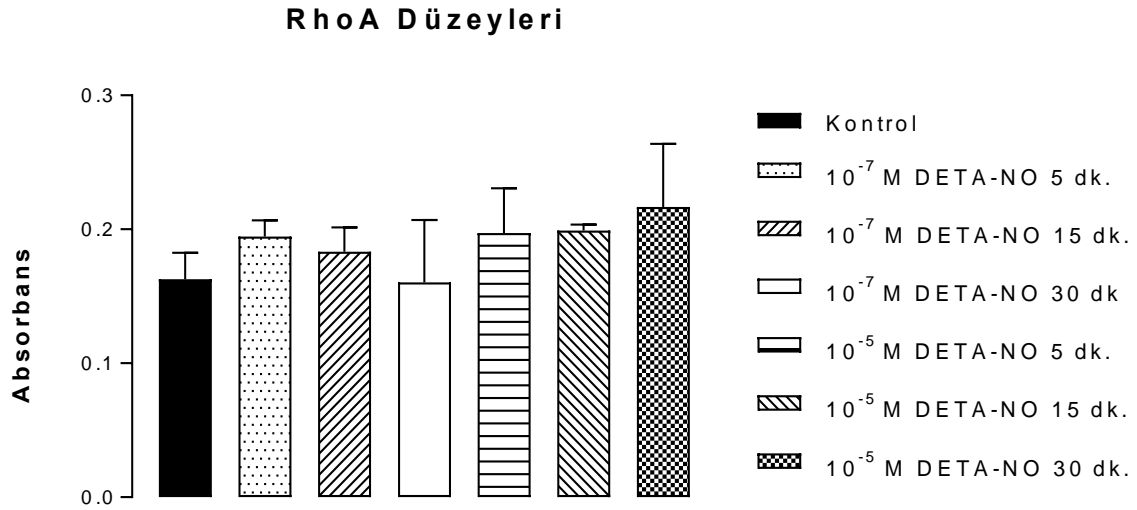
3T3-L1 hücre kültür ortamına  $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M konsantrasyonlarda uygulanan sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), 5. 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) değiştirmede (şekil 4.4.2.).



**Şekil 4.4.2.** Sodyum nitritin (NaNO<sub>2</sub>) 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi. Sodyum nitritin (NaNO<sub>2</sub>) 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi 3T3-L1 hücrelerine preadiposit dönemdeyken uygulanan 10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>) 5, 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) değıştirmemi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değeriendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

#### 4.4.3. DETA-NO'nun 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi

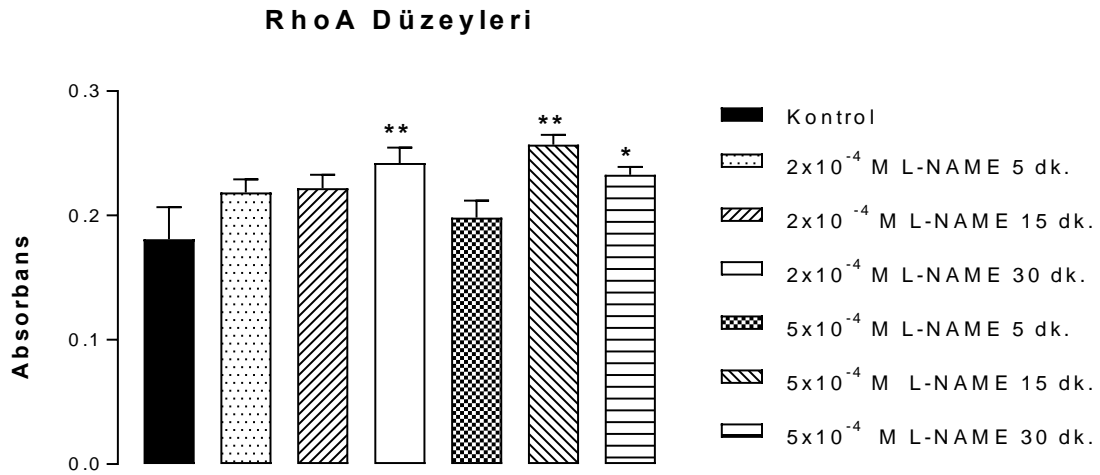
3T3-L1 Preadipositlerine uygulanan nitrik oksit (NO) donörü DETA-NO'nun RhoA translokasyonu üzerine etkisi değeriendirildi. Hücre kültür ortamına 10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonlarda uygulanan DETA-NO, 5, 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) değıştirmemi (Şekil 4.4.3.).



**Şekil 4.4.3.** DETA-NO'nun 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine preadiposit dönemdeyken uygulanan  $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M DETA-NO, 5. 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) değiştirmediler. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnett testi kullanıldı.

#### 4.4.4. L-NAME'in 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi

Preadipositlere uygulanan Nitrik oksit (NO) sentaz enzim inhibitörü L-NAME'in 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi değerlendirildi. L-NAME, ( $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  M) 5. dakikada RhoA translokasyonu üzerine etki göstermezken 15. ve 30. dakikalarda RhoA aktivitesinin göstergesi olan RhoA translokasyonlarını anlamlı olarak artırdı (Şekil 4.4.4.).

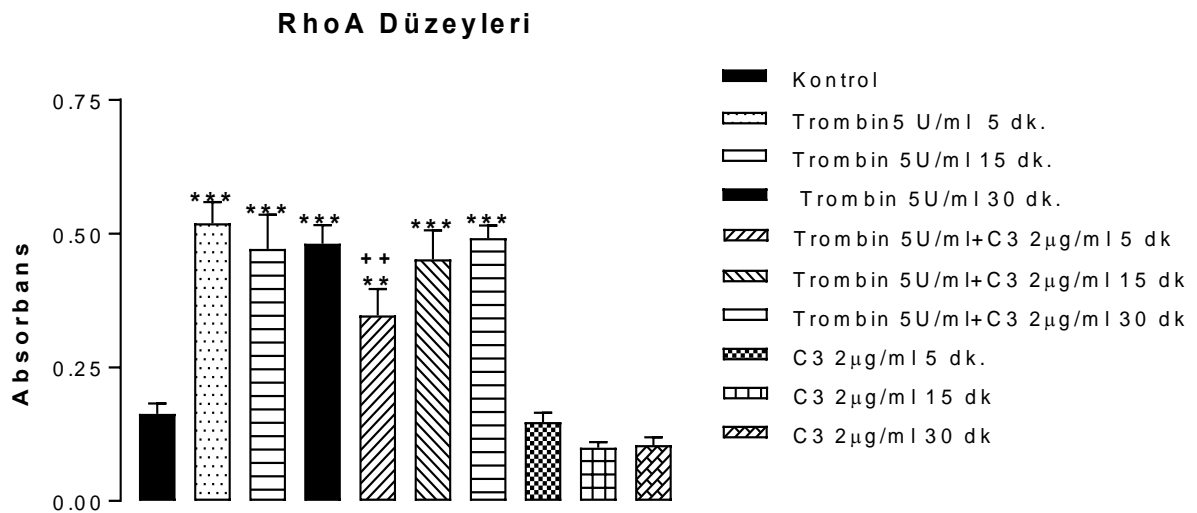


**Şekil 4.4.4.** L-NAME'in 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine preadiposit dönemdeyken uygulanan nitrik oksit (NO) sentaz enzim inhibitörü L-NAME (2 ve 5x10<sup>-4</sup> M), 5. 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) anlamlı bir şekilde artırdı. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve post-hoc test olarak Dunnet testi kullanıldı. \*: P<0.05, \*\*: P<0.01, kontrole karşı anlamlılık.

#### 4.4.5. Trombin ve C3'ün Ayrı Ayrı ve Kombine Uygulanmasının 3T3-L1 Hücrelerinde RhoA Translokasyonu Üzerine Etkisi

Preadipositlere uygulanan trombin (5 U/ml), 5. 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdı (Şekil 4.5.5.). RhoA inhibitörü, *Clostridium botulinum* toksini C3 (2 µg/ml), trombin ile oluşturulan RhoA translokasyonunu 5 dk.'da anlamlı olarak süprese etti. Tek başına uygulanan C3, her üç zaman diliminde RhoA aktivitesini değiştirmede (Şekil 4.4.5.).





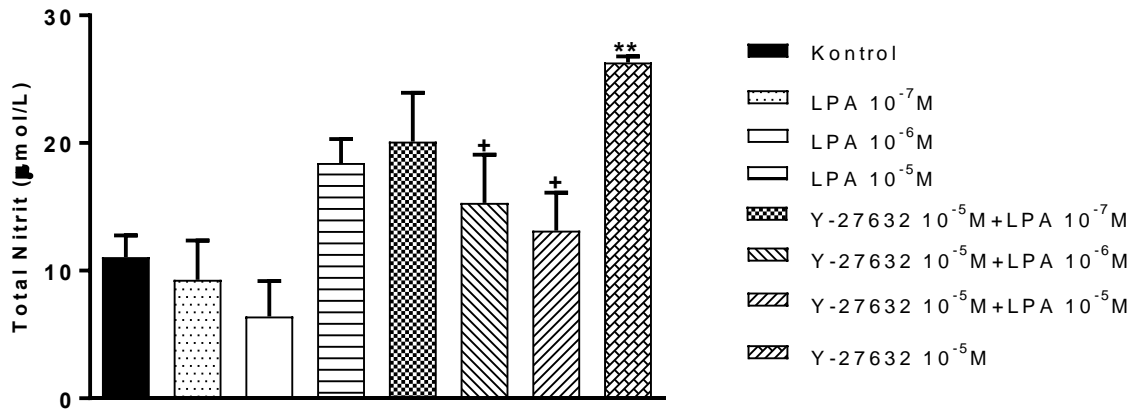
**Şekil 4.4.5.** Trombin ve C3'ün ayrı ayrı ve kombine uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine preadiposit dönemde uygulanan trombin (5 U/ml), 5, 15. ve 30. dakikalarda RhoA translokasyonlarını (aktivitesini) anlamlı bir şekilde artırdı. RhoA inhibitörü *Clostridium botulinum* toksini C3 (2 µg/ml), trombin ile oluşturulan RhoA translokasyonunu 5 dk.'da anlamlı olarak suprese etti. Tek başına uygulanan C3, her üç zaman diliminde RhoA aktivitesini değiştirmedir. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı. \*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$  (kontrolle göre anlamlılık); ++:  $P<0.01$  (trombin 5. dakika verisine göre anlamlılık).

#### 4.5. Nitrit/Nitrat Ölçümleri

##### 4.5.1. Lizofosfatidik Asidin (LPA) 3T3-L1 Hücrelerinin Kültür Ortamındaki Nitrit Düzeyleri Üzerine Etkisi

###### 4.5.1.1. 0-2. Gün:

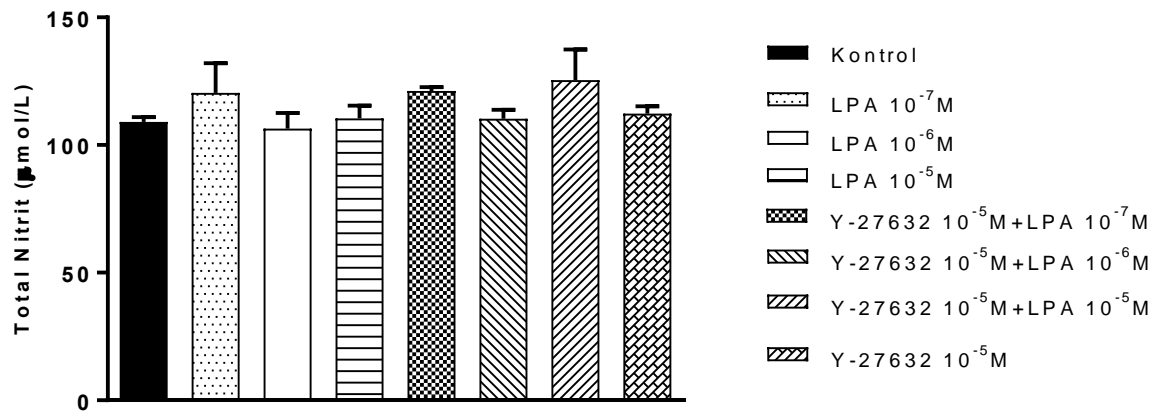
RhoA aktivatörü olarak bilinen lizofosfatidik asit (LPA,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M)'in post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0-2. gün arasında uygulanması, kültür ortamında nitrik oksidin metaboliti olan nitrit düzeylerini değiştirmedir. Ancak tek başına uygulanan Y-27632, nitrit seviyesini belirgin olarak artırdı. LPA ve Y-27632'nin kombine edilmesi, Y-27632'nin nitrit düzeyinde oluşturduğu artışı önledi (Şekil 4.5.1.1).



**Şekil 4.5.1.1.** RhoA aktivatörü LPA ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin 0-2. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücre kültüründe nitrit düzeylerine etkisi. Birer grupta deney protokolünün 0-2.günleri boyunca LPA ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) tek başına uygulandı. Birer grupta Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ön uygulaması yapıldıktan sonra LPA ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulaması yapıldı. Bir grupta ise Y-27632 ( $10^{-5}$  M) tek başına uygulandı. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P<0.05$  anlamlı kabul edildi. \*\*:  $P<0.05$  (kontrole göre anlamlılık).

#### 4.5.1.2. 0-4. Gün:

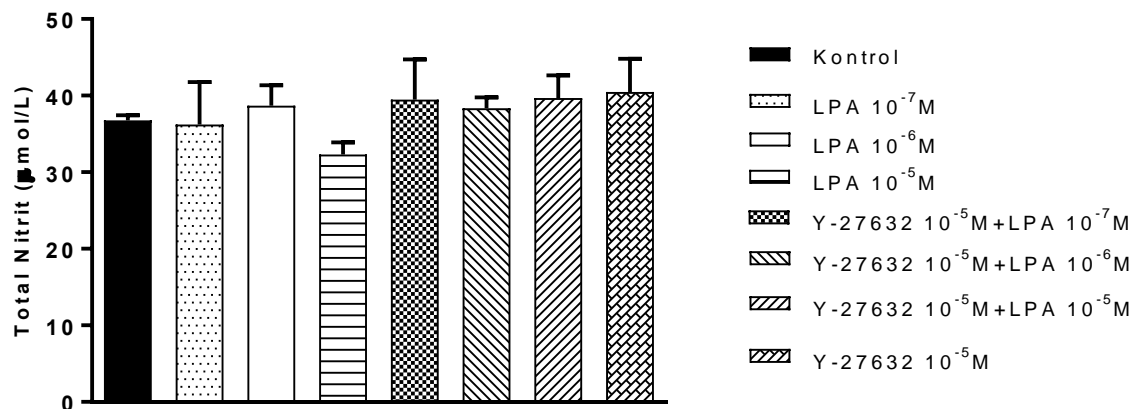
Lizofosfatidik asidin (LPA,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0-4. gün arasında tek başına ya da Y-27632 ile kombine uygulanması, kültür ortamında nitrik oksidin metaboliti olan nitrit düzeylerini değiştirmedir. (Şekil 4.5.1.2).



**Şekil 4.5.1.2.** RhoA aktivatörü LPA ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin 0-4. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücre kültüründe nitrit düzeylerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-4. günü boyunca birer gruba LPA 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı. Birer gruba Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) ön uygulaması yapıldı ve ardından LPA 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda uygulandı. Bir gruba ise tek başına Y-27632 (10<sup>-5</sup> M) uygulandı. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.5.1.3. 0-8. Gün:

Lizofosfatidik asidin (LPA, 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine deney protokolünün 0-8. günleri arasında tek başına ya da Y-27632 ile kombine uygulanması, kültür ortamında nitrik oksidin metaboliti olan nitrit düzeylerini değiştirmedi. (Şekil 4.5.1.3).

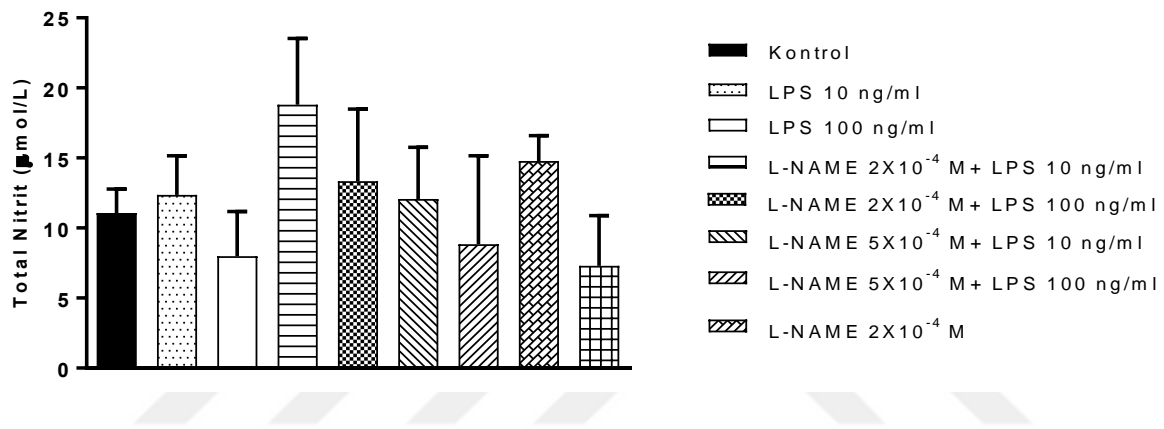


**Şekil 4.5.1.3.** RhoA aktivatörü LPA ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin 0-8. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücre kültüründe nitrit düzeylerine etkisi. LPA'nın ve Y-27632'nin deney protokolünün 0-8. günleri boyunca tek başına ya da kombine uygulanmasının hücre kültür ortamındaki nitrit düzeylerine etkisi olmadı. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.5.2. L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Bakteriyel Lipopolisakkaridin 3T3-L1 Hücrelerinin Kültür Ortamındaki Nitrit Düzeyleri Üzerine Etkisi

##### 4.5.2.1. 0-2. Gün:

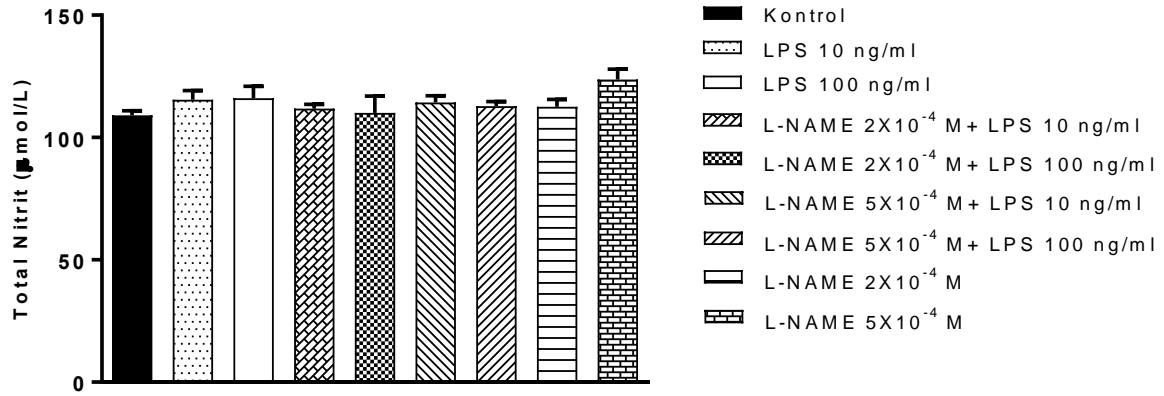
Bakteriyel endotoksin olan LPS'nin post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 10 ve 100 ng/ml konsantrasyonda 0-2 gün boyunca uygulanması kültür ortamında nitrit düzeylerinde belirgin bir değişiklik yapmadı. Ayrıca NOS inhibitörü L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) ile kombinasyonu da nitrit düzeyini etkilemedi (Şekil 4.5.2.1.).



**Şekil 4.5.2.1.** L-NAME ve LPS'in 0-2. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe deney protokolünün 0-2. günü boyunca birer gruba LPS (10, 100 ng/ml) tek başına uygulandı. Birer gruba L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-5}$  M) ön uygulaması yapıldı ve ardından LPS (10-100 ng/ml) uygulandı. Birer gruba ise tek başına L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) uygulandı. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

##### 4.5.2.2. 0-4 Gün:

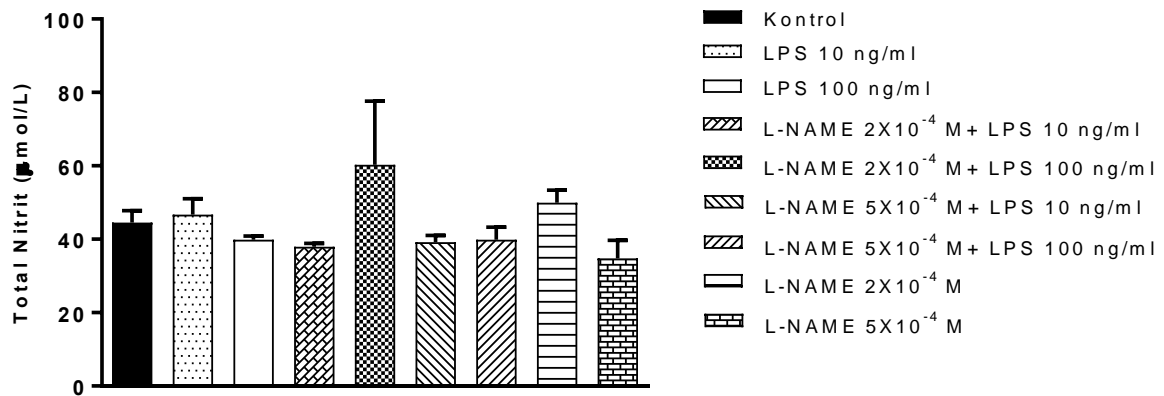
Bakteriyel endotoksin olan LPS'nin post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 10 ve 100 ng/ml konsantrasyonda 0-4 gün boyunca uygulanması kültür ortamında nitrit düzeylerinde belirgin bir değişiklik yapmadı. Ayrıca NOS inhibitörü L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) ile kombinasyonu da nitrit düzeyini etkilemedi (Şekil 4.5.2.2.).



**Şekil 4.5.2.2.** L-NAME ve LPS'in 0-4. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P<0.05$  anlamlı kabul edildi.

#### 4.5.2.3. 0-8. Gün:

Bakteriyel endotoksin olan LPS'nin post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 10 ve 100 ng/ml konsantrasyonda 0-8 gün boyunca uygulanması kültür ortamında nitrit düzeylerinde belirgin bir değişiklik yapmadı. Ayrıca NOS inhibitörü L-NAME (2 ve  $5 \times 10^{-4}$  M) ile kombinasyonu da nitrit düzeyini etkilemedi (Şekil 4.5.2.3).



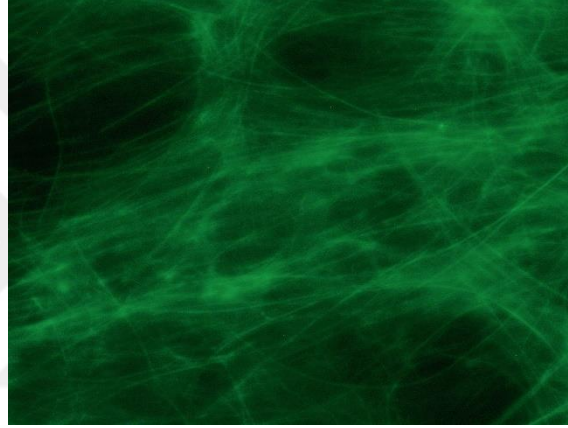
**Şekil 4.5.2.3.** L-NAME ve LPS'in 0-8. gün uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi. Veriler, ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA ve *post-hoc* test olarak Dunnet ve Bonferroni testleri kullanıldı.  $P<0.05$  anlamlı kabul edildi.

## 4.6. Floresan-Boyama Bulguları (Hücre İskeleti Bulguları)

### 4.6.1. Preadipositlerin Aktin Hücre iskeletinin Boyanması (kontrol)

#### 4.6.1.1.0. Gün:

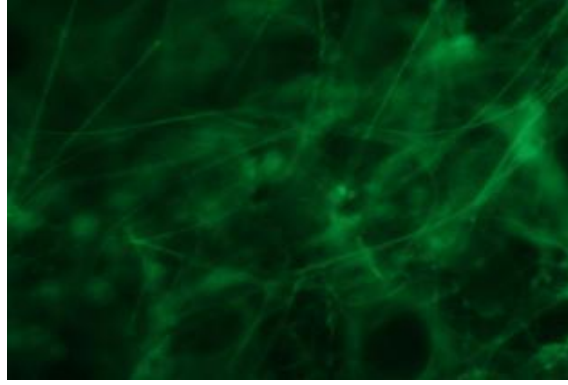
Bu deneylerde hücre kültür ortamında hiçbir test ajanı olmaksızın hücre iskeletinin Oregon Green Phalloidin ile boyanması görülmektedir. Uzun filamentöz aktin stress fiberleri 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin içinde hücre boyunca uzanan yeşil çizgiler halinde görülmektedir (Şekil 4.6.1.1).



**Şekil 4.6.1.1.** 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent (0. gündeki) aktin hücre iskeletinin görünümü. Aktinin hücre içerisinde boylu boyunca uzanan ince iplikler halinde görüldüğüne dikkat ediniz. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.1.2. 0-2. Gün

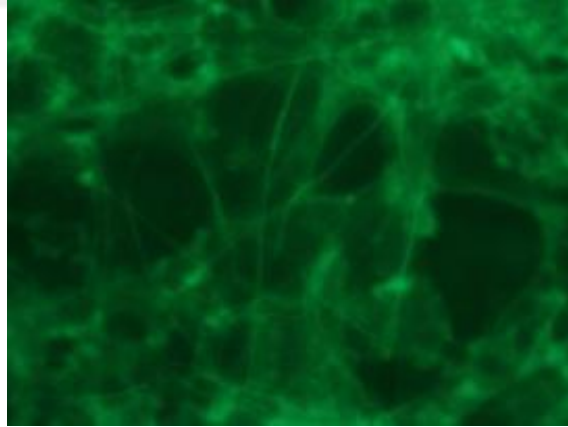
Bu deneylerde 3T3-L1 hücre kültür ortamına hiçbir test ajanı verilmeden hücreler Oregon Green Phalloidin ile boyandı ve aktin hücre iskeleti görüntülendi. Uzun filamentöz aktin stress fiberleri 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin içinde hücre boyunca uzanan yeşil çizgiler halinde görülmektedir (Şekil 4.6.1.2.).



**Şekil 4.6.1.2.** 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent 2. gündeki aktin hücre iskeletinin görülmesi. Aktinin hücre boyunca uzanan ince filamentler halinde görüldüğüne dikkat ediniz. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### **4.6.1.3. 0-4. Gün**

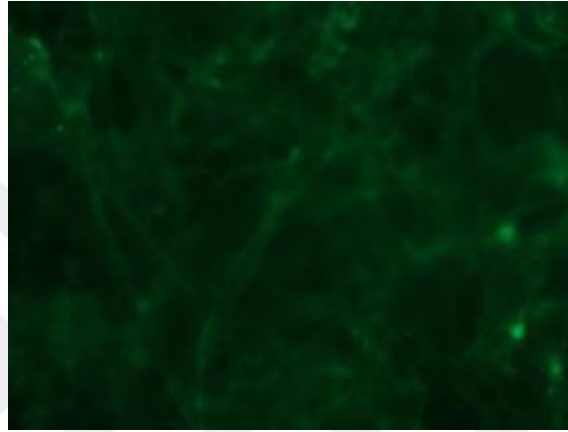
Bu deneylerde ortamda hiçbir test ajanı olmaksızın hücre iskeletinin Oregon Green Phalloidin ile boyanması görülmektedir. 0-4. günde preadipositler adiposite diferansiye olmaya başladıkları için hücre hacmindeki artışlar ve morfolojisindeki değişiklikler göze çarpmaktadır (Şekil 4.6.1.3.).



**Şekil 4.6.1.3.** 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent 4. gündeki aktin hücre iskeletinin görünümü. 0-4. günde preadipositler adiposite diferansiye olmaya başladıkları için hücre hacmindeki artışlar ve morfolojisindeki değişiklikler göze çarpmaktadır Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.1.4. 0-8. Gün

Bu deneylerde hücre kültür ortamında hiçbir test ajanı olmaksızın hücre iskeletinin Oregon Green Phalloidin ile boyanması görülmektedir. 0-8. günde preadipositler adiposite diferensiyeye oldukları için hücre hacmindeki artışlar ve morfolojisindeki değişiklikler (hücre merkezine lokalize büyük lipid damlaları ve sitoplazmanın bir kenara doğru sıkışık görünmesi gibi) göze çarpmaktadır (Şekil 4.6.1.4.). Aktin stress fiberleri yerini ortadaki büyük lipid damlacığını çevreleyen kortikal aktin liflerine bırakmıştır.



