



T.C

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) ESTROJEN VE
PROGESTERONUN ADİPOZİTOKİN SALIVERİLMESİ
VE DİFERANSİYASYON ÜZERİNE ETKİSİ: RHO/RHO-
KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI**

**Dr. Mehtap PEKTAŞ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. KANSU BÜYÜKAFŞAR**

MERSİN-2011



T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) ESTROJEN VE
PROGESTERONUN ADİPOZİTOKİN SALIVERİLMESİ
VE DİFERANSİYASYON ÜZERİNE ETKİSİ: RHO/RHO-
KİNAZ YOLAĞININ OLASI KATKISI**

Dr. Mehtap PEKTAŞ
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. KANSU BÜYÜKAFŞAR

**Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
(BAP-TF DTB (MP) 2009-2 TU) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik
Araştırma kurumu (TÜBİTAK, SBAG 109S126) tarafından
desteklenmiştir.**

MERSİN-2011

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve sürdürülmesinde tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a, farmakoloji eğitimim sürecinde her konuda yardım aldığım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN, Yrd. Doç. Dr. R. Nalan TİFTİK'e, yardımlarını esirgemeyen birlikte çalıştığım Arş. Gör. Hakan KURT ve Arş. Gör. Sencer Yurtsever'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Cengizhan ve çocuklarım Ayça ve Arda'ya, eğitimim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Mehtap PEKTAŞ

Mersin-2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	5
GİRİŞ VE AMAÇ	8
GENEL BİLGİLER	13
Yağ Dokusu	13
Yağ Hücresi Fonksiyonları	14
Adiposit Diferansiyasyonu	16
Adiposit Diferansiyasyonu Basamakları	19
Gen Ekspresyonda Erken Değişiklikler	21
Adipogenezin Hücresel ve Hormonal Regülasyonu	23
Yağ Hücresi Salgı Ürünleri	25
Adipokinler	25
Leptin	25
Adiponektin	31
Rezistin	35

Tümör Nekrozis Faktör- α	37
İnterlökin-6	39
Seks Hormonları	41
Estrojenler	42
Progesteronlar	51
Seks Steroid Hormonların Ekstranükleer	55
Sinyal Mekanizmaları Nongenomik Etkileri	
G Proteinleri	56
Rho Proteinleri	59
Rho/Rho-Kinaz Yolağı	61
GEREÇ VE YÖNTEMLER	71
Hücre Kültürü	71
Adiposit Diferansiyasyon protokolü	73
Oil red O boyama	74
ELİSA yöntemi	76
Western-Blot yöntemi	79
İstatistik	80
BULGULAR	
3T3-L1 hücreleri	81
17 β -estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine	82
0-2. gündeki etkisi	
17 β -estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine	83
0-4. gündeki etkisi	
17 β -estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine	84
0-6. gündeki etkisi	

17 β -estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi	85
E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi	86
E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi	87
E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi	88
E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi	89
Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi	94
Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi	90
Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi	91
Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi	92
17 β -estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi	93
17 β -estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi	94
17 β -estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi	95
17 β -estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi	96
E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi	97
E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi	98
E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi	99
E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi	100

adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi Progesteron ve kombinasyonlarının	101
adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi Progesteron ve kombinasyonlarının	102
adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi Progesteron ve kombinasyonlarının	103
adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi Progesteron ve kombinasyonlarının	104
adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi 17 β -Estradiol'ün leptin saliverilmesi üzerine etkisi	105
17 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun leptin saliverilmesi üzerine etkisi	106
17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun leptin saliverilmesi üzerine etkisi	107
Progesteronun leptin saliverilmesi üzerine etkisi	108
17 β -Estradiol'ün rezistin saliverilmesi üzerine etkisi	109
17 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun rezistin saliverilmesi üzerine etkisi	110
17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun rezistin saliverilmesi üzerine etkisi	111
Progesteronun rezistin saliverilmesi üzerine etkisi	112
17 β -Estradiol'ün adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi	113
17 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi	114
17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi	115
Progesteronun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi	116
17 β -Estradiol'ün TNF- α Saliverilmesi Üzerine Etkisi	117
7 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi	118
7 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi	119
Progesteronun TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi	120

17 β -Estradiol'ün IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi	121
17 β -Estradiol ve Y-27632	122
kombinasyonunun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi	
17 β -Estradiol ve ICI 182,780	123
kombinasyonunun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi	
Progesteronun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi	124
17 β -Estradiol'ün ROCK-1 ekspresyonu üzerine etkisi	125
17 β -Estradiol'ün ROCK-2 ekspresyonu üzerine etkisi	126
17 β -Estradiol'ün Rho A ekspresyonu üzerine etkisi	127
Progesteronun ROCK-1 ekspresyonu üzerine etkisi	128
Progesteronun ROCK-1 ekspresyonu üzerine etkisi	129
Progesteronun ROCK-1 ekspresyonu üzerine etkisi	130
TARTIŞMA	131
SONUÇ VE ÖNERİLER	147
KAYNAKLAR	150

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADD1/SREBP-1c	Adiposit determinasyon ve diferansiyasyon faktör-1/sterol regülatör element bağlayıcı protein-1c
AdipoR1	Adiponektin reseptör 1
AGRP	Agouti-ilişkili protein
AMPK	AMP-aktive protein kinaz
ap2	Adiposit spesifik protein
ASP	Açılasyon stimüle edici protein
BMP-4	Kemik morfojenik protein-4
11 β -HSD	11 beta-hidroksisteroid dehidrogenaz
CART	Kokain ve amfetamin serbestleştirici transcript
C/EBP	CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein
CREP	cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteini
CRH	Kortikotropin serbestleştirici hormon
DAG	Diaçilgliserol
DDL	Düşük dansiteli lipoprotein
ER	Estrojen reseptör
ER α	Estrojen reseptör α
ER β	Estrojen reseptör β
ERE	Estrojen yanıt elementi
ERK	Ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz
FABP	Yağ asidi bağlayıcı protein
G _D	Growt arrest
GDI	Guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü
GEF	Guanin nükleotid değıştirici faktör
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HMSCS	İnsan mezenkimal kök hücreleri

HSL	Hormon sensitif lipaz
IBMX	İzometilbutilksantin
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-6R	IL-6 reseptörü
IP ₃	İnozitol 1, 4, 5-trifosfat
JAK	Janus protein tirozin kinaz
LPA	Lizofosfatidik asid
LPL	Lipoprotein lipaz
MDI	Metilizobütilksantin-deksametazon-insülin
MLC	Myozin hafif zincir
MYPT	Myozin fosfataz hedef protein
NO	Nitrik oksid
NPY	Nöropeptit Y
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PRA	Progesteron reseptör A
PRB	Progesteron reseptör B
PPAR γ	Peroksizom proliferatif edici reseptör γ
pref-1	Preadiposit faktör-1
RBP-4	Retinol bağlayıcı protein-4
RELM	Rezistin benzeri moleküller
ROCK	Rho ile ilişkili kinaz
S1P	Sfingozin-1-fosfat
SHBG	Seks hormonu bağlayan globulin
STAT 3, 5, 6	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörleri 3,5,6
SRE	Steroid yanıt elementi
SYA	Serbest yağ asidi
TAG	Triaçilgliserol

TGF- β	Transforming büyüme faktörü- β
TNF- α	Tümör nekrotizan faktör- α
TZD	Tiazolidinedionlar
TNFR1, 2	TNF- α reseptörü
UCP-1	Ancoupling reseptör-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Adiposit diferansiyasyon basamakları)	19
Şekil 2 (3T3-L1 preadiposit diferansiyasyonun progresyonu)	21
Şekil 3 (Transkripsiyon faktörleri kaskadı yoluyla adipogenezin indüksiyonu)	24
Şekil 4 (Ob-Rb ile JAK-STAT aktivasyonunun mekanizması)	29
Şekil 5 (Adiponektin'in sinyal yolağı)	33
Şekil 6 (Estriol, estradiol ve estronun yapısı)	42
Şekil 7 (Estrojen sentezi)	44
Şekil 8 (Estrojen etki modeli)	46
Şekil 9 (Progesteron sentezi)	52
Şekil 10 (Rho ailesi GTPazların aktivasyonu)	58
Şekil 11 (Rho ailesi küçük GTPazlar)	60
Şekil 12 (Vasküler düz kas hücre kontraksiyonunda Rho/ROCK düzenlenme mekanizması.)	62
Şekil 13 (ROCK I ve ROCK II'nin moleküler yapısı)	63
Şekil 14 (Hemositometre lamının şematik görünümü)	73
Şekil 15 (ELISA yönteminin basamakları)	76
Şekil 16 (3T3-L1 hücreleri)	81

Şekil 17 (17β-estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi)	82
Şekil.18 (17β-estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi)	83
Şekil 19 (17β-estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi)	84
Şekil 20 (17β-estradiol'ün adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi)	85
Şekil 21 (E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi)	86
Şekil 22 (E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi)	87
Şekil 23 (E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi)	88
Şekil 24 (E ₂ -BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi)	89
Şekil 25 (Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi)	90
Şekil 26 (Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi)	91
Şekil 27 (Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi)	92
Şekil 28 (Progesteronun adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi)	93
Şekil 29 (17β-estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi)	94
Şekil 30 (17β-estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi)	95
Şekil 31 (17β-estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi)	96
Şekil 32 (17β-estradiol ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi)	97
Şekil 33 (E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi)	98

Şekil 34 (E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi)	99
Şekil 35 (E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi)	100
Şekil 36 (E ₂ -BSA ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi)	101
Şekil 37 (Progesteron ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-2. gündeki etkisi)	102
Şekil 38 (Progesteron ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-4. gündeki etkisi)	103
Şekil 39 (Progesteron ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-6. gündeki etkisi)	104
Şekil 40 (Progesteron ve kombinasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine 0-8. gündeki etkisi)	105
Şekil 41 (17β-Estradiol'ün leptin salıverilmesi üzerine etkisi)	106
Şekil 42 (17β-Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun leptin salıverilmesi üzerine etkisi)	107
Şekil 43 (17β-Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun leptin salıverilmesi üzerine etkisi)	108
Şekil 44 (Progesteronun leptin salıverilmesi üzerine etkisi)	109
Şekil 45 (17β-Estradiol'ün rezistin salıverilmesi üzerine etkisi)	110
Şekil 46 (17β-Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun rezistin salıverilmesi üzerine etkisi)	111

Şekil 47 (17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun rezistin salıverilmesi üzerine etkisi)	112
Şekil 48 (Progesteronun rezistin salıverilmesi üzerine etkisi)	113
Şekil 49 (17 β -Estradiol'ün adiponektin salıverilmesi üzerine etkisi)	114
Şekil 50 (17 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun adiponektin salıverilmesi üzerine etkisi)	115
Şekil 51 (17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun adiponektin salıverilmesi üzerine etkisi)	116
Şekil 52 (Progesteronun adiponektin salıverilmesi üzerine etkisi)	117
Şekil 53 (17 β -Estradiol'ün TNF- α Salıverilmesi Üzerine Etkisi)	118
Şekil 54 (17 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun TNF- α salıverilmesi üzerine etkisi)	119
Şekil 55 (17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun TNF- α salıverilmesi üzerine etkisi)	120
Şekil 56 (Progesteronun TNF- α salıverilmesi üzerine etkisi)	121
Şekil 57 (17 β -Estradiol'ün IL-6 Salıverilmesi Üzerine Etkisi)	122
Şekil 58 (17 β -Estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi)	123
Şekil 59 (17 β -Estradiol ve ICI 182,780 kombinasyonunun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi)	124
Şekil 60 (Progesteronun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi)	125
Şekil 61 (17 β -Estradiol'ün ROCK-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi)	126

Şekil 62 (17β-Estradiol'ün ROCK-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi)	127
Şekil 63 (17β-Estradiol'ün Rho A Ekspresyonu Üzerine Etkisi)	128
Şekil 64 (Progesteronun ROCK-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi)	129
Şekil 65 (Progesteronun ROCK-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi)	130
Şekil 66 (Progesteronun ROCK-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi)	131

ÖZET

Bu tezde seks hormonları, estrogen ve progesteronun, preadipositlerin (3T3-L1) olgun yağ hücrelerine diferansiyasyonuna ve bu hücrelerden leptin, rezistin, adiponektin, TNF- α , IL-6 gibi adipostokinlerin salıverilmesine olan etkilerini incelemeyi ve ayrıca bu etkilere, eğer varsa, Rho/Rho kinaz yolağının katkısını araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), hücre içine giremeyen bir estrogen analogu olan sığır serum albumini (BSA) ile konjuge edilmiş estradiol (E_2 -BSA, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (10^{-5} M) ve klasik estrogen reseptör blokörü, ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına veya kombine olarak 3T3-L1 hücrelerine 2, 4, 6 ve 8 gün boyunca uyguladık. Bu hormonların adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisi, lipid spesifik bir boya olan Oil red O ile değerlendirildi.

Başka bir deney serisinde diferansiye olmuş adipositlerde estrogen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), E_2 -BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) ve progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) leptin, adiponektin, rezistin, TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin salıverilmesi üzerine etkileri, Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 varlığında ve yokluğunda, araştırıldı.

Diğer taraftan, seks hormonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkilerine Rho/Rho-kinaz yolağının katkısını sorgulamak amacıyla, ROCK inhibitörü Y-27632 kullanımına ek olarak, RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyon düzeyleri Western-blot yöntemi araştırıldı.

Estrojen ve membran impermeabl estrogen analogu olan E_2 -BSA, adiposit diferansiyasyonuna farklı günlerde farklı şekilde etki etmektedir. Şöyle ki; diferansiyasyon sürecinin başlangıcında gerek 17β -estradiol gerekse E_2 -BSA diferansiyasyonu azaltmaktadır. 4-6. günlerde ise tam tersine bu estrogenik maddeler diferansiyasyonu artırıyor gibi görünmektedir. Buna karşılık 8. günde ise etkisiz bulunmuşlardır. Y-27632, estrogenin etkilerini değiştirmedir. Ancak, tek başına uygulandığında adiposit diferansiyasyonunu 2. günde arttırmaktadır. Diğer taraftan ICI 182,780 de 17β -estradiolün diferansiyasyon üzerine etkisini

değiştirmedi. Ancak Y-27632 gibi ICI 182,780 de tek başına adiposit diferansiyasyonunu arttırdı. 8. günde ise, ilginç olarak, ICI 182,780 adiposit diferansiyasyonunu azalttığı gözlemlendi.

ROCK inhibitörü Y-27632, E₂-BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisini değiştirmede. Ancak tek başına uygulanmasının adiposit diferansiyasyonunu arttırdığı gözlemlendi. Aynı şekilde, klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780, E₂-BSA'nın 3T3-L1 hücre diferansiyasyonu üzerine etkisini değiştirmede. Buna karşılık, tek başına uygulandığında ise diferansiyasyonu arttırdı. Ancak 8 gün boyunca uygulandığında ise tam tersi diferansiyasyonu azalttığı bulundu.

Diğer bir seks hormonu olan progesteron, kullanılan konsantrasyonlarda ve uygulanan süre boyunca, adiposit diferansiyasyonu üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı.

3T3-L1 preadipositlerde 17β-estradiol, progesteron ve ICI 182,780, leptin salıverilmesini değiştirmede. Ancak, Y-27632 ve onun 17β-estradiol ile kombinasyonu, leptin salıverilmesini anlamlı olarak arttırdı.

17β-estradiol, 10⁻⁸, 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlarda rezistin salıverilmesini artırırken diğer konsantrasyonlarda anlamlı bir etki bulunmadı. İlginç olarak ROCK inhibitörü Y-27632, 17β-estradiolün bu etkisini antagonize etti. Ancak klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 17β-estradiolün rezistin salıverilmesi üzerine etkisini değiştirmede fakat tek başına uygulanan ICI 182,780 rezistin düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Diğer taraftan, progesteron rezistin salıverilmesi üzerine etki göstermedi.

17β-estradiol, genel olarak adiponektin salıverilmesini anlamlı olarak azalttı. İlginç olarak Y-27632, bu etkiyi tersine çevirdi. ICI 182,780, 17β-estradiol'ün etkisini değiştirmeyenken, tek başına uygulanması adiponektin düzeylerini arttırdı. Progesteron ise, uygulanan konsantrasyonlarda, adiponektin düzeylerini artırırken, Y-27632 ve 17β-estradiol ile kombinasyonu bu etkiyi tersine çevirmedi.

17 β -estradiol (10^{-9} - 10^{-5} M), TNF- α saliverilmesini değiştirmezen, 10^{-4} M konsantrasyonda saliverilmeyi anlamlı olarak artırdı. Rho-kinaz enzim inhibitörü Y-27632, TNF- α düzeylerini arttırdığı bulundu. Bununla birlikte 17 β -estradiol'ün ICI 182,780 ile kombinasyonu TNF- α saliverilmesi üzerine etki göstermedi. Diğer taraftan progesteron da TNF- α saliverilmesi üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı. Ayrıca progesteronun 17 β -estradiol ve Y-27632 ile kombinasyonları da, TNF- α saliverilmesi üzerine her hangi bir etki meydana getirmede.

17 β -estradiol, kullanılan hiçbir konsantrasyonda IL-6 saliverilmesini etkilemedi. Ancak klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780, IL-6 düzeylerini anlamlı bir şekilde azalttı. Diğer taraftan, progesteron, uygulanan konsantrasyonlarda IL-6 düzeylerini azaltırken, Y-27632 ve 17 β -estradiol kombinasyonu bu etkiyi değiştirmede.

17 β -estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) ve progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) kullanılan konsantrasyonlarda ve uygulanan sürede ROCK-1, ROCK-2 enzimi ve RhoA protein ekspresyon düzeylerini anlamlı olarak değiştirmede.

Özet olarak, 17 β -estradiol ve hücre içine giremeyen analogu olan E₂-BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine farklı sürelerde farklı etkiler meydana getirmektedir. Erken dönemde 17 β -estradiol ve E₂-BSA (2. günde) diferansiyasyonu azaltırken ara dönemlerde (4-6. günlerde) diferansiyasyonu arttırdı. Daha geç dönemde ise (8. günde) adiposit diferansiyasyonu üzerine bir etki oluşturmadı. Rho kinaz enzim inhibitörü Y-27632 ve klasik estrogen reseptör blokörü ICI182,780 17 β -estradiolün etkilerini değiştirmede ancak tek başlarına uygulandığında her iki madde de adiposit diferansiyasyonunu genellikle artırdı. Progesteronun adiposit diferansiyasyonuna bir etkisi yoktu. 17 β -estradiol ve progesteron, leptin ve TNF- α düzeylerini değiştirmede. Ayrıca, 17 β -estradiolün, IL-6 düzeylerini etkilemediği buna karşılıık, rezistin düzeylerini arttırdığı ve adiponektin seviyelerini ise azalttığı bulundu. Progesteron ise rezistin seviyelerini değiştirmezen adiponektin düzeylerini arttırdı ancak IL-6 düzeylerini azalttı.

Sonuç olarak, başlıca estrojenik hormon olan 17β -estradiol, preadiposit diferansiyasyon sürecine farklı zaman dilimlerinde farklı etkilerle katkı sağlamaktadır. Ancak, bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının ve klasik estrojen reseptörlerinin aracılığı görünmemektedir. Buna karşılık, Rho-kinaz inhibisyonu adipogenezi artırmaktadır. Klasik estrojen reseptör blokörü olarak bilinen ICI 182780'in tek başına adipogenezi artırıyor olması onun başka bir etkisinden (örneğin GPER reseptörleri üzerinden agonistlik etkisinden) kaynaklanabilir. Progesteronun diferansiyasyon üzerine bir etkisi görünmemektedir. Diğer taraftan olgun yağ hücrelerinden adipositokin salıverilmesi üzerine de bu iki hormonun farklı etkileri bulunmaktadır ve bu şekilde çeşitli metabolik olaylara katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Estrojen, Progesteron, Adiposit Diferansiyasyonu, Adipositokinler, Rho kinaz.

ABSTRACT

Effects of Estrogen and Progesteron on Adipocyte Differentiation and Adipocytokine Release in Preadipocyte Cell Line, 3T3-L1: Possible Involvement of Rho/Rho-Kinase Signaling

In this study we aimed to investigate possible effects of sex hormones, estrogen and progesterone on the differentiation of preadipocyte (3T3-L1) to mature adipocyte on the synthesis and release of adipocytokines from these cells such as leptin, resistin, adiponectin, TNF- α and IL-6, and the involvement of a novel signaling pathway, if any Rho/Rho-kinase in both of effects.

For these purposes estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M), a membrane-impermeable form of estradiol, which is conjugated with bovine serum albumin (estradiol-BSA, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) and progesterone (10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M), a Rho kinase inhibitor Y-27632 (10^{-5} M), and to assess the role of estrogen receptor ICI 182,780 (10^{-5} M) alone or in combination treated to 3T3-L1 cells during day 2, 4, 6 and 8. To evaluate the effect of these hormones on adipocyte differentiation, lipid-specific Oil Red O, a dye was used.

In another set of experiments in differentiated adipocytes effect of estrogen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M), estradiol-BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) and progesterone (10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M) on leptin, adiponectin, resistin, TNF- α and IL-6 release were assessed at the presence and absence of Y-27632 (10^{-5} M) and ICI 182,780.

On the other hand to investigate the contribution of Rho/Rho-kinase pathway on the sex hormones induced adipocyte differentiation, a ROCK inhibitor Y-27632 and RhoA protein and its downstream effectors ROCK-1 and ROCK-2 expression levels were assessed by Western-blot.

Estrogen and a membrane impermeable estrogen analog E₂-BSA has diverse effect on adipocyte differentiation at different day of differentiation. That is; at the beginning of the differentiation process both 17 β -estradiol and E₂-BSA decrease the differentiation. In contrary of this estrogenic substances seems to increase differentiation on the day 4-6. However, they were found ineffective in the day 8. Y-27632 did not change the estrogens effects. However increased adipocyte differentiation on the day 2 when applied alone. On the other hand

also ICI 182,780 did not changed effect of 17β -estradiol on adipocyte differentiation. But, similar to Y-27632, also ICI 182,780 alone increased adipocyte differentiation. Interestingly, ICI 182,780 decreased adipocyte differentiation on the day 8.

ROCK inhibitor Y-27632 did not changed effect of E_2 -BSA on adipocyte differentiation. But alone administration of Y-27632 increased adipocyte differentiation. In a similar manner classical estrogen blocker ICI 182,780, did not changed effect of E_2 -BSA on 3T3-L1 cell differentiation. In contrast when applied alone increased differentiation. But when applied during 8 days decreased differentiation.

However progesterone which is another sex hormone did not any significant effect on adipocyte differentiation during applying time course at the concentrations tested.

17β -estradiol, progesteron and ICI 182,780 did not changed leptin release from 3T3-L1 preadipocytes. However Y-27632 alone or combination with 17β -estradiol significantly increased leptin release. While 17β -estradiol, increased resistin release at the 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M concentrations it did not create any significant effect at the other concentrations tested. Interestingly, a ROCK inhibitor Y-27632, antagonised this effect of 17β -estradiol. Bu a classical estrogen receptor blocker ICI 182,780 did not changed effect of 17β -estradiol on resistin release. But ICI 182,780 decreased resistin levels when applied alone. On the other hand progesterone, showed no effect of on the release of resistin.

In general 17β -estradiol significantly decreased adiponectin release. Interestingly Y-27632 reversed this effect. While ICI 182,780, did not changed 17β -estradiol effect, increased adiponectin levels when applied alone. Progesterone increased adiponectin levels at the concentration used but its combination with Y-27632 and 17β -estradiol did not reversed this effect.

While 17β -estradiol (10^{-9} - 10^{-5} M), did not changed TNF- α release it significantly increased release at 10^{-4} M concentration. Rho kinase enzym inhibitör Y-27632 increased TNF- α levels. But combination of 17β -estradiol with ICI 182,780 did not have any effect on TNF- α release. On the other hand progesterone did not have any significant effect on TNF- α release. In addition

also the combination of 17 β -estradiol and Y-27632 did not have any significant effect on TNF- α release.

17 β -estradiol did not changed IL-6 release at any concentrations tested. But classical estrogen receptor blocker ICI 182,780 significantly decreased IL-6 levels. On the other hand while progesterone decreased IL-6 levels at the concentrations tested combination of Y-27632 and 17 β -estradiol did not changed this effect.

17 β -estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) and progesterone (10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M) did not significantly changed ROCK-1, ROCK-2 and RhoA protein expression levels during experimental time course at the concentrations tested.