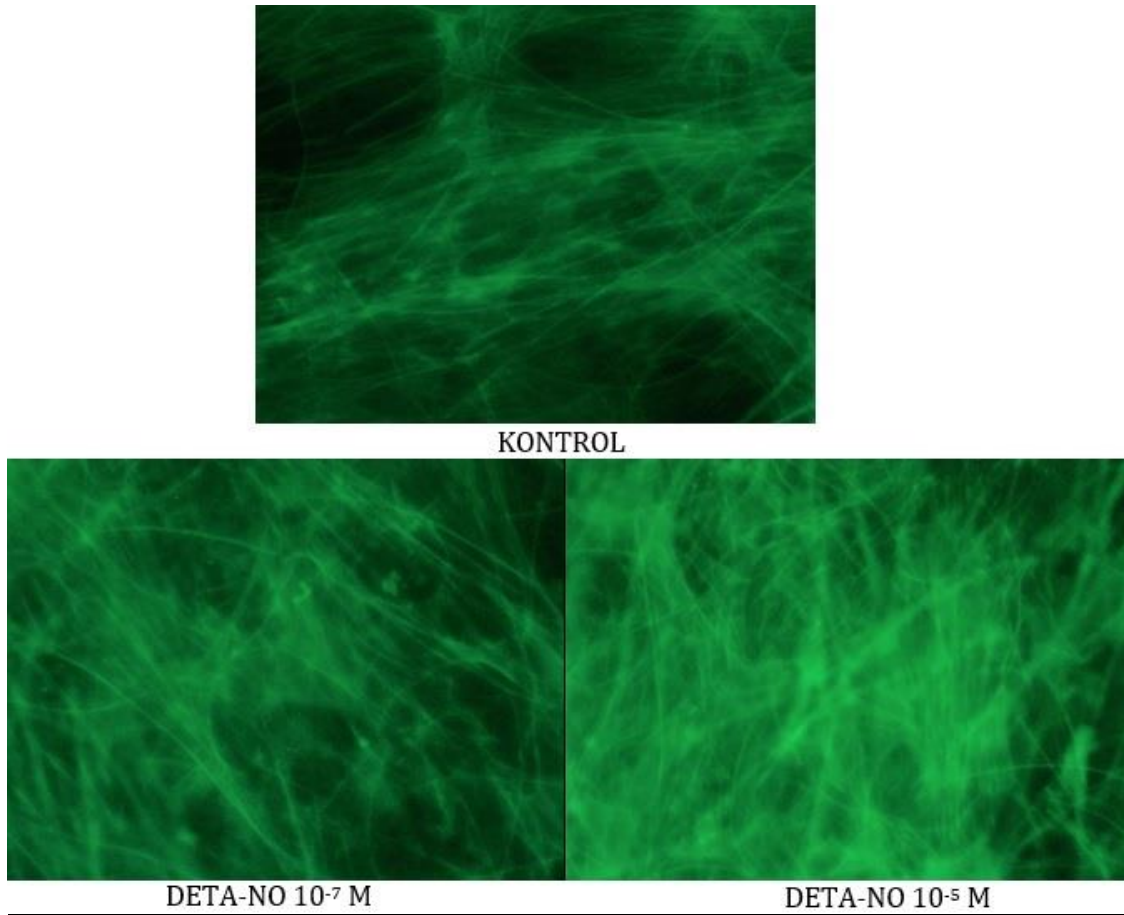
**Şekil 4.6.1.4.** 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent 8. gündeki aktin hücre iskeletinin görünümü. 0-8. günde preadipositler adiposite diferensiyeye oldukları için hücre hacmindeki artışlar ve morfolojisindeki değişiklikler göze çarpmaktadır Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.



## 4.6.2. DETA-NO'nun Preadipositlerin Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi

### 4.6.2.1. 0. Gün:

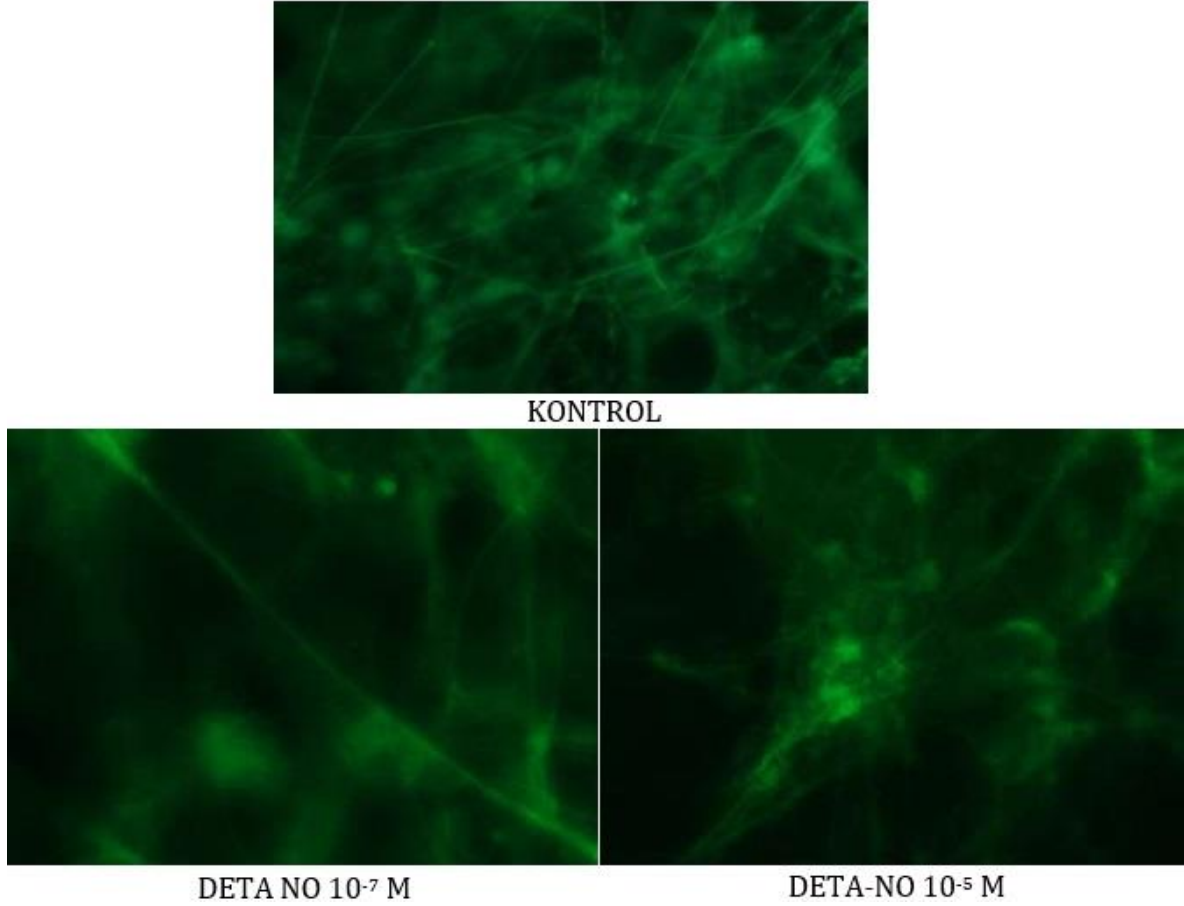
Hücre kültür ortamına uygulanan NO donörü DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M), post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde hücre iskeleti aktinin reorganizasyonu üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.6.2.1.).



**Şekil 4.6.2.1.** 3T3-L1 hücrelerin post-konfluent (0. gündeki) aktin hücre iskeleti üzerine  $10^{-7}$  M ve  $10^{-5}$  M DETA-NO'nun etkisi. DETA-NO, hücre iskeleti aktini üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı. DETA-NO uygulamasından sonra ortalama 1 saat içinde görüntü alınmıştır. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.2.2. 0-2. Gün:

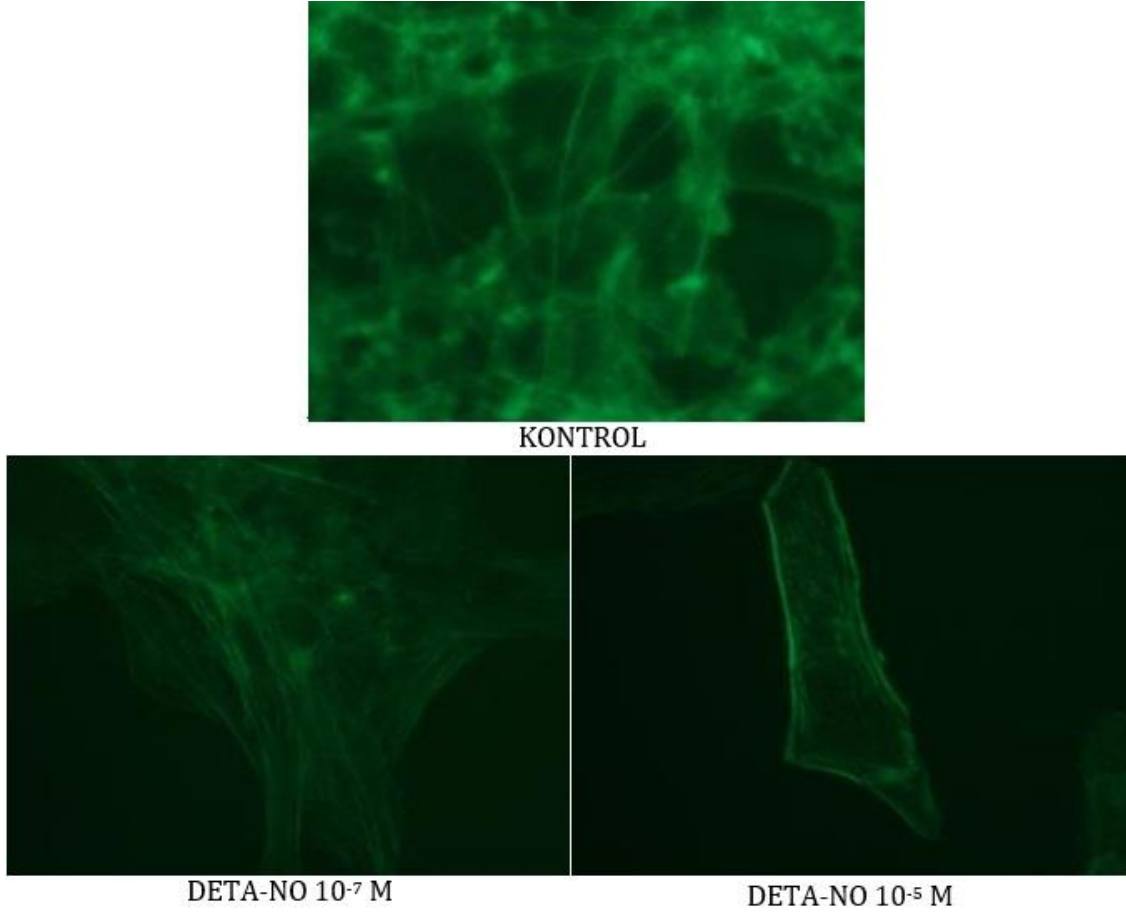
NO donörü DETA-NO'nun ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 2 gün boyunca uygulanması da hücre iskeleti aktininde herhangi bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.6.1.2.).



**Şekil 4.6.2.2.** 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-2.günü DETA-NO uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. DETA-NO,  $10^{-7}$  M (sol) ve  $10^{-5}$  M (sağ) hücre iskeleti aktini üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.2.3. 0-4. Gün:

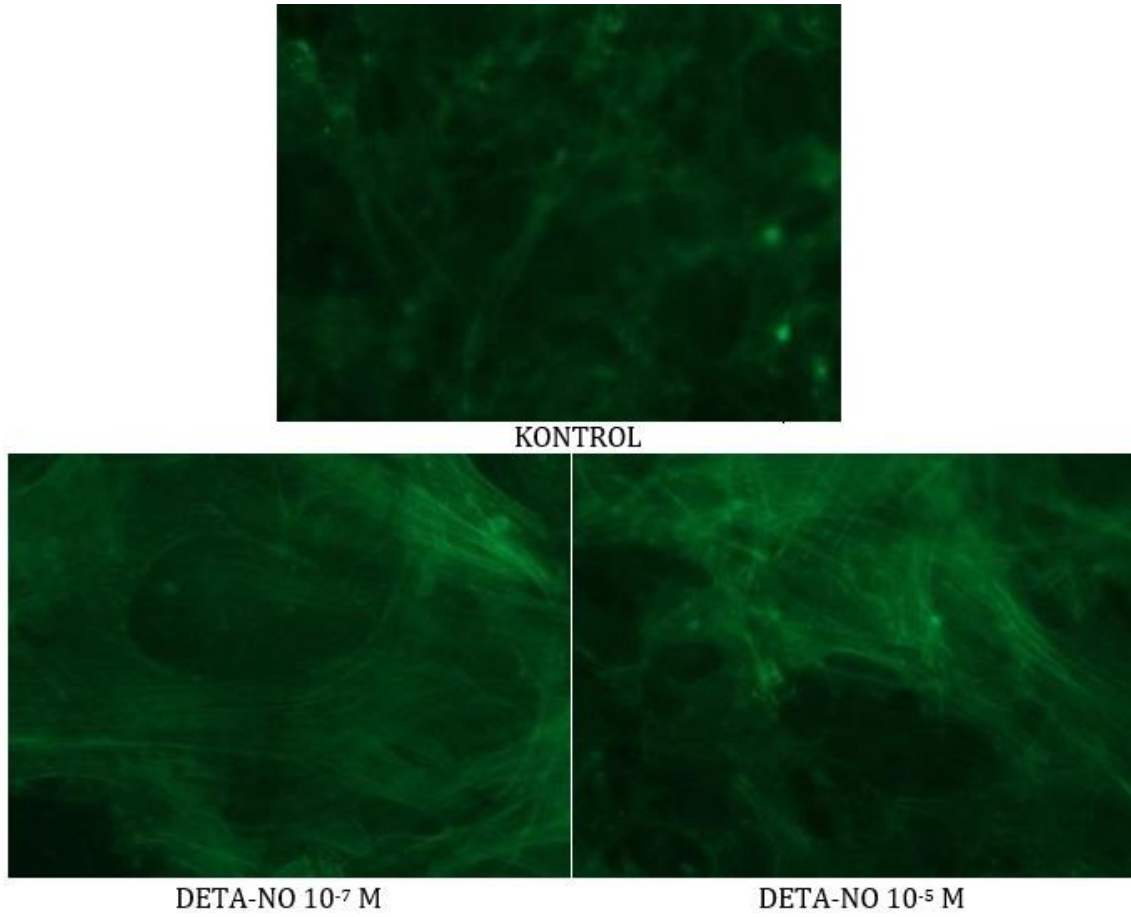
NO donörü, DETA-NO'nun ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 4 gün boyunca uygulanması hücre iskeleti aktininde belirginleşmeler, hücre sınırlarına çekilmeler, stres liflerinin ve hücre hacminde artışlar oluşturdu (Şekil 4.6.2.3.).



**Şekil 4.6.2.3.** 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-4.günü DETA-NO ( $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.2.4. 0-8. Gün:

Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 8 gün boyunca NO donörü DETA-NO ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) uygulanması hücre iskeleti aktininde belirginleşmeler, hücre sınırlarına çekilmeler, stres liflerinde belirginleşme ve hücre hacminde artışlar oluşturdu (Şekil 4.6.2.4.).

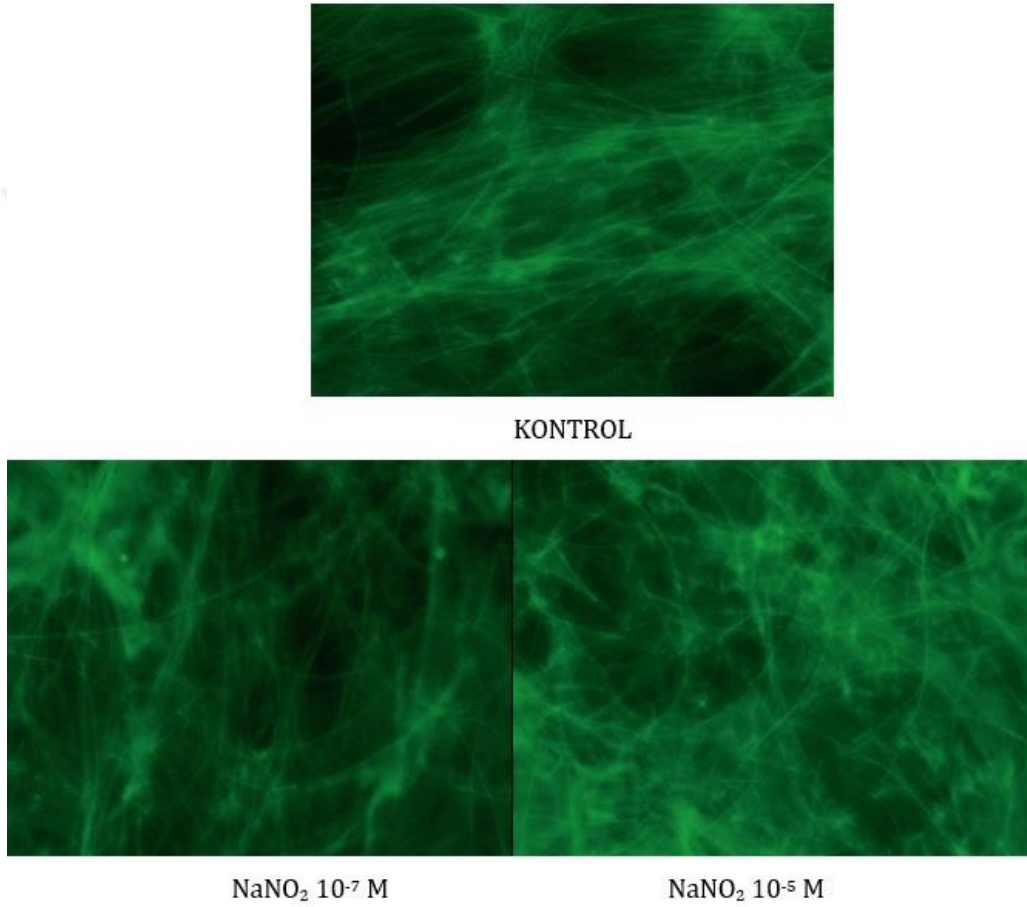


**Şekil 4.6.2.4.** 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-8. günü DETA-NO ( $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

### 4.6.3. NaNO<sub>2</sub>'in Preadipositlerin Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi

#### 4.6.3.1. 0.Gün

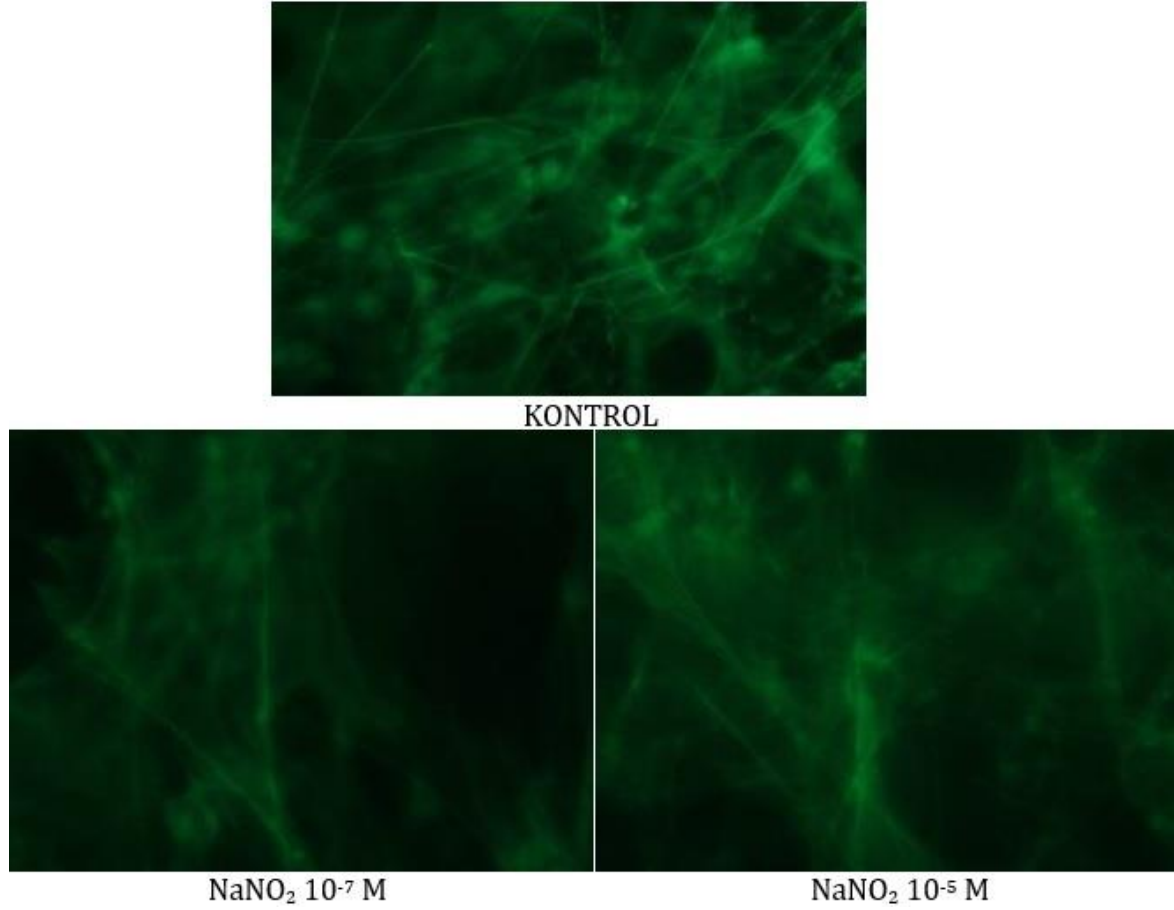
Hücre kültür ortamına uygulanan NO donörü NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M), post konfluent 3T3-L1 hücrelerinde hücre iskeleti aktininin reorganizasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 4.6.3.1).



**Şekil 4.6.3.1.** Diferensiyasyon protokolünün 0. günü NaNO<sub>2</sub> 'in (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup> M) preadipositlerin aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. DETA-NO uygulamasından sonra ortalama 1 saat içinde görüntü alınmıştır. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.3.2. 0-2.Gün:

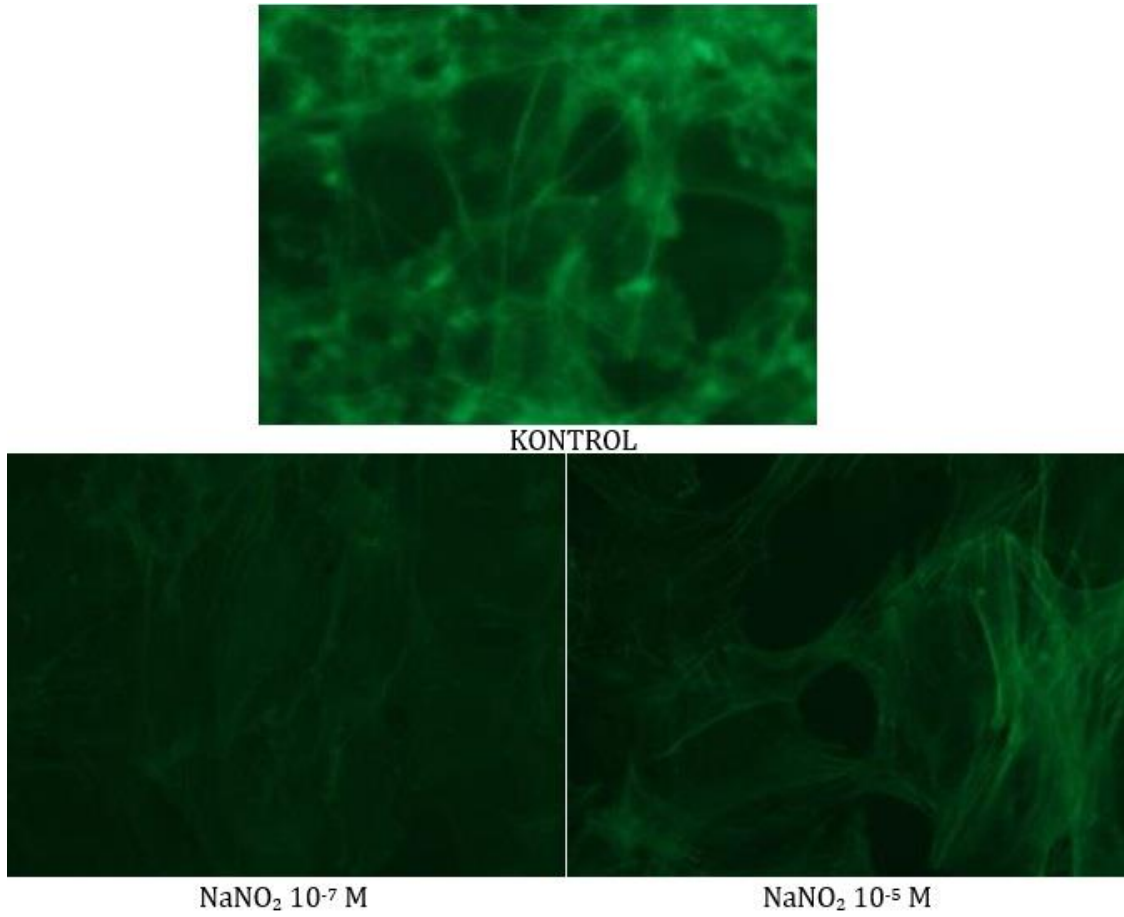
Hücre kültür ortamına 2 gün boyunca uygulanan NO donörü  $\text{NaNO}_2$  ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M), post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinin hücre iskeleti aktinin organizasyonu üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.6.3.2.).



**Şekil 4.6.3.2.** 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyon protokolünün 0-2. günü boyunca uygulanan  $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M  $\text{NaNO}_2$ 'nin etkisi. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.3.3. 0-4. Gün:

NO donörü, NaNO<sub>2</sub>'nin (10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M), post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 4 gün boyunca uygulanması hücre iskeleti aktininde belirginleşme ve stres liflerinin oluşumunda artış ortaya çıkardı (Şekil 4.6.3.3.).

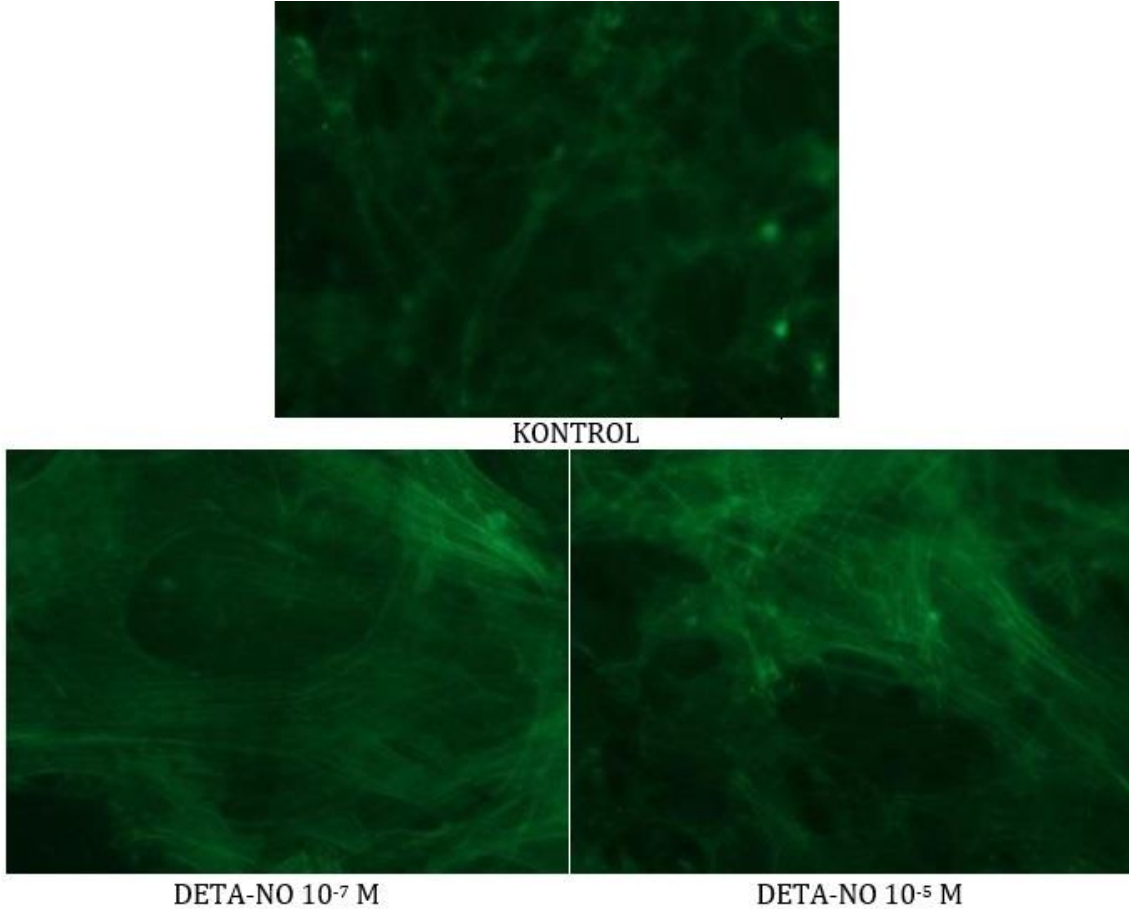


**Şekil 4.6.3.3.** 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-4. günü NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.



#### 4.6.3.4. 0-8. Gün:

NO donörü NaNO<sub>2</sub>'in (10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M), post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 8 gün boyunca uygulanması hücre iskeleti aktininde belirginleşmeye neden oldu ve stres lifi oluşumunu artırdı (Şekil 4.6.3.4.).



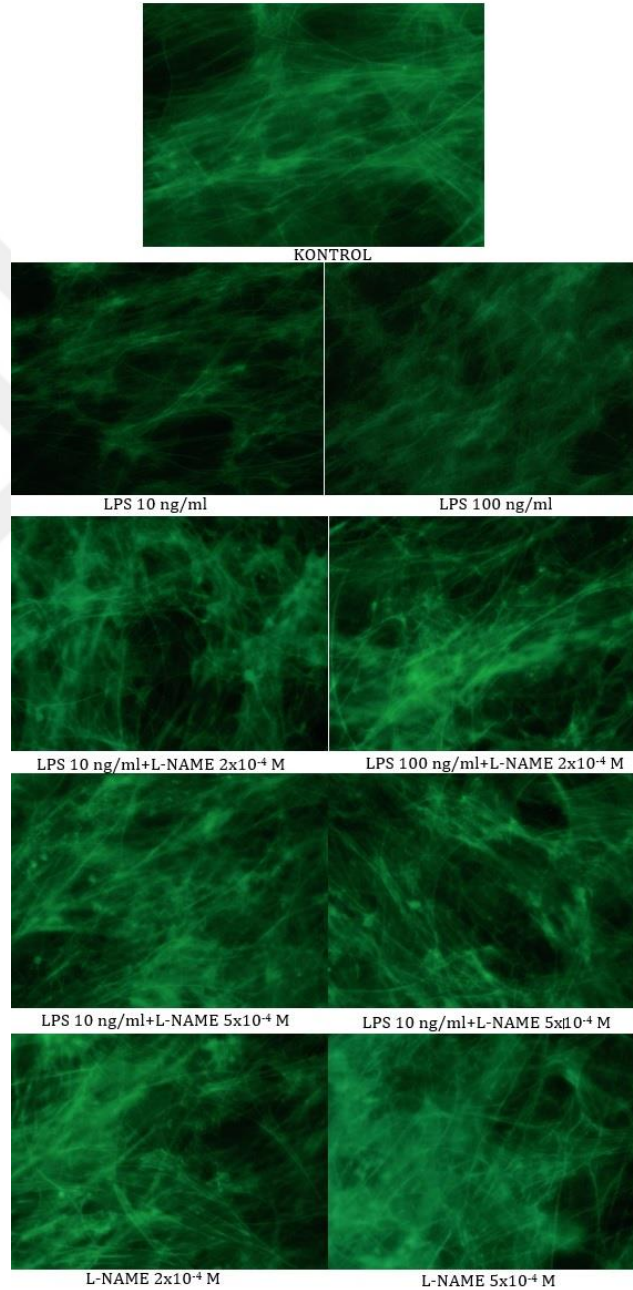
**Şekil 4.6.3.4.** 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyonun 0-8. günü NaNO<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-5</sup> M) uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.



#### 4.6.4. LPS Uygulamasının Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi ve bu Etkinin L-NAME Varlığında Ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.6.4.1. 0. Gün:

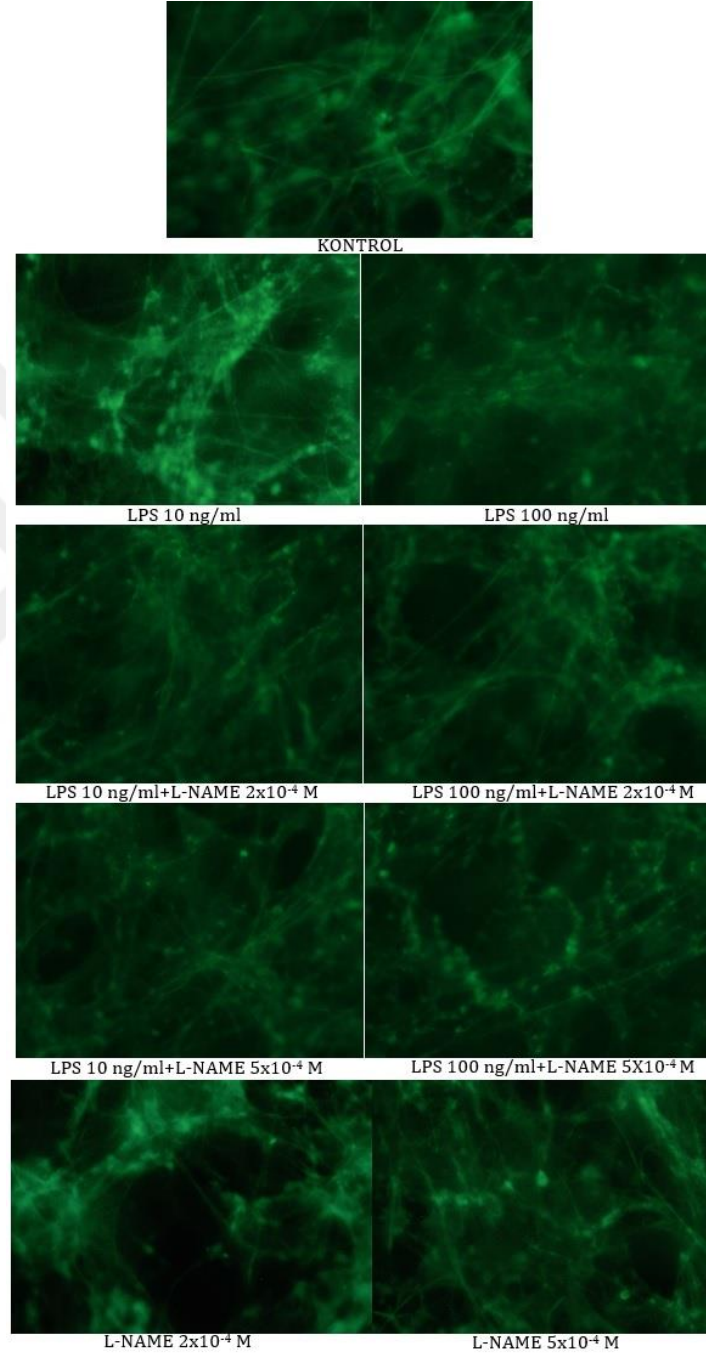
Hücre kültür ortamına uygulanan LPS ne tek başına ne de L-NAME ile kombine olarak uygulandığında 0. günde 3T3-L1 hücrelerinde hücre iskeleti aktininin reorganizasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadı.



**Şekil 4.6.4.1.** Diferensiyasyon protokolünün 0. günü LPS ve L-NAME uygulamasının aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. LPS (10 ve 100 ng/ml) ve L-NAME'in (2x10<sup>-4</sup> ve 5x10<sup>-4</sup> M) ayrı ayrı ve kombine uygulanmasının aktin hücre iskeleti üzerine etkileri değerlendirildi. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.4.2. 0-2.Gün:

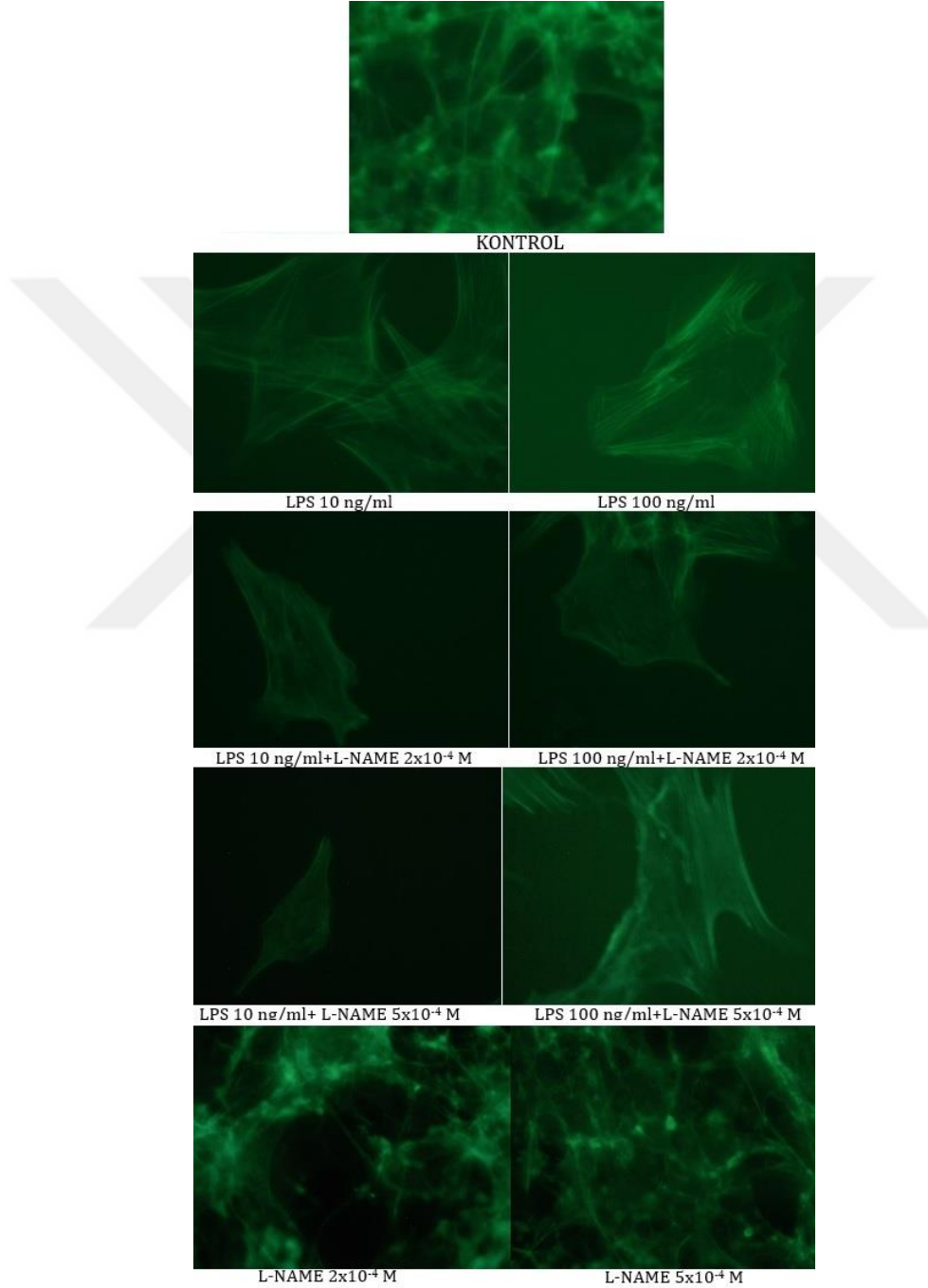
LPS, tek başına uygulandığında aktin hücre iskeletinde belirgin bir etkiye yol açmadı. LPS'in L-NAME ile kombinasyonu da hücre iskeleti organizasyonu üzerine anlamlı bir etki göstermedi.



**Şekil 4.6.4.2.** Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri boyunca LPS ve L-NAME'in aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. LPS (10 ve 100 ng/ml) ve L-NAME (2x10<sup>-4</sup> ve 5x10<sup>-4</sup> M) ayrı ayrı ya da kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.4.3. 0-4. Gün:

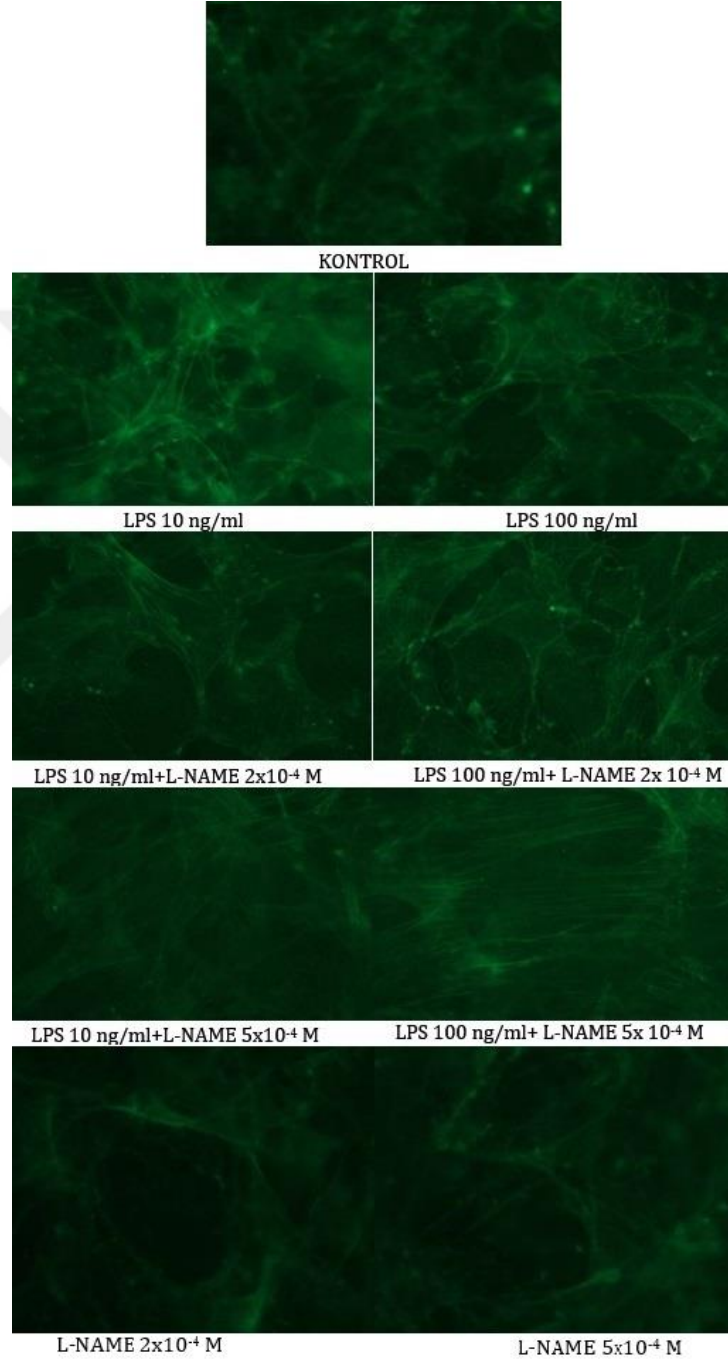
LPS'in 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyon protokolünün 0-4. günü boyunca uygulanması aktin hücre iskeletinde stress liflerinin oluşumunda artış ortaya çıkardı.LPS'in L-NAME ile kombinasyonu bu değişiklikleri ortadan kaldırmadı.



**Şekil 4.6.4.3.** Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günleri boyunca LPS ve L-NAME'in aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. LPS (10 ve 100 ng/ml) ve L-NAME (2x10<sup>-4</sup> ve 5x10<sup>-4</sup> M) ayrı ayrı ya da kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.4.4. 0-8. Gün:

LPS'in 3T3-L1 hücrelerine diferensiyasyon protokolünün 0-8. günü boyunca uygulanması stress liflerinin oluşumunda belirgin artış ortaya çıkardı. İlginç olarak NOS inhibitörü L-NAME'in LPS ile kombine edilmesi uygulanan her iki konsantrasyonda da stress fiberlerinin oluşumunu arttırmış gibi görünmektedir (şekil 4.6.4.4.).



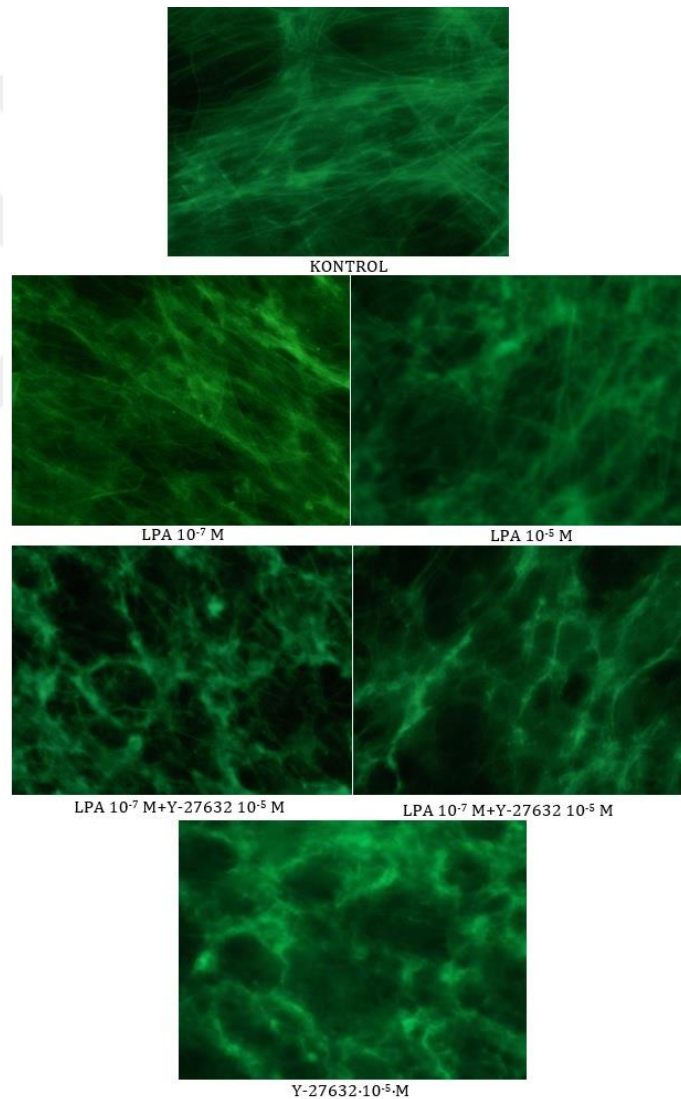
**Şekil 4.6.4.4.** Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günleri boyunca LPS ve L-NAME'in aktin hücre iskeleti üzerine etkisi. LPS (10 ve 100 ng/ml) ve L-NAME (2x10<sup>-4</sup> ve 5x10<sup>-4</sup> M) ayrı ayrı ya da kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.



#### 4.6.5. Lizofosfatidik Asidin Preadipositlerin Aktin Hücre İskeleti Üzerine Etkisi ve Bu Etkinin Y-27632 varlığında ya da Yokluğunda Değerlendirilmesi

##### 4.6.5.1. 0.Gün:

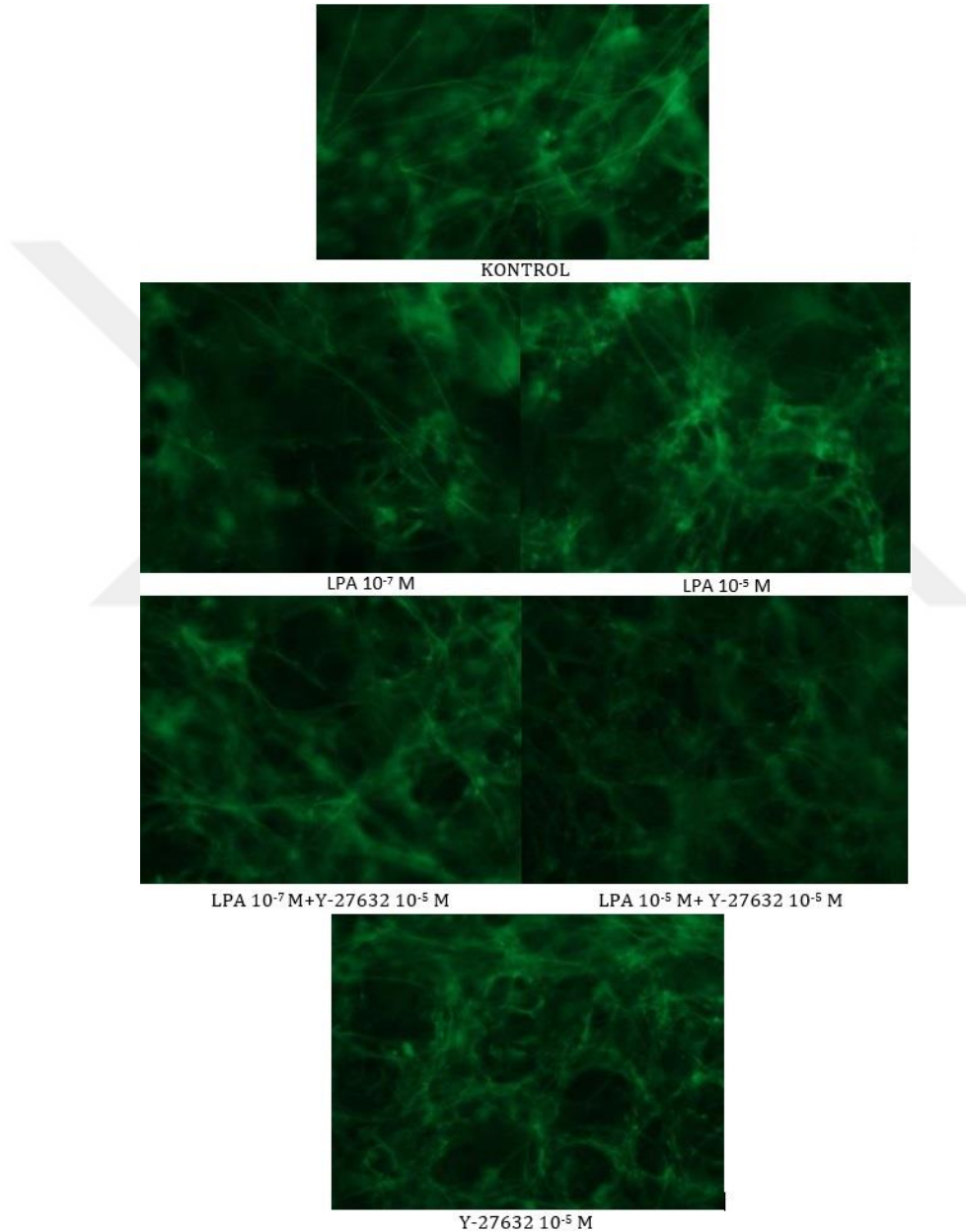
RhoA aktivatörü LPA'nın hücre kültür ortamına  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M konsantrasyonlarda uygulanması 3T3-L1 hücre iskeleti aktinin organizasyonu üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadı. Buna karşın, LPA'nın Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ile kombinasyonu aktin hücre iskeletinde belirgin değişikliklere yol açtı. Y-27632, stress fiberlerinin yapısında bozulmalara yol açarak aktinin kortikal aktin halinde hücre sınırlarına doğru kümelenmesine neden oldu (Şekil 4.6.5.1). Y-27632'nin tek başına uygulanması kortikal aktin oluşumunu arttırdı.



**Şekil 4.6.5.1.** Diferensiyasyon protokolünün 0. günü LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri. LPA ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M) ile Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ayrı ayrı ve kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.5.2. 0-2. Gün:

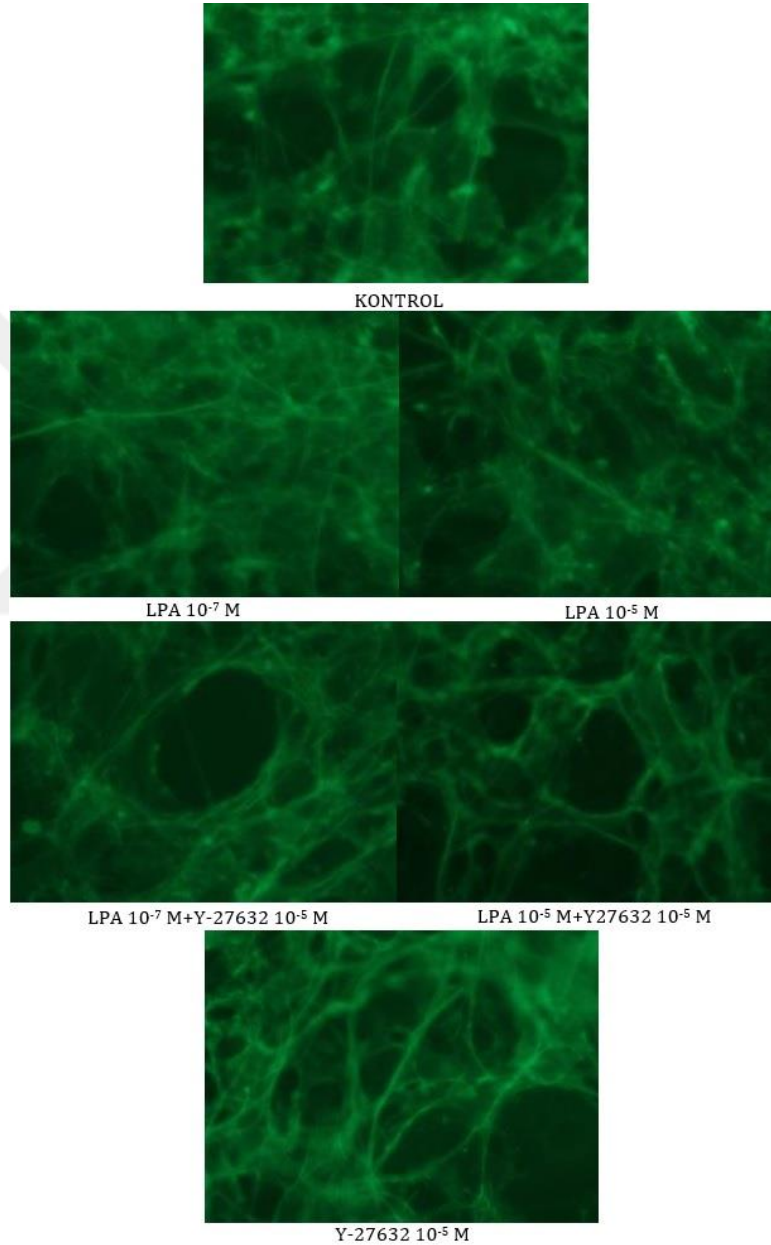
Lizofosfatidik asidin (LPA,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 2 gün boyunca uygulanması stress fiberlerinin miktar ve yoğunluğunda artışa yol açtı. Y-27632 ( $10^{-5}$  M), LPA'nın indüklediği stress fiberlerindeki bu artışı önledi ve kortikal aktin liflerinde artışa yol açtı. (Şekil 4.6.5.2.).



**Şekil 4.6.5.2.** Diferensiyasyon protokolünün 0-2. günü boyunca LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri. LPA ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M) ile Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ayrı ayrı ve kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.5.3. 0-4. Gün:

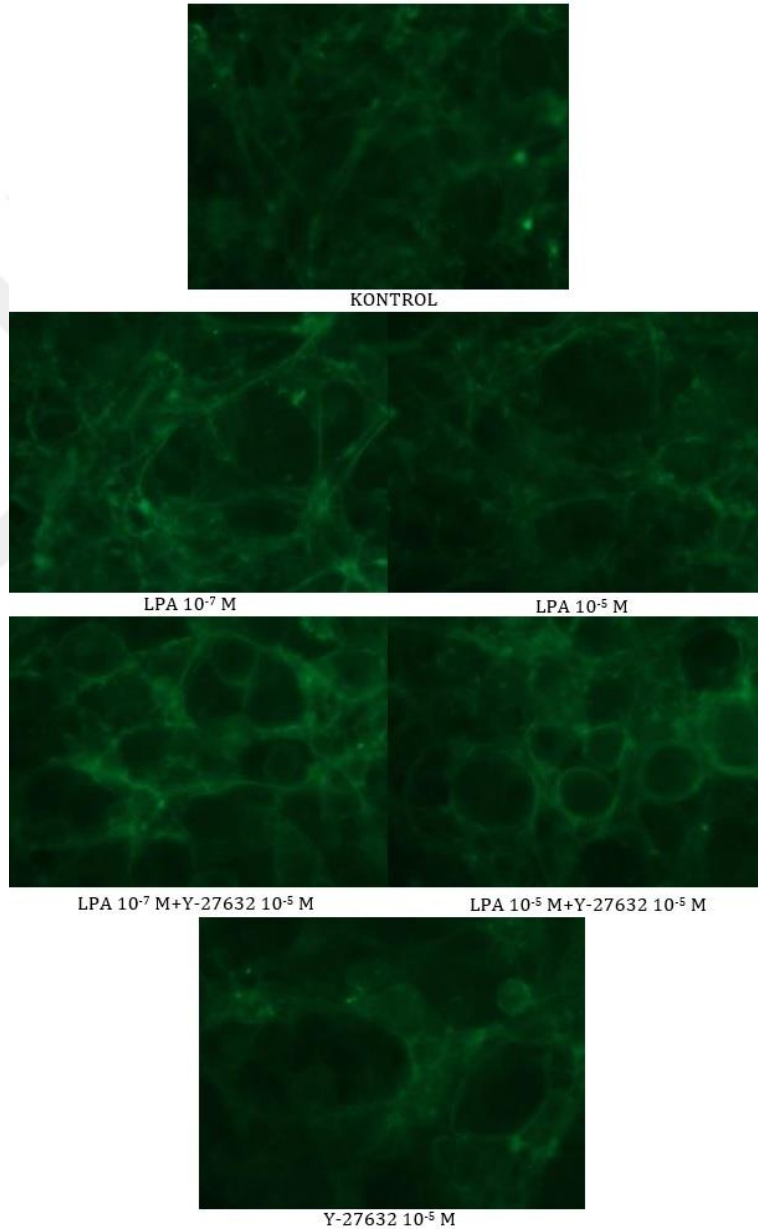
Rho-kinaz enzimini aktive ettiği bilinen lizofosfatidik asidin (LPA,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 4 gün boyunca uygulanması aktin hücre iskeleti reorganizasyonunda değişikliğe yol açarak aktin stress fiberlerinde kümelenmeler oluşturdu. Y-27632 ( $10^{-5}$  M), LPA'nın indüklediği bu kümelenmeyi önledi ve kortikal aktin liflerinde artışa yol açtı (Şekil 4.6.5.3.).



**Şekil 4.6.5.3.** Diferensiyasyon protokolünün 0-4. günü boyunca LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri. LPA ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M) ile Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ayrı ayrı ve kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.

#### 4.6.5.4. 0-8. Gün:

Rho-kinaz enzimini aktive ettiği bilinen lizofosfatidik asidin (LPA,  $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M) post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 8 gün boyunca uygulanması hücre iskeleti aktininin kortikal aktin lifleri dominant olacak şekilde reorganize olmasını azalttı. Y-27632 ( $10^{-5}$  M), aktin liflerinde LPA tarafından oluşturulan bu azalmayı önledi ve kortikal aktin liflerinde belirgin artışa yol açtı (Şekil 4.6.5.4.).



**Şekil 4.6.5.4.** Diferensiyasyon protokolünün 0-8. günü boyunca LPA ile Y-27632'nin 3T3-L1 hücrelerin aktin hücre iskeleti üzerine etkileri. LPA ( $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  M) ile Y-27632 ( $10^{-5}$  M) ayrı ayrı ve kombine olarak uygulandı. Floresan boya, Oregon-Green Phalloidine, X40 büyütme.



## TARTIŞMA

Bu tez, yağ hücre metabolizmasında önemli etkileri olan nitrik oksidin (NO) 3T3-L1 preadiposit hücre hatlarında diferensiyasyon, proliferasyon ve hücre iskeleti aktininin organizasyonu üzerine etkilerini ortaya koymak ve eğer bir etki gözlenirse bu etkinin yine yağ hücresi metabolizmasında esaslı katkıları olduğu gösterilen Rho/ROCK (Rho/Rho-kinaz) yoluyla ile olan ilişkisini ortaya koymak için gerçekleştirildi.

Bu amaçla 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe bir NO donörü olan DETA-NO ve hücre kültür ortamında NO'ye dekompoze olduğunu düşündüğümüz sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) kullanıldı. NO sentezini arttıran ajan olarak LPS, NO sentezini bloke etmek için bir NOS inhibitörü olan L-NAME ve ayrıca RhoA aktivatörü olarak LPA ve trombin ile RhoA inhibitörü olarak C3 ekzoenzim; ROCK inhibitörleri olarak Y-27632 ve H-1152 kullanıldı.

3T3-L1 hücrelerinin proliferasyonunun değerlendirilmesi amacı ile MTT proliferasyon analizi yapıldı. Adiposit diferensiyasyonu Oil-Red O boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Rho-kinaz enzim ekspresyonları ve aktivitesinin değerlendirilmesinin yanı sıra iNOS enzim ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacı ile Western blot yöntemi kullanıldı. Bunun yanı sıra Western blot yöntemi ile ROCK aktivitesi ölçümü için LIM kinaz enziminin fosforilasyonu değerlendirildi. RhoA aktivasyonunun değerlendirilmesi kolorimetrik olarak G-LISA yöntemi ile yapıldı. Nitrik oksit düzeylerinin değerlendirilmesi amacı ile 3T3-L1 hücrelerinin kültür medyumlarındaki total nitrit/nitrat düzeyleri Griess yöntemi ile ölçüldü.