In summary 17 β -estradiol and E₂-BSA have diverse effect on adipocyte differentiation at different stages of differentiation. 17 β -estradiol and E₂-BSA decrease differentiation in early stages (day 2), increase differentiation in middle stages (day 4-6) have no effect in more late stages (day 8). Rho-kinase inhibitor Y-27632 and ICI 182,780 did not changed effect of 17 β -estradiol but when applied alone both of them generally increased adipocyte differentiation. Progesterone have no effect on adipocyte differentiation. 17 β -estradiol and progesterone did not changed leptin and TNF- α levels. In addition 17 β -estradiol did not changed IL-6, increased resistin and decreased adiponectin levels. Progesterone did not changed adiponectin levels but decreased IL-8 levels.

In conclusion 17 β -estradiol which is main estrogenic hormone has diverse effect on adipocyte differentiation at different stages of differentiation. But these effects appear to be not mediated via Rho/Rho-kinase pathway and classical estrogen receptor. In contrast, inhibition of Rho-kinase increases adipogenesis. Adipogenesis increase by classical estrogen receptor blocker ICI 182780 might come from another property of it other than classical blockage such as GPER receptor agonism. Progesterone does not appear to have an effect on differentiation. On the other hand these two hormones have diverse effect on adipocytokine release from mature adipocytes. In this way these hormones can contribute to a variety of metabolic events.

Keywords: Estrogen, Progesterone, Adipocyte Differentiation, Adipocytokines, Rho kinase.

GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin, yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize olan kronik bir hastalıktır¹. Obezitenin etyolojisinde birçok faktörün yer alması ve obezitenin gelişiminin nasıl önleneceği tam olarak anlaşılabilmesi önemli bir sorun olarak görünmektedir². Tüm dünyada obezite ve eşlik eden metabolik sendrom (diyabet, bozulmuş glikoz toleransı ve insülin direnci ile birlikte hipertansiyon, hiperlipidemi, santral obezite ve mikroalbuminüriden en az ikisinin eşlik etmesi) sıklığının epidemik olarak artıyor olması, bir metabolik ve endokrin organ olan yağ dokusuna olan ilgiyi arttırmıştır³.

Yağ dokusu, bağ dokusunun özel bir tipidir ve genellikle içerdiği triaçilgliserollerin, gerektiğinde enerji amacıyla kullanılmak üzere depolandığı bir doku olarak bilinmektedir. Yağ dokusu artık sadece bir enerji deposu değil, aynı zamanda aktif endokrin organ olarak kabul edilmektedir. Enerjinin yağ hücresinde depolanması ve salgılanması hormonal sinyallerle (insülin, katekolaminler, glukokortikoidler gibi) kontrol edilir. Yağ hücresinden adipokin olarak adlandırılan çok sayıda madde (leptin, rezistin, TNF- α , adiponektin ve IL-6 vs.) salgılandığı saptanmıştır⁴.

Hormonlar, adiposit gelişimi ve fonksiyonları için önemlidir ve adipoz dokunun major düzenleyicisidirler. Bu hormonlar arasında büyüme hormonu, tiroid hormonu, glukokortikoidler, katekolaminler, insülin ve insülin-benzeri büyüme faktörü gibi birçok hormon yer almaktadır².

Adipoz doku insanlarda vücut yağ dağılımında cinsiyet spesifik farklılık gösterir. Kadınlarda erkeklere göre subkütanöz yağın birikimi daha fazladır. Kadınlarda subkütanöz yağ birikiminin puberteyle birlikte artış göstermesi subkütanöz yağ depolanmasında estrogenin rolünün olabileceğini göstermektedir. Buna zıt olarak erkekler abdominal yağ depolanmasına meyilli iken premenapozal dönemde kadınlarda abdominal yağ birikimi estrogen tarafından inhibe edilmektedir. Kadınlarda adiposit kitlesinde artış adiposit sayısı ve aynı zamanda adiposit boyutlarında artış ile sonuçlanmaktadır. Bu

veriler estrogenlerin adipositlerin gelişiminde, erişkin adiposit boyutları ve sayısının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte androjenler gibi diğer hormonlarında cinsiyet farklılıklarına bağlı adipoz depolanmasını modüle etmesi açıkça şuna işaret etmektedir; adiposit sayısı ve adipoz dağılımındaki seksüel dimorfizm tek başına estrogenin kadına karşı erkekteki etkilerini yansıtmayabilir².

1970'lerde estrogenin insan preadiposit proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilmiş, farklı türlerde ve deney sistemlerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir⁵. Estrogenin preadiposit proliferasyonunu stimüle ettiğine dair tutarlı bulgular olmasına rağmen, adiposit diferansiyasyonu üzerine estrogenin etkisine dair veriler çelişkilidir². Sıçan preadipositleri ve mezenkimal kök hücrelerde yapılan çalışmalarda estrogenin adiposit diferansiyasyonu stimüle ettiği^{5,6,7}, bununla birlikte primer kemik iliği stromal hücre kültürlerinde veya kemik iliği stromal hücre hatlarında ise adipogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir⁸⁻¹⁰.

Progesteronunda adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisi konusunda çelişki sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar progesteronun preadipositlerin steroid-aracılı diferansiyasyonunu ve lipid sentezini LPL-aktivitesindeki artış yoluyla yağ birikimi üzerine stimülatör etkili olabileceğini göstermişlerdir¹¹⁻¹⁶. Bjorntorp ve ark. ise progesteronun abdominal adipoz dokuda anti-glukokortikoid etki aracılığıyla dişi yağ dağılımında yer alabileceğini göstermiş, progesteronun glukokortikoidle indüklenen vücut yağ birikimi ve yağ hücre diferansiyasyonunu inhibe ettiğini çalışmalarda göstermişlerdir^{17,18}. Ayrıca estrogen ve progesteronun yağ dokusundan salınan adipositokinler üzerine farklı etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Seks steroid hormonları yoluyla adipoz dokuların dağılımı ve miktarının düzenlenmesindeki mekanizma açık değildir. Olası mekanizmalardan biri, transkripsiyonel yöntem yoluyla genomik seviyede adipoz dokuda anahtar proteinlerin düzenlenmesi olabilir. Bu durum steroid reseptörlerinin adipoz dokularda bulunmasını gerektirir. Nitekim adipoz dokuda estrogen ve progesteron reseptörünün varlığı gösterilmiştir¹⁹. Diğer olası mekanizma nongenomik etki yoluyla hücre membranında ikincil habercilerin düzenlenmesi

olabilir²⁰. Bu da, plazma membranında var olan seks steroid reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca seks hormonları birçok dokuda hem genomik hem de nongenomik mekanizmaların aracılığıyla etkisini göstermektedir. Nongenomik etkide hormonlar plazma membranındaki reseptörlere bağlanır ve etkileri ikincil haberciler ile taşınır¹⁹. Bu nongenomik etkilere, mitojen aktive eden protein kinaz/ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz (MAPK/ERK1/2), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-kinaz) ve çeşitli tirozin kinaz gibi farklı yolların aracılık ettiği gösterilmiştir²¹. Yapılan çalışmalar, küçük GTP-bağlayıcı protein Rho ve efektörü Rho-kinaz (ROK/ROCK)'ın düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti organizasyonu, hücre adezyonu ve motilitesi, sitokinez ve gen ekspresyonunu içeren birçok hücre sel fonksiyonda rol oynadığını göstermiştir. Birçok dokuda estrogen ve progesteronun etkisine Rho/Rho kinaz yolağının aracılık ettiği gösterilmiştir. Estrogenin ayrıca ER/G α_{13} /RhoA/ROCK-2/moesin kaskadı yoluyla endotelial hücre migrasyonuna öncülük ettiğini, progesteron ve medroksiprogesteron asetatın (MPA) endotelial hücre migrasyonunu, moesin aktivasyonu yoluyla artırdıkları da gösterilmiştir^{22,23}. Yine aynı şekilde ER α 'nın, G α_{13} /Rho A/ROCK/moesin kaskadı yoluyla estrogen bağımlı meme kanser hücrelerinin hareketi, invazyonu ve buna bağlı olarak kanser metastazıyla ilişkili olduğunu ortaya konmuştur²⁴. Chrissobolis ve ark. dişi sıçanların serebral dolaşımında Rho-kinaz fonksiyonunun baskılandığı ve bu etkinin endojen estrojene bağlı olduğunu göstermişler ve bu etkinin premenapozal kadınlarda inme insidansının azalmasına katkı sağlayabileceğini işaret etmişlerdir²⁵.

3T3-L1 ve 3T3-F442A sıklıkla kullanılan hücre hatlarıdır ve bunlar 17-19 günlük fare embriyolarından köken alan Swiss 3T3 hücrelerinden izole edilen klonlardır²⁶. Bu hücre hatları insülin, deksametazon ve fosfodiesteraz enzim inhibitörü izobutilmetil ksantini (IBMX) içeren hormonal stimulus altında morfolojik ve yapısal olarak matür adipositlere benzeyen hücrelere diferansiye olurlar²⁷. Bu hücre hatları sonsuz sayıda pasajlanabilir, çalışmalar için preadipositlere kaynak sağlar²⁸.

3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz (ROCK) enziminin varlığı gösterilmiştir. Bu enzim Y-27632 ile selektif bir şekilde inhibe edildiğinde lipid birikimini ve

adipogenezin arttığı saptanmıştır. Bu etkilere olasılıkla adipojenik transkripsiyon faktörlerinin artışı aracılık etmektedir. Diğer taraftan Rho-kinaz inhibisyonu, adipojenik geç belirteçlerden biri olan adiponektin ekspresyonunu da artırmıştır²⁹.

Yağ dokusunda ve farklı pek çok dokuda etkisi olduğu bilinen Rho/Rho-kinaz yolağının, estrogen ve progesteronun bu etkilerine (diferansiyasyon ve adipositokin salıverilmesine) aracılık edip etmediği bilinmemektedir. Bu amaçla, 3T3-L1 fibroblast klon hücrelerinde estrogen ve progesteronun adiposit diferansiyasyonu ve bu hücrelerden sekrete edilen adipositokin (leptin, rezistin, adiponektin, TNF- α ve IL-6) düzeylerine olan etkilerini ve bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının katkısı olup olmadığını değerlendirdik.

Bu amaçla estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), hücre içine giremeyen bir estrogen analogu olan sığır serum albumini (BSA) ile konjüge edilmiş estradiol (estradiol-BSA, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) ve progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (10^{-5} M) ve estrogen reseptörünün katkısının olup olmadığını anlamak için ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve kombine olarak 3T3-L1 hücrelerine 2, 4, 6 ve 8 gün boyunca uyguladık. Bu hormonların adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisini değerlendirmek için lipid spesifik bir boya olan Oil red O kullandık. Oil red O, lipid birikiminin miktarının saptanmasında, adiposit diferansiyasyonun analizinde güvenilir, geçerli ve çok kullanılan bir yöntem olarak refere edilmektedir³⁰.

Yine 8. günde olgun diferansiye adipositlerde estrogen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), estradiol-BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) ve progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) leptin, adiponektin, rezistin, TNF- α ve IL-6 salıverilmesi üzerine etkileri, Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 varlığında ve yokluğunda, söz konusu sitokinlere özgü kitler yardımıyla, hücre medyumlarında ölçüldü. Bu şekilde estrogen ve progesteronun sitokin salıverilmesi üzerine etkileri ve bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının katkısını araştırdık.

Seks hormonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkilerine Rho/Rho-kinaz yolağının katkısını araştırmak için, ROCK inhibitörü Y-27632

kullanımına ek olarak, RhoA proteini ve alt efektörlerinden olan ROCK-1 ve ROCK-2 ekspresyonları Western-Blot yöntemi ile değerlendirildi. Bu amaçla iki grup oluşturduk. 1. grup 3T3-L1 hücrelerine 2 gün, 2. gruba ise 8 gün süreyle estrojen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve bunların kombinasyonlarını uyguladık.

GENEL BİLGİLER

YAĞ DOKUSU

Yağ dokusu, bağ dokusunun özel bir tipidir ve büyük oranda adipositlerden ayrıca fibroblast, makrofaj, lökosit ve preadiposit gibi birçok hücreden oluşur. Normal ağırlıktaki bir insanda, erkeklerde vücut ağırlığının %15-20'sini, kadınlarda ise vücut ağırlığının %20-25'ini yağ dokusu oluşturmaktadır⁴. Yağ hücreleri hamileliğin 15. haftasından sonra, fibroblastlardan preadipositlere mitoz ile çoğalarak dönüşür. Yaşamın ilk iki yılında preadipositlerden yağ hücreleri oluşur, büyüklük ve sayı olarak en çok bu yıllarda değişime uğrarlar³¹. Puberteye kadar yağ hücre sayısı çoğalarak artmaya devam eder. Ergenlikten itibaren mitoz bölünme olmaz, sadece hücre büyüklüğünde değişim görülür. Bu nedenle puberte öncesi obezite hiperplastik (hücre sayısı ve büyüklüğün de artış), puberte sonrası hipertrofik (hücre çapı ve hacminde artış)'tir. Yağ hücrelerinin çapı 20-200 µm arasındadır. Yağ hücresi çap olarak 20 kata kadar, hacim olarak ise 1000 kata kadar ulaşabilir³¹.

Kapillerden zengin bir doku olan yağ dokusu deri altında, mezenteriyum, omentum gibi bölgelerde metabolizmaya katılan aktif bir doku olarak bulunmaktadır. Ayak tabanı, avuç içi, göz çukurunda bulunan yağ dokusu ise, daha çok mekanik koruyucu olarak fonksiyon görmektedir. Yağ dokusu kahverengi (multiloküler) ve beyaz yağ (uniloküler) dokusu olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kahverengi yağ hücreleri çok sayıda mitokondri içerir ve erişkinde çok az sayıda bulunur. Ayrıca termoregülasyonda görev alması ile beyaz yağ hücrelerinden farklılık gösterir.

Beyaz yağ dokusu ise dağılımına göre viseral yağ (karın boşluğunda iç organlar etrafında yerleşmiş olan, omental yağ) ve deri altı yağ olmak üzere iki kısımda incelenir^{32,33}. Total vücut yağının %10 kadarını oluşturan viseral yağ yaşlanmayla birlikte %20'lere kadar çıkabilir. Deri altı ve viseral yağ arasında hücre büyüklüğü, membran reseptörleri, kana yağ asidi salgılama ve yağ depolama fonksiyonları bakımından farklılıklar vardır^{33,34}.

Beyaz yağ dokusunda tek bir büyük lipid damlacığı varken (uniloküler), kahverengi yağ dokusunda çok sayıda lipid damlacığı bulunur (multiloküler)³⁵. Kahverengi yağ dokusunun temel görevi enerji harcanmasını ve termogenezi

sağlamaktır. Yenidoğan birisinin ağırlığının %2-3'ü kahverengi yağ dokusudur. Sonradan ısı düzenleme mekanizmasının devreye girmesiyle beraber kahverengi yağ dokusu beyaz yağ dokusuna dönüşür. Kahverengi yağ dokusu çok sayıda UCP-1 içeren mitokondriye sahiptir. Isı dengesini korumak için yaygın kapiller ağa sahiptir. Kahverengi yağ dokusu vücutta özellikle toraksta, perikard çevresinde, intraskapüler aralıkta, sinoatriyal düğümde, karında böbrek üstü bezi çevresinde ve intraperitoneal alanda bulunur^{36,37}.

Yağ dokusu ve yağ hücreleri kan damarları ile yakın ilişkilidir ve iyi gelişmiş bir kapiller ağa sahiptir. Yağ dokusu kapillerleri iskelet kası kapillerlerine göre daha geçirgen ve lipoprotein lipaz (LPL) bakımından zengindir. Yağ doku hücreleri kendi aralarında, kapiller endotel ve damar düz kasları ile sürekli iletişim halindedir³⁵.

Adipoz dokunun sinir yapısı kahverengi ve beyaz adipoz doku arasında farklılık gösterir. Kahverengi adipoz dokuda çok sayıda noradrenerjik lif bulunmuştur, kan damarları ile birlikte seyretmektedir ve direkt olarak adipositlerle temas halindedir. Adipoz dokuda adrenerjik reseptörler mevcuttur (α_1 , 2 ve β_1 , 2). Parankimal liflerin dansitesi, organın fonksiyonel durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Soğuk maruziyeti süresince kahverengi adipoz dokuda noradrenerjik parankimal liflerin sayıları artarken, beslenme süresince beyaz yağ dokusunda noradrenerjik parankimal liflerin sayıları artar³⁵.

Yağ hücresine dışarıdan hormonlar ve sitokinler aracılığıyla otokrin, parakrin ve endokrin sinyaller gelir. Yağ hücresi membranında ve sitoplazmasında bir çok farklı reseptörler bulunur. Yağ hücresi membranında bulunan reseptörler; hormon sitokin reseptörleri (örneğin, leptin, insülin, TSH, anjiyotensin II gibi), adrenerjik reseptörler (β_1 , β_2 , β_3 , α_1 ve α_2 reseptörleri gibi), lipoprotein reseptörleri (örneğin, VLDL, LDL, HDL gibi) ve sitoplazmada bulunan nükleer reseptörler olmak üzere sınıflandırılabilir³¹.

Yağ Hücresi Fonksiyonları

Son 20 yıl içinde hücre kültür çalışmaları ve mikro analiz yöntemleri ile yağ hücresi fonksiyonlarının moleküler mekanizmaları aydınlatılmaya

başlanmıştır. Preadipositlerden yağ hücresinin farklılaşması *in vitro* ortamlarda çalışılmış ve yağ hücresinin fonksiyonları incelenebilmiştir. Bu amaçla geliştirilen model hücre 3T3-L1 hücresidir³⁸.

Yağ hücresinin başlıca görevi metabolizma fazlası enerjiyi, trigiseridlere çevirerek depolamak, ihtiyaç durumunda depo trigliseridleri yağ asidine dönüştürerek kana vermek ve sinirsel ve hormonal yolla metabolik kontrolü sağlamaktır³⁹.

Adipositler, açlık veya fiziksel egzersiz ve stres durumları gibi enerji ihtiyacı yüksek olduğu durumlarda trigliseridleri yağ asitlerine hidroliz eder ve bu süreç hormon sensitif lipazın (HSL) aktivasyonuna bağlıdır. Bu durum başlıca katekolaminler tarafından stimüle edilir. İntrasellüler üretilen cAMP'yi, protein kinaz A'nın aktivasyonu takip eder. Protein kinaz A yağ damlacıklarının yüzeyini kaplayarak onları HSL'dan koruyan bir protein olan perilipinleri fosforile ederek etki gösterir. Fosforile perilipinler damlacıkların yüzeyinden ayrılarak sitozole dağılır, HSL yağ damlacığının yüzeyine bağlanarak trigliseridleri hidrolize eder³⁹.

Ayrıca yağ dokusunun seks steroidlerinin bioaktivitesi ve seviyelerinin kontrolünde de yer aldığı saptanmıştır. Sitokrom p450-bağımlı aromataz adipoz stromal hücreleri yoluyla üretilir ve preadipositlerde androjenlerin estrojenlere dönüşümüne aracılık eder (örneğin, androstenedionun estrona ve testosteronun estradiola dönüşümü). Adipoz dokuda bulunan 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi ise zayıf seks steroidlerini güçlü olanlara dönüştürür (örneğin, androstenedionun testostere ve estronun estradiola dönüşümü). Oksidoredüktaz 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 (11 β -HSD-1) inaktif 11 β -ketoglukokortikoid metabolitlerinin dönüşümünü katalize eder (örneğin, insanlarda kortizon ve rodentlerde 11-dehidrokortikosteronun aktif 11 β -hidroksillenmiş metabolitlerine, insanlarda kortizol ve farelerde kortikosteron). 11 β -HSD-1, viseral beyaz yağ dokusunda bol miktarda eksprese edilir ve sirkülasyondaki seviyelere etkisi olmadan kortizol ve kortikosteronun lokal üretimi artar. Yapılan çalışmalar 11 β -HSD-1 aktivitesi artışı ile metabolik sendrom arasında ilişki olduğunu göstermiştir^{40,41}.

Adiposit kökenli tokluk faktörü olan leptinin keşfedilmesi, adipoz dokunun aktif bir endokrin organ olarak tanınmasını sağlamıştır^{42,43}. Yağ dokusu fizyolojik olarak aktif, sitokinler ile benzer özellikleri taşıyan ve bundan dolayı “adipositokin” olarak adlandırılan çok sayıda peptid salgılar⁴⁴. Bu maddelerin vücut dengesinde, immün cevapta, kan dolaşımında ve steroid metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Bilinen adipositokinler arasında leptin, tümör nekrozis faktör- α , interlökin-6, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), adipsin, rezistin ve adiponektin yer almaktadır. Son zamanlarda visceral adipoz doku tarafından üretilen visfatin ve retinol binding protein-4 (RBP-4) bu gruba dahil olmuştur⁴⁵. Bu salgı ürünleri obezitede tip 2 diyabet patogenezinin belirlenmesinde önemli faktörler olarak görev yaparlar.

Yağ Hücresi ve İnflamasyon

Obezite ile birlikte CRP-1 (C reaktif protein) ve IL-6 gibi inflamatuvar mediyatörlerin artmış olması obezitenin “hafif dereceli inflamatuvar bir hastalık” olarak nitelendirilmesine yol açmıştır⁴⁶.

Üç büyük gelişme, yağ dokusunun immün ve inflamatuvar yanıtlara katkısının anlaşılmasında büyük rol oynamıştır^{42,47,48}. Bunlardan birincisi, yağ dokusunun yalnızca adipositleri değil fibroblast, preadiposit, doku yerleşimli makrofajlar ve vasküler unsurları da içerdiğinin anlaşılmasıdır. İkincisi, yağ dokusunun yağ asidlerinin salınımına ek olarak, inflamatuvar ajanlara ve sinyallere duyarlı reseptörleri eksprese ettiği bilgisidir, bu reseptörler uyarıldıklarında çok sayıda yapısal ve metabolik olarak çeşitlilik gösteren moleküller salgılamaktadır. Adipokinler olarak adlandırılan bu moleküller arasında TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, serum amiloid A proteinleri, monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1), makrofaj inflamatuvar proteinleri, metalloproteinaz doku inhibitörleri, plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1), alternatif kompleman sistem proteinleri, bir renin-anjiyotensin sistemi, anjiyotensin protein, vasküler endotelial büyüme faktörü ve leptin, rezistin, adiponektin gibi hormonlar vardır.

Üçüncüsü, yağ dokusunun reseptör ve adipokin ekspresyon ve sekresyonu, lipid depolama kapasitesi ve yağ asidi içeriği açısından farklılıklar gösteren birçok deri altı, intraabdominal, intramüsküler ve intratorasik depolarda dağılmış olduğunun anlaşılmasıdır. Genel olarak, omental ve mezenterik adipositler yağ asitleri ve adipokinlerin uyarıyla salınması yönünden deri altı adipositlerinden daha aktif olduğu gösterilmiştir^{42,47}.

Triaçilgliserol depolanmasındaki artışla birlikte, doku morfolojisinde ve metabolik aktivitesinde değişiklik, makrofaj infiltrasyonu ve artmış inflamatuvar mediyatör salınımıyla beraber yağ dokusu hücresinin hacminde artış görülür⁴⁷⁻⁴⁹. Yağ dokusunda en çok bulunan hücre tipi adipositler olmasına rağmen %5-10 oranında CD14⁺ ve CD31⁺ makrofajlar bulunur ve diyetle uyarılan triaçilgliserol birikimi ile birlikte makrofaj infiltrasyonuna yol açar, öyle ki makrofajlar yağ dokusunun %60'a varan bir kısmını oluşturabilir ve inflamatuvar sitokinlerin büyük kısmına katkıda bulunabilir^{47,48}. Kadınların yağ dokusundaki makrofaj oranı erkeklerden fazladır ve ayrıca visceral yağ dokusundaki makrofaj sayısı da deri altı yağ dokusundan daha fazladır⁴⁶.

ADİPOSİT DİFERANSİYASYONU

1980'lere kadar yağ hücreleri, enerji birikimi için sadece depo görevi gören, uygun hormonların etkisi altında lipidlerin toplandığı veya salındığı bir doku olarak bilinirdi. Modern moleküler biyolojik yaklaşımlar bu bakış açısını radikal olarak değiştirmiştir⁵⁰.

Adipositlerin ve adipoz dokunun orijini ve embriyonik kök hücre prekürsörlerinin adiposit kökene yönelmesine neden olan moleküler olaylar tam olarak anlaşılmamıştır. Birçok türde beyaz yağ dokusu oluşumu doğumdan önce başlar ve doğumdan sonra hızla genişler ve yağ hücre boyutlarının ve sayısının artışıyla sonuçlanır. Embriyonik gelişim süresince mezenkimal kök hücreleri, mezodermden köken alan yağ, kıkırdak ve kemik dokusu gibi dokular meydana getirirler⁵¹.

Preadiposit diferansiyasyonun ortaya konulması için yapılan *in vivo* çalışmaları zordur⁵². Bu çalışmalar için preadiposit primer kültürü kullanılmakta,

bununla birlikte primer kültürün eksik yönleri bulunmaktadır. Şöyle ki; fibroblastları diğer fibroblast benzeri hücrelerden izole etmek zordur. Aynı zamanda fazla miktarda yağ dokusu gereklidir, çünkü total yağ dokusunun küçük bir oranını preadipositler oluşturmaktadır. Ayrıca primer kültür, kültür şartlarında sınırlı yaşam süresine sahiptir²⁸.

Diğer taraftan adiposit gelişimi hakkındaki bilgilerin çoğu adiposit hücre kültür model çalışmaları yoluyla geliştirilmiştir. Preadiposit diferansiyasyonunda kullanılan bu modellerin de avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Önemli avantajları klonal elde edilen hücre hatlarında hücre popülasyonu homojendir ve diferansiyasyonun benzer basamaklarında bulunur. Bu uygulamalara tam yanıtı olarak sağlar. Ayrıca bu hücreler sonsuz sayıda pasajlanabilir, çalışmalar için preadipositlere kaynak sağlar²⁸.

Adiposit hücre kültür model çalışmaları için iki model sistemi vardır:

1. Pluripotent hücre hatları (10T1/2, Balb/c 3T3, 1246, RCJ3.1 ve CHEF/18 fibroblast) birçok farklı hücre tipine dönüşebilir.

2. Unipotent preadipositler (3T3-L1, 3T3-F422A, 1246, Ob1771, TA1 ve 30A5) adiposit köküne yönelmeye hazır hücre hatlarıdır⁵³.

3T3-L1 ve 3T3-F442A sıklıkla kullanılan hücre hatlarıdır ve bunlar 17-19 günlük fare embriyolarından köken alan Swiss 3T3 hücrelerinden izole edilen klonlardır²⁶. Bu hücreler insülin, deksametazon ve fosfodiesteraz enzim inhibitörü izobutilmetil ksantini içeren hormonal stimulus altında morfolojik ve yapısal olarak matür adipositlere benzeyen hücrelere diferansiyasyon olurlar²⁷.

İnsülin, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) aracılığıyla etki gösterir ve IGF-1 adipojenik kokteylde insülinin yerine kullanılabilir. Deksametazon sentetik glukokortikoid agonisti olup glukokortikoid reseptör yolağını kullanır. Metilizobutilksantin (MIX), cAMP-fosfodiesteraz inhibitörüdür, cAMP-bağımlı protein kinaz yolağını stimüle eder²⁸.

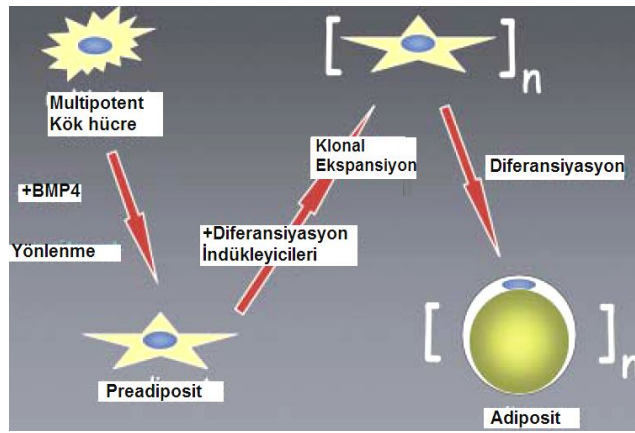
Takibinde yapılan biyokimyasal ve moleküler analizler ile yağ hücrelerin fonksiyonel karakteristiğini kazandığı kanıtlanmış olur. Bundan dolayı bu hücre

hatları adipogenezin, transkripsiyonel düzenleyicilerinin keşfi için çok önemlidir²⁷.

Adiposit Diferansiyasyonu Basamakları

1. Yönlenme

Vasküler stromadaki kök hücrelerin sinyallere cevap olarak adiposit kökene yönelmesini içeren bir süreçtir (şekil 1). Adiposit gelişim programının yönlenme süreci hakkında sınırlı bilgi mevcuttur.



Şekil 1: Adiposit diferansiyasyon basamakları⁵³.

Multipotent kök hücrelerin adiposit kökene dönüşüm sinyalinden sorumlu gen faktörü bilinmemektedir. Yeni adiposit hücrelerin adiposit kökene kabulü için belkide gerekli sinyal, matür adiposit tarafından sekrete edilmektedir. Matür adipositlerden sekrete edilen faktörlerin preadiposit proliferasyonu ve diferansiyasyonunu başlatması bu görüşü desteklemektedir⁵⁴⁻⁵⁶. Bununla birlikte bu faktörlerin hiçbiri saptanmamıştır. Farklı çalışmalarda yönlenmede BMP4'ün (kemik morfogenetik protein-4) önemli rol oynadığı *ex vivo* gösterilmiştir. BMP4 dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) ailesinin bir üyesidir ve uygulanan 10T1/2 hücrelerinde yüksek sıklıkla preadiposit karakter kazanmasına neden olmaktadır. Böylece MDI uygulanması ile bu hücreler adipositlere diferansiye olur⁵⁷. Bu veriler BMP4 hücrelerin preadipositlere yönelmesine ve uygun sinyallerin terminal diferansiyasyona neden olduğuna işaret etmiştir. BMP, kemik oluşumu gelişim sürecinde oldukça fazla çalışılmıştır. BMP'ler hücre

membranı yüzey reseptörüne bağlanır ve Smad sinyal yolağını aktive eder⁵⁸. Smad proteinleri nükleusa geçer ve kemik ve kıkırdak fenotipinden sorumlu genlerin ekspresyonunu aktive eder. 10T1/2 hücrelerine uygulama yapılması Smad1'in fosforilasyonunu hızlı bir şekilde aktive eder⁵⁷.

Ayrıca hücre dansitesi ve hücre şeklininde köken yönlenmesinde rol oynadığına dair bulgular mevcuttur. McBeath ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada düşük dansitede ekilen insan mezenkimal kök hücrelerin (hMSCS) yüksek potansiyelle osteoblast haline geldiği, oysa yüksek dansiteli ekim yapıldığında adiposit haline geldiğini rapor etmişlerdir⁵⁹.

2. Büyümenin Durması ve Mitotik Klonal Ekspansiyon

Preadiposit hücre hatlarının adipojenik indükleyiciler tarafından adipogenez için stimüle edilmesi ile preadipositler adiposit fenotipi ve adiposit genlerinin transkripsiyonel aktivasyonundan önce eşzamanlı hücre siklusuna yeniden girerek ve bir iki tur hücre bölünmesine maruz kalırlar bu durum mitotik klonal ekspansiyon olarak bilinmektedir. DNA replikasyonu ve kromatin yapısındaki değişikliklerin klonal ekspansiyon sürecinde ortaya çıktığına inanılmaktadır⁶⁰. Buna rağmen mitotik klonal ekspansiyonun adipogenez için gerekliliği tartışmalıdır, bazı kanıtlar mitotik klonal ekspansiyonun terminal diferansiyasyon için ön koşul olduğunu gösterirken, bazı çalışmalarda ise mitotik klonal ekspansiyon olmaksızın diferansiyasyonun olabileceğini ifade etmektedir⁶¹.

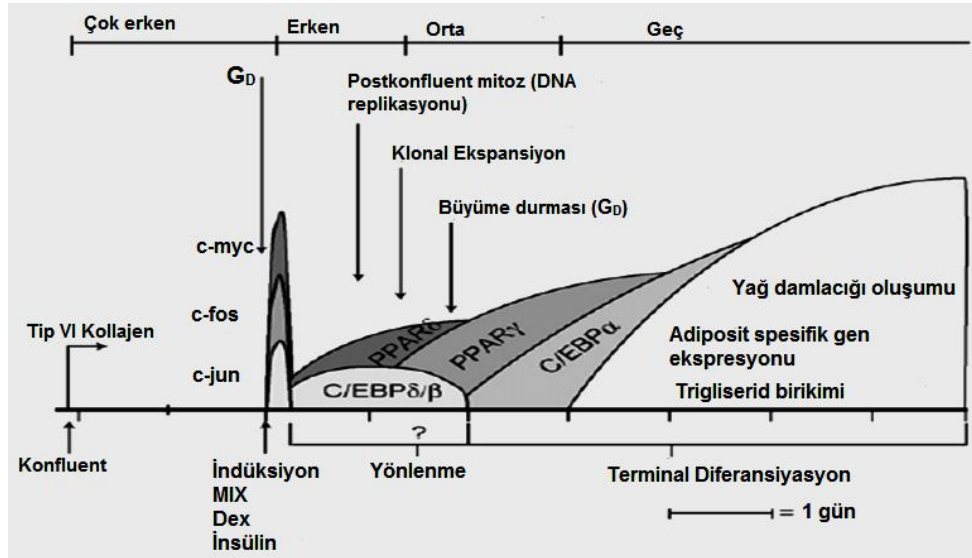
3. Terminal Diferansiyasyon

Hücreler, klonal ekspansiyon basamağını tamamladıktan sonra, hücre siklusunun "growth-arrest" (G_D) basamağına girerler, bu basamaktan sonra hücreler geri dönüşümsüz olarak diferansiyasyona uğrarlar⁶². 3T3-L1 preadipositlerde siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri p18, p21 ve p27'nin ekspresyonlarındaki değişiklikler yoluyla bu süreç karakterize edilmiştir⁶³. Bu süreçte adiposit diferansiyasyona yönelmiş hücreler G_D basamağına girene kadar undiferansiye duruma tekrar geri dönebilirler. Bununla birlikte bir kere G_D 'den çıktıktan sonra terminal diferansiyasyona yönelmiş hale gelirler.

Terminal diferansiyasyonu sürdürülmesi için C/EBP α ve PPAR γ 'nın ekspresyonları yoluyla olur. C/EBP α ve PPAR γ genlerin sinerjik olarak transkripsiyonu aktive ederek etkiler ve adiposit fenotipi gösterir⁶⁴.

Gen Ekspresyonunda Erken Değişiklikler

3T3-L1 preadipositler konfluent olduklarında adiposit diferansiyasyonunun çok erken markırlarını eksprese ederler (şekil 2). Konfluent olan hücrelerde hücre-hücre kontaktı, tip 6 kollajen genleri ve lipoprotein lipazın ekspresyonunu indükler⁶⁵. MDI'ya 1 saat maruziyetten sonra c-fos, c-jun, c-myc gibi nükleer protoonkojenlerin ve CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein β ve δ ekspresyonları gözlenir⁵¹.



Şekil 2: 3T3-L1 preadiposit diferansiyasyonunun süreci⁶⁶.

Lipoprotein lipazın (LPL) mRNA'nun ekspresyonu, adiposit diferansiyasyonunun erken işareti gibi görünmektedir^{60,67,68}. Lipoprotein lipaz, matür adipositler tarafından da sekrete edilir ve lipid birikiminin kontrolünde santral rol oynar. Bununla birlikte konfluent hücrelerde LPL ekspresyonu, kendiliğinden ortaya çıkar ve adiposit diferansiyasyonu için gerekli ajanların eklenmesinden bağımsızdır⁶⁹. Ayrıca makrofajlar ve kardiyak kas hücrelerini içeren diğer mezenkimal hücre tiplerinde de sentez ve sekrete edilir⁷⁰⁻⁷².

Adiposit diferansiyasyonu sürecinde hücreler fibroblastikten, sferik şekle dönüşür, ekstrasellüler matriks komponentlerinin tipi ve seviyesi, hücre iskeleti komponentleri, hücre morfolojisinde çarpıcı değişiklikler meydana gelir. Aktin ve tübülün ekspresyonunun azalması adiposit diferansiyasyonunda erken olaydır ve adiposit spesifik genlerin ekspresyonu ve morfolojisinde açıkça değişiklikler meydana gelmektedir⁷³.

Ayrıca plazminojen kaskadı, preadipositlerin stromal ekstrasellüler matriksin proteolitik yıkımı, lipid birikimi, adiposit spesifik gen ekspresyonu ve hücre şekil değişikliği için gereklidir⁷⁴.

Adiposit fenotipinin kazanımı, 200'den fazla genin ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili bulunmuştur⁷⁵. Birçok transkripsiyon faktör ailesi adipogenez sürecinde anahtar düzenleyici olarak rol oynar. Konfluent preadipositler adipojenik kokteyle maruz bırakıldıklarında C/EBP β ve C/EBP δ ekspresyonu indüklenir ve sırasıyla PPAR γ 2 ve C/EBP α aktive olur. Diferansiye preadipositler tarafından PPAR γ 2'nin uygun ligandının üretimi, olasılıkla transkripsiyonel kaskadının sınırlayıcı basamağını oluşturur. Adiposit determinasyon ve diferansiyasyon faktör-1/ sterol regülatör element bağlayıcı protein-1c (ADD1/SREBP-1c) diğer anahtar transkripsiyon faktörüdür ve adiposit diferansiyasyonuna ilaveten, lipid metabolizmasında yer alır, çok sayıda karaciğer genlerinin transkripsiyonunu modüle eder⁵⁰.

C/EBP'ler, PPAR γ 2 ve ADD1/SREBP-1c'ye ek olarak preadiposit-adiposit geçişinin moleküler kontrolünde kritik rol oynayan GATA bağlayıcı-transkripsiyon faktörleri GATA-2 ve GATA-3 ve cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteini (CREP)'de bu süreçte yer alır^{76,77}.

Transkripsiyon faktörü CREB, geleneksel diferansiyasyon ajanları tarafından (insülin, DEX, IBMX) upregüle edilir. 3T3-L1 preadipositlerde aktive CREB'in overekspresyonu, adipogenezin başlangıcı için yeterli ve gereklidir. Öyle ki, dominant-negatif CREB'in overekspresyonu, geleneksel diferansiyasyon indükleyicileri uygulanan hücrelerde adipogenezini bloke eder⁷⁶.

Diğer sinyal moleküllerinden olan preadiposit faktör-1 (pref-1) ve Wnt'ler adiposit diferansiyasyonunu düzenlerler^{78,79}. Pref-1 adiposit diferansiyasyonunun bir inhibitörüdür ve plazma membran proteini olarak sentez edilir. Pref-1, 3T3-L1 preadipositlerinde oldukça fazla miktarda eksprese edilir fakat matür yağ hücrelerinde saptanmaz. DEX, bir diferansiyasyon ajanı olup, pref-1 transkripsiyonunu inhibe eder ve olasılıkla adipogenez teşvik eder. Pref-1'in downregülasyonu adipoz dönüşümü için gereklidir⁷⁹.

Adipogenezin Hücresel ve Hormonal Regülasyonu

Adipogenezin İndükleyicileri

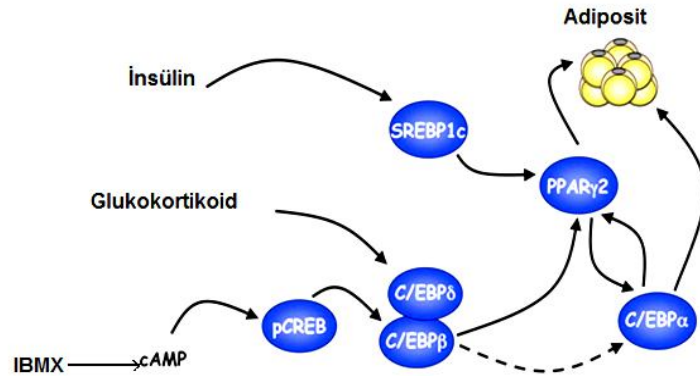
Çeşitli ajanlar bu hücrelerde diferansiyasyonun indüksiyonu için kullanılmış, son gözlemler etkili diferansiyasyon için *in vitro* insülinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. İnsülin, diferansiyasyonu ve her bir yağ hücrelerinde lipid birikiminin miktarını artırır⁸⁰. Ayrıca insülin güçlü antiapoptotik aktiviteye sahiptir⁸¹. İlginç olarak insülin reseptörleri, eğer varsa, preadipositlerde az miktarda eksprese edilmektedir⁸². İnsülinin diferansiyasyon üzerine etkisi, IGF-1 reseptörüyle çapraz-aktivasyonu yoluyla ortaya çıkar. IGF-1, fetal buzağı serumunun kritik komponentidir. IGF-1 ve insülin birçok farklı "downstream" sinyal transdüksiyon yollarını aktive ederler ki, bunlardan biri veya hepsi bu hormonların adipojenik etkilerine aracılık eder. Her iki molekül Ras'ı stimüle eder fakat insülin/IGF-1'le stimüle edilen yağ hücre diferansiyasyonunda Ras sinyalinin asıl rolü çok açık değildir. İnsülin etkisinin, diğer bir "downstream" efektörü protein kinaz B (Akt) adipogenez için diğer bir olası mediyatördür⁵⁰.

Glukokortikoidler, primer adipositler ve kültür preadiposit hücre hatlarında optimal diferansiyasyonu indüklemek için yıllardır kullanılmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda, glukokortikoidler deksametazon formunda uygulanmaktadır. Deksametazonun, glukokortikoid reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla etki oluşturduğuna inanılmaktadır. Bu reseptörler PPAR'da olduğu gibi büyük bir süperfamilyanın nükleer hormon reseptörüdür. Glukokortikoid reseptörlerinin adipogenezde yer alan transkripsiyonel hedefi belirsizdir. Deksametazonun C/EBP δ 'yı indüklediği gösterilmiştir ve C/EBP δ adipojenik

aktivitelerinden sorumlu olabilir (şekil 3). Deksametazon, adipogenezin negatif düzenleyicisi olan preadiposit faktör 1 (pref-1)'in ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Pref-1, preadipositlerde bulunmaktadır. Pref-1'in ekspresyonu, deksametazonun prediferansiyatif etkisini bloke eder⁸³.

Diğer hormonların etkileri belirsizdir. Büyüme hormonu, çeşitli kültür preadiposit hücre hatlarında adipogenezin açık bir şekilde indüklerken, primer adiposit kültürlerinde bu etki gösterilmemiştir. Hatta diferansiyasyonun bu hücrelerde, büyüme hormon tarafından inhibe olabileceği görünmektedir. Büyüme hormon yokluğu olan insanlarda tutarlı olarak, normal yağ depolarına sahip oldukları hatta obez olabileceği gözlenmiştir. Tiroid hormon, retinoik asid ve çeşitli prostaglandinlerin *in vitro* adipogenez üzerine etkiye sahip olduğu gösterilmiş fakat *in vivo* rolünü destekleyen kanıtlar yetersizdir⁵⁰.

Diferansiyasyonun indüklenmesinde önemli diğer bir bileşik ise cAMP'dir. Kültüre preadipositik hücre hatlarında yapılan çalışmalar bir fosfodiesteraz inhibitörü olan metilizobutilksantin eklenmesi diferansiyasyonu artırdığı gösterilmiştir (izobutilmetilksantin; IBMX). cAMP'nin deksametazon ve insülin ile kombinasyonu bu etkiyi güçlendirmekte ve 3T3-L1 hücrelerinde yağ hücrelerinin indüklenmesi için gerekli uygulamada tercih edilmektedir⁷⁶.



Şekil 3: Transkripsiyon faktörleri kaskadı yoluyla adipogenezin indüksiyonu⁸⁴.

İndometazin, adipogenezde rol aldığı iyi bilinen bir transkripsiyon faktörü olan peroksizom proliferasyonunu aktive eden reseptör γ/α (PPAR γ/α)'nın bir ligandıdır⁸⁵.

Adipogenez İnhibitörleri

Adiposit diferansiyasyonu, transmembran molekülü pref-1'in ekspresyonu yoluyla düzenlenir. Bu molekül preadipositlerde bulunmakta fakat yağ hücre diferansiyasyonu sürecinde downregüle olmaktadır⁵⁰. Pref-1 oldukça yüksek oranda preadipositlerde eksprese olmakta fakat diferansiyasyon sürecinde azalmaktadır ve matur adipositlerde bulunmamaktadır. Pref-1 *in vitro* ve *in vivo* adiposit diferansiyasyonun derecesini yansıtmakta ve böylece preadiposit belirteci olarak kullanılmaktadır⁸⁶.

TNF- α ve IL-6'yı içeren çeşitli sitokinler ve diğer birçok proinflamatuvar moleküller, birçok kültüre preadiposit hücre hatlarında adiposit diferansiyasyonunu baskıladığı bulunmuştur. PDGF, FGF ve EGF gibi birçok büyüme faktörü de adipogenezin potent inhibitörüdür. Bunların adipogenez üzerine inhibitör etkisine aracılık eden olası mekanizmalar; mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1-2 (ERK1 ve ERK2)'dir^{87,88}.

YAĞ HÜCRESİ SALGI ÜRÜNLERİ

ADİPOKİNLER

Adipoz doku; adipositokin olarak da bilinen ve metabolik olarak önemli olan çok sayıda proteini sekrete eden aktif bir metabolik dokudur^{89,90}. Bazı adipokinler özellikle santral veya visceral obezite olmak üzere obezite ile ilişkili kardiyovasküler komplikasyonlar ve insülin direncinde major rol oynarlar.

LEPTİN

1950 yılında Jackson laboratuvarı, erken yaşlarda ciddi obezite, hiperfaji, diyabet ve enerji tüketiminde azalmayla özelleşmiş ob/ob olarak adlandırılan otozomal resesif bir mutasyon belirlemiştir. 1953 yılında ise Kennedy ve arkadaşları lipostatik teori adı verilen ve vücut yağ dokusu depolarının durumunu beyine bildirerek enerji alımını ayarlayan, yağ dokusunda yapılan ve dolaşıma verilen bir faktörün varlığını ileri sürmüşlerdir⁹¹. Harvey, 1958 yılında kobayların dolaşımında doygunluk veren bir faktörün varlığını göstermiştir. 1969'da Coleman obezitenin genetik mekanizmasını açıklamak için parabiosis

çalışmaları sonucunda obez hayvan modelleri tanımlamıştır. Bu hayvanlar, ob/ob fare (genetik obez), db/db fare (diyabetik obez) ve fa/fa sıçan (hipotalamik obez) modelleri olan deneklerdir ve halen günümüzde obezite çalışmalarında kullanılmaktadırlar⁹¹.

Leptin, Yunanca “ince, zayıf” anlamına gelen leptos’tan türetilmiştir. İlk kez 1994 yılı sonunda adiposit kökenli sinyal faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu faktörün, kendi reseptörleri ile etkileşmesinden sonra vücut ağırlığı ve enerji tüketiminin denetimi gibi karmaşık bir yanıtı uyardığı, ayrıca üreme ve nöroendokrin sinyal oluşumunda da önemli işlev gördüğü bildirilmiştir⁹². 1995’de leptin’in moleküler yapısının bulunması ile endokrinolojide önemli bir gelişme olmuş ve leptin ile ilgili çalışmalar bu genlerin tanımlanmasıyla hız kazanmıştır^{93,94}.

Ob geni ilk olarak 1994 yılında Friedman ve arkadaşlarınca 8 yıl süren araştırmalar sonucunda klonlanmıştır⁹⁵. Ob geni sıçanlarda 6 nolu kromozomda bulunur. İnsanlarda ise 7. kromozom’un uzun kolunun 31. bölgesinde yani 7q31’dedir⁹³. Leptin 167 aminoasit içeren, 16 kDA ağırlığında ve 4 α heliks yapısında sitokin benzeri bir proteindir. İnsan ve sıçan leptin’i %84 oranında benzerlik göstermektedir⁹⁶.

Leptinin Sentezi

Leptin, primer olarak yağ hücresinde ob geni tarafından mRNA’ya kodlanıp sentezlenmektedir⁹². Büyük kısmı beyaz yağ dokusunda, az bir bölümü de kahverengi yağ dokusunda sentez edilerek kana verilir⁹⁷. Deri altı yağ dokusu hücrelerinde leptin mRNA miktarı, viseral yağ dokusuna karşın iki kat fazladır ve yağ hücresinden salgılanması β_3 adrenerjik reseptörler aracılığıyla olmaktadır⁹⁸.

Leptinin yağ hücrelerinden salgılandığının gösterilmesinden sonra birçok dokuda leptin salgılandığı bulunmuştur. Leptinin mide-bağırsak sisteminde, özellikle midede sentezlendiği bulunmuştur⁹⁹. Ayrıca, iskelet kası¹⁰⁰, meme bezi¹⁰¹, kemik iliği¹⁰², dermal fibroblastlar¹⁰³, endometriyum¹⁰⁴, hipofiz¹⁰⁵, testis, ovaryum ve kıl follikülleri¹⁰⁶ leptinin diğer kaynak dokularıdır.