Çalışmamızda 3T3-L1 hücrelerinin diferensiyasyon sürecinin önemli bir parçası olduğu gösterilen mitotik klonal ekspansiyon evresinde gözlenen hücre proliferasyonu üzerine nitrik oksidin etkisinin değerlendirilmesi amacı ile DETA-NO ve  $\text{NaNO}_2$  ile nitrik oksit donasyonu yapıldı. Hem DETA-NO ve hem de  $\text{NaNO}_2$  uygulanan konsantrasyonlarda hiçbir zaman aralığında proliferasyon üzerine etki göstermedi. Hücre kültür ortamına uygulanan LPS, 0-2 gün uygulamasında proliferasyon üzerine etki göstermedi ancak 0-4 gün uygulandığında proliferasyonu belirgin olarak inhibe etti. L-NAME'in LPS ile kombine edilmesi bu inhibisyonu ortadan kaldırdı. L-NAME'in tek başına uygulanması ise 0-4 gün uygulamasında  $5 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonda proliferasyonu inhibe etti. LPS'in proliferasyon üzerine inhibitör etkisinin L-NAME tarafından ortadan kaldırılması, LPS'in preadiposit proliferasyonu üzerine inhibitör etkisinin iNOS stimülasyonu yolu ile olabileceğini düşündürmektedir. Seçici olmayan NOS inhibitörü L-NAME'in 0-4. günde tek başına uygulandığında proliferasyonu inhibe etmesi, 3T3-L1 hücrelerinde bazal şartlarda salıverilen sitoprotektif ve antioksidan etkili fizyolojik nitrik oksidin sentezinin L-NAME tarafından inhibisyonuna bağlı olabilir. Fizyolojik şartlarda pikomolar düzeyde sürekli olarak salıverilen nitrik oksidin sitoprotektif etki ortaya koyduğu bilinmektedir [633, 634]. Bu bulgular ışığında eNOS tarafından salıverilen fizyolojik bazal nitrik

oksidin mitotik klonal ekspansiyon evresinde görülen 2 tur preadiposit proliferasyonunun devamlılığını destekleyici bir rol oynuyor olabileceği akla gelmektedir.

Proliferasyon süreci üzerine Rho/Rho-kinaz yolağının etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile RhoA aktivasyonu yapmak için LPA'nın proliferasyon aşamasının süregeldiği 0-2 ve 0-4. günlerde uygulandığında, LPA'nın hücre proliferasyonunu belirgin ve anlamlı olarak stimüle ettiği görüldü. LPA tarafından proliferasyonda oluşturulan bu stimülasyon ROCK inhibitörü Y-27632 tarafından geri çevrildi. ROCK inhibitörü Y-27632 tek başına uygulandığında 0-2. gün arası uygulamada etkisiz bulunurken, 0-4 günler arasında proliferasyonu belirgin olarak inhibe etti. Trombin ise 0-2 ve 0-4. günler arası uygulandığında proliferasyonu anlamlı olarak stimüle etti. Y-27632 ile kombine edilmesi proliferasyon üzerine trombinin oluşturduğu stimülasyonu ortadan kaldırdı. Bu bulgular, LPA ve trombin tarafından proliferasyonda oluşturulan artışın Rho/ROCK yolağı aracılığı ile olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra Rho/Rho-kinaz yolağının adipogenezi baskılayıcı etkisini diferensiyasyon sürecinin ilk kısmı olan mitotik klonal ekspansiyon üzerinden gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir.

Bunun yanı sıra terminal diferensiyasyon sürecinin bitmiş olduğu kabul edilen 8. gün yapılan MTT boyamasının sonuçları değerlendirildiğinde diferensiyasyon ve proliferasyon deneylerinin neredeyse tamamında etkisiz olduğu gösterilen DETA-NO ve NaNO<sub>2</sub>'in MTT boyama sonuçları üzerinde de kontrole göre etkisiz bulunduğu görüldü. Bunun yanı sıra LPS'in 0-8. gün uygulandığı grupta tüm dozlarda MTT boyama sonuçlarında kontrole göre anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak L-NAME, 0-8 gün uygulamasında her iki konsantrasyonda da MTT boyama sonuçlarını belirgin olarak düşürdü. L-NAME'in 0-4 gün aralığında proliferasyonunu inhibe ederek sayısal olarak artışını engellediğini varsayabileceğimiz 3T3-L1 hücrelerinin diferensiyasyonu üzerine belirgin bir inhibitör etki yaptığı da göz önüne alınırsa başlangıçta çelişkili görünebilecek bu durumun rahatlıkla açıklanabileceği ortadadır. Denilebilir ki, L-NAME uygulaması hem proliferasyonu baskılayarak diferensiyasyon sürecinin başlangıcındaki hücre sayısını azaltmış ve hem de diferensiyasyonu baskılayarak 8. gün hücre kültür ortamındaki preadiposit ve olgun adiposit sayısının azalmasına yol açmıştır. Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve H-1152 ise 8. gün MTT boyama sonuçlarını belirgin olarak düşürmüştür. Y-27632 ve H-1152'nin diferensiyasyonu arttırdığı göz önüne alınca bu bulgular uyumlu görünmektedir. Trombin, 0-8. günler arası uygulamada her iki konsantrasyonda da MTT boyama sonuçlarını belirgin olarak arttırdı. Trombinin oluşturduğu artış, Y-27632 tarafından ortadan kaldırıldı. MTT proliferasyon analizinin temel uygulama prensibi gözönüne alındığında 0-8. gün uygulanan ajanların 8. gün sonunda MTT analizinin yapılması diferensiyasyon üzerine farklı bir bakış açısından yorum yapabilmeyi sağlayacaktır: Buna kısaca değinmek gerekirse, MTT'nin hücre içinde mitokondriyal redüktazlar tarafından formazana çevriminin değerlendirildiği bu analiz 8. günde hücre kültür ortamındaki olgun adiposit sayısı arttıkça daha düşük bir sonuç vermelidir.

Çünkü, olgun adipositlerde mitokondri sayısı preadipositlere göre belirgin olarak düşmektedir. Bunun yanı sıra, diferensiyasyon sürecinin erken evrelerinde preadipositlerdeki oldukça aktif olan mitokondriler olgun adipositlerde daha az aktiftir [635, 636]. Bu açıdan bakıldığında 8. gün MTT ölçüm sonuçlarında azalma olması, diferensiyasyonun arttığını gösteren indirekt bir gösterge olarak değerlendirilebilir. Bu yüzden adipogenez arttırdığı gösterilmiş olan Rho-kinaz inhibitörlerinin uygulandığı gruplarda 8. gün MTT sonuçlarının belirgin şekilde azalmış olması anlamlıdır. Bunun yanı sıra, Rho-kinazı aktive ettiğini bildiğimiz trombinin de MTT sonuçlarında belirgin artışa yol açması ve bu artışın Y-27632 ile ortadan kaldırılması da bu bulguyu destekler niteliktedir.

Çalışmamızda NO donörü DETA-NO'nun 0-2. gün arasında hücre kültür ortamına uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin diferensiyasyonunda artışa yol açtığı görüldü. Elde edilen bu sonuç daha önce yapılan başka bir çalışmada insan preadipositlerine DETA-NO uygulaması sonucu adipogenezde artış olduğunu gösterilmesi ile [637] uyumludur. Ancak, deney serilerinin diğer günlerinde uygulanan DETA-NO, 3T3-L1 hücrelerinin diferensiyasyonu üzerine herhangi bir etki göstermedi. Bu durum nitrik oksidin preadiposit diferensiyasyonunun erken evresine karışan yolaklar aracılığı ile etki oluşturmuş olacağını akla getirmektedir. Çalışmamızda hücre kültür ortamında nitrik okside dekompoze olduğunu düşündüğümüz  $\text{NaNO}_2$ , test edilen günlerde preadiposit diferasyonu üzerine herhangi bir etki göstermedi. Bu bulguyu proliferasyon deneylerinde sodyum nitritin herhangi bir etkisinin gösterilememesi ile birlikte değerlendirince, bu durumun kullanılan test ajanının fizikokimyasal özellikleri ile ilgili olabileceği akla gelmektedir. Test edilen iki nitrik oksit donöründen DETA-NO diferensiyasyon üzerine etki gösterirken, sodyum nitritin etki göstermemesi, hücre kültür ortamında sodyum nitritin nitrik okside yetersiz dekompozisyonu ile açıklanabilir. Bunun ortaya konulması için NO düzeylerinin ölçüldüğü daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sodyum nitritin sulu ortamda iyonize olması sonucu nitrit anyonu açığa çıkar. Nitrit iyonları, uygun şartlarda (asit pH'da) indirgenerek NO'a dönüşebilir. Ancak bizim deney şartlarımızda bu dönüşümün ne derecede olduğu belli değildir. Nitritlerin oral alımı sonucu midenin asit ortamında nitrik okside dönüşümü gösterilmiştir [638]. Ancak bizim çalışmamızda hücre kültürü koşullarındaki nötral pH değerinde bu dönüşüm gerçekleşmemiş olabilir. Mide asit ortamı dışında  $\text{NO}_2^-$  iyonları NO'e dönüşebilir. Örneğin iskemik kalp yetmezliğinde asidotik ve ileri derecede indirgenmiş vücut koşullarında nitrit anyonundan nitrik oksit sentaz bağımsız olarak nitrik oksit üretimi gösterilmiştir [639]. Uygulanan diğer nitrik oksit donörü olan DETA-NO'nun nitrik oksit açığa çıkartması yüksek olasılıktır. Zaten çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak preadipositlerin diferensiyasyonunu stimüle ettiğini gösterdik.

Yapılan çeşitli çalışmalarda hem beyaz ve hem kahverengi yağ dokuda eNOS ve iNOS izoformlarının eksprese edildiği gösterilmiştir [28, 29, 61, 62]. Buna ek olarak yapılan *in vitro*

çalışmalarda hücre kültür ortamında NO varlığı sıçan kahverengi adipositlerinde proliferasyonu inhibe etmekte ve PPAR $\gamma$  (peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör  $\gamma$ ) ve “uncoupling protein 1” (kenetsizleme proteini 1) gibi adipojenik marker genlerin ekspresyonunun stimülasyonuna yol açmaktadır [52, 612]. İlginç olarak, NO primer hayvan yağ doku kültürleri ile 3T3-L1 gibi klon hücre kültürlerinde farklı etkiler göstermektedir. NO'in primer sıçan kahverengi yağ doku preadipositlerinin ve sıçan beyaz yağ doku preadipositlerinin diferensiyasyonunu stimüle ettiği [31], 3T3-L1 preadipositlerinde ise diferensiyasyonu süprese ettiği bildirilmiştir [32]. Bizim çalışmamızda da 3T3-L1 hücre kültürüne iNOS ekspresyonunu artıran bakteriyel lipopolisakkarid (LPS) uygulaması, genel olarak diferensiyasyonu süprese etti. Ancak, başka çalışmalarda kronik inflamasyonda ekspresyonu artan iNOS enziminin adipogenezisi arttırdığı [631] ve NOS inhibitörü L-NMMA (N<sup>G</sup>-monometil L-arginin) uygulamasının subkütan yağ dokuda lipolizi stimüle ettiği gösterilmiştir [33]. Bunun yanı sıra, T37i fibroblast hücre kültüründe NOS inhibitörü uygulamasının hücre kültürüne birlikte uygulanan interferon, TNF- $\alpha$  ve LPS'nin neden olduğu lipolizi %30 arttırdığı ve bu etkinin iNOS knock-out farelerden elde edilen yağ doku eksplantlarında ortadan kalktığı gösterilmiştir [34]. Buna karşın, başka bir çalışmada ise adipositlerde NOS inhibitörü DPI (Difenileniyodonyum klorid) uygulamasının hem bazal ve hem de dibutiril c-AMP tarafından stimüle edilen lipolizi azalttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak bu hücrelere NO donörü SNAP (S-nitrozo-N-asetilpenisilamin) uygulaması hem bazal ve hem de dibutiril c-AMP ile stimüle edilen lipolizde DPI tarafından oluşturulan azalmayı ortadan kaldırmıştır [640]. Bütün bu sonuçların ışığı altında bakıldığında adiposit diferensiyasyonu üzerine NO'nun etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamış gibi görünmektedir. Zira elde edilen bulgular çalışmadan çalışmaya çelişkili bir görünüm sergilemektedir. Bu durumda etkili olabilecek faktörler değerlendirildiğinde deney şartları, NO'nun üretim ve/veya salıverilme şekli, deney metodolojisi (in vivo-in vitro), NO'nun konsantrasyonu, doku ya da hücrelerin NO'e maruziyet süresinin uzunluğu, zamansal olarak maruziyetin başlama noktasının ve maruz kalınan periyodun preadipositlerin diferensiyasyon sürecinin hangi aşamasında olduğu gibi pek çok etken, ortaya çıkan deneysel sonuçlardaki bu belirgin sapmanın altında yatıyor olabilir. Buna ek olarak ileri sürülebilecek başka bir sav ise NO'in hücre tipine göre farklı etkiler göstermesinin yanı sıra, ortamdaki inflamasyonun düzeyine göre değişkenlik gösteriyor olabileceğidir. Ancak, söylenebilecek diğer bir şey ise LPS'nin diferensiyasyon üzerine inhibe edici etkisini NO dışında bir yolak aracılığı ile ortaya koymuş olabileceğidir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ışığında bu LPS'nin preadiposit diferensiyasyonu üzerine inhibe edici etkisini Rho/Rho-kinaz aracılığı ile oluşturduğu öne sürülebilir.

Nonspesifik NOS inhibitörü L-NAME'in (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil ester) *ob/ob* ve *db/db* obez farelere uygulanmasının hayvanlarda hem ağırlık kaybına ve hem de gıda alımında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir [60]. İnsan preadiposit hücre kültüründe kronik olarak NO donasyonu

yapılmasının adiposit diferensiyasyonunu arttırdığı bulunmuştur [637]. Başka bir çalışmada ise primer kahverengi adipositlerde SNAP ve GSNO (S-nitrozoglutasyon) gibi NO donörleri uygulanarak kronik NO donasyonu yapılması proliferasyonu inhibe ederken adipojenik diferensiyasyonu arttırmış ve bu artış L-NAME tarafından ortadan kaldırılmıştır [612]. Bu sonuçla uyumlu bir şekilde, bizim çalışmamızda da L-NAME uygulaması ile NOS inhibisyonu yapılması her iki konsantrasyonda da 0-2. gün dışındaki tüm zaman aralıklarında 3T3-L1 hücrelerinin diferensiyasyonunu anlamlı bir şekilde baskıladı. Çalışmamızda gösterdiğimiz bu bulgu, nitrik oksidin obezite gelişimine yol açan mekanizmaların bir parçası olarak rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir. Diferensiyasyonun baskılanması yağ dokunun stromal vasküler fraksiyonundaki preadipositlerden yeni yağ hücrelerinin oluşum hızında düşüşe yol açan ve dolayısı ile yağlanma artışında yavaşlamaya neden olan bir durumdur. iNOS eksik (-/-) farelerde büyüme normal olmasına rağmen yağ doku kitlesinde anlamlı azalma olmuştur [641].

Çalışmamızda RhoA aktivatörü olarak bilinen LPA, hücre kültür ortamına 0-2 boyunca gün uygulandığında diferensiyasyonu baskıladı ve bu baskılanma Y-27632 tarafından geri çevrilemedi. Bu durum iki olasılığı ima etmektedir: LPA ya 0-2 gün ortaya koyduğu etkiyi Rho/Rho-kinaz yolağı dışında bir etki ile ortaya koymaktadır ya da diferensiyasyon protokolünün 0-2. günleri arasında diferensiyasyonu indüklemek için kullanılan kokteyl (IBMX, deksametazon ve insülin) Rho/Rho-kinaz yolağı ile etkileşmektedir. LPA, deney protokolünün diğer günlerinde ise diferensiyasyonu azaltmakla birlikte bu azalma anlamlı bulunmadı. Literatürde LPA'nın kültüre endotelial hücrelerde eNOS aktivasyonu yaptığı gösterilmiştir [642, 643]. Bu durum da dikkate alındığında LPA'nın RhoA aktivasyonu yapmasına rağmen bir yandan da farklı bir mekanizma ile eNOS aktivasyonu yapıyor olma olasılığı da düşünülmelidir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda RhoA/ROCK sinyal yolağını indüklediği gösterilen trombinin [644, 645] 3T3-L1 hücre kültür ortamına uygulandığı tüm zaman aralıklarında diferensiyasyonu anlamlı bir şekilde baskıladığını ve Y-27632 ile kombine edilmesinin bu anlamlılığı ortadan kaldırdığını gösterdik. Bundan dolayı, trombinin Rho-kinaz aktivasyonu üzerinden diferensiyasyonu ve dolayısıyla adipogenezisi inhibe etmesi yüksek olasılıktır. Buna ek olarak ROCK inhibitörü Y-27632'nin diferensiyasyon serilerinde tek başına uygulandığında diferensiyasyonu arttırıcı etki göstermesinin yanı sıra diğer bir ROCK inhibitörü olan H-1152'nin de diferensiyasyonu anlamlı olarak arttırdığını gösterdik. Bu bulgu da Rho/Rho-kinaz yolağının adiposit diferensiyasyonunu süprese edici etki gösterdiğini doğrular mahiyettedir.

Öte yandan, Western blot bulgularımıza göre, çalışmamızda indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimini indüklemek için uygulanan LPS'nin birçok inflamatuvar olaya karıştığı gösterilmiş olan Rho-kinaz enziminin [646, 647] ekspresyonunu upregüle ettiğini gösterdik. LPS'nin Rho aktivatörü trombin gibi diferensiyasyonu süprese edici yönde etki gösterdiğini de bulduğumuzu da hesaba katınca LPS, bizim çalışmanın başlangıcında beklediğimiz gibi iNOS indüksiyonu

yapmak yerine Rho/Rho-kinaz yolağını aktive ederek etki oluşturuyor gibi görünmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgunun yanı sıra, L-NAME ön-uygulamasının, LPS uygulaması sonucu ROCK-2 ekspresyonunda ortaya çıkan up-regülasyonu kısmen azaltmakla beraber anlamlılığı tamamen ortadan kaldıramadığını da gösterdik.

Sonuç olarak, LPS 3T3-L1 hücrelerinde ROCK-2 ekspresyonunda artışa yol açmaktadır ve bu up-regülasyon NO dışında başka sinyal yolları aracılığı ile oluyor gibi görünmektedir. Buna ek olarak, NO ve Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki etkileşimi değerlendirmek için hücre kültürü ortamına uygulanan, NO donörü DETA-NO Rho-kinaz enzim ekspresyonları üzerine herhangi bir etki göstermedi. Bu durum iki şekilde yorumlanabilir: Birincisi nitrik oksit belki de direkt olarak Rho-Rho kinaz yolağı ile bir etkileşim ("crosstalk") göstermemektedir. İkincisi ise DETA-NO'nun diferensiyasyon ve proliferasyon üzerine etkisizliği de göz önüne alındığında, DETA-NO ile yeterince bir NO donasyonunun olmaması olasılığıdır.

Çalışmamızda LPS hücre kültür ortamına hem düşük hem de yüksek konsantrasyonda uygulandığında LIM kinaz fosforilasyonunda belirgin artışa neden olduğunu gösterdik. Bu bulgu, LPS'nin inflamatuvar rolü ile uyumludur. Zira çalışmamızda LPS, birçok inflamatuvar süreçte etkin rol oynadığı gösterilen Rho-kinaz enziminin ekspresyonunda da up-regülasyona yol açmıştır. Hücre kültür ortamında NOS inhibitörü L-NAME varlığında LPS tarafından indüklenen Rho-kinaz up-regülasyonunun önlenememesi bu olguya NO dışında başka sinyal yollarının karıştığını düşündürmektedir. Bu durumu destekleyen bir diğer bulgu çalışmamızda hücre kültür ortamında NO donörü DETA-NO tarafından NO donasyonu yapılmasının ROCK enzim ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe yol açmamasıdır. Birçok inflamatuvar süreçte rol oynamasının yanı sıra hücre diferensiyasyonu ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilen [648] TGF-β'nin, fare embriyonik fibroblast ve Swiss 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde ROCK-1 aracılığı ile LIMK-2'nin aktivasyonuna yol açtığı ortaya konulmuştur. Çeşitli hücre tiplerinde proliferasyonu inhibe eden ve hücreleri diferensiyasyona yönlendirdiği ortaya konulan [649] TGF-β'nin, LIMK aktivasyonu sonucu oluşan kofilin fosforilasyonu ile aktin hücre iskeletinin reorganizasyonuna karıştığı bulunmuştur [43]. Bu bizim çalışmamızda LPS tarafından LIM-Kinaz fosforilasyonundaki indüksiyonu ve bu indüksiyonun NO inhibitörü tarafından ortadan kaldırılamamasını açıklayabilecek bir bulgu gibi görünmektedir. Çünkü LPS uygulamasının PC3 (insan prostat epitel hücreleri) hücre kültüründe TGF-β ekspresyon ve salınımını arttırdığı gösterilmiştir [650]. Bunun yanı sıra edinsel bağışıklığın anahtar komponentlerinden birisi olan ve diferensiyasyon sırasında adipositlerde ekspresyonunun arttığı ortaya konulan ve bunun yanı sıra yağ dokuda yaygın olarak eksprese edildiği gösterilen TLR-4'ün de (Toll like receptor-4) [651, 652] LPS'nin bu etkisine katkıda bulunması olasıdır. Günümüzde artık LPS reseptörü olarak kabul edilen TLR-4'ün [653, 654] obez bireylerde yağ dokudaki adipositlerde ekspresyonunun arttığı ve bu artışın yağ doku stromal vasküler fraksiyonundaki monositlerdeki ekspresyonu ile

korele olduğu gösterilmiştir [655]. TLR-4'ün, yüksek yağ içerikli diyetle beslenme gibi durumlarda barsaktan absorpsiyonunun arttığı gösterilen LPS tarafından aktive edildiği ve böylece obezitede gözlenen sistemik düşük düzeydeki inflamasyona neden olduğu ortaya konulmuştur. Bu nokta şu nedenle önem kazanmış gibi görünmektedir: hem LPS ve hem de TLR-4 TGF- $\beta$  ekspresyonunu arttırmaktadır ve artmış olan TGF- $\beta$  nın da LIM-kinaz aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Böylece, ileri sürülebilir ki, Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı, obezitede gözlenen sistemik düşük düzeydeki inflamasyonda stromal vasküler fraksiyondaki fibroblastların olgun adipositlere diferensiyasyonunu engellemektedir.

Bakteriyel bir endotoksin olan LPS, 3T3-L1 hücre kültür ortamına uygulandığında iNOS enzim ekspresyonlarını arttırdığını gösterdik. Bu bulgu literatürle uyumlu ve beklendiği gibidir. Ancak, LPS iNOS enzim ekspresyonlarını arttırmasına rağmen Griess metodu ile yapılan ölçümlerde nitrit/nitrat düzeylerini arttırmadı. Bu ilk bakışta çelişkili gibi görünen bir durumdur. Çünkü iNOS enzim ekspresyonu arttığında bunun ortama salınan NO miktarında ve dolayısı ile total nitrit/nitrat düzeylerinde artışa neden olacağı düşünülebilir. Ancak, literatür değerlendirildiğinde durumun biraz daha karmaşık olabileceği görülecektir: Obezitede beden kitle indeksi ve vücuttaki yağ miktarı ile nitrik oksit metabolitlerinin plazma düzeyleri arasında korelasyon bulunduğu gösterilmiştir [63-65]. Endotoksik şok, sepsis ve periodontit gibi çeşitli infeksiyonların yanı sıra bazı inflamatuvar hastalıklarda nitrit/nitrat gibi kan NO metabolitlerinin düzeyinin arttığı gösterilmiştir [608-610]. Bununla birlikte bu konuda da çelişkili sonuçlar mevcuttur. Örneğin, yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada inflamatuvar bir durum olan periodontitli hastalarda nitrit/nitrat düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir [656]. Buna ek olarak multipl apikal periodontitli ratlarda NO ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı bulunmuş olmasına rağmen serum NO düzeylerinin azalmış olduğu gösterilmiştir [657]. Obezite dahil olmak üzere bütün bu durumlarda ortak olan nokta düşük ya da yüksek düzeyde bir inflamasyonun varlığıdır. Bizim çalışmamızda ise hücre kültür ortamına LPS uygulanması iNOS enzim ekspresyonunda up-regülasyon yapmasına karşın, ölçülen total nitrit/nitrat düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Gram negatif bakteriyemi ve sepsis gibi inflamatuvar durumlarda temel mediyatörlerden birisi olan bakteriyel LPS'nin, akut faz reaksiyonuna karışan birçok başka genin yanı sıra iNOS genini de indüklediği bilinmektedir [658] İlginç bir şekilde, kronik olarak yağ içeriği yüksek diyetle beslenmenin barsak florasının kompozisyonunun değişmesine yol açtığı gösterilmiştir. Bu değişiklik LPS'nin şilomikronlarla birleşmesini arttırır. Bunun yanı sıra barsak permeabilitesini değiştirir ve barsaktan LPS emilimini arttırarak sistemik dolaşımda çok düşük düzeyde endotoksemiye yol açar. Kronik olarak yüksek yağ içerikli diyetle beslenmenin bu mekanizmalar aracılığı ile de obezitede gözlenen inflamasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir [659-663]. Yakın zamanlarda ortaya konulan bu durum metabolik endotoksemi adı verilen bir konseptin ileri sürülmesini sağlamıştır

[659]. LPS tarafından yapılan iNOS indüksiyonunun mekanizması önce LPS'nin etkisiyle TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, interferon  $\gamma$  gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımının indüklenmesi ve bu mediyatörlerin de kombine bir etki ile iNOS indüksiyonu yapması gibi görünmektedir [664]. Yapılan bir çalışmada adipositlerde LPS tek başına uygulandığında iNOS enzim ekspresyonunu attırmasına rağmen, nitrit/nitrat düzeylerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı ancak IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  ile kombine olarak uygulandığında nitrit/nitrat düzeylerinde belirgin artışa yol açtığı gösterilmiştir [70]. Bu bulgu, bizim çalışmamızda gösterdiğimiz veriler ile uyumludur. Bunun yanı sıra, diğer çalışmalar olgun adipositler üzerinde yapılmıştır ancak bizim çalışmamızda LPS fibroblastların sonunda olgun adipositlere dönüştüğü dinamik bir süreç olan diferensiyasyon sırasında farklı zaman noktalarında uygulanmıştır. Ayrıca ortamda TNF- $\alpha$  ve IL-1, IL-6 ve interferon  $\gamma$  gibi proinflamatuvar etkenlerin yokluğunda LPS uygulaması yapılmıştır. Bu etkenler değerlendirildiğinde LPS'nin iNOS proteininin ekspresyonunda up-regülasyon yapmasına rağmen nitrit/nitrat düzeylerinde değişiklik olmaması anlaşılabilir olmaktadır.

Obez diabetik (*ob/ob*) farelerde karaciğer, iskelet kası ve beyaz yağ dokusunda iNOS enzim ekspresyonunun arttığı ortaya konulmuştur [67]. Bu ekspresyon artışına açlık hiperglisemisi ve insülin direnci eşlik etmektedir ve diabetik (*ob/ob*) farelere spesifik iNOS inhibitörü L-NIL (N6-(1-iminoetil)-L-lizin dihidroklorid) uygulanması hem açlık hiperglisemisini önlemiş ve hem de insülin direncini düzeltmiştir [67]. Buna ek olarak, yüksek yağ içerikli diyetle beslenen iNOS<sup>-/-</sup> farelerde iNOS enzimini kodlayan genlerin hedeflenmiş silinmesinin insülin direnci gelişimi ve açlık hiperglisemisine karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir [66]. Birlikte düşünüldüğünde bu sonuçlar nitrik oksidin belki de obezitede gözlenen kronik inflamasyona bağlı olarak gerçekleşen iNOS indüksiyonu nedeni ile insülin direnci gelişiminde rol oynamakta olabileceğini akla getirmektedir. Yüksek miktarda yağ içeren diyet ile beslenen farelerde selektif NOS inhibitörü L-NAME'in kronik olarak uygulanmasının, vücut ağırlığındaki artışı belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir [68]. Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelerde epididimal, subkütan, mezenterik ve karaciğer yağ birikimindeki artış, L-NAME uygulanan farelerde belirgin olarak baskılanmıştır. L-NAME yağ hücrelerinin hacmini ve trigliserit birikimini azaltmıştır. Buna ek olarak L-NAME uygulaması yüksek yağ içeren diyet alan farelerde insülin direncinde düzelmeye neden olmuştur [68]. Nitrik oksit düzeylerinin göstergesi olarak plazma nitrit düzeylerinin değerlendirildiği çalışmalardan birinde hiperkolesterolemisi bulunan Tip 2 diyabetik hastalarda plazma nitrit düzeylerinin belirgin olarak yükseldiği gösterilmiştir [69]. Buna ek olarak 14-19 yaş arası sağlıklı bireylerde plazma nitrit düzeylerinin total vücut yağ miktarı ile sıkı bir şekilde korele olduğu bulunmuştur [64]. Bunun yanı sıra, ratlarda hem beyaz ve hem de kahverengi yağ dokusunda bazal koşullarda iNOS enziminin eksprese edildiği gösterilmiştir [665]. İnflamatuvar bir durum olduğu bilinen visceral obezitede gözlenen düşük düzeydeki inflamasyonun iNOS enziminin indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir [30]. Diğer



yandan obezitenin yanı sıra, insülin direncinin gelişiminde etkili olduğu gösterilen proinflamatuvar sitokinler, oksidatif stres ve serbest yağ asitleri gibi etkenlerin iNOS'u kodlayan *Nos2* geninin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [666]. Sekrete ettiği yüksek (milimolar düzeyde) NO aracılığı ile inflamatuvar olaylarda önemli bir regülatör rol oynadığı gösterilmiş olan iNOS enziminin ekspresyonundaki artışın temel olarak yağ dokudaki belirgin düzeyde iNOS up-regülasyonundan kaynaklandığı ortaya konulmuştur [70]. Buna ek olarak, yapılan bir çalışmada NO'in 3T3-L1 hücre kültüründe plazminojen aktivatör inhibitörü ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonlarında artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bütün bu bulguların ışığında obezite ve/veya metabolik sendromda beyaz yağ dokuda gözlenen kronik inflamasyonun düzeltilmesinin yollarından birinin belki de NOS inhibisyonu yapılması olabileceği akla gelmektedir [28].