Leptin nabızsal ve gece gündüz ritmiyle salgılanır. Serum leptin yoğunluğu öğleden sonra düşük olup, gece yarısından sonra (24⁰⁰-02⁰⁰) zirve yapar. Leptin salgılanmasının gece gündüz ritmini denetleyen faktörler uyku ve uykunun neden olduğu glukoz, insülin ve büyüme hormonu yoğunluklarının yüksekliğidir. Yağ depolarının artışı serum leptin yoğunluğundaki gece-gündüz farkını azaltmaktadır. Normal ağırlıklı bireylerde serum leptin yoğunluğu ortalama 7,5±9,3 ng/ml iken, şişman insanlarda ortalama 31,3±24,1 ng/ml'dir. Leptin'in dolaşımdaki yarı ömrü 25-30 dakika kadar olup, çok kısadır ve böbrekler tarafından dolaşımdan alınarak idrar yoluyla atılır¹⁰⁷.

24 saatlik ritme ek olarak, normal ovülasyon döngüsü olan kadınlarda leptin'in salınımı aynı şekilde aylık bir döngü içinde gerçekleşir. Leptin salınımı menstruel siklusun sekresyon döneminde yüksektir¹⁰⁸.

İnsanlarda serum leptin yoğunluğu cinsiyete bağlı olarak da farklılık gösterir. Kadınlarda daha yüksek olan serum leptin düzeyi, farklı üreme hormonları ve kadınların daha fazla derialtı yağ dokusu içermeleri sonucudur¹⁰⁹. Androjenler, kiltür adipositlerinde leptin mRNA üretimi ve leptin salınımını baskılayarak, serum leptin yoğunluğunun düşük olmasına yol açar. Estrojenlerin leptin salgılanmasını uyarıcı etkisine karşın androjenler baskılıyor gibi görünmektedir^{110,111}.

Genel olarak, serum leptin düzeyleri beslenme ve hormonal faktörlerden etkilenir. Açlık leptin düzeyini düşürürken, aşırı beslenme de leptin salınımını arttırmaktadır. 24 saatlik açlık, leptin düzeyini başlangıca göre %30 oranında azaltır. Aşırı beslenme ise 12 saat içinde leptin düzeylerini %50 oranında artırır. Ayrıca insülin, glukokortikoidler ve ateş leptin düzeyini artırırken, egzersiz, noradrenalin, testosteron ve soğuk azaltır TNF α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler de leptin mRNA ve serum leptin düzeylerini değiştirmektedir¹⁰⁹.

Leptin Reseptörleri

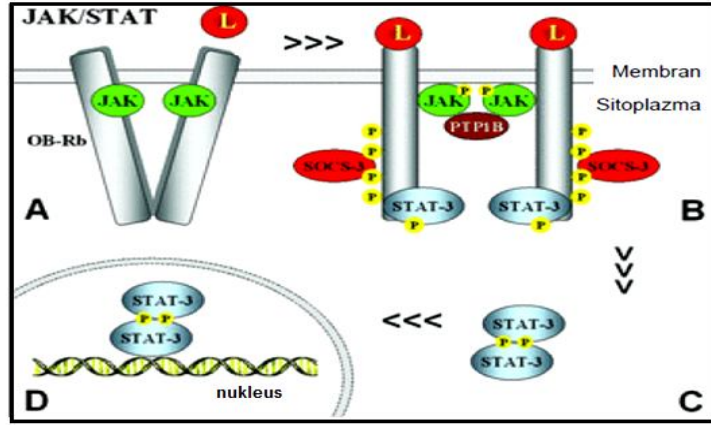
Leptin araştırmalarında önemli bir aşama da, 1994 yılında leptin (ob) geninin klonlanmasından yaklaşık bir yıl sonra leptin reseptörünün (Ob-R) tanımlanmasıdır¹¹². Ayrıca leptin ve leptin reseptörünün sitokinlere benzerlikleri

nedeniyle, leptin bir sitokin olarak da sınıflandırılır. Leptin'in yapısı IL-6 ve IL-11 ile leptin reseptörü ise IL-6 reseptörü ile benzerlik gösterir¹¹³. Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re ve Ob-Rf olarak altı farklı leptin reseptörü tanımlanmıştır¹¹⁴.

Leptin etkisini, özel leptin reseptörü izoformlarını aktive ederek gösterir. Uzun reseptör şeklinin yiyecek alımını ve enerji metabolizmasını düzenleyen hipotalamusta yerleştiği ve birincil olarak bu reseptörün leptin'in sinyalizasyonunda etkili olduğu bilinmektedir¹⁰⁹.

Kısa reseptör izoformunun ekspresyonu beyinde koroid pleksus ve leptomeninks gibi alanlarda çok fazladır. Leptin'in kan-beyin ya da kan-BOS engelinden geçişinde işlev görmektedir¹¹⁵.

Leptin metabolik etkilerinin çoğunu merkezi sinir sisteminde ve periferik dokularda bulunan leptin reseptörleriyle etkileşerek göstermektedir. Leptin reseptörü, uyarıyı Janus protein tirozin kinaz 2 (JAK proteinler) ile sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörlerine (STAT 3) iletir (şekil 4). Leptin'in kendi reseptörüne bağlanması reseptör ve reseptörle bağlantılı JAK'larda farklılaşmayı uyarır. Bu olay reseptörün sitoplazmik kısımlarındaki tirozin bölgelerinin fosforilasyonunu sağlamakta ve STAT proteinleri için fosfotirozin bağlanma yerleri oluşturmaktadır. Bu şekilde STAT proteinleri hem reseptöre, hem de dimer oluşturmak üzere başka bir STAT proteinine bağlanmaktadır. Fosforilasyondan sonra bu STAT proteinlerindeki tirozin bölgeleri reseptörden ayrılır. Sonuçta STAT proteinleri aktive olmuş olur. Çekirdeğe taşındıktan sonra STAT'a yanıt veren moleküllere ve DNA'ya bağlanırlar ve yanıtlayıcı hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar. Leptin reseptörü aktivasyonu ve transkripsiyon faktörlerinin enerji metabolizmasını düzenleyici etkilerine aracılık eden bu genler henüz bilinmemektedir.



Şekil 4: Ob-Rb ile JAK-STAT aktivasyonunun mekanizması¹¹⁶.

JAK-STAT sinyali ile aktive olan transkripsiyon sonucu birçok nöropeptid'in ekspresyonu değişir. Özellikle hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini etkileyen arkuat çekirdekdeki Nöropeptit Y (NPY) ve hipotalamus-hipofiz-böbreküstü bezi eksenini etkileyen kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) en iyi çalışan ve JAK-STAT sinyali ile ekspresyonu değişen nöropeptidlerdir¹⁰⁹.

Leptin'in Biyolojik İşlevleri

Leptin'in en önemli biyolojik işlevleri beslenme davranışını ve metabolizma hızını düzenlemesidir. En iyi bilinen ve en önemli etkisi hipotalamustaki iştah merkezlerini etkileyerek besin alımını azaltmasıdır^{117,118}. Leptin, enerji harcanmasını da artırarak metabolizma hızını artırır. Ayrıca seks dürtüsünün artması, sempatik aktivitede artış, ısı düzenleme etkisi, puberteye ulaşma üzerine etkisi, üreme, büyüme, gelişme ve kan yapımı üzerine etkileri vardır¹⁰⁹.

Birçok çalışma karaciğer, gastrik mukoza, keratinosit hücreler ve son zamanlarda meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu aktive edebileceği gösterilmiştir¹¹⁹⁻¹²¹. Leptin asıl olarak meme yağ dokusu tarafından sentez edilir ve leptin ekspresyonu normal ve tümoral insan meme epitelyum hücrelerinde saptanmıştır^{122,123}. Epidemiyolojik çalışmalar obezite ve meme kanseri arasında ilişki olduğunu, bu süreçte leptinin yer alabileceğini göstermiştir¹²⁴.

Leptin'in Kilo Düzenlemedeki İşlevi

Leptin, kemirgenlerde güçlü bir besin alımı baskılayıcısı ve enerji harcama uyararı olarak beslenme davranışını düzenler. Hipotalamusta arkuat nöronlarda besin alımını uyarıcı Nöropeptid Y (NPY), agouti-related protein (AGRP) ve oreksin gibi mediatörleri baskılayıp, iştahı azaltan α -melanosit stimüle edici hormon (α -MSH), kokain ve amfetamin salıverici transcript (CART) ve kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) yapımını uyararak besin alımını azaltmaktadır¹²⁵.

Leptin'in Yağ Metabolizması Üzerine Etkisi

Leptin, yağ dokusunda yağ asidi oksidasyonu artışı ile triaçilgliserol esterleşmesinin azaltılmasından sorumludur. Leptinin lipolitik yol üzerine otokrin ve parakrin etkileri vardır¹¹⁸. Hayvanlarda total yağ düzeyini gösteren ve temsil eden bir lipostat gibi hareket eder ve buna bağlı olarak yağ düzeyini düşürmek için gerçekleşen davranışları aktive eder. Leptinin plazma kolesterol, trigliserid ve glukoz düzeylerini azalttığı da saptanmıştır^{92,126}.

Leptin'in Glukoz Metabolizması Üzerine Etkisi

Leptin glukoz metabolizması üzerine de etkilidir. Zayıf hayvanlara leptin uygulanması, insülin düzeylerini değiştirmeden serum glukoz düzeyinde azalmaya yol açar. Leptin, insanda plazma insülin düzeyini değiştirmeden ve kilo kaybından bağımsız olarak periferik dokularda glukoz dönüşümünü ve alımını artırıp, karaciğer glikojen içeriğini azaltarak glukoz metabolizması üzerine akut etki yapmaktadır¹¹⁸. Leptin, kemirgenlerde pankreas β hücrelerindeki reseptörlerini etkileyerek insülin salgılanmasını baskılar¹²⁷.

Leptin ve Termogenez

Leptinin, enerji harcanmasına yaptığı en önemli etki termogenezdeki artıştır¹²⁸. Tiroid hormonlarının da termogenezisi arttırarak, enerji metabolizmasında düzenleyici rol oynadıkları bilinmektedir. Termogenezde en önemli faktörler, “uncoupling proteinler (UCP)”dir. Tiroid hormonları UCP2 ve UCP3 ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyarırlar ve enerji harcanmasına neden olarak, sonuçta fazla ısının oluşmasını sağlarlar. Leptin ise tiroid hormonlarının ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu arttırarak yüksek UCP3 düzeylerinin

oluşmasını sağlar ve bu da termogenezi artırır¹²⁹. Deney hayvanlarına da ekzojen leptin verilmesi hem fiziksel erki, hem de vücut sıcaklığını arttırmaktadır¹³⁰. Soğuk uygulaması sonucunda ise beyaz yağ dokusunda β adrenoreseptör aktivasyonu, sempatik aktivite artışı, cAMP ve Ob geni ekspresyonunu azaltarak leptin sentezini düşürmektedir. Isıtma sağlanınca soğğun bu etkisinin ortadan kalktığı ve leptin sentezinin arttığı gözlenmiştir¹³¹.

Leptin ve Obezite

Ob geninin klonlanması ve gendeki mutasyonun ob/ob farelerdeki obez fenotipten yükümlü olduğunun gösterilmesi, insanlarda da benzer bir durumun obeziteye neden olabileceği görüşünü akla getirmiştir. Leptin eksikliğinin obezite ile sonuçlandığı, günümüzde oldukça iyi bilinen ve kabul edilmiş bir gerçektir. Ancak obez insanlarda farelerdeki gibi bir mutasyon saptanmamıştır, leptin kodlayan gen normaldir¹⁰⁹. Yapılan çalışmalarda obezlerde plazma leptin düzeyinin yüksek olduğu ve vücut yağı ile birliktelik gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar leptin duyarsızlığı ya da direnci olabileceğini düşündürmüştür¹³². Benzer şekilde leptine direnç gösteren db/db fareler de obezdirlir. Leptinin sentez ve salgılanmasında ve kana salınan leptinin taşınmasında bir bozukluk, hipotalamusta leptin reseptör ve sinyal iletiminde bir yetersizlikten dolayı obezite gelişebilir¹³³.

Leptin anti-obezite etkisini başlıca enerji alımını azaltarak (iştahı azaltıp besin alımını azaltır) ve enerji harcanmasını artırarak (sempatik sinir sistemi aktivasyonu, termogenezis, artmış oksijen tüketimi) göstermektedir¹¹⁰.

ADİPONEKTİN

Adipositlerden sentezlenen 244 aminoasitten oluşan protein yapıda bir moleküldür. Adiponektin plazmada diğer hormonlara ve sitokinlere göre oldukça yüksek konsantrasyonda bulunur¹³⁴. 1995 ve 1996 yıllarında farklı gruplar tarafından bulunan ve bu nedenle de farklı adlandırılan adiponektinin diğer sinonimleri şunlardır: “adipose most abundant gene transcript 1 (apM1)”, “adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30)”, adipoQ ve “gelatin binding protein of 28 kDa (GBP28)”^{135,136}. İnsan adiponektini 17 kb’lik ADIPOQ

geni tarafından kodlanır ve bu gen 3q27 kromozomu üzerinde lokalize olmuştur¹³⁷. İlginç olarak 3q27 insan kromozomu tip 2 diyabet ve metabolik sendrom açısından da duyarlılık taşıyan gen bölgesi olarak tanımlanmıştır¹³⁸. Adiponektin büyük ölçüde ve özellikle farklılaşmış adipositlerden eksprese edilir ve kan dolaşımında yüksek düzeylerde bulunur¹³⁵. İnsanda serum adiponektin düzeyi normal şartlarda 5-30 µg/ml aralığındadır ve total plazma proteinlerinin %0,01'i kadardır¹³⁹. Plazma adiponektin düzeyleri erkeklerde kadınlardan daha düşüktür.

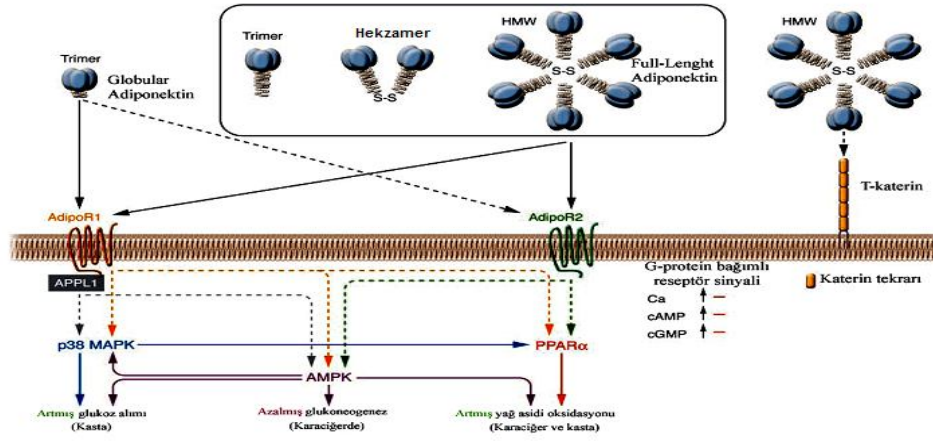
İnsan plazmasında adiponektin kollojen kısmının aracılığıyla oluşturduğu 3 majör oligomerik form şeklinde bulunur: düşük moleküler ağırlıklı (LMW) trimer, orta moleküler ağırlıklı (MMW) heksamer ve yüksek moleküler ağırlıklı oligomer (4-6 trimer) form (HMW)¹⁴⁰.

Adiponektin Reseptörleri ve Adiponektin Etki mekanizması

Birkaç yıl önce Yamauchi ve arkadaşları tarafından AdipoR1 ve AdipoR2 olmak üzere iki farklı adiponektin reseptör izoformu klonlanmıştır¹⁴¹. Her iki izoform da adipositler dahil birçok hücre tipinde eksprese edilir^{141,142}. Yağ hücrelerinde adiponektin reseptörlerinin keşfedilmesinden sonra, adiponektinin otokrin ve/veya parakrin yolla adipoz doku metabolizmasında düzenleyici rol oynayabileceği düşünülmüştür. İnsan dokuları içerisinde AdipoR1 başlıca iskelet kasında eksprese edilirken, AdipoR2 ağırlıklı olarak karaciğerde eksprese edilir. *In vitro* çalışmalar adiponektinin her iki reseptörün bağlanmasıyla PPAR γ ve AMP-aktive protein kinaz (AMPK) aktivitesinde artışa sebep olduğunu göstermektedir¹⁴¹.

AdipoR1 ve AdipoR2, 7 transmembran domaini içeren yüzey membran proteinidir; N terminalleri integral, C terminalleri ise eksternaldir ve bildirilen tüm G protein-bağlantılı reseptörlerin topolojisine zıttır. AMPK ve PPAR γ aktivasyonunun kesin mekanizması bilinmemektedir¹⁴³. İki reseptör sinyal yolları açısından birbirinden açık bir şekilde farklı yol izlerler. AdipoR2, çoğunlukla yağ asidi oksidasyonunu artırıp, inflamasyon ve oksidatif stresi inhibe ederek enerji dağılımını uyaran PPAR α metabolik yolunun aktivasyonu ile bağlantılı iken, AdipoR1, AMPK metabolik yolunun aktivasyonu ile sıkı bir şekilde bağlantılı

olup artmış yağ asidi oksidasyonu ile birlikte hepatik glikoz üretiminin inhibisyonunu düzenler (şekil 5)¹⁴⁴.



Şekil 5: Adiponektin'in sinyal yolağı⁴⁰⁴

Adiponektin reseptörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonal regülasyonu henüz aydınlatılamamıştır. Şimdiye kadar adiponektin gen ekspresyonunun insan makrofajlarında PPAR ile düzenlendiği gösterilmiştir ve beyaz adipoz dokuda AdipoR1 ve PPAR γ gen ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur^{145,146} AdipoR1 ve AdipoR2 reseptörlerinin her ikisinin ekspresyonu, insülin rezistanslı *ob/ob* farelerin kas ve adipoz dokusunda azalmıştır ve bu farelerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında hiperglisemi ve hiperinsülinemi görülmektedir¹⁴⁷.

Adiponektinin Metabolik Etkileri

Adiponektinin iskelet kasında karbonhidrat ve yağ metabolizması üzerinde potansiyel etkisi vardır. Çeşitli çalışmalarda globüler adiponektin tedavisinin hem iskelet kası hücre kültürlerinde hem de izole kasta yağ asidi yararlanımını düzelttiği gösterilmiştir^{148,149}.

Son yıllarda, kardiyomiyositlerde de adiponektin reseptörleri bulunmuştur. Adiponektin tedavisinin kardiyomiyositlerde glikoz ve yağ asidi alımını önemli derecede artırdığı belirtilmiştir¹⁵⁰. Diğer taraftan adiponektin kültüre kardiyak miyositlerde AMPK fosforilasyonunu indükler^{150,151}. Adiponektin eksikliği insülin direnci, glikoz metabolizması bozukluğu ve daha sonraki kalp yetmezliğinin şiddeti ile ilişkilidir. Aynı zamanda adiponektinin globular kısmı ile

tedavi kalpte yağ asidi oksidasyonunu, AMPK aktivasyonundan bağımsız olarak, önemli derecede artırır¹⁵².

Adiponektin ekspresyonu subkütan yağ dokusunda visceral yağ dokusundan daha fazladır. Obezitede dolaşımdaki düzeyi azalırken kilo verildiğinde düzeyleri artar. İnsülin adiponektin üretimini artırır. Kronik böbrek yetersizliğine bağlı hemodiyaliz hastalarında da sağlıklı bireylere göre adiponektin düzeylerinin 2,5 misli daha yüksek olduğu bulunmuştur. Adiponektinin diyete bağlı obezitenin erken safhasında henüz küçük adipositler aktifken arttığı, adipositlerin hipertrofik hale geldiği uzun süreli obezite durumunda ve tip 2 diyabette ise azaldığı bildirilmiştir¹³⁶.

Adiponektin düzeyleri vücut yağı oranı, bel-kalça oranı ve intraabdominal yağ miktarıyla negatif korelasyon gösterir. Yine adiponektin düzeyleri açlık plazma insülin konsantrasyonu, açlık glikoz konsantrasyonu, glikoz tolerans testinin 2. saatindeki glikoz konsantrasyonu, sistolik ve diyastolik kan basıncı, total ve LDL-kolesterol konsantrasyonları, trigliserid ve ürik asit düzeyleriyle negatif, insülin duyarlılığı ve HDL-kolesterol düzeyiyle pozitif korelasyon gösterir¹⁵³. Üstelik diyabetik olup da koroner arter hastalığı bulunan olguların adiponektin düzeyleri diyabetik olup da koroner arter hastalığı olmayan olgulardan daha düşük bulunmuştur¹⁵⁴.

Adiponektin, damar duvarında, TNF- α üretimini baskılayarak adezyon moleküllerinde azalmaya yol açar ve monosit adezyonunu inhibe eder¹³⁶, çöpçü reseptörlerin ekspresyonunu azaltarak makrofajların köpük hücrelerine dönüşümünü önler¹⁵⁵ ve büyüme faktörlerinin uyardığı düz kas hücrelerinin bu bölgeye göçü ve proliferasyonlarını azaltır¹³⁶. Bundan dolayı adiponektin düzeyleri ile karotis intima media kalınlığı arasında ters bir ilişki tespit edilmiştir. Adiponektin vasküler intimada kollojen I, III ve V'e özgün olarak bağlanır ve özellikle hasara uğramış damar duvarında birikir. Bu açıdan zedelenmiş damarın tamiri sürecinde rol aldığı düşünülmektedir. Ayrıca adiponektin endotel hücrelerinde nitrik oksit üretimini artırır ve anjiyogenezi uyarır. Bu etkilerine insülin reseptörlerinin fosforilasyonunda artış, AMP'ye bağlı artan protein kinazların aktive oluşu ve nükleer faktör kappa B yolağının modülasyonu

aracılık etmektedir. Sonuç olarak adiponektin yağ dokusunda üretilen antidiyabetik, antiinflamatuvar ve antiaterojenik bir hormondur¹³⁶.

Adiponektin ve Kemik Oluşumu

Adiponektin ile kemik homestazı arasındaki ilişki ilk defa Berner ve arkadaşları tarafından bulunmuş ve adiponektinin reseptörlerini AdipoR1 ve AdipoR2, kemik biçimlendirici hücrelerde sekrete ve eksprese edildiğini göstermişlerdir. Adiponektin aynı zamanda osteoblast kültüründe hücre proliferasyonunu stimüle ettiği, başka bir çalışmada ise bunun tersi bulunmasına rağmen adiponektin kemik metabolizmasında etkisi olduğu açıktır¹⁵⁶.

Adiponektin ve kanser

Meme ve prostat kanserli kişilerde adiponektin seviyesi düşük bulunmuş ve farelerde in vitro incelemelerde adiponektinin olasılıkla neo-vaskülarizasyonun süpresyonu yoluyla tümör büyümesini inhibe ettiği görülmüştür¹⁵⁶. Adiponektin ekspresyonu ve salınımı insülin ve glukokortikoidler tarafından düzenlenmektedir^{157,158}.

REZİSTİN

Rezistin son yıllarda keşfedilen, yağ hücresinden salgılanan bir hormondur¹⁵⁹. Rezistin 12.5 kDa ağırlığında sisteinden zengin bir polipeptiddir¹⁶⁰. Rezistin mRNA'sı 20 aminoasitli bir sinyal dizisi içeren, 114 aminoasitlik bir polipeptid olarak sentezlenir. Sekrete edilen 94 aminoasitlik kısımda 11 sistein kalıntısı bulunmaktadır. Rezistin disülfid dimerleri şeklinde sekrete edilir ve her dimerizasyon için tek bir sistein içermektedir¹⁶¹.

Rezistin iki bağımsız grubun aynı zamanda çalışmaları sonucu elde edilmiştir¹⁵⁹. Uluslararası komite tarafından rezistin adı; rezistin, FIZZ3, ADSF, RELM, FIZZ1, Retn1, adipofilin adları arasından, insülin direncindeki rolü nedeniyle seçilmiştir. İnsanda rezistinin geninin 19. kromozomda olduğu tespit edilmiştir¹³⁶.

Rezistin, Rezistin like molecules (RELM) denilen bir protein ailesine aittir. Bu ailenin karakteristik özelliği C-terminal ucunda sisteinden zengin bir segment olmasıdır. Bu gruba ait 3 farklı protein RELM- α , RELM- β ve rezistindir. RELM- α 'nın alerjik olaylarla, RELM- β 'nin ise özellikle kolon tümörlerinde tümör oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁶². Rezistin dimer yapılı bir moleküldür ve cys 26 daki bir mutasyon bu proteinin ekspresyonunu monomer hale getirmektedir¹⁶¹. Farelerde rezistin, yağ dokusu miktarı ve adiposit farklılaşmasına bağlı olarak primer beyaz yağ dokusunda eksprese edilir¹⁶³. Akciğer, plasenta ve pankreasın β hücrelerinde daha düşük seviyelerde eksprese edilmiştir¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

Rezistin ekspresyonunu inflamatuvar süreçler, glukokortikoidler ve lipopolisakkaritler artırırken, TNF- α , β -adrenerjik uyarı ve PPAR γ ise azaltmaktadır¹⁶². Rezistin, antidiyabetik bir ilaç olan thiazolidinedionların (TZD) mekanizması araştırılırken bulunmuştur. TZD özellikle yağ hücresinde (3T3-L1 yağ hücresi) belirgin olarak farklılaşma sağlayan, hücre içine yağ asidi alımını artıran, plazma serbest yağ asidi miktarını azaltan ve insüline duyarlılığı artıran antidiyabetik etkili bir ilaçtır. PPAR γ yağ hücresinde bulunan ve en iyi adipojenik determinasyon sağlayan faktördür¹⁶⁷. TZD'lar antidiyabetik etkilerini PPAR γ üzerinden gösterirler. *In vitro* koşullarda 3T3-L1 yağ hücrelerinde rezistin miktarında ve rezistin mRNA'sı ekspresyonunda azalmaya neden oldukları görülmüştür¹⁶⁸. 3T3-L1 yağ hücresi, insülin ile stimüle edildiğinde, glikoz alımı (transportu) belirlenebilen ve ölçülebilen model hücre olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler ile otokrin ve parakrin mekanizmaları açıklayan kültür çalışmaları, rezistin keşfine neden olmuştur¹⁶⁹. 3T3-L1 hücreleri adipogenez sırasında rezistin mRNA'sının indüklenmesiyle rezistin sentezi yaparlar^{167,168}. *In vivo* olarak 3T3-L1 yağ hücresinde rezistin ve rezistin mRNA'sı seviyesinin, TZD uygulamasının down regülasyonu sayesinde azaldığı gösterilmiştir^{168,170}. Adipoz dokudaki rezistin mRNA seviyelerinin azalmasının negatif feedback ile plazma rezistin seviyelerini arttırdığı düşünülmektedir. Diyetle uyarılmış obez hayvan modellerinde, ob/ob ve db/db genotipli obez farelerde serum rezistin seviyelerinin arttığı görülmüştür¹⁷¹. Diğer hayvan modellerinde ise ekspresyonunun ve sekresyonunun azaldığı saptanmıştır¹⁷².

Hipergliseminin rezistin ekspresyonunu uyarıcı etkisi olduğu ve insülinin 3T3-L1 adipositlerde rezistin gen ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür¹⁷³. IGF'nin adipogenezisi uyardığı ve rezistin gen ekspresyonunu azalttığı bilinmektedir¹⁷⁴. Çocuklarda rezistin seviyeleri pubertal gelişimle korelasyon gösterirken, diğer metabolik parametrelerle korelasyon göstermemektedir¹⁷⁵.

Rezistin hayvan modellerinde proinflamatuvar sitokinleri upregüle ettiği ve inflamasyonu uyardığı görülmüştür¹⁷⁶. Tüm bu bulgular rezistin ateroskleroz patogenezinde direkt rolü olduğunu düşündürmektedir¹⁷⁷. TZD tedavisinin insülin direncine neden olan adiposit genlerini down regülasyona uğrattığı gösterilmiştir. Rezistin *in vivo* koşullarda glikoz toleransını bozmaktadır. Diyetle uyarılan obezitede insülin aktivitesinin ve kan şekeri düzeyinin antirezistin antikörlerle düzeldiği görülmüştür. Rezistin insülinin yağ dokusuna glikoz alımını uyarıcı etkisini nötralize ettiği bilinmektedir. Beyaz yağ dokusunda rezistin gen ekspresyonu, kahverengi yağ dokusundan daha fazladır. Meme dokusunda rezistin mRNA'sının ekspresyonu azdır. Bunun nedeninin memenin kendi özel yağ dokusundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Gonadlarda rezistin mRNA'sının ekspresyonu yüksek seviyede iken bu cinsiyete ve depo yağ oranına göre değişmektedir¹⁷⁸.

TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR- α

TNF- α , kaşektin olarak da adlandırılan, 17 kDa ağırlığında bir sitokindir¹⁷⁹. Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF- α , özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere fibroblast, endotel hücreleri, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından sentezlenmektedir¹⁸⁰. TNF- α özellikle lipid metabolizması, koagülasyon, insülin rezistansı ve endotel üzerine etki etmektedir. Bunların yanında apoptozisi indükler, akut inflamasyon sırasında fagositlerin aktivasyonunu ve karaciğerde akut faz reaktanlarının sentezi ve salgılanmasını artırır. Yağ dokusundan trigliseridlerin dolaşıma salınmasını ve iskelet kasında proteinlerin yıkımını artırır, anaerobik glikolizi uyarır ve septik şokun patogenezinde etkilidir³⁹.

Obez kişilerde adipositlerde ve vasküler bağ dokusu hücrelerinde TNF- α reseptörlerinin sentezi artmaktadır¹⁸¹. TNF- α insülinin yağ ve kas dokusu

üzerindeki etkilerini inhibe etmekte ve insüline dirençli hayvanlarda lipit yıkımına neden olmaktadır^{182,183}. TNF- α konsantrasyonu ağırlık kaybı ve antidiyabetik tedavi ile azalmaktadır¹⁸⁴. TNF- α 'nın hipofiz üzerinde de önemli etkileri vardır. Sıçan hipofiz hücrelerinde bazal TSH sekresyonunu etkilemediği fakat TRH stimülasyonuna bağlı TSH sekresyonunu azalttığı görülmüştür¹⁸⁵. Başka bir çalışmada ise intravenöz TNF- α enjeksiyonunun GH sekresyonunu uyardığı, TSH sekresyonunu ise inhibe ettiği görülmüştür¹⁸⁶.

TNF- α için TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere 2 adet reseptör tanımlanmıştır. TNF- α bu reseptörler üzerinden inflamasyon için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlar¹⁸⁷. Tip 2 diyabetiklerde ve diyabetik olmayan kişilerde adipoz doku TNF- α konsantrasyonunun obezite ve insülin direnciyle pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır^{188,189}.

Obez kadınlarda adipoz doku TNF- α ekspresyonu, plazma glikoz, insülin ve trigliserid düzeyleri ile korele bulunmuştur¹⁸⁸. TNF- α , adiponektin seviyelerini azaltarak insülin direnci gelişmesine yol açabilir¹⁹⁰.

Tümör Nekrozis Faktör- α ve Obezite

Birçok çalışmada TNF- α 'nın adipoz dokudan da salındığını gösterilmiştir. Obezitede TNF- α seviyesinin arttığı bilinmektedir. Vücut kitle indeksi ve adipoz doku TNF- α mRNA seviyesi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Kilo kaybı, adipoz dokuda azalmış TNF- α mRNA ekspresyonu ile ilişkilidir. Tümör nekrozis faktör alfa geninin promotor bölgesindeki genetik değişiklikler dokuda TNF- α ekspresyonu ile ilişkilidir^{191,192}.

Tümör Nekrozis Faktör- α ve Ateroskleroz

Aterosklerotik damarlarda aterom plaklarında, makrofaj köpük hücreleri ve düz kas hücrelerinde TNF- α 'nın artmış oranda bulunması ateroskleroz patogeneğinde TNF- α 'nın rolü olduğunu düşündürmektedir¹⁹³. İnsan ve hayvanlardaki aterosklerotik lezyon; makrofaj, düz kas hücresi, T-lenfosit ve mast hücresi gibi çeşitli hücreler içerir. Bu hücrelerin hepsi TNF- α üretir ve TNF- α 'ya yanıt verir. Birçok çalışma TNF- α 'nın aterosklerozun gelişimindeki her aşamaya katıldığını göstermiştir. Adipoz dokuda da üretilen ve obez bireylerde

fazla miktarlarda sentezlenen TNF α , düz kas hücre çoğalmasını ve göçünü artırarak, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırarak aterosklerotik lezyonun ilerlemesine neden olur¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Tümör Nekrozis Faktör- α ve Lipid Metabolizması

Adipositlerin anahtar görevi fizyolojik enerji ihtiyaçlarına göre lipid metabolizmasını düzenlemektir. Yağ asiti alımı, lipoliz ve lipogenezin düzenlendiği çeşitli basamaklar vardır. Bu basamakların her biri insülin, kortizol, katekolaminler, büyüme hormonu, testosteron, serbest yağ asitleri (SYA) ve sitokinler gibi çeşitli uyarılara farklı yanıtlar verirler. TNF- α 'nın lipid metabolizmasında düzenleyici rolü olduğunu gösteren çeşitli kanıtlar vardır. Adipositlerde yağ asitleri, dolaşımdaki yağ asitlerinden, hücre içi lipolizden ve glukoz yıkımından elde edilir. Yağ asiti alımı lipoprotein lipaz tarafından hızlandırılır. TNF- α 'nın lipoprotein lipaz aktivitesini ve ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca TNF- α , serbest yağ asidi (SYA) taşıyıcılarının adipoz dokuda ekspresyonunu azaltır. Dolaşımdan SYA'nın alımının azalması obezitedeki hiperlipideminin bir nedenidir¹⁹⁴.

Tümör Nekrozis Faktör- α ve insülin Direnci

Tip II diyabetik hastaların %80'inin obez olduğu ve obezite hiperglisemi olsun ya da olmasın insülin direnci ile ilişkili olduğundan, obezite ve insülin direnci arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu ilişkide en fazla tanımlanan faktör TNF- α 'dır. TNF- α , adiponektinin etkisini antagonize ederek ve insülin reseptöründeki tirozin kinazı baskılayarak insülin direncine neden olur¹⁹⁵.

İTERLÖKİN-6

IL-6, 21-28 kD ağırlığında tek bir protein zincirinden oluşan, 212 aminoasit içeren O- ve N- glikolizasyon ve fosforilasyon bölgeleri içeren bir polipeptiddir. Çok yönlü işleve sahip bir sitokin olarak hematopoezi, akut faz reaktanlarını, immün yanıtı düzenler ve konağın savunma mekanizmasında merkezi bir rol oynar. İnsan IL-6 geni 7.P²¹ kromozomunda bulunur. IL-6; T ve B lenfositleri, monosit, fibroblast, keratinosit, endotelial, mezengial, kemik iliği stroma hücreleri, astrositler ve çeşitli tümör hücreleri tarafından üretilir. Normal

koşullar altında hücrelerden salgılanmaz. Viral enfeksiyonlar, lipopolisakkaritler ve çeşitli sitokinlerin uyarısı ile salgılanır. Travma, inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve çeşitli malignitelerde serum düzeyleri artar¹⁹⁷.

IL-6 hedef hücre yüzeyindeki özgül reseptörüne (IL-6R) bağlanır. IL-6R hemopoietin ailesinin bir üyesidir. İki işlevsel zincir içerir. 80 kD ağırlığındaki bir zincir IL-6 bağlayıcı molekül veya gp80 (glikoprotein 80) olarak IL-6'ya özgül olarak bağlanır. Diğer işlevsel zincir 130 kD ağırlığında gp130 sinyal iletici zincirdir¹⁹⁸.

IL-6, IL-6R bağlanarak hücre içine sinyal taşıyıcı protein gp130 ile mesajları iletir, bunun sonucunda ras/MAP kinase ve JAK/STAT sinyal yollarını uyarır, aktive STAT ve ras-MAPK yolları plazma hücre proliferasyonu için gereklidir¹⁹⁹. IL-6 karaciğerde akut faz reaktanlarının, özellikle de CRP ve fibrinojenin sentezini indükler²⁰⁰. Ayrıca T lenfositlerinde IL-10 üretimi de IL-6 tarafından indüklenmektedir²⁰¹. IL-6, TNF- α ve leptine benzer şekilde aromataz aktivitesini indüksiyonu yoluyla estrogen biyosentezini stimüle eder²⁰².

IL-6, çözünür IL-6 reseptörlerine bağlanarak osteoklastları aktive eder ve kemik rezorpsiyonuna neden olur. Bu anlamda IL-6, osteoporoz ve romatoid artrit patogenezinde önemli bir sitokin haline gelmiştir²⁰³.

IL-6 hipofize etki ederek ACTH salınımını indükler ve ayrıca direkt olarak adrenal bezlere etki ederek glukokortikoid üretimine neden olur¹⁸⁷.

IL-6, leptin gibi, yağ dokusu hücrelerinden salgılanan adipokinler arasında yer alır. Sekresyonu, yağ hücresi artışı ile birlikte artar. Dolaşımdaki IL-6 konsantrasyonu vücut yağ yüzdesi ile koreledir. Yağ dokusu hücre tiplerinden IL-6 sekresyonunun ne şekilde düzenlendiği henüz belirlenmemiştir. Buna rağmen, humoral (insülin, glukokortikoidler), nöral (sempatik sinir sistemi aktivitesi) ve parakrin (IL-1 β , TNF α) sinyallerin hepsinin yağ dokusundan IL-6 üretimini düzenlediği gösterilmiştir. IL-6, pek çok doku üzerine hormonal etkileri olan bir sitokindir. Endotelyum, obezitenin metabolik etkilerine katkısı açısından bunların en anlamlısı olarak düşünülmektedir²⁰⁴.

Viseral yağ dokusundaki IL-6 konsantrasyonu derialtı yağ dokusundaki IL-6 konsantrasyonundan yüksektir²⁰⁵. Yüksek IL-6 düzeyleri koroner arter

hastalığı ve ateroskleroz ile ilişkilidir. IL-6'nın endotelial adezyon moleküllerinin salınmasını arttırdığı gözlenmiştir^{206,207}. IL-6 reseptörlerinin hipotalamusta da bulunduğu ve ön hipofiz hormonlarının salınmasını uyarıcı etki gösterdiği bildirilmiştir²⁰⁸. Obez kişilerde plazma IL-6 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir²⁰⁹. IL-6'nın lipoliz ve yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı, plazma düzeylerinin insülin direnciyle korelasyon gösterdiği bulunmuştur²¹⁰.

SEKS HORMONLARI

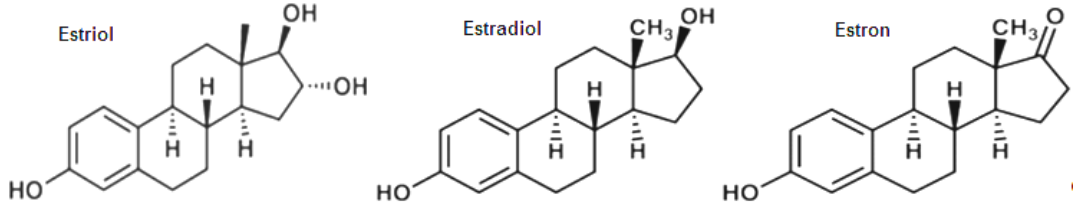
Bütün steroidlerin öncülü olan kolesterol dolaşımdaki lipoproteinlerden sağlanabileceği gibi endojen olarak asetattan da sentezlenebilir. Tüm steroidlerin sentezi için ön madde asetattır²¹¹. Kolesterolün yan zincirin kırılması ve oksidasyonu sonucu pregnenolon oluşur. Pregnenolondan da diğer steroidler üretilir. Steroid hormonların biyosentezinde kolesterolün pregnenolona dönüşmesi hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur. Kolesterolün steroid hormonlara dönüşebilmesi için mitokondri ve endoplazmik retikulumda bir dizi enzimatik modifikasyondan geçmesi gerekir. Bu enzimlerin çoğu sitokrom P-450 oksidazlar grubundandır. Steroid hormon sentezi için en az 6 ayrı P-450 enzimi gerekmektedir²¹².

Klinik ve deneysel çalışmalar seks steroidlerinin (estrojen, testosteron ve progesteron) adipoz dokunun fonksiyonları ve dağılımı üzerine etkisi olduğunu göstermiştir. Bu yağ dağılımı dişi ve erkeklerde farklılıklar gösterir ve seks hormonları bu dağılımda belirgin rol oynar¹⁹.

Seks hormonlarının bu etkileri estrojen reseptör α (ER α), estrojen reseptör β (ER β), G proteini ile ilişkili estrojen reseptörü (GPER), progesteron reseptör A (PRA), progesteron reseptör B (PRB), androjen ve testosteron reseptörleri olmak üzere kendilerine ait reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptörlerin varlığı dişi ve erkek her iki cinsin subkütanöz ve viseral adipoz dokusunda gösterilmiştir¹⁹. Seks steroid hormonların adipoz doku üzerindeki etkilerini lipid metabolizması, adipokin sekresyonu, sinyal proteinleri ve reseptör ekspresyonunu içermektedir ve bu etkileri genomik (transkripsiyonel) ve nongenomik mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkmaktadır^{213,214}.

ESTROJENLER

Doğal estrojenlerin başlıcaları estradiol, estron ve estrioldur (şekil 6). Kadınlarda estrojenik etkiden asıl sorumlu ana estrojen hormon estradiol (estradiol 17 β)'dür. 18 karbonlu bir steroiddir ve A halkası aromatik (fenolik) niteliktedir; 3 numaralı karbondan bir -OH grubu ve 17 numaralı karbondan bir β -OH grubu içerir.



Şekil 6:Estriol, estradiol ve estronun yapısı²¹⁵.

Estradiol, gravimetrik etki gücü en yüksek olan doğal estrojendir. Vücutta kısmen estron'a dönüşür. Bu bileşikler estron veya diğer adıyla 19-norandrostan diye bilinen 18 karbonlu bir iskelete sahiptir²¹⁶.

Estrojenler diğer steroid hormonlara oranla çok daha etkin bileşiklerdir, ufak miktarlarda da etki oluşturabilirler. Bir günde sentez edilen ve salgılanan estriol miktarı 0,5 mg'dan azdır, diğer steroid hormonların günlük salgılanan miktarları ise çok daha yüksektir. Şöyle ki; estradiolün günlük salgılanan miktarı, salgılanma hızının en yüksek olduğu siklus ortası dönemde günde 25-100 μ g ve luteal dönemdeki maksimum değeri günde 10-80 μ g'dır. Salgılanmanın siklik özellik göstermesi nedeniyle, plazmadaki estradiol konsantrasyonu da buna uygun olarak değişir. Menstrüel siklusun ilk günlerinde plazma estradiol düzeyi 6 ng/dl kadardır. Ovulasyondan önceki yükselme sırasında bu değer 33-70 ng/dl'ye ulaşır. Estron salgılanması genel olarak estradiolunkine yakın bir hızda olur. Erkeklerde estrojen düzeyi, kadınlarda yükselmeler dışında kalan zamanlardaki taban düzeye yaklaşık olarak eşittir²¹⁶.

Estrojenlerin Sentezi

Dişi cinste estrojenlerin büyük kısmı, özel durumlar hariç overlerde graaf folikülünde sentez edilirler, sentez yeri graaf folikülünün granüloza hücreleridir.

Overlerdeki sentezde estrojenlerin prekürsörleri, teka hücrelerinde yapıp granüloza hücrelerine sunulan androjenik maddelerdir. Şöyle ki androstenedion overlerde estrona ve kısmen de testosterona dönüştürülür. Testosteron ise dimetilasyon ve aromatisasyon sonucu estradiol'a çevrilir.

Estrojen sentezi;

1) Plasentanın sinsiyotrofoblast hücreleri gebelik sırasında çok yüksek miktarda estrojen ve progesteron sentez eder ve salgılar. Bu hücreler aromataz enziminden zengindir. Ancak plasenta sentezin ön basamaklarını oluşturmak için gerekli enzim sistemine sahip değildir. Bu nedenle estrojen sentezi için gereken estrojen prekürsörlerinin çoğunu fetusun adrenal korteksinden sağlar. Böylece gebelikte estrojen sentez eden bir fötoplental sistem oluşur. Annenin idrarla çıkardığı günlük estriol miktarının izlenmesi, gebeliğin sonuna doğru fetusun sağlık durumunu izlemekte kullanılan bir yaklaşımdır. Plasentada progesteron, annenin kan dolaşımı içinde gelen prekürsör pregnenolon'dan sentez edilir. Progesteron gebeliğin sürdürülmesi için gerekli bir hormondur.

2) Adrenal korteksinde dehidroepiandrosteronun dehidrojenasyonu sonucu oluşan androstenedion kısmen estron'a ve o da estradiol'a dönüştürülür. Postmenapozal dönemdeki kadınlarda veya overektomi yapılmış olanlarda varolan estrojenin az bir kısmı adrenal kortekste sentez edilen estrojenlerdir. Büyük kısmı ise adrenallerden salgılanan androstenedionun over dışı yapılarda dönüşümünden oluşan estrojenlerdir.

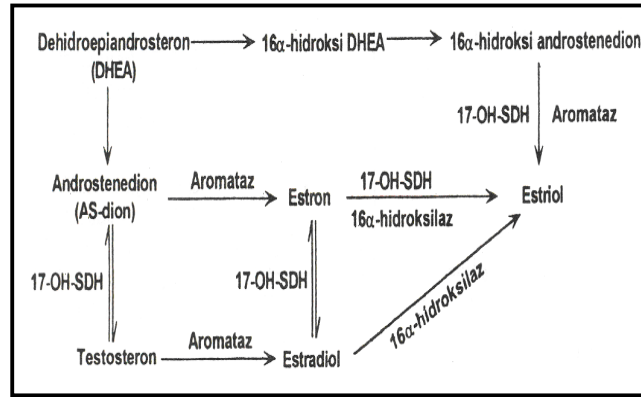
3) Testislerde, leydig hücreleri, testosteron yanında, testosteron'dan ve androstenedion'dan az miktarda oluşan estrojenleri de salgırlar.

4) Başta yağ dokusu olmak üzere çeşitli dokular (karaciğer, böbrek, akciğerler, cilt, beyin, çizgili kaslar vb) kadınlarda büyük kısmı adrenal korteksinden kan dolaşımına dökülen androstenedion ve testosterondan estron ve estradiol sentez ederler²¹⁶.

Premenapozal dönemde vücutta oluşan estronun yaklaşık % 25'i over dışı kaynaktan, %75'i ise overlerden gelir. Postmenapozal kadınlarda ise

estrojenin ana kaynağı adrenal korteksinden salgılanan androstenediondan oluşan estrondur.

Androstenediondan estron ve testosterondan estradiol oluşumu aromataz enzimi tarafından katalize edilir ve steroid içindeki A halkası aromatik (üç çift bağlı) duruma getirilir. Aromataz enzimi, over ve plasenta dışında, implante olmamış blastokistte, kadınlarda yağ dokusunun stroma hücrelerinde, erkeklerde Leydig ve Sertoli hücrelerinde ve hem erkeklerde hem de kadınlarda karaciğer, cilt, çizgili kaslar ve beynin çeşitli bölgelerinde bulunur (şekil 7).



Şekil 7: Estrojen Sentezi²¹⁶.

Dağılım ve Metabolizma

Estrojen, plazmada albümine ve seks hormonu bağlayan globulin (SHBG) adı verilen bir beta-globuline büyük ölçüde bağlanırlar. Estadiolün yaklaşık %70'den fazlası bağlı durumdadır. SHBG karaciğerde yapılır ve sentezi estrojenler tarafından artırılır, artma sentez yapan enzimlerin indüksiyonu sonucu meydana gelir. SHBG erkeklerde testosteronu da bağlar ve testosterona karşı afinitesi estradiole göre daha fazladır. Bu nedenle SHBG'e testosteron bağlayan globulin (TBG) adı da verilir. Estrojenler SHBG'e yüksek oranda bağlanırken albumine gevşek bir şekilde bağlanırlar. Ancak albumin SHBG'e göre daha yüksek kapasiteli bir bağlanma yeridir²¹⁶.

Estradiol ve estron karaciğer hücrelerinde iki yönlü bir reaksiyonla birbirlerine dönüştürülürler (interkonversiyon). Estradiol'un estrona dönüşümünü katalizleyen enzim 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimidir. Estron ve estradiolün karaciğer ve diğer bazı dokularda oluşan ilk ve en önemli metaboliti

estrioldür, bu dönüşümün enzimi 16 α -hidroksilaz enzimi ile 16 α -hidroksi estron üzerinden olur. Estradiol ve estronun estriol'e dönüşümü bunların estrojenik etkinliğini önemli ölçüde azaltır. Estriol'un parsiyel agonist etkisi vardır. Güçlü estrojenik etkinlik gösteren estradiol ile birlikte verildiğinde, estrojene duyarlı bazı yapılarda ki estrojen reseptörleri estriol tarafından bloke edildiğinden estriolün etkinliği azalır. O halde estriol anti-estrojenik etkinlik de gösterebilir. Vajina ve servikste estriol, estradiolün etkisini önlemez.