Griess metodu ile nitrit/nitrat düzeylerinin ölçümü ile ilgili sonuçlar değerlendirildiğinde sadece selektif ROCK inhibitörü Y-27632'nin  $10^{-5}$  M konsantrasyonda 0-2 gün arası tek başına uygulandığı grupta ölçülen nitrit düzeylerinin anlamlı bir artış gösterdiği ilginç bir nokta olarak göze çarpmaktadır. 0-2 gün Y-27632 tarafından nitrit düzeylerinde oluşturulan bu artış, Rho-kinaz aktivatörü LPA tarafından ortadan kaldırılmıştır. Bu bulgu damar düz kasında RhoA inhibisyonunun eNOS'ın stimülasyonuna yol açması [35] ile paralel bir bulgu gibi görünmektedir. ROCK inhibisyonunun diğer deney serilerinde nitrit düzeylerinde anlamlı bir yükselmeye yol açmamış olması, olasılıkla diferensiyasyon sürecinin ilk iki günü aktive olan yolakların diğer günlerdeki yolaklardan farklı oluşundan kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra NOS inhibitörü L-NAME'in nitrit düzeyleri üzerine anlamlı bir etki oluşturmaması ortamda iNOS stimülasyonuna yol açacak TNF- $\alpha$ , IL-6 vb. inflamatuvar bir etkenin bulunmamasına bağlanabilir. Nitekim bir çalışmada adipositlerde iNOS stimülasyonu ile birlikte nitrit/nitrat düzeylerinde anlamlı bir artış oluşabilmesi için, inflamatuvar sitokinlerin tek başına uygulamasının bile yeterli olmadığı ve IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  ve LPS'in bir anlamda visceral obezitedeki düşük dereceli inflamatuvar durumu taklit edecek şekilde kombine bir kokteyl olarak uygulandığında nitrit/nitrat düzeylerinde belirgin artışa yol açtığı gösterilmiştir [70]. Bunun yanı sıra, diferensiyasyon süreci henüz devam ederken ve hücreler olgun adiposit özelliklerini henüz kazanmamışken eNOS enziminin henüz L-NAME tarafından belirgin şekilde azaltılacak düzeyde bazal nitrik oksit salınımı yapmadığı da öne sürülebilir. Bununla birlikte nitrit/nitrat ölçümü için kullanılan deney metodunun da önemli bir handikapı bulunduğunu gözardı etmemek gerekmektedir: PBS (fosfatla tamponlanmış salin) gibi protein kalıntısı içermeyen solüsyonlarda daha doğru sonuçlar veren Griess metodu ile nitrit/nitrat ölçümü, kan, serum ve hücre kültür medyumu gibi protein kalıntısı içerebilen ortamlarda nitrit/nitrat düzeyi ölçümü için kullanılırken ortamdan tam olarak uzaklaştırılmamış protein kalıntıları ile nitrik oksidin interfere olabilmesi ya da bu kalıntıların

540 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilmesi nedeni ile sonuçlarda farklılıklar oluşabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [667].

RhoA aktivasyonları (translokasyonları) üzerine yaptığımız deney serilerinde NO donörleri DETA-NO ve NaNO<sub>2</sub>, RhoA translokasyonları üzerine etki göstermedi. Bununla birlikte ilginç olarak, NO sentaz enzimini bloke eden nitro-L-arginin metilesteri (L-NAME) de tek başına RhoA aktivasyonunu süprese etti. Bu, L-NAME'nin aslında vazokonstriktör ve hipertansif etkisiyle uyumlu görünmektedir çünkü L-NAME, uzun süreli kullanımda Rho/Rho-kinaz yolağını stimüle edip [668, 669] hipertansiyona neden olabilmektedir.

RhoA aktivatörleri trombin ve LPA'nın RhoA translokasyonları üzerine etkisi literatürle uyumlu bulundu. LPA 10<sup>-7</sup> M konsantrasyonda değil ama 10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda RhoA translokasyonunu belirgin olarak arttırdı. Bunun yanı sıra yakın zamanda yapılan çalışmalarda farklı hücre tiplerinde aralarında HUVEC (insan umbilikal endotel hücreleri), RhoA aktivasyonunu arttırdığı gösterilen trombin [668, 669, 676] bizim çalışmamızda da 3T3-L1 hücrelerinde RhoA translokasyonlarını belirgin olarak arttırdı. RhoA'yı ADP-ribozilleyerek inhibe eden *Clostridium botulinum* ekzoenzimi C-3 [674, 675], trombin ile artırılan RhoA translokasyonunu baskıladı. Bu sonuçlarda trombin ve LPA'nın Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonu aracılığı ile etki gösterdiğini doğrulamaktadır.

Çalışmamızda preadiposit diferensiyasyonu sırasındaki aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine nitrik oksidin etkisini değerlendirmek amacı ile yapılan Oregon green Phalloidin ile floresan boyama deneylerinde ise nitrik oksit donasyonu yapmak için kullanılan DETA-NO ve NaNO<sub>2</sub>, diferensiyasyon sürecinin 0. ve 0-2. günleri uygulandığında etki göstermemesine rağmen ilginç olarak 0-4. ve 0-8. günler arasında uygulandığında stress fiber oluşumunu arttırdı ve kortikal aktin liflerinin ortaya çıkışını baskıladı. 3T3-L1 preadipositlerinde diferensiyasyon sırasında aktin stress fiberlerinin yerini hücrenin merkezinde bulunan büyük lipid damlasını çevreleyen kortikal aktin liflerine bıraktığı bilinmektedir [676]. DETA-NO ve NaNO<sub>2</sub>'in 0-4 ve 0-8. günler arasında uygulanmasının stress fiberlerinin miktarında artışa neden olduğunun gösterilmesi, akla NO donasyonunun preadiposit diferensiyasyonu üzerine inhibitör etkisinin aktin hücre iskeleti reorganizasyonuna olabileceğini getirmekle birlikte, diferensiyasyon ve proliferasyon deneylerinde bu yönde bir etki gözlenmemesi bu olasılığı tartışmaya açık hale getirmektedir. Bu durumu daha ilginç hale getiren olgu ise 3T3-L1 hücre kültür ortamına nitrik oksit inhibitörü L-NAME uygulanmasının preadipositlerin aktin hücre iskeleti reorganizasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe yol açmamış olmasıdır. L-NAME'in etki göstermemesi, 3T3-L1 preadipositlerinin bazal NO düzeylerinin diferensiyasyon süreci sırasında hücre iskeletinde oluşan değişiklikler üzerine herhangi bir etkisi olmaması ile açıklanabilir.

Lipopolisakkarid 0-2. gün dışındaki diğer zaman aralıklarında aktin hücre iskeleti üzerine belirgin bir etki gösterdi. LPS uygulaması 3T3-L1 hücrelerinin aktin hücre iskeletinde stress

fiberlerinin oluşumunu çok belirgin olarak arttırdı. Stress fiberlerindeki bu artış Rho-kinaz tarafından aktin hücre iskeletinde oluşturulan değişikliklerle çok benzerdir ve bu da LPS'nin etkisinde Rho/Rho-kinaz yolağının rol aldığını düşündüren diğer bulgulara önemli bir katkı yapmaktadır.

Çalışmamızda Rho/Rho-kinaz yolağının adiposit diferensiyasyonu sırasında 3T3-L1 hücrelerinin aktin hücre iskeletinin reorganizasyonu üzerine etkilerini değerlendirmek için amacı ile yapılan Oregon green Phalloidin ile floresan boyama deneylerinde RhoA aktivatörü LPA 0. gün dışında tüm zaman aralıklarında 3T3-L1 preadipositlerinin aktin hücre iskeleti organizasyonu üzerine belirgin düzeyde etki gösterdi. LPA, hem  $10^{-7}$  M ve hem de  $10^{-5}$  M konsantrasyonda uygulandığında hücrelerde aktin stress fiber oluşumunu anlamlı şekilde indükledi. LPA tarafından indüklenen stress fiberlerinin oluşumu, Y-27632 tarafından ortadan kaldırıldı. Bu bulgu adiposit diferensiyasyonu için Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonunun önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Bunu daha ileri düzeyde destekleyen bir bulgu da Y-27632'nin hem kombine uygulamada ve hem de tek başına uygulandığında kortikal aktin artışına ve diferensiyasyonun 4. gününden sonra da hücre içi lipid birikiminde artışa neden olmasıdır. Y-27632'nin tek başına uygulanması adipogenezi fasilite ediyor gibi görünmektedir. Bu bulgular ışığında Rho/Rho-kinaz yolağının aktin hücre iskeleti reorganizasyonu yolu ile adiposit diferensiyasyonu üzerine inhibitör etki gösterdiği söylenebilir.

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

NO ve Rho/ROCK yolağının preadiposit diferensiyasyonuna, proliferasyonuna ve hücre iskeleti aktininin regülasyonuna aracılık ettiği görülmektedir. Ancak, bu yolakların etkinliği ve katkı oranları preadipositlerin diferensiyasyonun hangi aşamasında olduğuyla da yakından ilgilidir. NO, adipojenik etki yapıyor gibi görünmektedir. Rho/ROCK yolağı da tam tersine lipolitik etki gösteriyor gibi hareket etmektedir. Bu iki sinyal sistemi kendi aralarında zıt fonksiyon görerek olasılıkla in vivo koşullarda birbirlerinin etkinliğini regüle edebilmektedir. Rho/ROCK yolağını inhibe eden ajanların antihipertansif etki başta olmak üzere pek çok patolojik durumda kullanım potansiyeli bulunmaktadır ve bazı indikasyonlarda klinik deneme döneminde. Ancak, bu ilaçların olası lipojenik etkisi dikkate alınmalıdır. Bu durum özellikle kronik kullanım durumunda daha büyük önem arz etmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1]. Jaffe, T., Schwartz, B. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer*, **2008**, 123, 2543-2556.
- [2]. Cooke, S. P., Heine, A. P., Taylor, A. J. The role of estrogen and estrogen receptor- $\alpha$  in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, **2001**, 178, 147-154.
- [3]. Pallottini, V., Bulzomi, P., Galluzzo, P. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infect Disord Drug Targets*, **2008**, 81, 52-60.
- [4]. Frayn, K. N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I.A., Coppack, S. W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes RelatMetab Disord*, **2003**; 27: 875-88.
- [5]. Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J., Foster, M. T. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Invest*, **2016**, 26 (1): 25-42.
- [6]. Berg, A. H., Scherer, P. E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ Res*, **2005**, 96, 939-949.
- [7]. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, **2011**, 11 (2), 85-97.
- [8]. Gregoire, F. M., Smas, C. M., Sul, S. K. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev*, **1998**, 78 (3), 783-809.
- [9]. Wang, P., Mariman, E., Renes, J., Keijer, J. The Secretory Function of Adipocytes in the Physiology of White Adipose Tissue. *J Cell Physiol*, **2008**, 216, 3-13.
- [10]. Hossain, P., Kavar, B., El Nahas, M. Obesity and Diabetes in the Developing World -A Growing Challenge. *N Engl J Med*, **2007**, 356 (3), 213-215.
- [11]. Lebovitz, H. E. The relationship of obesity to the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract Suppl*, **2003**, 134, 18-27.
- [12]. Chernogubova, E. Adrenergic stimulation of glucose uptake in Brown Adipocytes. Doktora tezi. Stocholm Üniversitesi, Stockholm, İsveç, **2005**.
- [13]. Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F., Zwahlen, M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*, **2008**, 371, 569-578.
- [14]. Flegal K. M., Graubard, B. I., Williamson, D.F., Gail, M. H. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*, **2005**, 293, 1861-1867.
- [15]. Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J.P., Al Mamun, A., Bonneux, L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med*, **2003**, 138, 24-32.
- [16]. Schling, P., Löffler, G. Cross talk between adipose tissue cells: Impact on pathophysiology. *News Physiol Sci*, **2002**, 17, 99-104.

- [17]. Schaffler, A., Müller-Ladner, U., Schölmerich, J., Büchler, C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocr Rev*, 2006, 27 (5), 449-467.
- [18]. Otto, T. C., Lane, M. D., Cox, M. M. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **2005**, 40, 229-242.
- [19]. Dani, C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissues Organs*, **1999**, 165, 173-180.
- [20]. Case, J., Horvath, T. L., Howell, J. C., Yoder, M. C., March, K. L., Srour, E. F. Clonal multilineage differentiation of murine common pluripotent stem cells isolated from skeletal muscle and adipose stromal cells. *Ann NY Acad Sci*, **2005**, 1044, 183-200.
- [21]. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(5), 911-919.
- [22]. Desruisseaux, M. S., Nagajyothi, Trujillo, M. E., Tanowitz, H. B., Scherer, P. E. Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infect Immun*, **2007**, 75 (3), 1066-1078.
- [23]. Lefterova, M. I., Lazar, M. A. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20 (3), 107-114.
- [24]. Hall, A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*, **1998**, 279, 509-514.
- [25]. Kümper, K., Mardakheh, F., K., McCarthy, A., Yeo M., Gordon W Stamp, G. W., Angela Paul, A., Worboys, J., Sadok, A., Jorgensen, C., Guichard, S., Christopher J Marshall, C. J. Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. *eLife*, **2016**; 5, e12203, 1-24.
- [26]. Noguchi, M., Hosoda, K., Fujikura, J., Fujimoto, M., Iwakura, H., Tomita, T., Ishii, T., Arai, N., Hirata, M., Ebihara, K., Masuzaki, H., Itoh, H., Narumiya, S., Nakao, K. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-Associated Kinase II enhances adipogenesis. *J Biochem*, **2007**, 282 (40), 29574-29583.
- [27]. Sordella, R., Jiang, W., Chen, G. C., Curto, M., Settleman, J. Modulation of Rho GTPase Signaling regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis. *Cell*, **2003**, 113, 147-158.
- [28]. Ribiere, C., Jaubert, A. M., Gaudiot, N., Sabourault, D., Marcus, M. L., Boucher, J.L., Denis-Henriot, D., Giudicelli, Y. White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *BBRC*, **1996**, 222, 706-712.
- [29]. Ignarro, L. J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl*, **1996**, 55, 2-5.
- [30]. Lago, F., Dieguez, C., Gomez-Reino, J., Gualillo, O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheum*, **2007**, 3 (12), 716-724.
- [31]. Yan, H., Aziz, E., Shillabeer, G., Wong, A., Shanghavi, D., Kermouni, A., Abdel-Hafez, M., Lau, D. C. W. Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture. *J Lipid Res*, **2002**, 43, 2123-2129.
- [32]. Hiroyuki, K., Naoko, M., Takako, K., Shin-Ya, T., Megumi, W., Tohru, M., Teruo, K., Hideo, Y. Nitric oxide suppresses preadipocyte differentiation in 3T3-L1 culture. *Mol Cell Biochem*, **2007**, 300 (1-2), 61-67.

- [33]. Andersson, K., Gaudiot, N., Ribiere, C., Elizalde, M., Giudicelli, Y., Arner, P. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Brit J Pharmacol*, **1999**, 126, 1639–1645.
- [34]. Penfornis, P., Marette, A. Inducible Nitric Oxide Synthase Modulates lipolysis in adipocytes. *J Lipid Res*, **2005**; 46, 135-142.
- [35]. Tiftik, R. N., Erol, A., Çınar, M. G., Kubat, H., Ark, M., Ülker, S., Büyükafşar, K. Nitric oxide does not downregulate Rho-kinase (ROCK-2) expression in rat coronary endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2008**, 51(2), 140-147.
- [36]. Cetin, S., Leaphart, C. L., Li, J., Ischenko, I., Hayman, M., Upperman, J., Zamora, R., Watkins, S., Ford, H.R., Wang, J., Hackam, D.J. Nitric oxide inhibits enterocyte migration through activation of RhoA-GTPase in a SHP-2-dependent manner. *Am J Physiol Gastr L Physiol*, **2007**, 292, G1347-G1358.
- [37]. Luo, L., Jan, L., Jan, Y. N. Small GTPases in axon outgrowth. *Perspect Dev Neurobiol*, **1996**, 4, 199-204.
- [38]. Henning, S. W., Galandrini, R., Hall, A., Cantrell, D. A. The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development. *EMBO J*, **1997**, 16, 2397–2407.
- [39]. Carnac, G., Primig, M., Kitzmann, M., Chafey, P., Tuil, D., Lamb, N., Fernandez, A. RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts. *Mol Biol Cell*, **1998**, 9, 1891-1902.
- [40]. McMullan, R., Lax, S., Robertson, V. H., Radford, D. J., Broad, S., Watt, F. M., Rowles, A., Croft, D. R., Olson, M. F., Hotchin, N. A. Keratinocyte Differentiation Is Regulated by the Rho and ROCK Signaling Pathway. *Current Biology*, **2003**; 13: 2185–2189.
- [41]. Ridley, A. J. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, **2001**, 114, 2713-2722.
- [42]. Sumi, T., Matsumoto, K., Nakamura, T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **2001**, 276 (1), 670-676.
- [43]. Vardouli, L., Moustakas, A., Stournaras, C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor. *J Biol Chem*, **2005**, 280 (12), 11448–11457.
- [44]. Acevedo, K., Moussi, N., Li, R., Soo, P., Bernard, O. LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J Histochem Cytochem*, **2006**, 54, 487-500.
- [45]. Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A., Nakamura, T. Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 23092-23096.
- [46]. Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S., Mizuna, K. LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem J*, **2001**, 354, 149-159.

- [47]. Gamell, C., Schofield, A. V., Suryadinata, R., Sarcevic, B., Bernard, O. LIMK2 Mediates Resistance to Chemotherapeutic Drugs in Neuroblastoma Cells through Regulation of Drug Induced Cell Cycle Arrest.
- [48]. Davila, M., Frost, A. R., Grizzle, W. E., Chakrabarti, R. LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: Implications in prostate cancer. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 36868-36875. *Plos One*, **2013**, 8, 8, e72850
- [49]. Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K., Mizuno, K. Mitosis-specific activation of LIM motif containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J Biol Chem*, **2002**, 277, 22093-22102.
- [50]. Chakrabarti, R., Jones, J. L., Oelschlager, D. K., Tapia, T., Tousson, A., Grizzle, W. E. Phosphorylated LIM Kinases Colocalize with  $\gamma$ -Tubulin in Centrosomes During Early Stages of Mitosis. *Cell Cycle*, **2007**, 6, 23, 2944-2952.
- [51]. Christopherson, K. S., Bredt, D. S. Perspectives Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Nitric Oxide in Excitable Tissues: Physiological Roles and Disease. *J Clin Invest*, November **1997**, 100, 10, 2424-2429.
- [52]. Engeli, S., Janke, J., Gorzelniak, K., Böhnke, J., Ghose, N., Lindschau, C., Luft, F. C., Sharma, A. M. Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res*, **2004**, 45, 1640-1648.
- [53] Moncada, S., Palmer Higgs, A. E. NO physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **1991**; 43 (2), 109-142
- [54]. Michel, T., Feron, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, **1997**, 100, 2146-2152.
- [55]. Garcia, X., Stein, F. Nitric Oxide. *Semin Pediatr Infect Dis*, **2006**, 17, 55-57.
- [56]. Denninger, J. W., Marletta, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1411, 334-350.
- [57]. Cleeter, M. W. J., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S., Schapira, A. H. V. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, **1994**, 345, 50-54.
- [58]. Katzung, B.G. Basic and Clinical Pharmacology. 10th ed, Singapore, **2007**, McGraw-Hill Companies.
- [59]. Taylor, C. T., Moncada, S. Nitric Oxide, Cytochrome C Oxidase, and the Cellular Response to Hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2010**, 30, 643-647.
- [60]. Morley, J. E., Flood, J.F. Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am J Phys*, **1994**, 266, R164-R168.
- [61]. Elizalde, M., Rydén, M., Harmelen, V. V., Eneroth, P., Gyllenhammar, H., Holm, C., Ramel, S., Ölund, A., Arner, P., Andersson, K. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res*, **2000**, 41, 1244-1251.



- [62]. Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Cozzi, V., Cinti, S., Carruba, M. O., Nisoli, E. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Letters*, **2002**, 514, 135-140.
- [63]. Ryden, M., Elizalde, M., Harmelen, V. V., Ohlund, A., Hoffstedt, J., Bringman, S., Andersson, S. K. Increased expression of eNOS protein in omental vs subcutaneous adipose tissue in obese human subjects. *Int J Obesity*, **2001**, 25, 811–815.
- [64]. Choi, J. W., Pai, S. H., Kim, S. K., Ito, M., Park, C. S., Cha, Y. N. Increases in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese humans. *Clin Chem*, **2001**, 47, 1106–1109.
- [65]. Nozaki, M., Fukuhara, A., Segawa, K., Okuno, Y., Abe, M., Hosogai, N., Matsuda, M., Komuro, R., Shimomura, I. Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *BBRC*, **2007**, 364, 33–39.
- [66]. Perreault, M., Marette, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*, **2001**, 7, 1138–1143.
- [67]. Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A., Ueki, K., Kaneki, M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*, **2005**, 54, 1340–1348.
- [68]. Tsuchiya, K., Sakai, H., Suzuki, N., Iwashima, F., Yoshimoto, T., Shichiri, M., Hiratay, Y. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*, **2007**, 148, 4548–4556.
- [69]. Ferlito, S., Gallina, M. Nitrite plasma levels in type 1 and 2 diabetics with and without complications. *Panminerva med*, **1998**, 40(4), 304-308.
- [70]. Kapur, S., Marcotte, B., Marette, A. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol Endoc M*, **1999**, 276, 635-641.
- [71]. Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., Curtin, L. R. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*, **2010**, 303 (3), 235-41.
- [72]. Finucane, M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., Singh, G. M., Gutierrez, H. R., Lu, Y., Bahalim, A. N., Farzadfar, F., Riley, L. M., Ezzati, M. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*, **2011**, 377 (9765), 557-567.
- [73]. Obesity and overweight. Who Factsheet No:311, **2015**.
- [74]. Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Al Mamun, A., Bonneux, L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med*, **2003**, 138, 24-32.
- [75]. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *J Amer Med Assoc*. 2012; 307 (5): 491–97

- [76]. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999–2010. *J Amer Med Assoc*, 2012; 307 (5): 483–490
- [77]. Wang. Y. C., McPherson. K., Marsh, T., Gortmaker, S. L., Brown, M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet*, **2011**, 378, 815–825.
- [78]. Razay, G., Vreugdenhil, A., Wilcock, G. Obesity, abdominal obesity and Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **2006**, 22: 173–176.
- [79]. Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *New Engl J Med*, **2003**, 348, 1625–1638.
- [80]. Kanneganti, T. D., Dixit, V. D. Immunological complications of obesity. *Nature Immunol*, **2012**, 13, 707–712.
- [81]. Jensen, M. D. Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. *J Roy soc med*, **2002**, 95 (42), 3-7.
- [82]. Feng, B., Zhang, T., Xu, H. Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann NY Acad Sci*, **2013**, 1281, 160–177.
- [83]. Gesta, S., Tseng, Y. H., Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, **2007**, 131, 242–256.
- [84]. Seale P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Chin, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Michael, A., Rudnicki, M. A., Beier, D.R., Spiegelman, B. M. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, **2008**, 454, 961–967.
- [85]. Ailhaud, G., Grimaldi, P., Negrel, R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*, **1992**, 12, 207–233.
- [86]. Frühbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F. J., Burrel, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2001**, 280, E827–E847.
- [87]. Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., Spiegelman, B. M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, **2012**, 150, 366–376.
- [88]. Park, A., Kim, W. K., Bae, K. H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, **2014**; 26, 6(1), 33-42.
- [89]. Ishibashi, J., Seale, P. Medicine. Beige can be slimming. *Science*, **2010**, 328, 1113–1114.
- [90]. Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2007**, 293, E444–E4529.
- [91]. Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., Kahn, C. R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, **2009**, 360, 1509–1517.

- [92]. Fantuzzi, G., Mazzone, T. Adipose tissue and adipokines in health and disease. *Humana Press Inc*, **2008**, 949-999.
- [93]. Enerback, S. Human Brown Adipose Tissue. *Cell Metab*, **2010**, 11, 248-252.
- [94]. Sacks, H., Symonds, M. E. Anatomical Locations of Human Brown Adipose Tissue Functional Relevance and Implications in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, **2013**, 62, 1783-1790.
- [95]. Cannon, B., Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, **2004**, 84, 277-359.
- [96]. Foster, D. O., Frydman, M. L. Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol*, **1978**, 56 (1), 110-122.
- [97]. Power, G. G. Biology of temperature: the mammalian fetus. *J Dev Physiol*, **1989**, 12 (6), 295-304.
- [98]. Puchalski, W., Bockler, H., Heldmaier, G., Langefeld, M. Organ blood flow and brown adipose tissue oxygen consumption during noradrenaline-induced nonshivering thermogenesis in the Djungarian hamster. *J Exp Zool*, **1987**, 242 (3), 263-271.
- [99]. Symonds, M. E. Brown Adipose Tissue Growth and Development. *Scientifica*, **2013**, 305763, 1-14.
- [100]. Egawa, M., Yoshimatsu, H., Bray, G. A. Effects of 2-deoxy-D-glucose on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. *Am J Physiol*, **1989**, 257 (6), R1377-R1385.
- [101]. Madden, C. J., Morrison, S. F. Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats. *J Physiol*, **2005**, 566, 559-573.
- [102]. Saely, C. H., Geiger, K., Drexel, H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology*, **2012**, 58, 15-23.
- [103]. Bjorntorp, P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **1996**, 20, 291-302.
- [104]. Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., Arner, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, **2008**, 453, 783-787.
- [105]. Miller, W. H Jr., Faust, I. M., Goldberger, A. C., Hirsch, J. Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat. *Am J Physiol*, **1983**; 245, 74-80.
- [106]. Wajchenberg, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, **2000**, 21, 679-738.
- [107]. Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T. Interlukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, **1990**, 265, 621-636.
- [108]. Marin P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B., Kvist, H., Holm, G., Lars Sjöström, L., Per Björntorp, P. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism*, **1992**;41, 1242-1248.

- [109]. Ibrahim M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews*, **2010**, 11 (1), 11-18.
- [110]. Rebuffe-Scrive, M., Lundholm, K., Björntorp, P. Glucocorticoid hormone binding to human adipose tissue. *Eur J Clin Invest*, **1985**; 15, 267-271.
- [111]. Freedland, E. S. Role of critical visceral adipose tissue threshold in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab*, **2004**, 1 (12), 1-24.
- [112]. Lemieux, I., Pascot, A., Prud'homme, D., Alméras, N., Bogaty, P., Nadeau, A., Bergeron, J., Després, J. P. Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2001**, 21, 961-967.
- [113]. Karlsson, C., Lindell, K., Ottoson, M., Sjöstrom, L., Carlsson, B., Carlson, L. M. S. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab*, **1998**, 83, 3925-3929.
- [114]. Alessi, M. C., Peirretti F., Morange, P., Henry, M., Nalbone, G., Juhan-Vague, I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes*, **1997**, 46 (5), 860-867.
- [115]. Nedergaard, J., Cannon, B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, 1831, 943-949.
- [116]. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., Lima, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Pediatr (Rio J)*, **2007**, 83(5), 192-203.
- [117]. Cinti, S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2005**, 73, 9-15.
- [118]. Nicholls, D. G., Rial, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr*, **1999**, 5, 399-406.
- [119]. Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., Cannon, B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency, *Biochim Biophys Acta*, **2001**, 1504, 82-106.
- [120]. Ricquier, D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Frontiers in endocrinology*, **2011**, 2 (85), 1-7.
- [121]. Urbankova, E., Voltchenko, A., Pohl, P., Jezek, P., Pohl, E. E. Transport kinetics of uncoupling proteins: Analysis of UCP1 reconstituted in planar lipid bilayers. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 32497-32500.
- [122]. Jezek, P., Zackova, M., Ruzicka, M., Skobisova, E., Jaburek, M. Mitochondrial uncoupling proteins-facts and fantasies. *Physiol Res*, **2004**, 53, 199-211.
- [123]. Winkler, E., Klingenberg, M. Effect of Fatty Acids on H<sup>+</sup> Transport Activity of the Reconstituted Uncoupling Protein. *J Biol Chem*, **1994**, 269, 2508-2515.
- [124]. Carobbio, S., Rosen, B., Vidal-Puig, A. Adipogenesis: New insights into brown adipose tissue differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, **2013**, 51, T75-T85.

- [125]. Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychemüller, A., Gordts, P. L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., Heeren, J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, **2011**, 17, 200–205.
- [126]. Fedorenko, A., Lishko, P. V., Kirichok, Y. Mechanism of fatty acid- dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, **2012**, 151, 400–413.
- [127]. Hoang, T., Smith, M. D., Jelokhani-Niaraki, M. Expression, folding and proton transport activity of human uncoupling protein-1 (UCP1) in lipid membranes: evidence for associated functional forms. *J Biol Chem*, **2013**, 1-23.
- [128]. Dragunow, M., Cameron, R., Narayan, P. Image-based high-throughput quantification of cellular fat accumulation. *J Biomol Screen*, **2007**, 12, 999-1005.
- [129]. Huttunen, P., Hirvonen, J., Kinnula, V. The occurrence of Brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **1981**, 46, 339–345.
- [130]. Cousin, B., Cinti, S., Morrioni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L., Casteilla, L. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: Molecular and morphological characterization. *J Cell Sci*, **1992**, 103 (4), 931–942.
- [131]. Ghorbani, M., Himms-Hagen, J. Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL16,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **1997**, 21, 465–475.
- [132]. Xue, B., Coulter, A., Rim, J. S., Koza, R. A., Kozak, L. P. Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Mol Cell Biol*, **2005**, 25, 8311–8322.
- [133]. Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., Nedergaard, J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*, **2010**, 285, 7153–7164.
- [134]. Scherer, P. E. The Multifaceted Roles of Adipose Tissue—Therapeutic Targets for Diabetes and Beyond: The 2015 Banting Lecture. *Diabetes*, **2016**, 65, 1452–1461.
- [135]. Ahima, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, **2006**, 14 (5), 242–249.
- [136]. Nawrocki, A. R., Scherer, P. E. Keynote review: the adipocyte as a drug discovery target. *Drug Discov Today*, **2005**, 10, 1219–1230.
- [137]. Scherer, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*, **2006**, 55, 1537–1545.
- [138]. Trayhurn, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: New perspectives on fat. *Acta Physiol Scand*, **2005**, 184, 285–293.
- [139]. Sethi, J. K., Hotamisligil, G. S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, **1999**, 10, 19-29.