Estradiol, estron ve bunlardan oluşan estriol, karaciğerde sülfirik asid ve glukronik asid ile konjüge edilerek inaktif duruma getirilirler. Bu konjugatların bir kısmı safra içinde itrah edilir, fakat safra içinde ince barsağa gelen konjugatlar enterohepatik siklusa girerler²¹⁶.

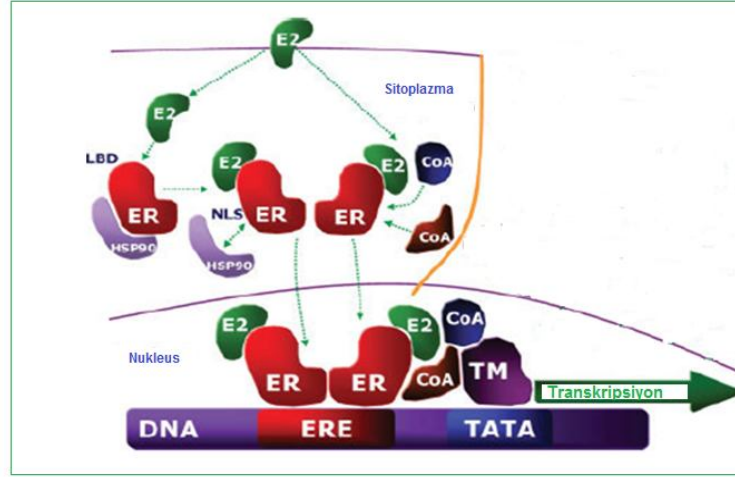
Estrojen Reseptörleri

Estrojen reseptörleri nükleer reseptör süperfamilyasının üyesidir. 17 β -estradiol (E₂) ER α / β 'ya bağlanan asıl ligandır. E₂ gonadlar ve adrenal korteks yoluyla kan dolaşımına sekrete edilir. ER yoluyla çeşitli dokuların diferansiyasyon ve proliferasyonu, üreme fonksiyonları seksüel davranışlar ve gelişiminde belirgin rol oynar. Örneğin E₂/E α etkileşimi, E₂ ile indüklenen meme ve uterin dokunun proliferasyonundan sorumludur²¹⁷.

ER'lerinin karakteri 1960'larda ortaya konmuştur. Bundan sonra insan ER cDNA başarılı bir şekilde klonlanmıştır²¹⁸. Klasik estrojen reseptörü olarak ER α tanımlanmış iken, 1990'larda sıçan prostatında ikinci olarak ER β reseptörü bulunmuştur²¹⁹. Ayrıca estrojenin hızlı etkilerine transmembranal bir reseptörün aracılık ettiği bulunmuş ve bu yeni membranal estrojen reseptörü G-protein kenetli reseptör 30 olarak tanımlanmıştır (GPER veya GPR30)³⁵⁹.

ER'leri ligand ile indüklenen transkripsiyon faktörleri olarak kabul edilmektedir. Lipofilik estrojen hücre membranını serbest olarak geçer ve ER'lerine bağlanır ve reseptörlerde konformasyonel değişikliğe yol açar ve estrojen-ER komplekslerinin nükleer translokasyon ve homo/heterodimerizasyonuna izin verir (şekil 8). Bunlar hedef genlerin promotör bölgesi üzerindeki estrojen yanıt elementine bağlanırlar (ERE)²¹⁸. Estrojen yanıt

elementinin promotör bölgesinde SP1 veya aktivatör protein 1 (AP1) ile protein-protein etkileşimi yoluyla direkt veya indirekt bağlanırlar. Böylece transkripsiyon mekanizması ile etkileşimi yoluyla gen ekspresyonu düzenlenir, mRNA seviyelerinde artış veya azalma ve ilişkili protein üretimi ve fizyolojik yanıtlarla sonuçlanır²²⁰.



Şekil 8. Estrojen etki modeli²¹⁸.

Estrojen reseptör- α , 6 nolu kromozomun uzun kolunda ki bir genden 8 ekzon içeren 6.8 kilobazlık mRNA'dan dönüştürülür. Yaklaşık 66.000 moleküler ağırlığına sahip ve 595 aminoasidlidir. Alfa reseptörün yarı ömrü yaklaşık 4-7 saattir. Estrojen reseptör-alfa hızlı dönüşümü olan bir proteindir. Daha yakın zamanda keşfedilen estrojen reseptör-beta kromozom 14, q22-q24'de lokalize bir gen tarafından kodlanır²²¹.

Estrojen reseptörleri A'dan F'ye kadar adlandırılan 6 bölge ve 5 alana ayrılır. ER β , DNA bağlanma alanında ER α ile aminoasid dizilişi açısından %97 benzerlik gösterir. Hormon bağlanma alanında ise %59 benzerlik gösterir. Estrojen reseptörleri değişik dokularda farklılıklar gösterir. Örneğin; ER β beyin belirli bölgelerinde ve kardiyovasküler sistemde hakim olan estrojen reseptörüdür. Spesifik estrojenlere farklı ve selektif cevaplar verir. Over folikülündeki granüloza hücrelerindeki estrojen reseptörleri sadece ER β mRNA'sı içerir. İnsan akciğeri her iki reseptörü de içerir. Alfa ya da beta estrojen reseptörüne bağlanan aynı estrojen zıt etkilere neden olabilir. Örneğin;

estradiol ER α ile gen transkripsiyonunu stimüle ederken aynı sistemde ER β ile gen transkripsiyonunu inhibe eder²²¹.

Steroid hormonların genomik etkileri bir saat veya daha uzun süren kısmen yavaş oluşan bir cevapla karakterizedir. Fakat bazı steroid hormon etkileri birkaç dakika gibi kısa sürede meydana gelir ve bu hızlı cevabın oluşmasında nongenomik mekanizmalar etkili olmaktadır. Bu hızlı cevaplar aynı zamanda gen transkripsiyon ve protein sentez inhibitörlerinden etkilenmezler. Hızlı cevaplar bütün steroid hormonlar için bildirilmiştir ve membrandan sodyum ve kalsiyum transportunu içermektedir. Pek çok steroid hormon için spesifik hücre membran reseptörleri tanımlanmıştır. Fakat bu bağlanma bölgeleri ile ilgili fizyolojik rolleri tanımlamak güç olmaktadır²²¹. Bu nongenomik etkiler estrogen bağlayıcı protein ile ilişkili non-ER plazma membranı yoluyla veya plazma membranı bitişiğinde veya ER lokalizasyonu yoluyla ortaya çıkar²²⁰.

Estrojenlerin Etkileri

Estrojenin Seks Karakteristikleri ve Genital Kanal Üzerine Fizyolojik etkileri

Estrojen kadınlarda memelerin büyümesi, kalça ve uyluklarda yağ toplanması ve kadınsal davranışların ve libido artışını sağlar. Estrojen pubertede uterusun büyümesini, menstrüel siklusun ilk yarısında endometriyum hücrelerinde proliferasyonu ve uterus kontraktilesini artırır, vajinada epitelin kalınlaşmasını ve keratinizasyonunu sağlarlar, hücrelerin glikojen içeriğini ve vajina ortamını asitleştirir, vaskülaritesini artırır. Uzun kemiklerde epifiz plaklarının kapanarak uzamanın durdurulması, aksiler ve pubik bölgelerde kıllanma ve belirli bölgelerde cilt pigmentasyonunun gelişmesinden de sorumludur²¹⁶.

Estrojenlerin Kemik Üzerine Etkileri

Estrojenler, kemik matriksinin normal şekilde sürdürülebilmesi ve matrikste Ca²⁺ çökmesi için gereklidirler ve kemikte Ca²⁺ rezorbsiyonunu inhibe ederler. Paratiroid hormonun kemiklerde etkisini antagonize ederek kemik

rezorpsiyon hızını azaltır²²². Ayrıca hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda osteoblast diferansiyasyonunu artırdığı gösterilmiştir⁹.

Estrojenlerin Metabolizma Üzerine Etkileri

Estrojenler HDL ve VLDL sentezini artırırken LDL sentezini inhibe eder, total kolesterol düzeyini düşürür, safranin kolesterol içeriğini, protein sentezini, koagülasyon faktörlerinin sentezini artırır (II, VII, IX, X). Ayrıca su ve tuz emilimini artırır. Estrojenler antitrombin III sentezini azaltırlar. Estrojenlerin enerji dengesinde ve glukoz homestazında yer aldığı son zamanlarda bilinmektedir. Fakat hangi reseptörler ve hangi mekanizmalar aracılığıyla yaptığı tam olarak açığa çıkmamıştır. ER α , iskelet kası, adipoz doku, karaciğerde insülin duyarlılığını ve aynı zamanda pankreas β hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlemektedir²²³. Viseral obezite menapozdan önce kadınlarda çok sık karşılaşılan bir durum değildir. Menapozla birlikte viseral adipoziteye meyil ve bununla birlikte vasküler riskte artış ortaya çıkmaktadır. Mekanizma tam olarak ortaya konmamıştır. Estrojenlerin gluteofemoral bölgede lipoprotein lipaz aktivitesini artırdığı bilinmektedir²²⁴.

Kardiyovasküler Sistem

Kardiyovasküler sistem estrojen için önemli bir hedeftir²²⁵. Koroner arterlerdeki estrojene bağlı vazodilatasyonun kısmen nongenomik kalsiyum akış mekanizmasına bağlı olduğu düşünülmektedir²²¹. Kalp hastalıkları riski erkeklerde yaşla birlikte artarken, premenapozal kadınlarda bu risk düşük menapozla birlikte hızlı bir artış gösterir²²⁶. Postmenapozal dönemde estrojen replasmanı alan kadında kardiyovasküler mortalite almayan kadınlara göre %30-50 daha düşüktür. Estrojenin kardiyovasküler koruyucu etkilerinin, lipid profilindeki antiaterojenik etkisine ve arter duvarı ve endoteldeki direkt etkisine bağlı olduğunu göstermiştir^{227,228}. Estrojen replasman tedavisi düşük dansiteli lipoprotein (DDL) düzeyini azaltırken, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyini artırır. Ayrıca arter duvarında kolesterol depolanmasını ve aterosklerotik plak oluşmasını önlediği gösterilmiştir^{228,229}.

Nitrik oksidin (NO), ateroskleroz gelişimini damarlarda gevşemeye neden olarak ve endotelde monosit adezyonuna engel olarak önlediği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda estrogenin vasküler tonus üzerine olan etkisini endotelde NOS-3 aktivitesini kontrol ederek gösterdiği öne sürülmektedir. 17 β -estradiolün NOS-3 aktivitesini reseptöre bağlı mekanizma ile arttırmaktadır. Aynı zamanda 17 β -estradiol, NOS-3 üzerinde Ca²⁺/kalmodulin sistemini etkileyerek de etki gösterebilir²²⁸. Uzun süre estrojene maruz kalmanın neointimal ve vasküler düz kaslardaki proliferasyonu azalttığı, hem in vivo hemde in vitro olarak arterleri remodelize ettiği gösterilmiştir. Arterlerin uzun süre estrogenlere maruz kalmasının kasıcı ajanlara karşı oluşan cevabı azaltırken, gevşetici ajanlara karşı oluşan cevabı artırdığı bildirmektedir. Estrogenin bu etkisi, bazal veya agonistle stimüle edilen endotelden salgılanan gevşetici faktörler (NO gibi), prostasiklin ve henüz tanımlanmamış gevşetici mediyatörlerle ilişkisi olabilir. Estrogen endotelial fonksiyonlara etkilerinin yanı sıra, vasküler düz kaslarda intrasellüler sinyal yollarını değiştirebilir ve böylece kasıcı ajanlara karşı oluşan vasküler cevap verilebilirliği azaltır. Estrogenin vasküler duvardaki uzun süreli etkilerinin endotel ve düz kaslardaki estrogen reseptörlerinin aktivasyonuna ve sonuç olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Estrojene uzun süre maruziyet vasküler endotelde endotelial NO-sentaz gen ekspresyonunu upregüle eder ve vasküler düz kasta fosfoinositid turnoverini ve inozitol trifosfat oluşumunu azaltır. Bu da nörotransmitter ve humoral faktörlere karşı uzun süre estrogenle indüklenen vasküler duyarlılıktan sorumludur.

Estrogen vasküler tonusta direkt ve akut etkiler sahiptir. Estrogenin arterleri hem endotele bağımlı ve hem de endotelden bağımsız mekanizmalarla gevşettiği bildirilmiştir. Endotelden bağımsız estrogenle indüklenen gevşeme genellikle Ca²⁺ kanallarının blokajına, Ca²⁺ influksunun inhibisyonuna ve dokudaki cAMP, cGMP düzeylerindeki değişime bağlıdır, oysa estrogenle indüklenen endotele bağımlı gevşemenin vasküler endotelden NO oluşumunun stimülasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir²³⁰.

Santral Sinir sistemi

Estrojen, beynin çeşitli bölgelerindeki nöron membranlarında bulunan estrojen reseptörlerini [ER α (ER1) ve ER β (ER2)] doğrudan etkileyerek beyin işlevleri üzerinde etkili olmaktadır. Estrojenin nöroprotektif ve nörotrofik etkileri vardır. Estrojenin nöronları oksidatif strese, iskemiye, hipoglisemiye ve Alzheimer hastalığı patogeneğinde rolü olan amiloid proteine karşı koruyucu etkisi vardır. Sinir büyüme faktörleri oluşumunu uyarır ve bu nedenle, nöron gelişimini ve yaşamını artırır, hasarlı nöronları onarır ve dendrit dallanmasını artırır. Estrojen, sinapslarda serotonin, dopamin ve noradrenalin yoğunluğunu, salınmalarını, gerialımlarını ve enzimatik inaktivasyonlarını etkiler ve reseptör sayılarını artırır. Estrojen, kan damarları endotelyumundaki reseptörlerine bağlanarak nitrik oksit salınmasını uyarır ve vazodilatasyona neden olarak serebral perfüzyonu artırır. Ayrıca, estrojen antiinflamatuvar etkiyle kan damarlarını sitokinlerin ve serbest radikallerin zararından koruyarak ve plak oluşumunu engelleyerek serebral kan akımını güçlendirir²³¹. Seks steroidleri beyin hücreleri üzerine güçlü anksiyolitik etkilidir²³². Bu etki GABA-A reseptörlerin direkt nongenomik düzenlenmesi üzerine büyük ölçüde bağımlıdır²³³. Hipofiz hücrelerinde GABA-A reseptörleri progesteron tarafından da kullanılır²³⁴. Seks steroidleri beyinde protein kinaz kaskadını düzenler. Nöroblastoma hücrelerinde E₂, MAPK'ları aktive eder. Bu etki klasik nükleer mekanizmaların etkisinden bağımsızdır, fakat ICI 182,780 veya tamoksifen tarafından bloke edilmez²³⁵.

Estrojen ve Bilişsel İşlev

Sağlıklı yaşlı kadınlarda da, beyin volümü perimenopozal dönemde estrojen seviyelerinin düşmesiyle birlikte azalmaya başlar. Atrofi, özellikle bellek ve bilişsel işlevle ilişkili beyin bölgeleri olan hipokampus ve parietal lobda görülür. Erkeklerde beyin volümündeki benzer bir kayıp belirli bir dekada kadar (60'lı yaşlar) başlamaz. Bunun nedeni erkek seks hormonları oluşumunun yaşla birlikte daha tedrici olarak azalmasıdır. Testosteronun estrojene aromatisasyonundan dolayı, 60 yaşın üzerindeki erkekler aynı yaştaki kadınlara göre, yaklaşık 3 kat daha fazla dolaşan estradiole sahiptir²³⁶.

Kadınlardaki bu serebral değişimler, perimenopozal dönemde sözel bellek sorunlarına neden olur. Bilişsel işlev kaybı, endojen estrogen yetersizliği ile ilişkili olabilir. Bir osteoporoz çalışmasında, düşük kemik yoğunluğu gösteren kadın grubunda daha sık demans belirtileri görülmüştür. Doğal menopoza giren kadınların menopozdan 5 yıl kadar sonra bellek bozukluğu gösterme olasılığına karşın, ooforektomi geçiren premenopozal kadınlar, ani ve şiddetli estrogen düşüşüne bağlı olarak, ameliyattan 2 ay gibi kısa bir süre sonra ERT ile geri dönebilen bilişsel işlev bozuklukları gösterirler²³⁷.

Estrogen ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Klinik ve deneysel veriler estrogenin nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. İnme, Parkinson hastalığı ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıklarda koruyucu özelliğinin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir²²⁰.

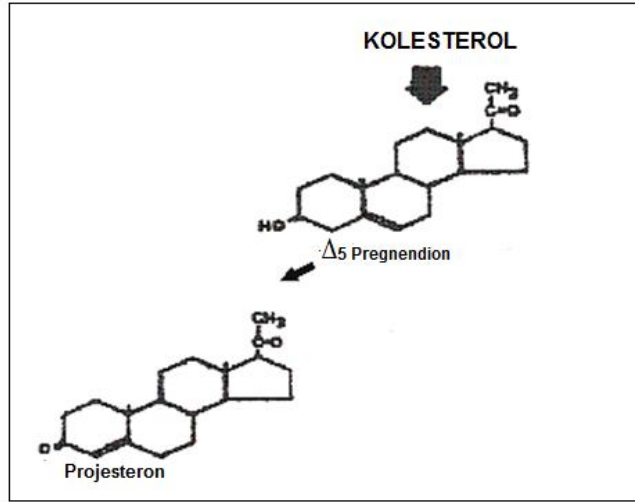
Estrogen ve Kanser

Meme epitelinin estrojene kümülatif maruziyeti meme kanserine risk oluşturmaktadır. Bu ilişkiyi açıklayan iki hipotez vardır. Birincisi; estrogen reseptörlerine bağlanan estrogenin meme hücrelerinde proliferasyonu stimüle etmesi, doku içinde hedef hücre sayısını artırmasıdır. Bu, hücre bölünmesindeki artış ve DNA sentezinin artışı replikasyon hatası için risk oluşturur ve zararlı mutasyonların oluşmasıyla sonuçlanır. Normal hücresel süreç bozulur, örneğın apoptozis, hücresel proliferasyon ve DNA tamiri gibi. İkinci hipotez; estrogen metabolizması ürünleri yoluyla genotoksiklerin üretimine yol açar, direkt DNA hasarı, tekrarında nokta mutasyonu oluşur. Estrogen her iki mekanizma ile meme kanserinin artışını ve/veya başlamasını etkileyebilir. Ayrıca over, endometrium ve prostat kanserlerinin gelişiminde de rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır²²⁰.

PROGESTERONLAR

Progesteron ve onun gibi etki yapan ilaçlara progestinler veya progestogenler denir. Progesteron esas olarak menstruel siklusun ikinci yarısında korpus luteumdan salgılanır. Progesteron steroid prekürsörlerinden oluşumu over, testis, adrenal korteks ve plasentada gerçekleşir (şekil 9). Korpus luteumda progesteronun sentez ve sekresyonuna LH'in etkisi, G proteinine

bağlı membran reseptör sinyal iletim yolu ile gerçekleşir. Bu da adenilat siklaz stimülasyonu aracılığı ile cAMP oluşumunu artırır.



Şekil 9: Progesteron sentezi²¹⁶.

Progesteron, menstrüel siklusun ilk yarısında folikülden az miktarda salgılanır, ovülasyondan sonra folikülün korpus luteum'a dönüşmesiyle salgılanması artar. Daha az miktarda olmak üzere steroid hormon sentezi yapılan diğer yerlerden (adrenal korteks ve testislerden) de salgılanır. Yirmibir karbonlu bir steroiddir.

Progesteron esas olarak overlerden ve siklik bir şekilde salgılanır. Overlerin progesteron salgısı menstrüel siklusun ikinci yarısında (luteal dönemde) artar. Bu dönemde korpus luteumun teka interna ve diğer hücreleri progesteron salgırlar. Daha az miktarda olmak üzere testisler ve adrenal korteksinden de salgılanır. Bu sayılan üç yerde progesteron, kolesterolden oluşan pregnenolondan sentez edilir. Sentez edilen progesteronun bir kısmı salgılanır, kalan kısmı hücrelerde yerine göre estrogenlere, testosterona veya kortikosteroidlere dönüştürülür. Progesteron bu sayılan hormonların hepsinin prekürsörüdür.

Estrojenlerle birlikte kendine has etkileri meydana getirir. Estrojenler, progesteronun etkilerini artırırken progesteron, estrogenlerin etkilerini artırmaz, bazen azaltır. Gebelerde 7. haftadan itibaren plasenta tarafından giderek artan bir hızda progesteron salgılanır. Gebeliğin son üç ayında placentadan bir günde

salgılanan progesteron miktarı 200-300 mg'a çıkar. Bu miktar menstrüel siklusun luteal döneminde overlerden salgılanan miktara (günde yaklaşık 24 mg) göre oldukça yüksektir. Siklusun foliküler döneminde overlerden çok az (günde 1.5 mg) salgılanır. Gebeliğin ilk üç ayından sonra insanda overlerin veya korpus luteumun çıkarılması gebeliğin sürdürülmesini etkilemez. Bu yapılar daha önce çıkarıldığında ise progesteron eksikliği nedeniyle düşük olur²¹⁵. Özellikle gebeliğin ilk 8 hafta boyunca sürdürülmesi için progesteron gereklidir.

Progesteron Reseptörleri

Progesteron reseptörü (PR) transkripsiyonel düzeyde estrogenlerle indüklenir ve progestinlerle hem transkripsiyonel hem de translasyonel (çevrim) düzeylerde (olasılıkla reseptör fosforilasyonu ile) azaltılır²³⁸. PR'nin A ve B olmak üzere iki formu bilinir. Homo ve heterodimerler (AA, BB, AB) doğal progesteron ligandları ile aktive olurlar. A ve B PR'ü farklı genleri etkilerler ve farklı moleküler fonksiyonlara sahiptirler, bu nedenle progesterona hedef doku yanıtı her reseptörün farklı ekspresyonundan ve bunların konsantrasyonlarının oranından, ayrıca hedef dokudaki uyarlayıcı protein içeriğinden etkilenecektir^{239,240}. PRA ve PRB'nin fonksiyonu organlar arasında farklılık gösterir (uterus ve meme gibi). Progesteronun memede normal proliferatif etkisi için PRB gerekli iken uterusuda içeren genital sistemde progesteronun etkisi için PRA gereklidir²⁴¹. PRA, PRB tarafından indüklenen uterin ve meme bezi hiperplazisine karşı koruyucudur²⁴².

Dağılım ve Metabolizma

Progesteron karaciğerde önemli ölçüde ilk geçiş eliminasyonuna uğradığı için oral dozu paranteral dozundan yüksektir. Progesteron plazmada bir transport proteini olan transkortine kısmen bağlanmış olarak bulunur. Progesteron karaciğerde ve incebarsak mukozasında hızlı bir şekilde metabolize edilir. Oral biyoyararlanımı yaklaşık olarak %25'dir. Eliminasyon yarılanma ömrü 15-95 dakika arasında değişir. Başlıca metaboliti pregnandiol (5 β -pregnandiol)'dür. Diğer metabolitleri 5 α -pregnandion ve 20 α -dihidroprogesterondur. Bunlar zayıf progesteron benzeri etkinlik gösterirler. Pregnandiol glukuronik asid ile konjuge edilir ve bu şekilde böbrekten idrara

itrah edilir. Progesteron fazla lipofilik bir hormon olduğundan kısmen yağ dokusunda depo edilir. Vücutta progesteron sentez hızının ölçüsü idrarla çıkarılan pregnandiol miktarıdır. Vücutta salıverilen progesteronun %25-30 kadarlık bir kısmı idrarda pregnandiol şeklinde çıkar²⁴³.

Progesteron Etkileri

Progesteronun Over ve Uterus Üzerine Etkileri

Ovülasyondan sonra oluşan korpus luteuma paralel olarak progesteron salgılanması artar. Siklusun ikinci yarısında salgılanan progesteron, endometriyumda mitotik etkinliği baskılar ve kalınlaşmayı durdurur. Zigot oluşmuşsa, progesteron T lenfositlerini inhibe ederek implantasyon yerinde zigota ve ileride ondan oluşan embriyoya karşı immünolojik red reaksiyonunu önler. Vajinada epitelin kalınlaşmasını ve keratinizasyonunu sağlarlar. Uterus düz kas hücrelerini inhibe ederek gevşetir ve gebeliğin sürdürülmesinde önemli rol oynar²⁴³.