- [140]. Smitka, K., Marešová, D. Adipose tissue as an endocrine organ: an update on pro-inflammatory and anti-inflammatory microenvironment. *Prague Medical Report*, **2015**; 116 (2), 87-111.
- [141]. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **1994**, 1, 372 (6505), 425-432.
- [142]. Auwerx, J., Staels, B. Leptin. *Lancet*, **1998**, 351, 737-742.
- [143]. Friedman, J. M. Leptin Regulates Adipose Tissue Mass. *Keio J Med*, **2011**, 60 (1), 1-9.
- [144]. Fantuzzi, G., Mazzone, T. Adipose Tissue and Atherosclerosis Exploring the Connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2007**, 27, 996-1003.
- [145]. Kantorová, E., Jesenská, U., Hierny, D., Zelenák, K., Sivák, S., Stanlík, M., Galajda, P., Nosá, V., Kurla, E. The Intricate Network of Adipokines and Stroke. *Int J Endocrinol*, **2015**, 967698, 1-8.
- [146]. Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., Lewin, M. J. M. The stomach is a source of leptin. *Nature*, **1998**, 394, 790-793.
- [147]. Glasow, A., Kiess, W., Andergg, U. Expression of leptin (ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**, 86, 4472-4479.
- [148]. Gonzalez, R. R., Caballero-Campo, P., Jasper, M. Leptin and Leptin Receptor Are Expressed in the Human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab*, **2000**, 85 (12), 4883-4888.
- [149]. Long, J., Shuya, Z., Bartolome, G. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, **2000**, 141, 333-339.
- [150]. Wang, J., Lie, R., Hawkins, M. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, **1998**, 393, 384-388.
- [151]. Considine, R. V. Regulation of leptin production. *Rev Endocrinol Metab Disord*, **2001**, 2, 357-363.
- [152]. Casabielle, X., Hawkins, M., Tome, M. A., Peino, R., Dieguez, C., Casanueva, F. F. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*, **1997**, 82, 4270-4273.
- [153]. Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J. S. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**, 94, 11073-11078.
- [154]. Stojšavljević, S., Palčić, M. G., Jukić, L. V., Duvnjak, L. S., Duvnjak, M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, **2014**, 20 (48), 18070-18091.
- [155]. Mantzoros, C. S. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*, **1999**, 130, 671-680.

- [156]. Jackson, M. B., Ahima, R. S. Leptin. *Nutrition and Health: Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, 2007; 35–46
- [157]. Mantzoros, C. S., Magkos, F., Brinkoetter, M., Sienkiewicz, E., Dardeno, T. A., Kim, S. Y., Hamnvik, O. P. R. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2011**, 301(4), E567-E584.
- [158]. Vaiopoulos, A. G., Marinou, K., Christodoulides, C., Koutsilieris, M. The role of adiponectin in human vascular physiology. *Int J Cardiol*, **2012**, 155 (2), 188–193.
- [159]. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N, Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. Plasma concentrations of a novel, adipose specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2000**, 20: 1595–1599.
- [160]. Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N. L., Ortmeyer, H. K., Arita, Y., Hansen, B. C., Matsuzawa, Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, **2001**, 50, 1126–1133.
- [161]. Yang, W. S., Lee, W. J, Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C. L., Chen, C.L., Tai, T. Y., Chuang, L. M. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**, 86, 3815–3819.
- [162]. Takahashi, M., Arita, Y., Yamagata, K., Matsukawa, Y., Okutomi, K., Horie, M., Shimomura, I., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. Genomic structure and mutations in adipose specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **2000**, 24, 861-886.
- [163]. Kissebah, A. H., Sonnenberg, G. E., Myklebust, J., Goldstein, M., Broman, K., James, R. G., Marks, J. A., Krakower, G. R., Jacob, H. J., Weber, J., Martin, L., Blangero, J., Comuzzie, A. G. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**, 97, 14478-14483.
- [164]. Briggs, D. B., Jones, C. M., Mashalidis, E. H., Nunez, M., Hausrath, A. C., Wysocki, V. H. and Tsao, T.-S. Disulfide-dependent self-assembly of adiponectin octadecamers from trimers and presence of stable octadecameric adiponectin lacking disulfide bonds in vitro. *Biochemistry*, **2009**, 48, 12345–12357.
- [165]. Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P. Kimura, S., Nagai R., Kadowaki, T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Bio Chem*, **2003**, 278, 40352–40363.
- [166]. Peake, P. W., Hughes, J. T., Shen, Y., Charlesworth, J. A. Glycosylation of human adiponectin affects its conformation and stability. *J Mol Endocrinol*, **2007**, 39, 45–52.
- [167]. Richards, A. A., Stephens, T., Charlton, H. K., Jones, A., Macdonald, G. A., Prins, J. B. and Whitehead, J. P. Adiponectin multimerization is dependent on conserved lysines in the collagenous domain: evidence for regulation of multimerization by alterations in posttranslational modifications. *J Mol Endocrinol*, **2006**, 20, 1673–1687.

- [168]. Nishimura, M., Izumiya, Y., Higuchi, A., Shibata, R., Qiu, J., Kudo, C., Shin, H. K., Moskowitz, M. A., Ouchi, N. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanisms. *Circulation*, **2008**, 117(2), 216–223.
- [169]. Frühbeck, G. Vasoactive factors and inflammatory mediators produced in adipose tissue. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, **2007**; 63–77.
- [170]. Rothan, H. A, Suhaeb, A. M., Kamarul, T. Recombinant Human Adiponectin as a Potential Protein for Treating Diabetic Tendinopathy Promotes Tenocyte Progenitor Cells Proliferation and Tenogenic Differentiation In Vitro. *Int J Med Sci*, **2013**, 10, 1899-1906.
- [171]. Okamoto, Y., Arita, Y., Nishida, M., Muraguchi, M., Ouchi, N., Takahashi, M., Igura, T., Inui, Y., Kihara, S., Nakamura, T., Yamashita, S., Miyagawa, J., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res*, **2000**, 32, 47–50.
- [172]. Beatty, A. L., Zhang, M. H., Ku, I. A., Na, B., Schiller, N. B., Whooley, M. A. Adiponectin is associated with increased mortality and heart failure in patients with stable ischemic heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*, **2012**, 220 (2),587–592.
- [173]. Wei, Z., Peterson, J. M., Lei, X., Cebotaru, L., Wolfgang, M. J., Baldeviano, G. C., Wong, G. W. C1q/TNFRelated protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes. *J Biol Chem*, **2012**, 287, 10301–10315.
- [174]. Enomoto, T., Ohashi, K., Shibata, R., Higuchi, A., Maruyama, S., Izumiya, Y., Walsh, K., Murohara, T., Ouchi, N. Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *J Biol Chem*, **2011**, 286: 34552–34558
- [175]. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa Y., Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, **2005**, 307, 426–430.
- [176]. Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., Fasshauer, M. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*, **2005**, 185, R1–R8
- [177]. Chen, M. P., Chung, F. M., Chang, D. M., Tsai, J. C., Huang, H. F., Shin, S. J., Lee, Y. J. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **2006**, 91, 295–299.
- [178]. Tsuji, S., Uehori, J., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Matsuhisa, A., Toyoshima, K., Seya, T. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 23456–23463.
- [179]. Yang, R. Z., Lee, M. J., Hu, H., Pray, J., Wu, H. B., Hansen, B. C., Shuldiner, A. R., Fried, S. K., McLenithan, J. C., Gong, D. W. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2006**, 290, E1253–E1261.



- [180]. de Souza, B. C. M, Yang, R. Z., Lee, M. J., Glynn, N. M., Yu, D. Z., Pray, J., Ndubuizu, K., Patil, S., Schwartz, A., Kligman, M., Fried, S. K., Gong, D. W., Shuldiner, A. R., Pollin, T. I., McLenithan, J. C. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*, **2007**, 56, 1655–1661.
- [181]. Yamawaki, H., Tsubaki, N., Mukohda, M., Okada, M., Hara, Y. Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochem Biophys Res Commun*, **2010**, 393, 668–672.
- [182]. Yamawaki, H., Kuramoto, J., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M., Hara, Y. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2011**, 408, 339–343.
- [183]. Brunetti, L., Orlando, G., Ferrante, C., Recinella, L., Leone, S., Chiavaroli, A., Di Nisio, C., Shohreh, R., Manippa, F., Ricciuti, A., Vacca, M. Orexigenic effects of omentin-1 related to decreased CART and CRH gene expression and increased norepinephrine synthesis and release in the hypothalamus. *Peptides*, **2013**, 44, 66–74.
- [184]. Oświęcimska, J., Suwała, A. Świątochowska, E., Ostrowska, Z., Gorczyca, P., Ziara-Jakutowicz, K., Machura, E., Szczepańska, M., Kukła, M., Stojewska, M., Ziara, D., Ziara, K. Serum omentin levels in adolescent girls with anorexia nervosa and obesity. *Physiol Res*, 2015, 64 (5),701-709.
- [185]. Herder, C., Ouwens, D. M., Carstensen, M., Kowall, B., Huth, C., Meisinger, C., Rathmann, W., Roden, M., Thorand, B. Adiponectin may mediate the association between omentin, circulating lipids and insulin sensitivity: results from the KORA F4 study. *Eur J Endocrinol*, **2015**, 172, 423–432.
- [186]. Steppan, C. M., Lazar, M. A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, **2002**, 13, 18–23.
- [187]. Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., Lazar, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, **2001**, 409, 307–312.
- [188]. Rajala, M. W., Qi, Y., Patel, H. R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U. B., Sinha, M. K., Gingerich, R. L., Scherer, P. E., Ahima, R. S. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*, **2004**, 53, 1671–1679.
- [189]. Verma, S., Li, S. H., Wang, C. H., Fedak, P. W., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*, **2003**, 108, 736–740.
- [190]. Kawanami, D., Maemura, K., Takeda, N., Harada, T., Nojiri, T., Imai, Y., Manabe, I., Utsunomiya, K., Nagai, R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, 314, 415–419.
- [191]. Calabro, P., Samudio, I., Willerson, J. T., Yeh, E. T. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*, 2004, 110, 3335–3340.

- [192]. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, **1993**, 259, 87–91.
- [193]. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, **1988**, 53, 45–53.
- [194]. Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2001**, 280, E745–E751.
- [195]. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, J. A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **2003**, 112 (12), 1796–1808.
- [196] Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M. F. The c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem*, **2000**, 275, 12 (24), 9047–9054.
- [197]. Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee Y. H., Shoelson, S. E., White, M. F. Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J Biol Chem*, **2002**, 277, 2 (11), 1531–1537.
- [198]. Baud, V., Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, **2001**, 11 (9), 372–377.
- [199]. Feingold, K. R., Grunfeld C. Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J Clin Invest*, **1987**, 80 (1), 184–190.
- [200]. Nguyen, M. T, Satoh, H., Favellyukis, S., Babendure, J. L., Imamura, T., Sbodio, J. I., Zalevsky, J., Dahiyat, B. I., Chi, N. W., Olefsky, J. M. JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **2005**, 280 (42), 35361–35371.
- [201]. Park E. J., Lee, J. H., Yu, G. Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R.G., Österreicher, C. H., Takahashi, H., Karin, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, **2010**, 140(2), 197–208.
- [202]. Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H., Kishimoto, T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1985**, 82, 5490–5494.
- [203]. Mohamed-Ali V., Goodrick S., Rawesh A., Katz D. R., Miles J. M., Yudkin J. S., Klein S., Coppel S. W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, **1997**, 82 (12), 4196–4200.
- [204]. Fain J. N., Madan A. K., Hiler M. L., Cheema P., Bahouth S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, **2004**, 145 (5), 2273–2282.

- [205]. Fontana, L., Eagon, J. C., Trujillo, M. E., Scherer, P. E., Klein, S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes*, **2007**, 56 (4), 1010-1013.
- [206]. Naitoh, Y., Fukata, J., Tominaga, T., Nakai, Y., Tamai, S., Mori, K., Imura, H. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **1988**, 155, 1459-1463.
- [207]. Spangelo, B. L., Judd, A. M., Isakson, P. C., MacLeod, R. M. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinol*, **1989**, 125, 575-577.
- [208]. Kotake, S. K., Sato, K., Kim, K. J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., Kashiwazaki, S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res*, **1996**, 11, 88-95.
- [209]. Ershler, W. B. Interleukin-6: A cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc*, **1993**, 41, 176-181.
- [210]. Ershler, W. B., Sun, W. H., Binkley, N. The role of interleukin-6 in certain age-related diseases. *Drugs Aging*, **1994**, 5, 358-365.
- [211]. Keller, E. T., Wanagat, J., Ershler, W. B. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci*, **1996**, 1 (1), d340-357.
- [212]. Vgontzas, A. N., Bixler, E. O., Lin, H. M., Prolo, P., Trakada, G., Chrousos, G. P. IL-6 and its circadian secretion in humans. *Neuromodulation*, 2005, 12(3), 131-140.
- [213]. Bastard, J. P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., Hainque, B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **2002**, 87, 2084-2089.
- [214]. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., Ridker, P. M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, **2001**, 286, 327-334.
- [215]. Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H., Pfeiffer, A. F. 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.
- [216]. Vozarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P. A., Bogardus, C., Pratley, R. E. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*, **2001**, 9, 414-417.
- [217]. Lyngso, D., Simonsen, L., Bülow, J., Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *J Physiol*, **2004**, 543, 379-386.
- [218]. van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Moller, K., Saltin, B., Febbraio, M. A., Pedersen, B.K. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **2003**, 88, 3005-3010.

- [219]. Petersen, W.W., Carey, A.L., Sacchetti, M., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Febrario, M. A., Acute IL-6 treatment in creases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2004**, 288, E155–E162.
- [220]. Cao, H. Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease. *J Endocrinol*, **2014**, 220 (2), T47–T59.
- [221]. Graham, T. E., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wason, C. J., Oberbach, A., Jansson, P. A., Smith, U., Kahn, B. B. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*, **2006**, 354, 2552–2563.
- [222]. Kotnik, P, Fischer-Posovszky, P, Wabitsch, M. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol*, **2011**, 165, 703–711.
- [223]. Janke, J., Engeli, S., Boschmann, M., Adams, F., Jana, B., J, Luft, F. C., Sharma, A. M., Jordan, J. Retinol-Binding Protein 4 in Human Obesity. *Diabetes*, **2006**, 55, 2805–2810.
- [224]. Takebayashi, K., Suetsugu, M., Wakabayashi, S., Aso, Y., Inukai, T. Retinol Binding Protein-4 Levels and Clinical Features of Type 2 Diabetes Patients. *J Clin Endocrinol Metab*, **2007**, 92(7), 2712–2719.
- [225]. Yang, Q., Graham, T. E., Nimesh, M. N., Preitner F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L., Kahn, B. K. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, **2005**, 436, 356–362.
- [226]. Ouchi, N., Higuchi, A., Ohashi, K., Oshima, Y., Gokce, N., Rei, S. R., Akasaki, Y., Shimono, A., Walsh, K. Sfrp5 Is an Anti-Inflammatory Adipokine That Modulates Metabolic Dysfunction in Obesity. *Science*, **2010**, 329 (5990), 454–457.
- [227]. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, **2002**, 420 (6913), 333-336.
- [228]. Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J. G., Bandyopadhyay, G. K., Luo, J. L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J. M., Karin, M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab*, **2007**, 6 (5), 386-397.
- [229]. Becerra, S. P. Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol*, **1997**, 425, 223–237.
- [230]. Tombran-Tink, J., Chader, G. G., Johnson, L. V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res*, **1991**, 53, 411–414.
- [231]. Dawson, D. W., Volpert, O. V., Gillis, P., Crawford, S. E., Xu, H., Benedict, W., Bouck, N. P. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, **1999**, 285, 245–258.
- [232]. Cai, J., Jiang, W. G., Grant, M. B., Boulton, M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem*, **2006**, 281, 3604–3613.

- [233]. Famulla, S., Lamers, D., Hartwig, S., Passlack, W., Horrigs, A., Cramer, A., Lehr, S., Sell, H., Eckel, J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells. *Int J Obes*, **2011**, 35, 762–772.
- [234]. Crowe, S., Wu, L. E., Economou, C., Turpin, S. M., Matzaris, M., Hoehn, K. L., Hevener, A. L., James, D. E., Duh, E. J., Watt, M. J. Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity. *Cell Metab*, **2009**, 10, 40–47.
- [235]. Carnagarin, R., Dharmarajan, A. M., Dass, C. R. PEDF-induced alteration of metabolism leading to insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*, **2015**, 401C, 98–104.
- [236]. Filleur, S., Volz, K., Nelius, T., Mirochnik, Y., Huang, H., Zaichuk, T. A., Aymerich, M. S., Becerra, S. P., Yap, R., Veliceasa, D., Shroff, E. H., Volpert, O. V. Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res*, **2005**, 65, 5144–5152.
- [237]. Zhou, J., Gao, G., Crabb, J.W., Serrero, G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem*, **1993**, 268 (15), 10863–10869.
- [238]. Matsubara, T., Mita, A., Minami, K., Hosooka, T., Kitazawa, S., Takahashi, K., Tamori, Y., Yokoi, N., Watanabe, M., Matsuo, E., Nishimura, O., Seino, S. PGRN is a Key Adipokine Mediating High Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity through IL-6 in Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, **2012**, 15, 38–50.
- [239]. Qu, H., Deng, H., Hu, Z. Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance. *Mediators Inflamm*, **2013**, 360190, 1-6.
- [240]. Youn, B. S., Bang, S. I., Klötting, N., Park, J. W., Lee, N., Oh, J. E., Pi, K. B., Lee, T. H., Ruschke, K., Fasshauer, M., Stumvoll, M., Blüher, M. Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes*, **2009**, 58, 627–636.
- [241]. Glatz, J. F. C., van der Vusse, G. J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res*, **1996**, 35, 243–282.
- [242]. Coe, N. R., Bernlohr, D. A. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1391, 287–306.
- [243]. Makowski, L., Boord, J. B., Kazuhisa, M. K., Babaev, V. R., Uysal, K. T., Morgan, M. A., Parker, R. A., Suttles, J., Sergio, F. S., Hotamisligil, G. S., Linton, M. F. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med*, **2001**, 7(6), 699–705.
- [244]. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M. F. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res*, **2000**, 41, 2017–2023.
- [245]. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M. F., Garvey, W. T. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, **2002**, 165 (2), 259-69.

- [246]. Llaverias, G., Noé, V., Peñuelas, S., Vázquez-Carrera, M., Sánchez, R. M., Laguna, J. C., Ciudad C. J., Alegret, M. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, 318 (1), 265–274.
- [247]. Hotamisligil, G. S., Johnson, R. S., Distel, R. J., Ellis, R., Papaioannou, V. E., Spiegelman, B. M. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, **1996**, 274, 1377–1379.
- [248]. Uysal, K. T., Scheja, L., Wiesbrock, S. M., Bonner-Weir, S., Hotamisligil, G. S. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*, **2000**, 141, 3388–3396.
- [249]. Tatemoto, K., Hosoya M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Fujino, M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**, 251 (2), 471-476.
- [250]. Masri, B., Knibiehler B., Audigier, Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal*, **2005**, 17, 4, 415-426.
- [251]. Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartre, N., Vaudry, H., Corvol, P., Llorens-Cortes, C. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J Am Soc Nephrol*, **2008**, 19, 1015–1024.
- [252]. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., Nguyen, T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, **1993**, 136 (1–2), 355–360.
- [253]. Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., Yi, Y., Choe, W., Kolson, D. L., Mitrovic, B., Zhou, Y., Faulds, D., Collman, R. G., Hesselgesser, J., Horuk, R., Doms, R. W. An orphan seven transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*, **1998**, 72, 7934–7940.
- [254]. Matsumoto, M., Hidaka, K., Akiho, H., Tada, S., Okada, M., Yamaguchi, T. Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven transmembrane receptor, APJ, in human brain. *Neurosci Lett*, **1996**, 219, 119–122.
- [255]. Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y., Lawrie, K. W., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J. E., Herrity, N. C., Murdock, P., Darker, J. G. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem*, **2003**, 84, 1162–1172.
- [256]. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., O'Dowd, B. F. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem*, **2000**, 74, 34–41.
- [257]. Hansen, A., Chen, Y., Inman, J. M., Phan, Q. N., Qi, Z. Q., Xiang, C. C., Palkovits, M., Cherman, N., Kuznetsov, S. A., Robey, P. G., Eva, M. E., Brownstein, M. J. Sensitive and specific method for detecting G protein-coupled receptor mRNAs. *Nature Methods*, **2007**; 4: 35–37.

- [258]. Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., Davenport, A.P. [<sup>125</sup>I]-(Pyr<sup>1</sup>) Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Brit J Pharmacol*, **2001**, 132, 1255–1260.
- [259]. Kleinz, M. J., Davenport, A. P. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Reg pept*, **2004**, 118, 119–125.
- [260]. Kleinz, M. J., Skepper, J. N., Davenport, A. P. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Reg pept*, **2005**, 126, 233–240.
- [261]. Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpenne, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J. S., Valet, P. Apelin, a newly identified adipokine upregulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, **2005**, 146, 1764–1771.
- [262]. Butruille, L., Drougard, A., Knauf, C., Moitrot, E., Valet, P., Storme, L., Deruelle, P., Lesage, J. The apelinergic system: sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice. *Peptides*, **2013**, 46, 94–101.
- [263]. Than, A., He, H. L., Chua, S. H., Xu, D., Sun, L., Leow, M. K. S., Chen, P. Apelin enhances Brown Adipogenesis and Browning of White Adipocytes. *J Biol Chem*, **2015**, 1–25
- [264]. Zoua, M. X.; Liu, H. Y.; Haraguchi, Y., Soda, Y., Kazuhiko, T. K., Hoshino, H. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Letters*, **2000**, 473, 15–18.
- [265]. Cheng, X., Cheng, X. S., Pang, C. C. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, **2003**, 470, 171–175.
- [266]. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., Fujimiya, M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*, **2001**, 99, 87–92.
- [267]. Farkasfalvi, K., Stagg, M. A., Coppen, S. R., Siedlecka, U., Lee, J., Soppa, G. K., Marczin, N., Szokodi, I., Yacoub, M. H., Terracciano, C. M. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem Biophys Res Commun*, **2007**, 357, 889–895.
- [268]. Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllyla, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuhola, J., Rysa, J., Toth, M., Ruskoaho, H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*, **2002**, 91, 434–440.
- [269]. Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillo, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatei, M., Bloom, S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**; 291: 1208–1212.
- [270]. Chen, M. M., Ashley, E. A., Deng, D. X., Tsalenko, A., Deng, A., Tabibiazar, R., Ben-Dor, A., Fenster, B., Yang, E., King, J. Y., Fowler, M., Robbins, R., Johnson, F. L., Bruhn, L., McDonagh, T., Dargie, H., Yakhini, Z., Tsao, P. S., Quertermous, T. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation*, **2003**, 108, 1432–1439.

- [271]. Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., Sugaya, T., Matsuzaki, H., Yamamoto, R., Shiota, N. H., Okunishi, H., Kihara, M., Umemura, S., Sugiyama, F., Yagami, K., Kasuya, Y., Mochizuki, N., Akiyoshi F. A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem*, **2004**, 279, 26274–26279.
- [272]. Lee, D. K., George, S. R., O'Dowd, B. F. Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci*, **2006**, 27, 190–194.
- [273]. Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Miklos, P. M., Llorens-Cortes, C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem*, **2001**, 77 (4), 1085 –1096.
- [274]. De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., Llorens-Cortes, C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *PNAS*, **2004**, 101, 10464–10469.
- [275]. Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., Beaudet, A. Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology*, **2004**, 145, 4392–4400.
- [276]. Tobin, V. A., Bull, P. M., Arunachalam, S., O'Carroll, A. M., Ueta, Y., Ludwig, M. The effects of apelin on the electrical activity of hypothalamic magnocellular vasopressin and oxytocin neurons and somatodendritic peptide release. *Endocrinology*, **2008**, 149, 6136–6145.
- [277]. Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., Fujino, M. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrums. *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1452, 25-35.
- [278]. Kunduzova, O., Alet, N., Delesque-Touchard, N., Millet, L., Castan-Laurell, I., Muller, C., Dray, C., Schaeffer, P., Herault, J. P., Savi, P., Bono, F., Valet, P. Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J*, **2008**, 22, 4146–4153.
- [279]. Geiger, K., Muendlein, A., Stark, N., Saely, C. H., Wabitsch, M., Fraunberger, P., Drexel, H. Hypoxia induces apelin expression in human adipocytes. *Horm Metab Res*, **2011**, 43(6), 380–385.
- [280]. Berry, M. F., Pirolli, T. J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K. J., Gardner, T. J., Woo, Y. J. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation*, **2004**, 110 (suppl II), II-187–II-193.
- [281]. Dai, T., Ramirez-Correa, G., Gao, W. D. Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur J Pharmacol*, **2006**, 553, 222–228.
- [282]. Japp, A. G., Cruden, N. L., Barnes, G., van Gemeren, N., Mathews, J., Adamson, J., Johnston, N. R., Denvir, M. A., Megson, I. L., Flapan, A. D., Newby, D. E. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*, **2010**, 121, 1818–1827.
- [283]. Wang, C., Du, J. F., Wu, F., Wang, H. C. Apelin decreases the SR Ca<sup>2+</sup> content but enhances the amplitude of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*, **2008**, 294, H2540–H2546.



- [284]. Hashimoto, T., Kihara, M., Ishida, J., Imai, N., Yoshida, S. I., Toya, Y., Fukamizu, A., Kitamura, H., Umemura, S. Apelin Stimulates Myosin Light Chain Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2006**, 26, 1267-1272.
- [285]. Ladeiras-Lopes, R., Ferreira-Martins, J., Adelino, F., Leite-Moreira, A. F. The Apelinergic System: The Role Played in Human Physiology and Pathology and Potential Therapeutic Applications. *Arq Bras Cardiol*, **2008**, 90(5), 343-349.
- [286] Hotamışlıgil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**, 91, 4854-4858.
- [287]. Shah, A., Nehal, M. N., Reilly, M. P. Adipose Inflammation, Insulin Resistance, and Cardiovascular Disease. *J Parenter Enteral Nutr*, **2008**, 32 (6), 638-644.
- [288]. Vieira-Potter, V.J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol*, **2014**, 16 (10), 1484-1492.
- [289]. van Harmelen, V., Skurk, T., Hauner H. Primary culture and differentiation of human adipocyte precursor cells. *Methods Mol Med*, **2005**, 107, 125-135.
- [290]. McNelis, J. C., Olefsky, J. M. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity*, **2014**, 41, 36-48.
- [291]. Bruun, J. M., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., Richelsen, B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): Implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*, **2005**, 90, 2282-2289.
- [292]. Christiansen, T., Richelsen, B., Bruun, J. M. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes*, **2005**, 29, 146-150.
- [293]. Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A. Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S., Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, **2009**, 15, 930-939
- [294]. Lin, Y., Lee, H. Berg, A. H., Lisanti, M. P., Shapiro, L., Scherer, P. E. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem*, **2000**, 275, 24255-24263.
- [295]. Cottam, D. R, Mattar, S. G, Barinas-Mitchell, E., Eid, G., Kuller, L., Kelley, D. E., Schauer, P. R. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg*, **2004**, 14, 589-600.
- [296]. Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., Manolagas S. C., Chrousos G. P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*, **1998**, 15,128 (2),127-37.
- [297]. Lanthier, N., Leclercq, I. A. Adipose tissues as endocrine target organs. *Best Pract Res Cl Ga*, **2014**, 28, 545-558.
- [298]. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I, Lima, F. B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, **2006**, 50, 216-229.

- [299]. Diraison, F., Dusserre, E., Vidal H., Sothier, M., Beylot, M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2002**, 282, E46-E51.
- [300]. Crossno, J. T. Jr., Majka, S. M., Grazia, T., Gill, R. G., Klemm, D. J. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest*, **2006**, 116, 3220-3228.
- [301]. Sarjeant, K., Stephens, J. M. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2012**, 4 (a008417), 1-19.
- [302]. Green H., Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, **1974**, 3, 127-133.
- [303]. Green, H., Kehinde, O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*, **1976**, 7, 105-113.
- [304]. Green, H., Kehinde, O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol*, **1979**, 101, 169-172.
- [305]. Ghorbani, A., Abedinzade, M. Comparison of In Vitro and In Situ Methods for Studying Lipolysis. *ISRN Endocrinology*, **2013**, 205385, 1-6.
- [306]. Moreno-Navarrete, J. M., Fernández-Real, J. M. Adipocyte Differentiation. *Adipose Tissue Biology*, **2012**, VI (Bölüm 2), 17-38.
- [307]. Distel, R. J., Ro, H. S., Rosen, B. S., Groves, D. L., Spiegelman, B. M. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: Direct participation of c-fos. *Cell*, **1987**, 49, 835-844.
- [308]. Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Suzuki, R., Kitamura, T., Akira, S., Kadowaki, T., Nagai, R. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab*, **2005**, 1, 27-39.
- [309]. Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S., Friedman, J. M. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 34167-34174.
- [310]. Birsoy, K., Chen, Z., Friedman, J. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab*, **2008**, 7, 339-347.
- [311]. Cao, Z., Umek, R. M., McKnight, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, **1991**, 5, 1538-1552.
- [312]. Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M., McKnight, S. L. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*, **1995**, 9, 168-181.
- [313]. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J.L., Brown, M. S. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, **1997**, 99, 838-845.

- [314]. Stephens, J. M., Morrison, R. F., Pilch, P. F. The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **1996**, 271, 10441–10444.
- [315]. Kawai, M., Namba, N., Mushiake, S., Etani, Y., Nishimura, R., Makishima, M., Ozono, K. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPAR $\gamma$  pathway. *J Mol Endocrinol*, **2007**, 38, 19–34.
- [316]. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., Mortensen, R. M. PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, **1999**, 4, 611–617.
- [317]. Hu, E., Tontonoz, P., Spiegelman, B. M. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci*, **1995**, 92, 9856–9860.
- [318]. Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **1994**, 79, 1147–1156.
- [319]. Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P., Camp, H. S. PPAR $\gamma$  knockdown by engineered transcription factors: Exogenous PPAR $\gamma$ 2 but not PPAR $\gamma$ 1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev*, **2002**, 16, 27–32.
- [320]. Doney, A. S., Fischer, B., Leese, G., Morris, A. D., Palmer, C. N. Cardiovascular risk in type 2 diabetes is associated with variation at the PPAR $\gamma$  locus: A Go-DARTS study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2004**, 24, 2403–2407.
- [321]. Monajemi, H., Zhang, L., Li, G., Jenning, E. H., Cao, H., Maas, M., Brouwer, C. B., Kalkhoven, E., Stroes, E., Hegele, R. A., Leff, T. Familial partial lipodystrophy phenotype resulting from a single-base mutation in deoxyribonucleic acid-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *J Clin Endocrinol Metab*, **2007**, 92, 1606–1612.
- [322]. Cornelius, P., Enerback, S., Bjursell, G., Olivercrona, T., Pekala, P. H. Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumor necrosis factor. *Biochem J*, **1988**, 249, 765–769
- [323]. Dani, C., Amri, E. Z., Bertrand, B., Enerback, S., Bjursell, G. Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. *J Cell Biochem*, **1990**, 43, 103–110.
- [324]. Cornelius, P., MacDougald, O. A., Lane, M. D. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr*, **1994**, 14, 99–129.
- [325]. Clarke, S. L., Robinson, C. E., Gimble, J. M. CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, 240, 99–103.
- [326]. Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L. R., Farmer, S. R. Conditional ectopic expression of C/EBP $\beta$  in NIH3T3 cells induces PPAR $\gamma$  and stimulates adipogenesis. *Genes Dev*, **1995**, 9, 2350–2363.
- [327]. Christy, R. J., Kaestner, K. H., Geiman, D. E., Lane, M. D. CCAAT/ enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**, 88, 2593–2597.
- [328]. Lin, F. T., Lane, M. D. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**, 91, 8757–8761.

- [329]. Tang, Q. Q., Lane, M. D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem*, **2012**, 81, 715–736.
- [330]. Theriault, B. L., Shepherd, T. G., Mujumdar, M. L., Nachtigal, M. W. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, **2007**, 28 (6), 1153–1162.
- [331]. Yoshikawa, H., Yoshioka, K., Nakase, T., Itoh, K. Stimulation of Ectopic Bone Formation in Response to BMP-2 by Rho Kinase Inhibitor. *Clin Orthop Relat Res*, **2009**, 467, 3087–3095.
- [332]. Bowers, R. R., Kim, J. W., Otto, T. C., Lane, M. D. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2006**, 103, 13022–13027.
- [333]. Bowers, R. R., Lane, M. D. A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle*, **2007**, 6, 385–389.
- [334]. Huang, H. Y., Song, T. J., Li, X., Hu, L. L., He, Q., Liu, M., Lane, M. D., Tang, Q. Q. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2009**, 106, 12670–75.
- [335]. Tang, Q. Q., Otto, T. C., Lane, M. D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**, 101, 9607–9611.
- [336]. Bowers, R. R., Lane, M. D. Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. *Cell Cycle*, **2008**, 7, 1191–1196.
- [337]. Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., MacDougald, O. A. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, **2000**, 289, 950–53.
- [338]. Kang, S., Bennett, C. N., Gerin, I., Rapp, L. A., Hankenson, K. D., Macdougald, O. A. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, **2007**, 282, 14515–14524.
- [339]. Qian, S. W., Li, X., Zhang, Y. Y., Huang, H. Y., Liu, Y., Sun, X., Tang, Q. Q. Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC Dev Biol*, **2010**, 10, 47, 1-11.
- [340]. Rajan, S., Gupta, A., Beg, M., Shankar, K., Srivastava, A., Salil Varshney, S., Kumar, D., Gaikwad, A. N. Adipocyte transdifferentiation and its molecular targets. *Differentiation*, **2014**, 87, 183–192.
- [341]. Qiu, Z., Wei, Y., Chen, N., Jiang, M., Jiarui Wu, J. Liao, K. DNA Synthesis and Mitotic Clonal Expansion Is Not a Required Step for 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation into Adipocytes. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 11988–11995.
- [342]. Tang, Q. Q., Otto, T. C., Lane, M. D. CCAAT/enhancer binding protein b is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, 100, 850–855.
- [343]. Tang, Q. Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J. W., Otto, T. C., Pandey, A., Lane, M. D. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein by MAPK and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is required for adipogenesis. *PNAS*, **2005**, 102, 28, 9766–9771.

- [344]. Niemelä S., Miettinen, S., Sarkanen, J. R., Ashammakhi, N. Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. *Topics in Tissue Engineering*, **2008**, 4, 1-26.
- [345]. Bourne, H. R., Sanders, D.A., McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **1990**, 348, 125-132.
- [346]. Wettschureck, N., Offermans, S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol Rev*, **2005**, 85, 1159-1204.
- [347]. Hamm, H. E. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*, **1998**, 273, 669-672.
- [348]. Neer, E. J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 1995, 80, 249-257.
- [349]. Casey, P. J., Seabra, M. C. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem*, **1996**, 271, 5289-5292.
- [350]. Bos, J. L., Rehmann, H., Wittinghofe, A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, **2007**, 129, 5, 865-877.
- [351]. Cherfils, J., Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, 2013, 93, 269-309.
- [352]. Bishop, A. L., Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J*, **2000**, 348, 241-255.
- [353]. Loirand, G., Sauzeau, V., Pacaud, P. Small g proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects. *Physiol Rev*, **2013**, 93, 1659-1720.
- [354]. Ridley, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc*, **2013**, 251, 3, 242-249.
- [355]. Madaule, P., Axel, R. A novel ras-related gene family. *Cell*, **1985**, 41, 31-40.
- [356]. Bustelo, X. R., Sauzeau, V., Berenjano, I. M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, **2007**, 29 (4), 356-370.
- [357]. Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **1991**, 349 (6305), 117-127.
- [358]. Pankaj, G. Dual function of LIMK2 in endothelial cells. Doktora tezi. Ludwig Maximilians Üniversitesi tıp fakültesi insan biyolojisi AD, Münih, **2005**.
- [359]. Etienne-Manneville S., Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **2002**, 420, 629-663.
- [360]. Vicente-Steijn, R., Kolditz, D. P., Mahtab, E. A., Askar, S. F., Bax, N. A., Van Der Graaf, L. M., Wisse, L. J., Passier, R., Pijnappels, D. A., Schaliij, M. J., Poelmann, R. E., Gittenberger-De Groot, A. C., Jongbloed, M. R. Electrical activation of sinus venosus myocardium and expression patterns of RhoA and Isl-1 in the chick embryo. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **2010**, 21, 1284-1292.
- [361]. Chen, W., Mao, K., Liu, Z., Dinh-xuan, A. T. The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer. *Oncology Letters*, **2014**, 8, 1907-1911.

- [362]. Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B., van Aelst, L. Rho GTPases: Signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*, **2000**, 261, 1–12.
- [363]. Jaffe, A. B., Hall, A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*, **2002**, 84, 57–80.
- [364]. Ridley, A. J. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **2004**, 84, 13–19.
- [365]. Ridley, A. J., Hall, A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **1992**, 70, 389–399.
- [366]. Olson, M. F., Ashworth, A., Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, **1995**, 269, 1270–1272.
- [367]. Aznar, S., Lacal, J. C. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett*, **2001**, 165, 1–10.
- [368]. Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A., Hotchin, N. A. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol*, **1997**, 137, 1421–1431.
- [369]. Somlyo, A. V. New roads leading to Ca<sup>2+</sup> sensitization. *Circ Res*, **2002**, 91, 83–88.
- [370]. Zhang, B., Chernoff, J., Zheng, Y. Interaction of Rac1 with GTPase-activating proteins and putative effectors. A comparison with Cdc42 and RhoA. *J Biol Chem*, **1998**, 273, 8776–8782.
- [371]. Iden, S., Collard, J. G. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2008**, 9, 846–859.
- [372]. Adamson, P., Marshall, C. J.; Hall, A.; Tilbrook, P. A. Post-translational modifications of p21Rho proteins. *J Biol Chem*, **1992**, 267, 20033–20038.
- [373]. Adamson, P., Paterson, H. F.; Hall, A. Intracellular localization of the p21Rho proteins. *J Cell Biol*, **1992**, 119, 617–627.
- [374]. Fritz, G., Henninger, C. Rho GTPases: Novel Players in the Regulation of the DNA Damage Response? *Biomolecules*, **2015**, 5, 2417–2434.
- [375]. Hoffman, G. R., Nassar, N., Cerione, R. A. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator Rhogdi. *Cell*, **2000**, 100, 345–356.
- [376]. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, **1999**, 11, 545–554.
- [377]. Wennerberg, K., Forget, M. A., Ellerbroek, S. M., Arthur, W. T., Burrridge, K., Settleman, J., Der, C. J., Hansen, S. H. Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol*, **2003**, 13, 1106–1115.
- [378]. Guilluy, C., Garcia-Mata, R., Burrridge, K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol*, **2011**, 21(12), 718–726.
- [379]. Self, A. J., Hall, A. Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol*, **1995**, 256, 67–76.

- [380]. McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, S., Mbamalu, M., Settleman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L. B., Pawson, T. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J*, **1993**, 12 (8), 3073-3081.
- [381]. Goicoechea, S. M., Awadia, S., Garcia-Mata, R. I'm coming to GEF you. Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, **2014**; 8 (6): 535-549.
- [382]. Rossman, K. L., Der, C. J., Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide Exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2005**, 6, 167-80.
- [383]. Cook, D. R., Rossman, K.L., Der, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*, **2013**, 33, 4021-4035.
- [384]. Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., Takai, Y. Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem*, **1990**, 265, 9373-9380.
- [385]. Hart, M. J., Maru, Y., Leonard, D., Witte, O. N., Evans, T., Cerione, R. A. A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science*, **1992**; 258: 812-815.
- [386]. Boulter, E., Garcia-Mata, R. RhoGDI A rheostat for the Rho switch. *Small GTPases*, **2010**, 1 (1), 65-68.
- [387]. Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G., Pacaud, P. Phosphorylation of Serine 188 Protects RhoA from Ubiquitin/Proteasome-Mediated Degradation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res*, **2005**, 96, 1152-1160.
- [388]. Leung, T., Manser, E., Tan, L, Lim, L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*, **1995**, 270 (49), 29051-29054.
- [389]. Peck, J. W, M., Bouker, K. B., Bowden, E., Burbelo, P. D. The RhoA-binding protein, Rhoophilin-2, Regulates Actin Cytoskeleton Organization. *J Biol Chem*, **2002**, 277, 46, 43924-43932.
- [390]. Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., Narumiya, S. Rhotekin, a New Putative Target for Rho Bearing Homology to a Serine/Threonine Kinase, PKN, and Rhoophilin in the .Rho-binding Domain. *J Biol Chem*, **1996**, 271, 23, 7, 13556 -13560.
- [391]. Watanabe, N., Madaule, P., Reid T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., Narumiya, S. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*, **1997**, 16, 3044-3056.
- [392]. Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N., Shuh Narumiya, S. A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Letters*, **1995**, 377, 243 248.
- [393]. Gavard, J., Gutkind, J. S. Protein Kinase C-related Kinase and ROCK Are Required for Thrombin-induced Endothelial Cell Permeability Downstream from G $\alpha_{12/13}$  and G $\alpha_{11/q}$ . *JBC*, **2008**, 283, 44, 29888-29896.

- [394]. Robinson, J. D., Pitcher, J. A. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is a Rho-activated scaffold protein for the ERK MAP kinase cascade. *Cell Signal*, **2013**, 25, 2831–2839.
- [395]. Riento, K., Ridley, A. J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2003**, 4, 446–456.
- [396]. Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., Narumiya, S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associatedcoiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*, **1996**, 392, 189–193.
- [397]. Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J*, **1996**, 15: 1885–1893.
- [398]. Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Amano, M., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 46046–46051.
- [399]. Dvorsky, R., Blumenstein, L., Vetter, I. R., Ahmadian, M. R. Structural Insights into the interaction of ROCK I with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem*, **2004**, 279, 7098–7104.
- [400]. Hartmann, S., Ridley, A. J., Lutz, S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Frontiers in Pharmacology*, **2015**, 6 (276), 1-16.
- [401]. Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M. F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, **2001**, 3, 339–345.
- [402]. Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., Breard, J. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med*, **2001**, 201, 465–471.
- [403]. Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., Breard, J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, **2001**, 3, 346–352.
- [404]. Komander, D., Garg, R., Wan, P. T., Ridley, A. J., Barford, D. Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I: RhoE complex structure. *EMBO J*, **2008**, 27, 3175–3185.
- [405]. Wang, Y., Zheng, X. R., Riddick, N., Bryden, M., Baur, W., Zhang, X., Surks, H. K. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **2009**, 104, 531–540.
- [406]. Yoneda, A, Multhaupt, HA, Couchman, JR. The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol*, **2005**, 170, 443–453.
- [407]. Amano, M., Nakayama, M., Kaibuchi, K. Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton*, **2010**, 67, 545–554.
- [408]. Shimokawa, H., Takeshita, A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2005**; 25 (9), 1767-1775.



- [409]. Fukumoto, Y., Matoba, T., Ito, A., Tanaka, H., Kishi, T., Hayashidani, S., Abe, K., Takeshita, A., Shimokawa, H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart*, **2005**;91, 391–392.
- [410]. Denker, S. P., Huang, D. C., Orłowski, J., Furthmayr, H., Barber, D. L. Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H<sup>+</sup> translocation. *Mol Cell*, **2000**, 6, 1425–1436.
- [411]. Noma, K., Oyama, N., Liao, J. K. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2006**, 290 (3), C661–C668.
- [412]. DeFeo, T. T., Morgan, K. G. Calcium-force relationships as detected with aequorin in two different vascular smooth muscles of the ferret. *J Physiol*, **1985**, 369, 269-282.
- [413]. Bradley, A.B., Morgan, K.G. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during pocine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol*, **1987**, 385, 437–448.
- [414]. Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev*, **2003**, 83, 1325–1358.
- [415]. Wier, W. G., Morgan, K. G. α1-Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **2003**, 150, 91–139.
- [416]. Dimopoulos, G. J., Semba, S., Kitazawa, K., Eto, M., Kitazawa, T. Ca<sup>2+</sup>-Dependent Rapid Ca<sup>2+</sup> Sensitization of Contraction in Arterial Smooth Muscle. *Circ Res*, **2007**, 100 (1), 121–129.
- [417]. Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **1994**, 372 (6503), 231-236.
- [418]. Fukata, Y., Amano, M., Kaibuchi, K. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **2001**, 22 (1), 32-39.
- [419]. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J. Actin dynamics, architecture and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, **2014**, 94, 235–263.
- [420]. Dupin I., Etienne-Manneville S. Nuclear positioning: mechanisms and functions. *Int J Biochem Cell Biol*, **2011**, 43, 1698-16707.
- [421]. Gundersen, G. G., Worman, H. J. Nuclear positioning. *Cell*, **2013**, 152, 1376-89.
- [422]. Holmes, K., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature*, **1990**, 347, 44–49.
- [423]. Janmey, P. A. Cell Membranes and the Cytoskeleton. *Handbook of Biological Physics 1* (edited by R. Lipowsky and E. Sackmann), **1995**; 805-849.
- [424]. Burlacu, S., Janmey, P. A., Borejdo, J. Distribution of actin filament lengths measured by fluorescence microscopy, *Am J Physiol*, **1992**, C5, 69–77.
- [425]. Müller, O, Gaub, H, Bärmann, M, Sackmann, E. Viscoelastic moduli of sterically and chemically cross-linked actin networks in the dilute and semi-dilute regime: Measurements by an oscillating disk rheometer. *Macromolecules*, 1991, 24, 3111–3120.

- [426]. Hvidt, S., Janmey, P. Elasticity and flow properties of actin gels. *Makromol Chem Macromol Symp*, **1990**, 39, 209–213.
- [427]. Janmey, P. A., Hvidt, S., Peetermans, J., Lamb, J., Ferry, J. D., Stossel, T. P. Viscoelasticity of F-actin and F-actin/gelsolin complexes. *Biochemistry*, **1988**, 27, 8218–8227.
- [428]. Goldman, R., Steiner, P. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments. *Ann Rev Biochem*, **1990**, 57, 593-625.
- [429]. Leterrier, J. L., Eyer, J. Properties of highly viscous gels formed by neurofilaments in vitro. *Biochem J*, **1987**, 245, 93–101.
- [430]. Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P., Schliwa, M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *Cell Biol*, **1991**, 113, 155–160.
- [431]. Fife, C. M., McCarroll, J. A., Kavallaris, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Brit J Pharmacol*, **2014**, 171, 5507–5523.
- [432]. Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C., Kumar, S., Geisse, N. A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K. K., Ingber, D. E., Weitz, D. A. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol*, **2006**, 173, 733–741.
- [433]. Fletcher, D. A., Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **2010**, 463 (7280), 485–492.
- [434]. Jordan, M. A., Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, **2004**, 4, 253–265.
- [435]. Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I. R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M. A., Wittinghofer, A. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell*, **2004**, 13, 511-22.
- [436]. Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya S., Watanabe, N. Actin Polymerization-Driven Molecular Movement of mDia1 in Living Cells. *Science New Series*, **2004**, 303, 5666, 2007-2010.
- [437]. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi K. Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). *Science*, **1996**, 273.
- [438]. Eitaki, M., Yamamori, T., Meike, S., Yasui, H., Inanami, O. Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC Cancer*, **2012**, 12, 469.
- [439]. Gunnarsen, J. M., Spirkoska, V., Smith, P. E., Danks, R. A., Tan, SS. Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression. *Glia*, 2000, 32, 146–154.
- [440]. Wang, W., Mouneimne, G., Sidani, M., Wyckoff, J., Chen, X., Makris, A., Goswami, S., Bresnick, A. R., John S. Condeelis, J. S., The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *JCB*, 173, **2006**, 3, 395–404.

- [441]. Martoglio, A. M., Tom, B. D., Starkey, M., Corps, A. N., Charnock-Jones, D. S., Smith, S. K. Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays. *Mol Med*, **2000**, 6, 750–765.
- [442]. Turhani, D., Krapfenbauer, K., Thurnher, D., Langen, H., Fountoulakis, M. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis*, **2006**, 27, 1417–1423.
- [443]. Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A. L., Wyckoff, J. B., Sahai, E., Strahler, J. R., Walker, A., Arenberg, D. A., Reddy, R. C., Akulapalli, S., Thannickal, V. J., Standiford, T. J., Andrews, P. C., Omenn, G. S. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res*, **2004**, 64, 8585–8594.
- [444]. Bagheri-Yarmand, R., Mazumdar, A., Sahin, A. A., Kumar, R. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer*, **2006**, 118, 2703–2710.
- [445]. Horita, Y., Ohashi, K., Mukai, M., Inoue, M., Mizuno, K. Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knockdown of Slingshot or LIM kinase. *J Biol Chem*, **2008**, 283, 6013–6021.
- [446]. Ross-Macdonald, P., de Silva, H., Guo, Q., Xiao, H., Hung, C. Y., Penhallow, B., Markwalder, J., He, L., Attar, R. M., Lin, T. A., Seitz, S., Tilford, C., Wardwell-Swanson, J., Jackson, D. Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors. *Mol Cancer Ther*, **2008**, 7, 3490–3498.
- [447]. Scott, R. W., Hooper, S., Crighton, D., Li, A., Konig, I., Munro, J., Trivier, E., Wickman, G., Morin, P., Croft, D. R., Dawson, J., Machesky, L., Anderson, K. I., Sahai, E. A., Olson, M. F. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J Cell Biol*, **2010**, 191, 169–185.
- [448]. Bernard, O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, **2007**, 39, 1071–1076.
- [449]. Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Narumiya, S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, **1999**, 285, 895–898.
- [450]. Mierke, C.T, Rosel, D., Fabry, B., Brabek, J. Contractile forces in tumor cell migration. *Eur J Cell Biol*, **2008**, 87, 669–676.
- [451]. Chang, T. C., Chen, Y. C., Yang, M. H., Chen, C. H., Hsing, E. W., Ko, B. S., Liou, J. Y., Kenneth, K., Wu, K. K. Rho kinases regulate the renewal and neural differentiation of embryonic stem cells in a cell plating density-dependent manner. *PLoS ONE*, **2010**, 5 (2), 1-9.
- [452]. Antras, J., Hilliou, F., Redziniak, G., Pairault, J. Decreased biosynthesis of actin and cellular fibronectin during adipose conversion of 3T3-F442A cells. Reorganization of the cytoarchitecture and extracellular matrix fibronectin. *Biology of the Cell*, **1989**, 66, 3, 247-254.
- [453]. Chen, L., Shi, K., Frary, C. E., Ditzel, N., Hu, H., Qiu, W., Kassem, M. Inhibiting actin depolymerization enhances osteoblast differentiation and bone formation in human stromal stem cells. *Stem Cell Research*, **2015**, 15, 281–289.

- [454]. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., Chen, C. S. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev Cell*, **2004**, 6, 483–495.
- [455]. Villalonga, P., Ridley, A. J. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors*, **2006**, 24, 159-164.
- [456]. Chircop, M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases*, **2014**, 5(e29770),1-14.
- [457]. Maddox, A. S., Burridge, K. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol*, **2003**, 160, 255-265.
- [458]. Matthews, H. K., Delabre, U., Rohn, J. L., Guck, J., Kunda, P., Baum, B. Changes in Ect2 localization couple actomyosin- dependent cell shape changes to mitotic progression. *Dev Cell*, **2012**, 23, 371-383.
- [459]. Mali, P., Wirtz, D., Searson, P. C. Interplay of RhoA and motility in the programmed spreading of daughter cells postmitosis. *Biophys J*, **2010**, 99, 3526-3534.
- [460]. Croft, D. R., Olson, M. F. The Rho GTPase Effector ROCK Regulates Cyclin A, Cyclin D1, and p27Kip1 Levels by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*, **2006**, 4612–4627.
- [461]. Bakal, C. J., Finan, D., LaRose, J., Wells, C. D., Gish, G., Kulkarni, S., DeSepulveda, P., Wilde, A., Rottapel, R. The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**, 102, 9529-34.
- [462]. Yasuda, S., Oceguera-Yanez, F., Kato, T., Okamoto, M., Yonemura, S., Terada, Y., Toshimasa, I. T., Narumiya, S. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature*, **2004**, 428, 767-771.
- [463]. Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J. S., Miki, T. Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol Biol Cell*, **2006**, 17, 43-55.
- [464]. Miller, A. L., Bement, W. M. Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux. *Nat Cell Biol*, **2009**, 11, 71-77.
- [465]. Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T., Takai, Y. Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). *J Cell Biol*, **1993**, 120, 1187–1195.
- [466]. Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Hall, A., Glotzer, M. A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr Biol*, **1997**, 7, 12–23.
- [467]. O’Connell, C. B., Wheatley, S. P., Ahmed, S., Wang, Y. L. The small GTP-binding protein rho regulates cortical activities in cultured cells during division. *J Cell Biol*, **1999**, 144, 305–313.
- [468]. Moorman, J. P., Bobak, D. A., Hahn, C. S. Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4. *J Immunol*, **1996**, 156, 4146–4153.
- [469]. Kaji, N., Muramoto, A., Mizuno, K. LIM Kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J Biol Chem*, **2008**, 283 (8), 4983–4992.

- [470]. Sumi, T., Hashigasako, A., Matsumoto, K., Nakamura, T. Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition. *Exp Cell Res*, **2006**, 312, 1021-1030.
- [471]. Nishimura, Y., Yonemura, S. Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci*, **2006**, 119, 104-114.
- [472]. Heng, YW, Koh, CG. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The Int J Biochem Cell Biol*, **2010**, 42, 1622-1633.
- [473]. Bernard, O., Ganiatsas, S., Kannourakis, G., Dringen, R. Kiz-1, a protein with LIM zinc finger and kinase domains, is expressed mainly in neurons. *Cell Growth Differ*, **1994**, 5, 1159-1171.
- [474]. Bernard, O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, **2007**, 39, 1071-1076.
- [475]. Nunoue, K., Ohashi, K., Okano, I., Mizuno, K. LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif-containing protein kinase family. *Oncogene*, **1995**, 11, 701-710.
- [476]. Hung, A. Y., Sheng, M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem*, **2002**, 277, 5699-5702.
- [477]. Sheng, M., Kim, M. J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*, 2002, 298, 776-780.
- [478]. Nagata, K., Ohashi, K., Yang N., Mizuno K. The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem J*, **1999**, 343, 99-105.
- [479]. Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T., Nakamura, T. *Oncogene*, **1994**, 9(6), 1605-1612.
- [480]. Okano I, Hiraoka J, Otera H, Nunoue K, Ohashi K, Iwashita S, Hirai M, Mizuno K. Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J Biol Chem*, 1995; 270: 31321-31330
- [481]. Foletta, V. C., Moussi, N., Sarmiere, P. D., Bamburg, J. R., Bernard, O. LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp Cell Res*, **2004**, 294, 392-405.
- [482]. Beltrami, A. Structural and functional analysis of cGMP dependent protein kinase I (cGKI) and LIM kinase 1 (LIMK1) engaged in BMP signaling crosstalk. Doktora tezi, Freie Üniversitesi Biyoloji, Farmakoloji ve Kimya Bölümü, Berlin, Almanya, **2012**.
- [483]. Scott, R. W., Olson, M. F. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med (Berl)*, **2007**, 85, 555-568.
- [484]. Chakrabarti, R. LIMK1 (LIM domain kinase 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, **2010**, 14 (7), 641-644.
- [485]. Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., Mizuno, K. Rho associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem*, **2000**, 275 (5, 3577-3582.

- [486]. Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., Minden, A. Cytoskeletal Changes Regulated by the PAK4 Serine/Threonine Kinase Are Mediated by LIM Kinase 1 and Cofilin. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 34, 32115–32121.
- [487]. Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., Gill, G. N. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*, 1999, 1, 253-259.
- [488]. Smolich, B., Vo, M., Buckley, S., Plowman, G., Papkoff, J. Cloning and Biochemical Characterization of LIMK-2, a Protein Kinase Containing Two LIM Domains. *J Biochem*, **1997**, 121, 382-388.
- [489]. Koshimizu, U., Takahashi, H., Yoshida, M. C., Nakamura, T. cDNA Cloning, Genomic Organization, and Chromosomal Localization of the Mouse LIM Motif-Containing Kinase Gene, *Limk2*. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, 241, 2, 243–250.
- [490]. Ikebe, C., Ohashi, K., Mizuno, K. Identification of Testis-Specific (*Limk2t*) and Brain-Specific (*Limk2c*) Isoforms of Mouse LIM-Kinase 2 Gene Transcripts. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**, 246, 2, 307–312.
- [491]. Takahashi, H., Funakoshi, H., Nakamura, T. Lim-kinase as a regulator of actin dynamics in spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res*, **2003**, 103, 290–298.
- [492]. Stanyon, C. A, Bernard, O. Lim-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol*, **1999**, 31, 389–394.
- [493]. Mittelstaedt, K. Y. M. K. Structural and functional characterisation of LIM kinases. Doktora tezi, St. Vincent Hastanesi St. Vincent Medikal Araştırma Enstitüsü Tıp Departmanı, Melbourne Üniversitesi, **2012**
- [494]. Manetti, F. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med Res Rev*, **2012**, 32, 968–998.
- [495]. Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., Caroni P. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, **1998**, 393, 805–809.
- [496]. Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, **1998**, 393, 809–812.
- [497]. Hotulainen, P., Paunolla, E., Vartiainen, M. K., Lappalainen, P. Actin-depolymerizing Factor and Cofilin-1 Play Overlapping Roles in Promoting Rapid F-Actin Depolymerization in Mammalian Nonmuscle Cells. *Mol Biol Cell*, **2005**, 16, 649–664.
- [498]. Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., Mizuno, K. Actin-depolymerizing Factor and Cofilin-1 Play Overlapping Roles in Promoting Rapid F-Actin Depolymerization in Mammalian Nonmuscle Cells. *J Cell Biol*, **2007**, 177, 465–476.
- [499]. Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., Mizuno, K. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*, **2001**, 12, 1131-1145.

- [500]. Bernstein, B. W., Bamburg, J. R. ADF/Cofilin: A Functional Node in Cell Biology. *Int J Mol Sci*, **2015**, 16, 4095-4120.
- [501]. Todorovski Z. A. LIMK1 Regulation of Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. Doktora tezi, Toronto Üniversitesi fizyoloji Bölümü, Toronto, Kanada, **2012**.
- [502]. Munsie, L. N., Desmond, C. R. Truan, R. Cofilin nuclear–cytoplasmic shuttling affects cofilin–actin rod formation during stress. *J Cell Sci*, **2012**, 125, 3977–3988.
- [503]. Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I., Sakai, H. Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**, 84, 5262–5266.
- [504]. Ohta, Y., Nishida, E., Sakai, H., Miyamoto, E. Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin. *J Biol Chem*, **1989**, 264, 16143–16148.
- [505]. Nebel, G., Meuer, S. C., Samstag, Y. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem*, **1996**, 271, 26276–26280.
- [506]. Yahara, I., Aizawa, H., Moriyama, K., Iida, K., Yonezawa, N., Nishida, E., Hatanaka, H., Inagaki, F. A role of cofilin/destrin in reorganization of actin cytoskeleton in response to stresses and cell stimuli. *Cell Struct Funct*, **1996**, 21, 421–424.
- [507]. Li, R., Doherty, J., Antonipillai, J., Chen, S., Devlin, M., Visser, K., Baell, J., Street, I., Anderson, R. L., Bernard, O. LIM kinase inhibition reduces breast cancer growth and invasiveness but systemic inhibition does not reduce metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis*, **2013**, 30, 483–495.
- [508]. Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., Itoh, K. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, 100, 7247–7252.
- [509]. Sumi, T., Matsumoto, K., Nakamura, T. Mitosis-dependent phosphorylation and activation of LIM-kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**, 290, 1315-1320.
- [510]. Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K., Mizuno, K. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J Cell Biol*, **2005**, 171, 349–359.
- [511]. Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., Mizuno, K. MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *EMBO J*; **2006**, 25, 713–726.
- [512]. Endo, M., Ohashi, K., Mizuno, K. LIM Kinase and Slingshot Are Critical for Neurite Extension. *J Biol Chem*, **2007**, 282, 13692–13702.
- [513]. Wen, Z., Han, L., Bamburg, J.R., Shim, S., Ming, G. L., Zheng, J. Q. BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *JCB*, **2007**, 178, 1, 107–119.
- [514]. Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K. Control of growth cone motility and morphology by LIM Kinase and slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci*, **2003**, 23 (7), 2527–2537.

[515]. Mishima, T, Naotsuka, M, Horita, Y, Sato, M, Ohashi, K, Mizuno, K. LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem Biophys Res Commun*, **2010**, 392, 577-581.

[516]. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1977**, 74, 3203-3207.

[517]. Davy, H. Researches, chemical and philosophical; chiefly concerning nitrous oxide, or dephlogisticated nitrous air, and its respiration. Londra: **1800**.

[518]. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*, 1999; 19 (4): 235-251

[519]. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byms, R. E., Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**, 84, 9265-9269.

[520]. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **1987**, 27, 524-526.

[521]. Lancaster, J. R. Jr. Nitric oxide in cells. *Am Sci*, **1992**, 80, 248-259.

[522]. Beckman, J. S., Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*, **1996**, 271(5), C1424-C1437.

[523]. Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M., Tomboulion P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**, 193, 1076-1082.

[524]. Malinski, T., Bailey, F., Zhang, H. Z. O., Chopp, H. M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, **1993**, 13, 355-358.

[525]. Meulemans, A. Diffusion coefficients and half lifes of nitric oxide and N-nitrosoarginine in rat cortex. *Neurosci Lett*, **1994**, 171, 89-93.

[526]. Ignarro, L. J. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. *Academic Press; San Diego, CA*, **2000**.

[527]. Liu, X., Miller, M. J. S., Joshi, M. S., Sadowska-Krowicka H., Clark D. A., Lancaster J. R. Jr. Diffusion-limited Reaction of Free Nitric Oxide with Erythrocytes. *J Biol Chem*, **1998**, 273(30), 18709-18713.

[528]. De Oliveira, M. G. S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **2016**, 119, 49-56.

[529]. Liang, H., Nacharaju, P., Friedman, A., Friedman, J. M. Nitric oxide generating/releasing materials. *Future Sci OA*, **2015**, 1(1), FS054, 1-10.

[530]. Liu, T., Schroeder, H. J., Wilson, S. M., Terry, M. H., Longo, L. D., Power, G. P., Blood, A. B. Local and Systemic Vasodilatory Effects of Low Molecular Weight S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med*, **2016**; 91, 215-223.



[531]. Cooke, J. P., Dzau, V. J. Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*, **1997**, 48, 489–509.

[532]. Ignarro, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep*, **1999**, 19, 51-71.

[533]. Scher, J. U., Pillinger, M.H., Abramson, S. B. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, **2007**, 9, 9-15.

[534]. Murad, F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*, **2006**, 355, 2003-2011.

[535]. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., Brecht, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, **1995**, 82, 743-752.

[536]. Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **2001**, 357, 593-615.

[537]. Moncada, S., Higgs, A. Mechanisms of disease; The L-Arg-NO-Pathway. *New Engl J Med*, **1993**, 329, 2002–2012.

[538]. Feng, C. Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions. *Coord Chem Rev*, **2012**, 256 (3-4), 393–411.

[539]. Klatt, P., Pfeiffer, S., List, B. M., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H. P., Werner, E.R., Schmidt, K., Mayer, B. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, **1996**, 271, 7336–7342.

[540]. List, B. M., Klosch, B., Volker, C., Gorren, A. C., Sessa, W. C., Werner, E. R., Kukovetz, W. R., Schmidt, K., Mayer, B. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*, **1997**, 323 (1), 159–165.

[541]. Forstermann, U, Sessa, WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, **2012**, 33 (7), 829–837.

[542] Li, J. M., Shah, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **2004**, 287, R1014-1030.

[543]. Schmidt, T. S., Alp, N. J. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clinical Science*, **2007**, 113, 47-63.

[544]. Forstermann, U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. *Handbook of Experimental Pharmacology—Nitric Oxide*. (Berlin, Springer), **2000**, 71–91.

[545]. Li, H., Raman, C. S., Glaser, C. B., Blasko, E., Young, T. A., Parkinson, J. F., Whitlow, M., Poulos, T. L. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, **1999**, 274, 21276–21284.

- [546]. Hemmens, B., Mayer, B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol*, **1998**, 100, 1–32.
- [547]. Fleming, I., Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **2003**, 284, R1–R12.
- [548]. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **1999**, 399, 597–601.
- [549]. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J., Sessa, W. C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain ‘calcium-independent’ eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem*, **2000**, 275, 6123–6128.
- [550]. Fleming, I., Busse, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*, **1999**, 43, 532–541.
- [551]. Sessa, W. C. eNOS at a glance. *J Cell Sci*, **2004**, 117 (12), 2427–2429.
- [552]. Ju, H., Zou, R., Venema, V. J., Venema, R. C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 18522–18525.
- [553]. Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D., Michel, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 15583–15586.
- [554]. Radomski, M. W., Palmer, R. M., Moncada, S. Characterization of the L-arginine-nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol*, **1990**, 101, 325–32.
- [555]. Radomski, MW, Palmer, RM, Moncada, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, **1987**, 2, 1057–1058.
- [556]. Gewaltig, M. T., Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, **2002**, 55 (2), 250–260.
- [557]. De Caterina, R., Libby, P., Peng, H. B., Thannickal, V. J., Rajavashisth, T. B., Gimbrone, M. A. G. Jr, Shin, W. S., Liao, J. K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, **1995**, 96, 60–68.
- [558]. Biffl, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A., Barnett, C. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. *J Surg Res*, **1996**, 63, 328–333.
- [559]. Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W., Medford, R. M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**, 93, 9114–9119.
- [560]. Takahashi, M., Ikeda, U., Masuyama, J., Funayama, H., Kano, S., Shimada, K. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, **1996**, 8, 817–821.
- [561]. Bredt, DS, Snyder, SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**, 87, 682–685.

- [562]. Bredt, DS, Hwang, PM, Glatt, CE, Lowenstein, C, Reed, RR, Snyder, SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, **1991**, 351, 714-718.
- [563]. Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **1994**, 23, 1121-1131.
- [564]. Hayashi, Y., Nishio, M., Naito, Y., Yokokura, H., Nimura, Y., Hidaka, H., Watanabe, Y. Regulation of Neuronal Nitric-oxide Synthase by Calmodulin Kinases. *J Biol Chem*, **1999**, 274, 29, 20597-20602.
- [565]. Komeima, K., Hayashi, Y., Naito, Y., Watanabe, Y. Inhibition of Neuronal Nitric-oxide Synthase by Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase IIa through Ser 847 Phosphorylation in NG108-15 Neuronal Cells. *J Biol Chem*, **2000**, 36, 28139-28143.
- [566]. Song, T., Hatano, N., Sugimoto, K., Horii, M., Yamaguchi, F., Tokuda, M., Miyamoto, Y., Kambe, T., Watanabe, Y. Nitric oxide prevents phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Serine1412 by inhibiting the Akt/PKB and CaM-K II signaling pathways. *Int J Mol Med*, **2012**, 30, 15-20.
- [567]. Adak, S., Santolini, J., Tikunova, S., Wang, Q., Johnson, J. D., Stuehr, D. J. Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 → Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 1244-1252.
- [568]. Zhou, L., Zhu, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, **2009**, 20, 223-230.
- [569]. Izumi, Y., Clifford, D. B., Zorumski, C. F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science*, **1992**, 257, 1273-1276.
- [570]. Izumi Y., Zorumski C. F. Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport*, **1993**, 4, 1131-1134.
- [571]. O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R., Arancio, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**, 88, 11285-11289.
- [572]. Schuman, E. M., Madiso, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **1991**, 254, 5037, 1503-1506.
- [573]. Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K., Kawai C. Purification of Nitric Oxide Synthase from Rat Macrophages. *J Biol Chem*, **1991**, 266, 19, 12544-12547.
- [574]. Hevel, J. M., White, K. A., Marletta, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem*, **1991**, 266, 22789-22791.
- [575]. Nussler, A. K., DiSilvio, M., Billiar, T. R., Hoffman, R. A., Geller, D. A., Selby, R., Madariaga, J., Simmons, R. L. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med*, **1992**, 176, 261-264.
- [576]. Geller, D. A., Billiar, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*, **1998**, 17, 7-23.

- [577]. Guo, F. H., De Raeve, H. R., Rice, T. W., Stuehr, D. J., Thunnissen, F. B., Erzurum, S. C. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**, 92, 7809–7813.
- [578]. Morrissey, J. J., McCracken, R., Kaneto, H., Vehaskari, M., Montani, D., Klahr, S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int*, **1994**, 45, 998–1005.
- [579]. MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol*, **1997**, 15, 323–350.
- [580]. Musial, A., Eissa, N. T. Inducible Nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation Pathway. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 26: 24268–24273.
- [581]. Wink, D. A., Cook, J. A., Kim, S., Vodovotz, Y., Pacelli, R., Kirshna, M. C., Russo, A., Mitchell, J. B., Jourde'heil, D., Miles, A. M., Grisham, M. B. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 11147–11151.
- [582]. Stone, J. R., Marletta, M. A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **1994**, 33, 5636-5640.
- [583]. Torres, J., Cooper, C. E., Sharpe, M., Wilson, M. T. Reactivity of nitric oxide with cytochrome c oxidase: interactions with the binuclear centre and mechanism of inhibition. *J Bioenerg Biomemb*, **1998**, 30, 63-69.
- [584]. Brown, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem*, **1995**, 232, 188-191.
- [585]. Brown, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1504, 46-57.
- [586]. Castro, L., Rodriguez, M., Radi, R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem*, **1994**, 269, 29409-29415.
- [587]. Kennedy, M. C., Antholine, W. E., Beinert, H. An EPR investigation of the products of the reaction of cytosolic and mitochondrial aconitases with nitric oxide. *J Biol Chem*, **1997**, 272 (33), 20340–20347.
- [588]. Cooper, C. E. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, 1411, 290-309.
- [589]. Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J. A., Kuno, T., Chang, B. Y., Waldman, S. A., Murad, F. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*, **1986**, 261, 7236-72341.
- [590]. Martin, E., Berka, V., Tsai, A. L., Murad F. Soluble guanylyl cyclase: the nitric oxide receptor. *Methods Enzymol*, **2005**, 396, 478-92.
- [591]. Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P., Weiner, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*, **2000**, 184, 409-420.

[592]. Weisbrod, RM, Griswold, MC, Yaghoubi, M, Komalavilas, P, Lincoln, TM, Cohen, RA. Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br J Pharmacol*, **1998**, 125, 1695-1707.

[593]. Cohen, R. A., Weisbrod, R. M., Gericke, M., Yaghoubi, M., Bierl, C., Bolotina, V. M. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase and inhibition of store operated  $Ca^{2+}$  influx. *Circ Res*, **1999**, 84, 210-219.

[594]. Ignarro, L. J., Kadowitz, P. J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1985**, 25, 171-191.

[595]. Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E., Nelson, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*, **2006**, 21, 69-78.

[596]. Webb, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiology Educ*, 2003; 27: 201-206 tone. *Physiology*, **2006**, 21, 69-78.

[597]. Mizuno, Y., Isotani, E., Huang, J., Ding, H., Stull, J. T., Kamm, K. E. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2008**, 295, C358.

[598]. Lee, M. R., Li, L., Kitazawa, T. Cyclic GMP causes  $Ca^{2+}$  desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 5063-5068.

[599]. Word, R. A., Tang, D. C., Kamm K. E. Activation properties of myosin light chain kinase during contraction/relaxation cycles of tonic and phasic smooth muscles. *J Biol Chem*, **1994**, 269, 21596-21602.

[600]. Adachi, T., Weisbrod, R. M., Pimentel, D. R., Ying, J., Sharov, V. S., Schöneich, C., Cohen, R. A. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*, **2004**, 10, 1200-1207.

[601]. Daaka, Y. S-nitrosylation-regulated GPCR signaling. *Biochim Biophys Acta*, **2012**, 1820, 743-751.

[602]. Whalen, E. J., Foster, M. W., Matsumoto, A., Ozawa, K., Violin, J. D., Que, L. G., Nelson, C. D., Benhar, M., Keys, J. R., Rockman, H. A., Koch, W. J., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J., Stamler, J. S. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Cell*, **2007**, 129, 511-522.

[603]. Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., Leung, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*, **2015**, 129, 83-94.

[604]. Wink, D. A., Mitchell, J. B. The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, **1998**, 25, 434-456.

[605]. Liu, X., Miller, M. J. S., Joshi, M. S., Thomas, D. D., Lancaster, R. J. R. Accelerated reaction of nitric oxide with  $O_2$  within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**, 95, 2175-2179.

[606]. Tamir, S., Tannenbaum, S. R. The role of nitric oxide in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta*, **1996**, 1288, F31-F36.

- [607]. Grisham, M. B., Jourd'heuil, D., Wink, D. A. Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Nitric oxide chemistry and inflammation*, **1999**, G 315-G32.
- [608]. Menaka, K. B, Ramesh, A., Thomas, B., Kumari, N. S. Estimation of nitric oxide as an inflammatory marker in periodontitis. *J Indian Soc periodontol*, **2009**, 13(2), 75-78.
- [609]. Natarajan, G., Glibetic, M., Raykova, V., Ofenstein, J. P., Thomas, R. L., Aranda, J. V. Nitric Oxide and Prostaglandin Response to Group B Streptococcal Infection in the Lung. *Ann Clin Lab Sci*, **2007**, 37 (2), 170-176.
- [610]. Saijo, F., Milsom, A. B., Bryan, N. S., Bauer, S. M., Vowinkel, T., Ivanovic, M., Andry, C., Granger, D. N., Rodriguez, J., Feelisch M. On the dynamics of nitrite, nitrate and other biomarkers of nitric oxide production in inflammatory bowel disease. *Nitric Oxide*, **2010**, 22 (2), 155–167.
- [611]. Ozden, S., Tatlipinar, S., Biçer, N., Yaylali, V., Yildirim, C., Ozbay, D., Güner, G. Basal serum nitric oxide levels in patients with type 2 diabetes mellitus and different stages of retinopathy. *Can J Ophthalmol*, **2003**, 38 (5), 393-396.
- [612]. Nisoli, E., Clementi, E., Tonello, C., Sciorati, C., Briscini, L., Carruba, M. O. Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. *Brit J Pharmacol*, **1998**, 125, 888–894.
- [613]. Aquilano, K., Barbato, D. L., Ciriolo, M. R. The multifaceted role of nitric oxide synthases in mitochondrial biogenesis and cell differentiation. *Commun Integr Biol*, **2015**, 8 (2), e1017158.1-e1017158.4.
- [614]. Zuckerbraun, B. S., Stoyanovsky, D. A., Sengupta, R., Shapiro, R. A., Ozanich, B. A., Rao, J., Barbato, J. E., Tzeng, E. Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**, 292, C824–C831.
- [615]. Chitaley, K. R., Webb, R. C. Nitric Oxide Induces Dilation of Rat Aorta via Inhibition of Rho-Kinase Signaling. *Hypertension*, **2002**, 39, 438-442.
- [616]. Takemoto, M., Sun, J., Hiroki, J., Shimokawa, H., Liao, J. K. Rho-kinase mediates hypoxia induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **2002**, 106, 57-62.
- [617]. Rikitake, Y., Liao, J. K. Rho GTP'ases, statins and nitric oxide. *Circ Res*, **2005**, 97, 1232-1235.
- [618]. Peunova, N., Scheinker, V., Ravi, K., Enikolopov, G. Nitric Oxide Coordinates Cell Proliferation and Cell Movements During Early Development of Xenopus. *Cell Cycle*, **2007**; 6 (24), 3132-3144.
- [619]. Büyükafşar, K., Arıkan, O., Ark, M., Seçilmiş, A., Ün, İ., Şingirik, E. Rho-kinase expression and its contribution to the control of perfusion pressure in the isolated rat mesenteric vascular bed. *Eur J Pharmacol*, **2004**, 485, 263–268.
- [620]. Matsumura, S., Abe, T., Mabuchi, T., Katano, T., Takagi, T., Okuda-Ashitaka, E., Tatsumi, S., Nakai, Y., Hidaka, H., Suzuki, M., Yasuharu, S. Y., Minami, T., Ito, S. Rho-kinase mediates spinal nitric oxide formation by prostaglandin E2 via EP3 subtype. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**, 338, 550–557.

- [621]. Zulauf, L., Coste, O., Marian, C., Möser, C., Brenneis, C., Niederberger, C. E. Cofilin phosphorylation is involved in nitric oxide/cGMP-mediated nociception. *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**, 390 (4), 1408-1413.
- [622] Mossman, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Meth*, **1983**, 65, 55-63.
- [623] Riss, T. L., Moravec, R. A., Andrew L Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. Cell Viability Assays. *J Immunol Meth*, **1983**, 65, 55-63.
- [624]. Krueger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition. Springer Science & Business Media*, **2008**, 15-20.
- [625]. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to NC sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1979**, 76, 4350-4354.
- [626]. LeGendre, N. Immobilon-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. *Biotechniques*, **1990**, (9), 788-805.
- [627]. Kurien, B. T., Scofield, R. H. Introduction to Protein Blotting. *Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection, Humana Press*, **2009**, (536), 15-22.
- [628]. Zhang, X., Broderick, M. Electrochemical NO sensors and their applications in biomedical research. *Biomedical Significance of Nitric Oxide, International Scientific literature, Inc*, 2003.
- [629]. Malinski, T., Mesaros, S., Patton, S. R., Mesarosova, A. Direct measurement of nitric oxide in the cardiovascular system. *Physiol Res*, **1996**, 45, 279-284.
- [630]. Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*, **1998**, 70, 2446-2453.
- [631]. Kleschyov, A. L., Munzel, T. Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol*, **2002**, 359, 42-51.
- [632]. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*, **2003**, 3, 276-284.
- [633]. Fiscus, R. R. Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neuronal cells. *Neurosignals*, **2002**, 11, 175-90.
- [634]. Cooke, J. P., Tsao, P. S. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation*, **1993**, 88, 2451-2454.
- [635]. Bogacka, I., Xie, H., Bray, G. A., Smith, S. R. Pioglitazone Induces Mitochondrial Biogenesis in Human Subcutaneous Adipose Tissue In Vivo. *Diabetes*, **2005**, 54, 1392-1399.
- [636]. Boudina, S., Graham, T. E. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. *Exp Physiol*, **2014**, 99.9, 1168-1178.

- [637]. Hemmrich, K., Gummersbach, C., Paul, N. E., Goy, D., Suschek, C. V., Kröncke, K. D., Pallua N. Nitric oxide and downstream second messenger cGMP and cAMP enhance adipogenesis in primary human preadipocytes. *Cytotherapy*, **2010**, 12, 547–553.
- [638]. Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M., McKenzie, H. Stomach NO synthesis. *Nature*, **1994**, 368, 502.
- [639]. Zweier, J. L., Samouilov, A., Kuppusamy, P. Enzyme Independent Formation Of Nitric Oxide In Tissues. Nitric Oxide in Transplant Rejection and Anti-Tumor Defense, Springer, Boston, MA, **1998**, 83-93.
- [640]. Gaudiot, N., Ribiere, C., Jaubert, A. M., Giudicelli, Y. Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2000**, 279, C1603–C1610.
- [641]. Gomez-Ambrosi, J., Becerrila, S., Oroza, P., Zabalza, S., Rodriguez, A., Muruzabal, F. J., Archanco, M., Gil, M. J., Burrell, M. A., Fruhbeck, G. Reduced adipose tissue mass and hypoleptinemia in iNOS deficient mice: effect of LPS on plasma leptin and adiponectin concentrations. *FEBS Letters*, **2004**, 577, 351–356.
- [642]. Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., Quon, M. J. Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 45, 45021–45026.
- [643]. Kou, R., Igarashi, J., Michel, T. Lysophosphatidic Acid and Receptor-Mediated Activation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *Biochemistry*, **2002**, 41, 15, 4982–4988.
- [644] van Nieuw Amerongen, G. P., van Delft, S., Vermeer, M. A., Collard, J. G., van Hinsbergh, V. W. M. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res*, 2000, 87,335-340
- [645] Ohkawara, H., Ishibashi, T., Sakamoto, T., Sugimoto, K., Nagata, K., Yokoyama, K., Sakamoto, N., Kamioka, M., Matsuoka, I., Fukuhara, S., Sugimoto, N., Takuwa, Y., Maruyama, Y. Thrombin-induced rapid Geranylgeranylation of RhoA as an Essential Process for RhoA activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2005, 280, 11, 10182–10188.
- [646]. Köksel, O., Yildirim, C., Tiftik, R. N. Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol*, **2005**, 510, 135-142.
- [647]. Büyükafşar, K., Arıkan, O., Ark, M., Kubat, H., Özveren, E. Upregulation of Rho-kinase (ROCK-2) expression and enhanced contraction to endothelin-1 in the mesenteric artery from lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol*, **2004**, 498, 1-3, 211-217.
- [648]. Roberts, A. B. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, **1998**, 24, 2-3, 111-119.
- [649]. Siegel, P. M., Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of tgf- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2003**, 3, 807-821.
- [650]. Pei, Z., Lin, D., Song, X., Li, H., Yao, H. TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGF $\beta$ 1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. *Cell Immunol*, **2008**, 254, 20–27.



- [651]. Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich J., Falk, W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- $\kappa$ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*, **2008**, 126, 233–245.
- [652]. Kopp, A., Buechler, C., Neumeier, M., Weigert, J., Aslanidis, C., Schölmerich, J. Schäffler, A. Innate Immunity and Adipocyte Function: Ligand-specific Activation of Multiple Toll-like Receptors Modulates Cytokine, Adipokine, and Chemokine Secretion in Adipocytes. *Obesity*, **2009**, 17, 648–656.
- [653]. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, **1998**, 282, 2085–2088.
- [654]. Palsson-Mcdermott, E. M., O’neill, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, **2004**, 113, 153–162.
- [655]. Ahmad, R. Al-Mass, A., Atizado, V., Al-Hubail, A., Al-Ghimlas, F., Al-Arouj, M., Bennakhi, A., Dermime, S., Behbehani, K. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *Journal of Inflammation* **2012**, 9, 48, 1-11.
- [656]. Andrukhov, O., Haririan, H., Bertl, K., Rausch, W. D., Bantleon, H. P., Moritz, A., Rausch-Fan, X. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. *J Clin Periodontol*, 2013, 40, 916–923.
- [657]. Cintra, L. T. A., Samuel, R. O., Azuma, M. M., de Queiróz, A. O. S., Ervolino, E., Sumida, D. H., de Lima, V. M. F., Gomes-Filho, J. E. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *JOE*, **2016**, 42 (5), 747–751.
- [658]. Weis, A., Oguchi, S., Cicatiello, L., Esumi, H. Dual Mechanism for the Control of Inducible-type NO Synthase Gene Expression in Macrophages during Activation by Interferon- $\gamma$  and Bacterial Lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, **1994**, 269, 8324-8333.
- [659]. Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C., Burcelin, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **2007**, 56, 1761-1772.
- [660]. Moreira, A. P. B., Texeira, T. F. S., Ferreira, A. B., Peluzio, M. D. C. G., Alfenas, R. D. C. G. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*, **2012**, 108, 801–809.
- [661]. Pendyala, S., Walker, J. M., Holt, P. R. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*, **2012**, 142 (5), 1100–1101.
- [662]. Neves, A. L., Coelho, J., Couto, L., Leite-Moreira, A., Roncon-Albuquerque, J. R. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J Mol Endocrinol*, **2013**, 51, R51–R64.

- [663]. Baker, B., Maitra, U., Geng, S., Li, L. Molecular and cellular mechanisms responsible for cellular stress and low-grade inflammation induced by a super-low dose of endotoxin. *J Biol Chem*, **2014**, 289, 23, 16262–16269.
- [664]. Andersson, J., Nagy, S., Bjork, L., Abrams, J., Holm, S., Andersson, U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev*, **1992**, 127, 69-96.
- [665]. Kapur, S., Picard, F., Perreault, M., Deshaies, Y., Marette, A. Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism. *Int J Obesity*, **2000**, 24 (4), S36-S40.
- [666]. Sugita, H., Fujimoto, M., Yasukawa, T., Shimizu, N., Sugita, M., Yasuhara, S., Martyn, J. A., Kaneki, M. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, **2005**, 280, 14203–14211.
- [667] Hunter, R. A., Storm, W. L., Coneski, P. N., Schoenfisch, M. H. Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. *Anal Chem*, **2013**, 85(3), 1957–1963
- [668]. Boer, C., Van der Linden, P. J., Scheffer, G. J., Westerhof, N., de Lange, J. J., Sipkema, P. RhoA/Rho kinase and nitric oxide modulate the agonist-induced pulmonary artery diameter response time. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**, 282, 3, H990-998.
- [669]. Ikegaki, I., Hattori, T., Yamaguchi, T., Sasaki, Y., Satoh, S. I., Asano, T., Shimokawa, H. Involvement of Rho-kinase in vascular remodeling caused by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Eur J Pharmacol*, **2001**, 427, 1, 69-75.
- [670]. Vouret-Craviari, V., Bourcier, C., Boulter, E., van Obberghen-Schilling, E. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci*, **2002**, 115, 12, 2475-2484.
- [671]. Bogatkevich, G. S., Tourkina, E., Abrams, C. S., Harley, R. A., Silver, R. M., Ludwicka-Bradley, A. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2003**, 285, 2, L334-343.
- [672]. Dusaban, S. S., Purcell, N. H., Rockenstein, E., Masliah, E., Cho, M. K., Smrcka, A. V., Brown, J. H. Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2013**, 110, 9, 3609-3614.
- [673]. Hassanian, S. M., Dinarvand, P., Rezaie, A. R. Adenosine regulates the proinflammatory signaling function of thrombin in endothelial cells. *J Cell Physiol*, **2014**, 229, 9, 1292–1300.
- [674]. Just, I., Huelsenbeck, S. C, Genth, H. Clostridium Botulinum C3 Exoenzyme: Rho-Inactivating Tool in Cell Biology and a Neurotrophic Agent. *Open Toxinology J*, **2010**, 3, 19-23.
- [675]. Narumiya, S., Morii, N., Sekine, A., Kozaki, S. ADP-ribosylation of the rho/rac gene products by botulinum ADP-ribosyltransferase: identity of the enzyme and effects on protein and cell functions. *J Physiol (Paris)*, **1990**; 84, 4, 267-272.
- [676] Kanzaki, M., Pessin, J. E. Insulin-stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes Is Dependent upon Cortical Actin Remodeling. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 45, 42436–42444.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Ahmet Sencer YURTSEVER

**Doğum Tarihi** :18.09.1968

**E-mail** : drasencer@gmail.com

**Öğrenim Durumu** :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Tıp fakültesi	Çukurova	1985-1994
Yüksek Lisans	Tıp fakültesi	Çukurova	1985-1994
Doktora	Tıbbi Farmakoloji	Mersin	2006-2017

**Görevler** :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Doktor	Gümüşhane Kelkit Eskiyoğ Sağlık Ocağı	1994-1996
Doktor	Mersin Gülnar İshaklar Sağlık Ocağı	1996-1996
Doktor	Mersin Gülnar Alanboğaz Sağlık Ocağı	1996-1996
Doktor	Mersin Davultepe Sağlık Ocağı	1996-1998
Doktor	Mersin İl Sağlık Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Şubesi	1998-2001
Doktor	Mersin İl Ambulans Servisi	2001-2010
Doktor	Mersin Devlet Hastanesi Acil Servis	2010-2017
Doktor	Mersin Şehir Hastanesi Acil Servis	2017

## ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Nacak, M., Erbagci, Z., Buyukafşar, K., Yurtsever, A. S., Tiftik, R. N. Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with allergic contact dermatitis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **2007**, 101(2),101-103.

2. Yurtsever, A. S., Pektaş, M., Kurt, A. H., Özkur, M., Ün, İ., Erenmemişoğlu, A., Büyükafşar, K. Proton Pompa İnhibitörü Omeprazolün sıçan alt Özofagus Sfinkteri Tonüsü Üzerine Etkisi: Rho/Rho-kinaz yolağının katkısı. Sözlü bildiri. 19. Ulusal farmakoloji Kongresi. Kongre bildiri ve özet kitabı, 2007, 218

3. Yurtsever, A. S., Pektaş, M., Ozkur, M., Un, I., Erenmemisoglu, A., Buyukafşar, K. Proton pump inhibitors omeprazole, lansoprazole and pantoprazole induce relaxation in the rat lower oesophageal sphincter. *J Pharm Pharmacol*, **2011**, 63(10),1295-1300.

4. Kubat, H., Yurtsever, A. S., Büyükafşar, K. Rho/rho-kinase signalling in chronically alcohol-fed mice. *Turk J Med Sci*, **2017**, 47(2), 668-674.



T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :2008/ 99

Tarih: 19/11/2008

Konu :Etik Kurul Çalışmasının Onayı

Sayın Prof.Dr.Kansu BÜYÜKAŞAR  
Temel Tıp Bilimleri Bölümü  
Farmakoloji Anabilim Dalı

Kurulumuza vermiş olduğunuz, “Preadipositlerde (3T3-L1) Rho/Rho-Kinaz ve Nitrik Oksit Yolağının Aktin Hücre İskeleti ve Adiposit Diferensiyasyonu Üzerine Etkileri” adlı çalışmanıza ilişkin 19/11/2008 tarihli proje başvurusu değerlendirme sonucu ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz/rica ederim.



Prof.Dr.Hakan ÖZTÜRK  
Kurul Başkanı

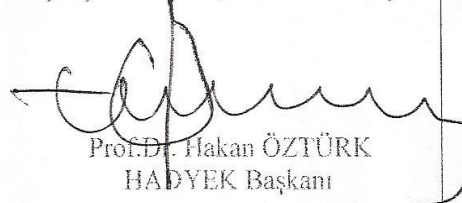
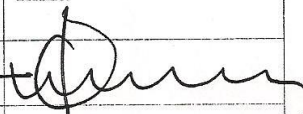


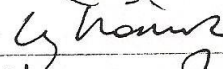

**EKLER:**

1- Değerlendirme Formu (1 sayfa)



**T.C.**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)**

**Proje Başvurusu Değerlendirme Sonucu**

Projenin Niteliği			
Araştırma <input checked="" type="checkbox"/>	Ön çalışma <input type="checkbox"/>	Eğitim <input type="checkbox"/>	
Projenin Adı/Dersin Adı:	“Preadipositlerde (3T3-L1) Rho/Rho-Kinaz ve Nitrik Oksit Yolağının Aktin Hücre İskeleti ve Adiposit Diferensiyasyonu Üzerine Etkileri”		
Başvuru Tarihi:	14.11.2008		
Başvuru No:	37		
Projenin/Dersin Yürütücüsü:	Prof.Dr.Kansu BÜYÜKAFŞAR		
Fakülte/Bölüm	MEÜTF. Temel Tıp Bilimleri Bölümü Farmakoloji Anabilim Dalı		
Karar Tarihi:	15.11.2008		
<b>Değerlendirme Sonucu</b>			
Uygun <input checked="" type="checkbox"/>	Düzeltilmesi Gerekir <input type="checkbox"/>	Koşullu Olarak Uygun <input type="checkbox"/>	Uygun Değildir <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri:	<p>Yürütücüsü olduğunuz “Preadipositlerde (3T3-L1) Rho/Rho-Kinaz ve Nitrik Oksit Yolağının Aktin Hücre İskeleti ve Adiposit Diferensiyasyonu Üzerine Etkileri” adlı çalışmanıza onay verilmesine oy birliği ile karar verildi.</p> <p style="text-align: right;">             Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK            HADYEK Başkanı         </p>		
HADYEK ÜYELERİ	Katılım	Kararın Onayı	İmza
Prof.Dr.Hakan ÖZTÜRK	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input checked="" type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bahar TUNÇTAN	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input checked="" type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Tahsin ÇOLAK	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input checked="" type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Kemal GÖRÜR	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input checked="" type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Hasan Basri KIRBAŞ	Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input checked="" type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	
Vet.Hek.Cem FIRAT	Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	
Av.Lale DAĞLI	Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/>	Onaylıyorum <input type="checkbox"/> Onaylamıyorum <input type="checkbox"/>	