Progesteronun Metabolik Termojenik Etkileri

Böbrek tubuluslarında aldosteronu kısmen antagonize etmesine bağlı olarak natriüretik ve diüretik etki yapar. DDL'yi, iştahı ve insülin salgısını artırır. Lipoprotein lipaz aktivitesini artırır. Zayıf katabolik etki yapabilirler. Hipotalamusta termoregülatör merkezi etkiler, menstrüel siklusun ikinci yarısında sıcaklığın 0.5°C yükselmesine neden olur²⁴³.

Progesteronun Kardiyovasküler sistem Üzerindeki Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri

Protein metabolizması üzerine olan etkisi tam belirgin değildir. Zayıf bir katabolik etki yapar. Progesterinler plazma trigliserid düzeyini düşürürler. Sentetik progesterinlerin büyük bir kısmı androjenik etkinlikleri nedeniyle DDL'de artma ve HDL'de düşme yapabilirler. Androjenik etkinliği belirgin olan sentetik progesterinlerin yüksek dozda uzun süre kullanılması arterleri bozabilir ve aterosklerotik kronik kalp hastalığına ve diğer iskemik bozukluklara yol açabilir. Ancak bu ilaçlar estrogenlerin aksine pıhtılaşmaya dokunmadıkları için direkt olarak tromboembolik bozukluklara yol açmazlar.

Progesteron hedef hücrelerdeki spesifik etkilerini progesteron reseptörlerini aktive ederek yaparlar. Reseptör molekülünde bir hormon bağlayan alan, DNA'ya bağlanan alan vardır. Agonist molekülü reseptöre bağlandığında reseptör molekülündeki konformasyonel değişiklik sonucu hsp90 molekülden kopar. Böylece reseptör molekülünün DNA'ya bağlanan alanı açılır ve molekül progesteronla düzenlenen bir genin hormon cevap alanları denilen (SRE) DNA bölgesine bağlanır. Böylece düzenlenen genin transkripsiyonu stimüle edilir. Meydana gelen özgül mRNA'lar hedef hücrede progesteron fonksiyonları ile ilgili protein sentezini artırır. Progesteron, estrojenin uterusu vasküler duvarda gevşeme yapıcı etkisine zıt bir etki gösterir²⁴³.

Seks Steroid Hormonların Ekstranükleer Sinyal Mekanizmaları Nongenomik Etkileri

Steroid hormon reseptörleri (SRs), hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Steroid hormonların spesifik SR ligand-bağlayıcı (LBD) alana bağlanması bu reseptörlerin yapısal değişikliği indükler. Ligand-bağlı reseptörlerin homo/heterodimerizasyonu ve nükleer translokasyonu ve bunların hedef genlerin promotör bölge üzerindeki steroid yanıt elementine (SRE) bağlanmasına izin verir. Böylece gen ekspresyonu transkripsiyon mekanizma ile etkileşimi yoluyla düzenlenir²⁴⁴.

Ancak, RNA ve protein sentezinin aktivasyonu yoluyla oldukça hızlı olan steroid hormonlar tarafından oluşan bu etkilerin gözlemlenmesi alternatif sinyal mekanizmalarının araştırılmasına öncülük etmiştir. Steroid sinyalinin yeni yolları için ek olarak bulgular hücre membranı seviyesinde reseptör alt tiplerinin bulunması yoluyla sağlanmıştır ve bu steroid hormonların non-nükleer etkileri için potansiyel yanıt olarak gösterilmiştir²⁴⁴. Bu mekanizma RNA sentezi ve reseptörlerin DNA'ya bağlanmasına gerek duymamakta ve bu etkinin non-transkripsiyonel olduğunu göstermektedir. Bu etkilerin klasifikasyonu moleküler temelin bilgisinin yetersizliğinden dolayı, tam olarak yapılmamıştır. Bu farklı fenomen SR'lerin "non-genomik" etkileri olarak tanımlanmıştır. Bu non-transkripsiyonel etkilerin tanımlanması için kuralları vardır. Bunlar etki, RNA ve protein sentezine kıyasla çok hızlı olmalı (dakikaya saniyeler içinde ortaya çıkar). Bu etki protein sentez veya RNA'nın inhibitörleri varlığında çoğalabilir. Bu

etki, hücre membranını geçemeyen moleküllerle birleşmiş steroid hormonların kullanılması ile artırılabilir olmalıdır²⁴¹.

Pietras ve Szego tarafından 1970'lerin sonlarında endometrial hücrelerde estradiol için sitoplazmik membran bağlayıcı bölgenin varlığını çalışmalarında tanımlamışlardır²⁴⁵. Gerçekten, plazma membran estrogen reseptörleri, hücre membranı iyon kanalları²⁴⁶, G-protein kenetli reseptörler (GPCRs)²⁴⁷, tirozin kinaz ve mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPKs)'ın düzenlenmesinde yer aldığı savunulmaktadır^{248,249}. Ayrıca, adenil siklaz üretiminin aktivasyonu²⁵⁰, aynı zamanda fosfolipaz C (PLC) aktivasyonuna neden olmaktadır²⁵¹.

Hücre membranı bağlayıcı bölge diğer hormonlar için de tanımlanmıştır. Membran progesteron reseptörleri sperm hücrelerinde bulunmuş, Cl⁻ kanalları ve Ca²⁺'un non-genomik aktivasyonu akrozomal reaksiyona yol açan hızlı yanıtı yol açmıştır²⁵². Ayrıca membran progesteron bağlayıcı bölge osteoblast²⁵³, granüloza hücreleri²⁵⁴ ve oositlerde belirtilmiştir²⁵⁵.

Steroid hormonların nongenomik etkileri enzim-bağlı reseptörler, iyon kanalları ve GPCR'lar gibi hücre membran reseptörleri ile ilişkilidir²⁵⁶. Bu yollar vasıtasıyla steroidler birçok hücre fonksiyonları düzenlerler²⁵⁷.

G protein Kenetli Reseptörler (GPCRs)

Steroid hormonlar tarafından GPCR'lerin düzenlenmesi non-genomik sinyal mekanizmalarından en iyi karakterize edilenlerden biridir. ER'leri osteoblast hücrelerinde G protein ile etkileşimi yoluyla fosfolipaz C-beta ile kenetlenir. Bu endoplazmik retikulumdan Ca²⁺'un mobilizasyonunu ve intrasellüler Ca²⁺ konsantrasyonunun hızlı artışına ve diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP₃) oluşumuna yol açar. ERα, G proteinlerinin izoformlarından Gα_i ile ilişkili iken, Gα_q ve Gα_s ile ilişkili değildir²⁵⁸.

Son zamanlarda endotelial hücre hareketini kullanma üzerine estrogenin hızlı etkisi karakterize edilmiş ve bunun membran ERα ile Gα₁₃ arasındaki direkt etkileşime aracılık ettiği gösterilmiştir. ERα-Gα₁₃ kompleksi küçük GTP'az Rho'yu aktive eder ve Rho ile ilişkili kinaz (ROCK) kaskadı aktin-düzenleyici protein moesini hızlı fosforile eder, kortikal aktin komplekslerinin formasyonu ve stres fiberlerin kaybı ile aktinin hızlı yeniden düzenlenmesine yol açar²¹⁸.

Estrogenin membranal etkilerinden sorumlu reseptör GPR30, intrasellüler Ca²⁺ depolarının hızlı mobilizasyonu gibi estrogenin ektranükleer etkisine

aracılık eder. Aynı zamanda hücre proliferasyonu gibi genomik etkiyede katkıda bulunur. GPR30, Heparin-bağlayıcı EGF'nin salınımının tetiklenmesi yoluyla EGFR'ye kenetlenir ve EGFR transaktive olur. Bu etkiler GPR30 yoluyla başlar ve estrogenin EGF-benzeri etkileri artırma kapasitesini açıklayabilir. Bu durum özellikle meme ve endometrial kanser gibi estrogen bağımlı tümörlerin gelişimi ve ilerlemesinde önemlidir²¹⁸.

Şimdiye kadar G proteinleri ve ER β arasında etkileşim rapor edilmemiştir. Progesteron ve androjenlerin GPCR'lerini modüle ettiği çalışmalarda gösterilmiştir^{259,260}.

G Proteinleri

Sinyal ileten G proteinleri "GTPaz"lar kabaca iki sınıfa ayrılır.

-Heterotrimerik G proteinleri

-Tek bir α subunit içeren küçük G proteinleri (p21-ras gibi)

Heterotrimerik G Proteinleri

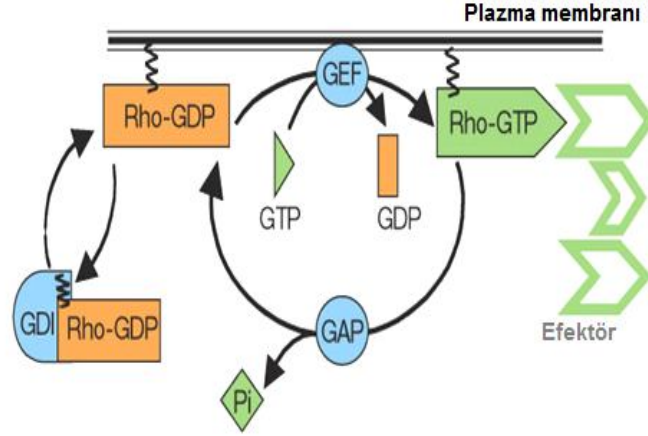
Heterotrimerik G proteinleri hücre membranından içeriye sinyal ileten moleküler anahtarlardır. Hücre membran reseptörü bir agonist tarafından işgal edildiği zaman, reseptör aktivitesinde uygun değişiklikler oluşturulur ve bu sinyal ilgili G proteinini aktive eder ve sonrasında efektörü aktive eder. G protein aracılı sinyal iletim sistemi sinyalin amplifikasyonuna da neden olur²⁶¹.

Küçük G Proteinleri

Moleküler biyolojide yapılan son çalışmalar küçük GTP-bağlı proteinlerinin (G proteinleri) hücre içi sinyalleme yollarında önemli role sahip olduğunu göstermiştir. G proteinleri (20-35 kDa) hücre farklılaşması, bölünmesi, hücre iskeletinin kontrolü gibi çeşitli hücresel olaylarda görev alır. Mayalardan insanlara kadar bütün ökaryot hücrelerde bulunan ve 100'den fazla üyeye sahip olan bir büyük aileyi oluşturur²⁶².

Küçük G proteinleri diğer G proteinleri gibi GDP ve GTP ile spesifik etkileşme ve GTP'az aktivitesi için sorumlu aminoasit dizilimine sahiptir.

Efektörleri ile etkileşebilmek için de ayrı bir bölgeye sahiptirler. Küçük G proteinleri GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere birbirine dönüşebilen iki forma sahiptir. İnaktif form GDP'nin aktif formu GTP'ye dönüşüm reaksiyonu GEF (Guanin nükleotid değiştirici protein, guanin nükleotid değiştirici faktör) ile stimüle edilirken, GDP/GTP dönüşüm reaksiyonu GDI (Guanin nükleotid dissosiasyon inhibitörü) ile inhibe edilir. Bu GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun hız kısıtlayıcı basamağı GDP-bağlı formdan GDP'nin ayrılmasıdır. Bu reaksiyon oldukça yavaştır ve GEF tarafından stimüle edilir. Hücre bir stimulus ile uyarıldığında küçük G proteini, GEF aracılığı ile inaktif formdan aktif forma dönüşür. Aktif hale gelmiş küçük G proteini de daha sonra "downstream" efektörlerini uyararak kendisine ait spesifik etkilerin oluşmasına neden olur²⁶³. (şekil 10)



Şekil 10: Rho ailesi GTPazların aktivasyonu²⁶⁴.

G proteinleri Rho, Ras, Rab, Sarl/Arf, Ran ve Rad/Gem ailelerinden oluşur²⁶⁵. Ras ailesinin Rap, Ral ve Reb, Rho ailesinin Rho (A'dan E'ye ve G izoformları), Rac (1'den 3'e izoformları), Cdc42 ve TC10 olmak üzere üyeleri belirlenmiştir²⁶⁶. Rab, Ran ve Arf proteinleri veziküler ve nükleo-sitoplazmik taşımadan, Ras ve Rho proteinleri ise ekstrasellüler uyaran gibi çeşitli sinyalleme ağında rol alırlar²⁶⁷.

Küçük G proteinleri sentezlendikten sonra lipidler ile posttranslasyonel değişikliklere uğrarlar. Bu lipid yapıları genellikle palmitoil, farnesil ve

geranilgeranildir. Bunların hücre membranına ve düzenleyicilere bağlanmaları ve alt efektörlerini aktive edebilmeleri için gereklidir²⁶⁶.

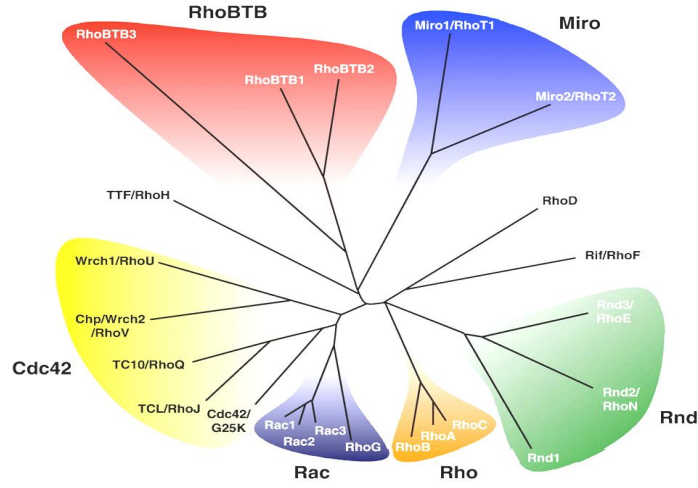
Rho Proteinleri

Rho geni ilk olarak 1985'de *Aplysia*'dan bir Ras homoloğu olarak klonlanmış ve bunu kısa süre sonra üç insan homoloğu RhoA, RhoB, RhoC izlemiştir²⁶⁸. RhoA, Ras süperfamilyasının küçük bir G proteindir. Aktif bir GTP bağlı form ile inaktif GDP bağlı form arasında gider gelir. RhoA hücre iskeleti organizasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gen regülasyonu gibi farklı hücre fonksiyonları için gerekmektedir. RhoA ve onun "downstream" efektörü Rho-kinaz (ROCK) vasküler endotel disfonksiyonuna aracılık eden önemli sinyal transdüksiyon mekanizmalarıdır²⁶⁹.

Rho'nun aktive olabilmesi için geranilgeranile olmuş C-terminal ucu ile membrana tutunması gerekir. Guanin nükleotid değişiminden sonra, Rho, Rho-kinaz, protein kinaz N, rhotekin, rhotekin, sitron, p140 mDia ve fosfolipaz D gibi efektörler ile etkileşime girer²⁷⁰.

Memelilerde Rho ailesi üyeleri 8 grupta toplanmaktadır (şekil 11);

Rac (Rac1-3, RhoG),
Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp, Wrch-1),
Rho (RhoA, RhoB, RhoC),
RhoD (RhoD ve Rif),
RhoH/TTF,
RhoBTB (RhoBTB1 ve RhoBTB2),
Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE),
Miro (Miro-1 ve Miro-2)²⁷¹.



Şekil 11: Rho ailesi küçük GTPazlar²⁷².

RhoA, vücutta en fazla eksprese edilen ve en çok çalışılan Rho proteini alt tipidir. Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılından ve fokal adezyondan²⁷³, hücre şekli²⁷⁴, agregasyonundan²⁷⁵, hücre hareketinden²⁷⁶ ve düz kas kasılmasından²⁷⁷, sorumludurlar. Ayrıca nörit retraksiyonu ve sitokinezis gibi birçok hücre fonksiyonunda önemli rol oynarlar^{278, 279}.

Rho proteinleri (Rho ve diğerleri) GDP-bağlı halde iken inaktif halde bulunur ve lizofosfatidik asid (LPA) ve sfingozin-1-fosfat (S1P) gibi ajanlarla stimüle edildiklerinde GTP-bağlı hale geçip aktif forma dönüşürler²⁸⁰.

Rho aktivitesini kontrol eden 3 protein tanımlanmıştır. Bunlar, Rho'nun aktive olmasını sağlayan GEP veya GEF (Guanin nükleotid değiş-tokuş proteini), GAP (GTP'az aktive edici protein) ve GDI (Guanin nükleotid disosiyasyon inhibitörü) proteinleridir.

Bu küçük G proteinlerinden Rho'nun uyarılması

- Rho-kinaz,
- protein kinaz N,
- rhopillin,
- rhotekin,

-citron,

-p140 mDia

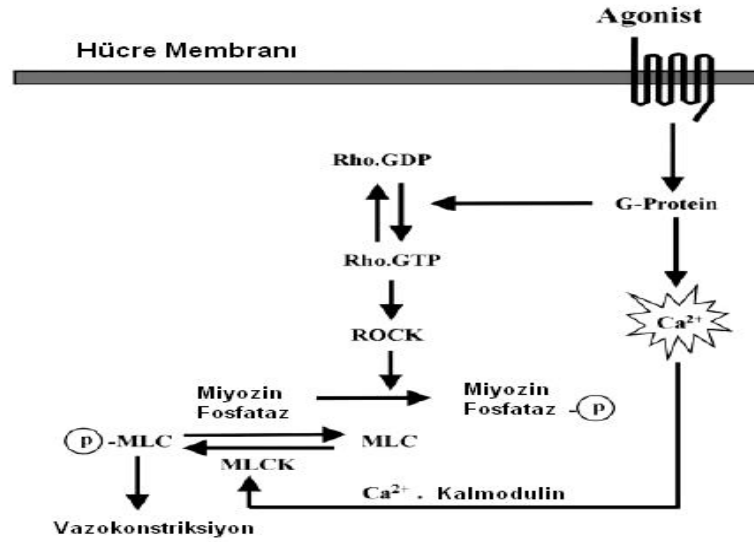
-fosfolipaz D ve potasyum kanal düzenleyicileri gibi “downstream” efektörlerin uyarılmasına neden olur. Bunlardan en fazla inceleneni ve üzerinde en çok çalışılanı Rho-kinazdır.

Rho/Rho-Kinaz Yolağı

Rho-kinazlar serin/treonin protein kinazlardır. Rho hücrede GTP-bağlı aktif form ile GDP-bağlı inaktif formda bulunur. Rho A, Rho B ve Rho C (toplam Rho olarak bilinir) aynı aminoasit sekanslarına sahip olduğundan bunların hücre içi hedefleri de benzerdir²⁶⁶. Rho proteinleri gen ekspresyonunu ve aktin hücre iskeletini kontrol eden sinyalleme yollarında rol oynarlar²⁸¹. Rho bağımlı yollar, Rho inhibitörü olan ve klostridium botulinum’dan elde edilen C₃ transferaz toksini kullanılarak incelenmiştir. Rho kinazlar (ROCK’lar) Rho’nun ilk efektörleri olarak keşfedilmiştir. ROCK, ROCK I ve ROCK II olmak üzere iki izoforma sahiptir.

1990’ların ortasında ilk olarak Rho kinaz α / ROK α /ROCK II izole edilmiştir. ROCK’un diğer izoformu ise Rho kinaz β / ROK β / ROCK I olarak tanımlanmıştır. Rho-kinaz yolağının düz kas hücrelerinde Ca²⁺ duyarlılığı, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre adezyonu, hücrel kontraksiyon gibi fizyolojik olaylarda, anjina, hipertansiyon, glokom, kanser invazyonu, preeklampsi gibi patolojik olaylarda rol oynadığı, insan ve hayvanlar üzerinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur²⁸². Sitoplazmik serbest kalsiyum seviyesindeki artış düz kaslarda kasılmayı tetikleyen temel mekanizmadır. Aynı zamanda düz kaslarda agonist ile indüklenen kontraksiyon büyük oranda membran potansiyelinden bağımsız mekanizmalar ile düzenlenmektedir. İntraselüler Ca²⁺ seviyesindeki artış, Ca²⁺’un kalmoduline bağlanmasını artırır. Ca²⁺-kalmodulin kompleksi, myozin hafif zinciri (MLC) fosforile etmek için, MLC kinazı aktive eder (şekil 12). Düz kas kasılmasının seviyesini MLC fosforilasyonunun derecesinin belirlediği genel olarak kabul görmektedir. MLC fosforilasyonu düz kaslarda kontraksiyona

neden olurken, hücre içi Ca^{2+} seviyesinin azalmasını takiben MLC defosforilasyonu gerçekleşir ve bu da gevşemeye neden olur. Hücre içi kalsiyum ölçülerek yapılan çalışmalarda, kalsiyum konsantrasyonunun MLC fosforilasyonu ve kasılmaya paralellik göstermediği belirlenmiştir. MLC fosforilasyonunun miktarı veya agonist stimülasyonu ile oluşturulan kontraksiyonun gücü, depolarizasyonla oluşturulan kalsiyum artışının neden olduğu kasılmalardan daha büyük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, MLC fosforilasyonunu ve kalsiyum konsantrasyonundan bağımsız kontraksiyonun derecesini düzenleyen önemli ilave mekanizmalar önerilmiştir. Daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki, GTP-bağlayıcı proteinler agonist-bağımlı kalsiyum duyarlılığında rol almaktadırlar.

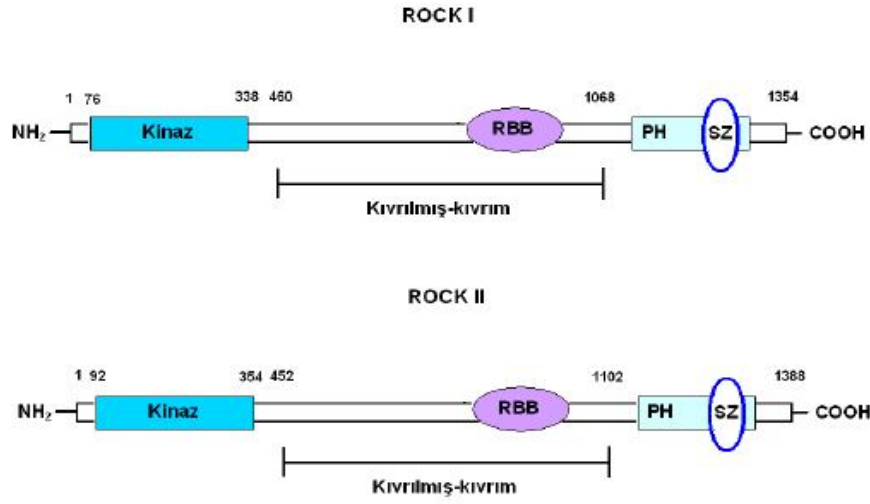


Şekil 12: Vasküler düz kas hücre kontraksiyonunda Rho/ROCK düzenlenme mekanizması. Daire içindeki P fosforilasyonu göstermektedir. MLC, miyozin hafif zincir; MLCK, MLC kinaz²⁸².

Küçük GTPaz Rho'nun agonistlerle indüklenen kalsiyum duyarlılığından sorumlu olduğu ve bu etkiyi miyozin fosfataz aktivitesinin inhibisyonu ile oluşturduğu düşünülmektedir. Rho proteinleri bu etkiyi downstream efektörleri olan Rho-kinaz "Rho-associated kinase" aracılığı ile oluşturmaktadır²⁸³. Rho-kinaz için spesifik inhibitörler kullanılarak daha sonra yapılan çalışmalar, Rho-kinaz aracılıklı kalsiyum duyarlılığının hipertansiyon ve koroner arter spazmı gibi hastalıklarda rolü olduğunu göstermiştir²⁸⁴.

Rho Kinazların Yapısı

ROCK, 160 kDa molekül ağırlığına sahip, serin/treonin protein kinaz aktiviteli Rho-bağlanan protein olarak tanımlanmıştır. Rho kinaz N23 terminal bölgesinde bulunan katalitik (kinaz) bölge, orta bölümde bulunan kıvrılmış-kıvrım (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde bulunan, sisteince zengin (SZ) bölgeden oluşan plekstrin-homoloğu bölge olmak üzere 3 ana bölgeden oluşur (şekil 13). Rho kinazın Rho-bağlanan bölgesi (RBB) kıvrılmış-kıvrım bölgenin C terminalinde lokalize olmuştur ve GTP-bağlı Rho'nun bu bölgeye bağlanması ile Rho kinazın aktivitesi artmaktadır.



Şekil 13: ROCK I ve ROCK II'nin moleküler yapısı²⁸⁵.

Rho-kinazın her iki izoformu kinaz bölgesinden %92, tüm aminoasit diziliminden % 65 benzerlik göstermektedir^{285,286}.

ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi

ROCK, oto-inhibitör etkiye sahiptir²⁸⁷. İnaktif formda ROCK'un C terminal PH bölgesi ve RB bölgesi, kinaz bölgesi ile etkileşim içindedir. Enzim bu etkileşimle oto inhibitör halka olarak şekillenir. Kinaz bölgesi yaklaşık 300 aa uzunluğunda ve serin/treonin protein kinaz aktivitesine sahiptir²⁸⁸. ROCK aktivitesi çeşitli mekanizmalarla regüle olur. Enzimin kinaz aktivitesi Rho bağlanmasından sonra artar^{289,290}. Kıvrılmış-kıvrım bölgesinde lokalize olan RBB yaklaşık 80 aa uzunluğunda olup, Rho A, Rho B, Rho C gibi yalnızca aktif

durumdaki Rho GTPaz'larla etkileşim içindedir²⁹¹. RBB ve GTP bağlı Rho'nun etkileşimi, ROCK'un inhibitör karboksi terminal bölgesi ile katalitik bölgesi arasındaki etkileşimi bozar. Rho iki farklı bölgeden enzim ile etkileşmektedir (Rho A'nın 23-40 ve 75-119 aa sekanslarından)²⁹².

Rho/ROCK yolu ekstrasellüler uyarana bağlı olarak aktive olur. Rho bağımlı ROCK aktivasyonu hücre tipine bağlı olarak kontraktilitede, hücre permeabilitesinde, migrasyonda ve proliferasyonda değişikliğe ve apoptoze neden olabilir.

ROCK Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

Hem ROCK I hem de ROCK II insan, sıçan ve fare dokularında eksprese olmaktadır^{286,290,293}. ROCK II beyin ve kas dokusunda fazla eksprese olurken, ROCK I böbrek, karaciğer ve testislerde eksprese olmaktadır. Hem ROCK I hem ROCK II vasküler düz kasta ve kalpte eksprese olmaktadır. Erken fare embriyolarında gelişen kalpte ROCK I kuvvetli eksprese olurken, ROCK II her yerde dağılmış şekilde bulunur²⁹⁴. ROCK I ve ROCK II dinlenme periyodunda sitozolde bulunurken Rho aktivasyonu ile membrana transloke olur²⁸⁹. ROCK II hücre bölünmesi sırasında stres liflerinde²⁹⁵ ve vimentin aracılı filament ağının oluşumunda lokalize olurken, ROCK I'in sentrozomlarla ko-lokalize olduğu gösterilmiştir²⁹⁶.

Substratlar

Hem ROCK I hem ROCK II serin veya treonin rezidülerinden çeşitli proteinleri fosforiller. ROCK'un ilk belirlenen hedefleri miyozin hafif zincir (MLC)²⁹⁷ ve miyozin hafif zincir fosfatazın miyozin bağlı alt üniti (MYPT1)'dir^{297,298}. ROCK doğrudan MLC üzerinden ya da dolaylı olarak MLC fosfatazı inaktive ederek MLC fosforilasyonunu artırabilir. Artmış MLC fosforilasyonu aktomiyozin kontraktilitesinde de stimülasyona neden olur²⁹⁹. ROCK II Ca²⁺ bağımsız olarak MLC'yi in vitro²⁹⁷ ve in vivo³⁰⁰ fosforile eder. Bu fosforilasyon MLC'yi MLC kinazın MLC'yi fosforilediği rezidüden gerçekleşmektedir (serin 19)²⁹⁷.

MLC ve MYPT1 dışında aktin hücre iskeleti regülasyonunda etkili ROCK substratları da vardır. Bunlar CPI-17 (Shi 2006-63), kalponin³⁰¹ LIM kinazlar³⁰², ezrin/radiksin/moesin (ERM)³⁰³, adusin³⁰⁴, sodyum-hidrojen değiş-tokuş pompası (NHE1)³⁰⁵ ve ZIP kinaz'dır³⁰⁶.

Apoptotik hücrelerde artmış MLC fosforilasyonu ve aktomiyozin kontraktilesi plazma membran tomurcuk oluşumunu regüle eder³⁰⁷. Farklı hücre tiplerinde kaspaz 3 aracılı ROCK I aktivasyonu, MLC fosforilasyonundaki artıştan sorumludur³⁰⁸. Fosfataz ve tensin-homolog (PTEN) yeni tanımlanan ROCK substratıdır. ROCK tarafından fosforillenen PTEN'in fosfataz aktivitesi artmaktadır. PTEN proteinleri ve fosfoinosidleri defosforile eder. Ayrıca hücre yaşayabilirliğini de içeren çeşitli biyolojik olaylarda önemli rollere sahip olan fosfatidil inozitol 3-kinaz/Akt yolağının da negatif regülatörüdür³⁰⁹.

Düz kas hücrelerinde ROCK'un insülin reseptör substrat 1(IRS1) sinyallemesini ve PI3-kinaz aktivasyonunu negatif olarak regüle ettiği gösterilmiştir³¹⁰. Buna zıt olarak ROCK adipositlerde, kas hücre kültürlerinde ve izole soleus kasında ROCK'un IRS1'i fosforillediği ve PI3-kinaz aktivasyonunun buna bağlı olarak arttığı gösterilmiştir³¹¹. ROCK, PI3-kinaz/Akt yolağının hem pozitif hem de negatif regülatörüdür.

RhoA/Rho-Kinaz'ın Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Kas hücreleri dışında ROCK'lar birçok hücre sel fonksiyonları Rho ikincil "downstream" etkileri ile düzenler. En önemlisi, ROCK'lar aktin-hücre iskeleti topluluğunu ve hücre kontraktilesini kontrol ederek birçok fizyolojik olaya katılmaktadır. Şimdiye kadar ROCK 1 ve ROCK 2'nin farklı fonksiyonları olduğuna dair çok fazla bilgi yoktur fakat bazı durumlarda farklı regüle edebilmektedirler³¹².

Rho-kinazın Kardiyovasküler Hastalıklar ile ilişkisi

Rho-kinazın fizyopatolojik olaylardaki rolleri, Y-27632 gibi Rho-kinaz inhibitörleri kullanılarak değerlendirilmiştir³¹³. Y-27632 hipertansif sıçanlarda yüksek kan basıncını doza bağımlı olarak düşürmekte iken normal kan basıncı değerlerine herhangi bir etkide bulunmamaktadır. Bu bulgu, Rho/Rho-kinaz

aracılıklı Ca^{2+} duyarlılığına bağlı düz kas kontraksiyonunun hipertansiyona neden olabildiğini göstermiştir³¹⁴.

Rho-kinaz'ın spesifik inhibitörü olan hidrosifasudil, 5-HT aracılıklı koroner hiperkontraksiyonu doza bağımlı olarak inhibe etmektedir. Spazmin bu inhibisyonuna, 5-HT aracılı MLC fosforilasyonu eşlik etmektedir. Bu sonuçlar, Rho-kinaz yolağı ile artan MLC fosforilasyonunun koroner arter spazmin patogeneğinde çok önemli bir rol aldığını göstermektedir³¹³. Ortaya konulan bulgular Rho-kinaz yolağının aterosklerotik lezyonların oluşmasında rol aldığını göstermektedir. Spesifik inhibitörler ile Rho-kinaz'ın inhibisyonu neointimal formasyonu inhibe etmektedir. Rho-kinazın, makrofajların ve düz kas hücrelerinin arterlerin dış çeperinden orta veya içe doğru invazyonu ve migrasyonunu düzenleyerek neointimal formasyonla ilgili olduğu görünmektedir³¹³.

Bazı çalışmalarda ise fasudil gibi Rho-kinaz inhibitörlerinin mikrovasküler anjinalı hastalarda terapötik önem taşıdığı ve stabil efor anjinalının tedavisi için yeni vazodilatör bir ilaç sınıfı olabileceği öne sürülmüştür²⁸².

Rho-kinazın Kanser ile İlişkisi

Tümörlü ve tümörlü olmayan mesane örneklerinde western blot tekniği ile Rho ve Rho-kinaz kantitasyonu yapılmıştır. Sonuçta artmış RhoA, RhoC ve Rho-kinaz üretiminin kas invazyonu, lenf nodu metastazı ve tümörün kötü yönde farklılaşması ile ilgili olduğu görülmüştür. Rho/Rho-kinaz yolağının mesane kanserinin oluşumu ve ilerlemede rolü olduğu ve prognostik marker olabileceği öne sürülmüştür. Testiküler germ hücre tümörlü 57 Japon hastadan alınan örneklerde RhoA ve Rho-kinaz genlerinin mRNA seviyeleri analiz edilmiştir. RhoA ve Rho-kinaz mRNA'ları tümörlü dokuda tümörlü olmayan dokudan daha fazla bulunmuştur. Yüksek RhoA ve Rho-kinaz mRNA ekspresyonunun tümörün evresi ile ilgili olduğu, Rho/Rho-kinaz yolunun testiküler germ hücreli tümörlerin ilerlemede rol oynadığı öne sürülmüştür³¹⁵.

Rho-kinazın Göz Hastalıkları ile İlişkisi

ROCK enzim inhibitörü Y-27632'nin intraoküler basıncı azalttığı ve aköz hümör dış akımını artırdığı, dolayısıyla başta glokom olmak üzere diğer bir takım göz hastalıklarının tedavisinde terapötik faydaları olabileceği bildirilmiştir³¹⁶.

Rho-kinaz ve Obstetrik

İnsan gebe myometriyumunda, ROCK 1 ve ROCK 2 izoformlarının arttığı gösterilmiştir. Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin oksitosinle oluşan kontraktıl aktiviteyi doza bağımlı olarak azalttığı ortaya konmuştur. Rho-kinaz inhibitörlerinin erken doğum tehdidinde yeni tokolitik ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür³¹⁷.

Rho-kinazın Üriner Sistem ile İlişkisi

İnsan ve tavşan penis kavernozaal düz kas hücrelerinde Rho-kinaz enzim ekspresyon ve aktivitesinin olduğu gösterilmiştir³¹⁸.

Bunun yanı sıra yapılan diğer çalışmalarda çeşitli türlerin korpus kavernozumlarında ROCK-1, ROCK-2, Rho-GDI ve Rho-GEF proteinlerinin varlığı tespit edilmiştir. Yaptıkları bir çalışmada Wang ve arkadaşları, tavşan ve insan korpus kavernozumunda Rho aracılı Ca^{2+} duyarlaşması olduğunu ve Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin, fenilefrinle kastırılmış kavernozaal dokuda doza bağımlı olarak gevşeme oluşturduğunu bildirmişlerdir³¹⁹.

Çeşitli hastalıklara sekonder gelişen erektil disfonksiyonda Rho-kinaz sinyal yolağının katkısının olduğu öne sürülmektedir. Örneğin diyabetik erektil disfonksiyon tedavisinde ROCK inhibitörleri, Y-27632 ve fasudilin tedavi değerlerinin olabileceğini bildirilmiştir³²⁰.

Diğer taraftan, vas deferensin motor aktivitesinde Rho/Rho-kinaz yolağının etkili olduğu ve bu yolağın inhibitörlerin hem erektil disfonksiyonda hem de prematür ejakülasyon bozukluklarında potansiyel terapötik ajanlar olabileceğini öne sürülmüştür³²¹.

Bunun yanısıra bir başka çalışmada da Rho/Rho-kinaz yolağının üreter düz kasının eksitator uyarılarla indüklenen kontraktıl aktivitesine önemli katkı

sağladığı ve ROCK inhibitörlerinin renal kolik tedavisinde potansiyel antispazmodik ilaçlar olabileceğine işaret edilmiştir³²².

Bununla birlikte, üreter obstrüksiyonunda Rho-kinaz yolağının up regüle olduğu ve artmış üreteral kasılmalara bu yolağın aracılık ettiğini bildirilmiştir³²³.

Rho-Kinazın Gastrointestinal Sistem Üzerindeki Etkileri

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması insan ve koyun safra keselerinin kontraktıl aktivitelere aracılık etmektedir^{324,325}. Gastrik fundusta Rho-kinaz enziminin kontraktıl aktivitede rol oynadığı ve kolinerjik sinir uçlarından asetil kolin salınımını uyarabildiği gösterilmiştir³²⁶.

Rho-Kinazın Solunum Sistemi Üzerindeki Etkileri

Bronşiyal düz kas tonusunun düzenlenmesinde Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması rol almaktadır. Bununla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada farelerde geranilgeraniltransferaz inhibisyonunun bronşiyal düz kas aşırı duyarlılığını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle selektif geranilgeraniltransferaz inhibitörlerinin alerjik bronşiyal astım gibi hava yolu aşırı duyarlılığı sonucu oluşan patolojik durumlarda potansiyel bir terapötik ajan olabileceği ileri sürülmektedir³²⁷. ROCK inhibitörlerinin inhalasyon yolu ile uygulandığında pulmoner hipertansiyonda selektif ve potent bir etki ile vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir³²⁸. Köksel ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da oleik asitle indüklenen akciğer hasarlanmasının Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile geri çevirilebildiği ve bu neden ile akciğer hasarlanması ile seyreden hastalıklarda terapötik etkisinin olabileceği bildirilmiştir³²⁹.

Rho-Kinazın Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının vücutta birçok farklı hücresel fonksiyonun yanı sıra santral sinir sisteminde de birtakım hücresel olaylara aracılık ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu yolağın anormal aktivasyonları santral sinir sistemine ait birçok hastalıkta ortaya konmuştur. Spinal kord ve kafa travmalarında Rho-kinaz enzim aktivitesinin artışına bağlı olarak nörit uzamasını inhibe olabildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte Rho-kinaz

enzim inhibitörlerinin spinal kord yaralanmasında, Alzheimer hastalığında, inflamatuvar ve demiyelinizan hastalıklarda, nöropatik ağrı ve diğer nörolojik hastalıklarda potansiyel nörodejeneratif tedavi edici ajan olabileceği öne sürülmektedir³³⁰. Öte yandan Rho-Rho-kinaz yolağı, nöronal fonksiyonları düzenlemekle birlikte sinir hücrelerinde de sinaps oluşumu, aksonal büyüme ve göç, dendrit şekillenmesi gibi olaylarda rol oynamaktadır^{331,332}.

Diğer taraftan iskemik nöronal hasarların erken safhalarında striatumda ve özellikle aksonlarda Rho-kinaz enzim ekspresyon ve aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ROCK enzim inhibitörü fasudilin bu aktivite artışını geri çevirdiği ve serebral infakta karşı in vivo olarak koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nöronal hücrelerde glutamatın ROCK enzim aktivitesinde rol oynadığı ve hidrosifasudilin de ROCK enzim inhibisyonu yolu ile glutamatın neden olduğu sinir hasarı ve hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir³³³.

Öte yandan ROCK inhibitörü fasudilin insanlarda subaraknoid kanamadan sonrası oluşan vazospazmı azalttığı anjiyografik olarak gösterilmiştir³³⁴. Bununla birlikte hem beyinde hem de omurilikte eksprese edildiği gösterilen Rho-kinaz enziminin nosisepsiyonda rol oynayabildiği ve ROCK inhibitörlerinin yeni bir antinosiseptif ilaç grubu olarak önerilebileceği bildirilmiştir³³⁵.

Ayrıca yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada da Rho/Rho-kinaz sinyal yolağının farelerde epilepsi gelişiminde rol oynayabileceği bu nedenle Y-27632 ve fasudilin potansiyel anti-epileptik ajanlar olabileceği gösterilmiştir³³⁶.

Rho-Kinazın İnflamasyon Üzerindeki Etkileri

Rho/Rho-kinaz yolağı, inflamasyona aracılık edebilmektedir. İnflamatuvar hücrelerin migrasyonu hücre iskeleti aktini tarafından düzenlenmektedir ve bu olayı düzenleyen en önemli mekanizmalardan birisi de Rho proteininin indüklediği sinyal ileti mekanizmasıdır³³⁷. Ayrıca Rho-kinazın sıçanlarda anjiyotensin-II ile indüklenen monosit kemoatraktant protein-1 ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ekspresyonuna aracılık ettiği, bununla birlikte yine

sıçanlarda yüksek glikoz düzeylerinin indüklediği artmış osteopontine de yine bu sinyal mekanizmasının aracılık ettiği bildirilmiştir³³⁸⁻³⁴⁰. Tüm bunlardan dolayı bu sinyal mekanizmasının vasküler fonksiyonlarla ilişkili inflamatuvar moleküllerin gen ekspresyonlarında ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, anjiotensin-II ve interlökin-1 ile kültür hücrelerinde oluşturulan inflamasyon ve bakteriyel endotoksinle (lipopolisakkaridlerle) *in vivo* olarak oluşturulan sistemik inflamatuvar yanıtta Rho-kinaz upregüle olmuştur³⁴¹.

Rho-Kinaz Enzimi İnhibitörleri

Rho-kinaz'ın farmakolojik inhibitörü olarak fasudil²⁹⁷ ve Y-27632 geliştirilmiştir ve bunlar ATP ile yarışmalı bir şekilde Rho-kinaz aktivitesini inhibe ederler³⁴². Fasudil'in ağız yoluyla alımından sonraki ana aktif metaboliti olan hidroksifasudil'in Rho-kinaz üzerinde daha spesifik bir inhibitör etkisinin olduğu yakınlarda gösterilmiştir^{343,344}.

Rho-kinaz NAD(P)H, IL-6, monosit kemoatraktan protein (MCP)-I, makrofaj migrasyon inhibitör faktör ve interferon (IFN)- γ 'yı içeren proinflamatuvar moleküllerin artışına aracılık eder. Trombojenik molekülleri (platelet aktive eden faktör (plazminojen aktivatörünün inhibitörü (PAI))-1 ve doku faktörü) ve fibrinojenik molekülleride (transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β 1 ve Bcl-2) artırır. Buna karşılık, Rho-kinaz endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) ve osteojenik molekülleri (kemik morfojenik protein [BMP-2] ve osteokalsin) azaltır. Bunların sonucunda, Rho kinaz aktive olduğunda inflamatuvar süreçler, tromboz ve doku fibrozisi hızlanır, buna karşın endotelial NO üretimi ve osteojenezis baskılanır. Rho-kinaz'ın kendi ekspresyonu da anjiotensin II ve IL-1 β gibi inflamatuvar uyaranlarla, PKC/NF-kB yoluyla üzerinden artar³⁴⁵.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3T3-L1 PREADİPOZİT HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC-CL-173) dondurulmuş olarak satın alınan beyaz yağ hücresi öncülü fare embriyonik fibroblast klon hücre tipi olan 3T3-L1 hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin özelliği diferansiyasyon medyumuna uygulandığında hücreler içinde lipid damlacıkları birikerek, adiposit fenotipi kazanma özelliğine sahip olmalarıdır.

Hücrelerin Besiyeri Ortamı

DMEM besi yeri ortamı	100 ml
Fötal sığır serumu	%10
Penisilin	%1
Streptomisin	%1
L-Glutamin	%1

Hücrelerin Fiziksel Ortam Şartları

Sıcaklık	37°C
pH	7.0-7.4
CO ₂	%5

3T3-L1 hücre hattının çözündürülmesi ve ekilmesi

ATCC'den dondurulmuş olarak gelen 3T3-L1 hücreleri 37°C'de 1-2 dk içinde çözündürüldü. Çözülen hücreler 15'lik tüpe konuldu ve üzeri hazırlanan komplete medyum [%10 buzağı serumu/%1 Penisilin/streptomisin/%1 glutamin/Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumuna (DMEM)] ile 15 ml'ye tamamlandı. 37°C 1200 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki süpernatant atıldı. Altta kalan pelet üzerine taze hazırlanmış komplete medyum 4-6 ml eklenerek hücrelerin iyice karışması sağlandı ve 25'lik flasklara ekim yapılarak inkübatöre kaldırıldı.

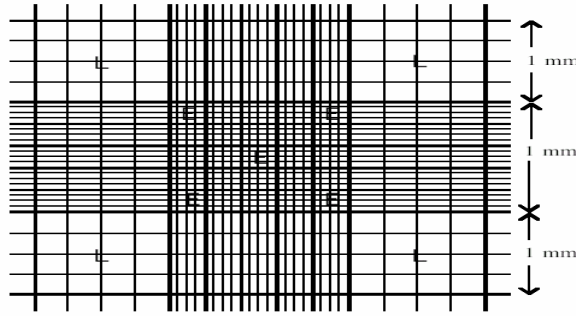
Hücrelerin iki günde bir medyumunu değiştirildi ve inverted mikroskopta bakılarak büyümeleri değerlendirildi. Konfluent olan hücreler (flask tabanını %80-90 kaplayan) tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Flasklar, PBS tamponu ile yıkanarak 1-1,5 ml tripsin konuldu. Tripsinin tabana iyice yayılması sağlandıktan sonra inkübatöre kaldırıldı. 5 dk sonra flasklara inverted mikroskopta bakılarak hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadıkları değerlendirildi. Hücrelerin tamamen kalktığından emin olduktan sonra hücreler flasklardan 15'lik tüpe alındı. Üzeri PBS tamponu ile tamamlandı ve 37°C 1200 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden alınan hücrelerin süpernatantı döküldükten sonra peletin üzeri komplete medyum ile tamamlanarak 1:3 oranında pasaj yapıldı. Yine aynı şekilde medyumları 2 günde bir değiştirilen hücreler konfluent olduklarında tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Adiposit diferansiyasyon deneyleri için 24'lü kuyucuğun kullanılması planlandı ve her kuyucuğa 2×10^4 hücre ekildi.

Hücre Sayımı

Genel olarak direkt hücre sayımında canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için genellikle hemositometre ile birlikte vital bir boya tripan blue kullanılır. Bu metodun uygulanması için toplam hücre süspansiyonundan sadece küçük fraksiyonlar gerekir. Kalın düz sayım odacıklı lamın üzerine lamel konması esasına dayanmaktadır. Temel olarak lam üzerinde çizgi ile kesin olarak kazanmış 1 mm kareler ve buna ilaveten daha küçük kareler içerir. Hücre süspansiyonlarının çember içine doldurulmasına izin verildiği zaman hücreler mikroskop altında gözlenebilir ve seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır. Bu sayımdan süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanabilir. Kullanılan tripan blue gibi canlılık boyası hücre kültür koşullarında kantitatif analiz sağlar³⁴⁶.

Çalışmamızda diferansiyasyon serilerini oluşturmadan önce çoğalttığımız hücreleri tripsin ile kaldırarak 50 ml'lik tüpe toplayarak üzerleri komplete medyum ile tamamlandı. Daha sonra iyice karışması ve hücrelerin dağılması sağlandı ve 10 µl tripan blue 10 µl süspansiyondan alınarak karıştırıldı. Lam ve lamelin arasına bırakıldı. Inverted mikroskopta 5 alan saptanarak ml'deki hücre

sayısı saptandı (Toplam canlı hücre sayısı /mL = hemositometre sayım sonucu x seyreltme katsayısı x 10⁴) (şekil 14).



Şekil 14: Hemositometre lamininin şematik görünümü

3T3-L1 Preadiposit Diferansiyasyon Protokolü

Hücre sayımı yapıldıktan sonra her kuyucuğa 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24'lü kuyucuğun her bir kuyucuğuna 1 ml komplete medyum [%10 buzağı serumu (CS)/ %1 Penisilin/streptomisin/ %1 glutamin/ Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu (DMEM)] konuldu. 2 günde bir medyumları değiştirilen hücrelerin inverted mikroskopta büyümeleri izlendi. Konfluent oldukları gün -2. gün kabul edildi. 2 gün daha bekletilen hücrelere (postkonfluent; 0. gün olarak kabul edilir) 0. günde adiposit diferansiyasyonu indüklemesi için 0.5 mM izobutilmetilksantin (IBMX), 0.25 µM deksametazon ve 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM (fetal sığır serumu/Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu) uygulandı (0-2. gün). 2 gün sonra hücrelere 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM uygulandı (2-4. gün) ve 4. gün %10 FBS/DMEM'le 8. güne kadar inkübasyon sürdürüldü (4-8. gün). 8. günde deney sonlandırılarak adiposit diferansiyasyonu Oil Red O boyama ile değerlendirildi.

Oil Red O çalışma solüsyonunun hazırlanması

Oil red O'dan 0,7 gr alınarak 200 ml isopropanolda çözüldü. 1 gece bekletildi. 0,22 mm membran filtresinden geçirildikten sonra bu hazırlanan stok solüsyonu +4 °C'de bekletildi. Kullanılacağı zaman stok solüsyonundan 6 birim, 4 birim de dH₂O'dan alınarak karıştırıldı ve 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,22 mm membran filtresinden geçirilerek kullanıldı.

Oil Red O boyama ile adiposit diferansiyasyonunun değerlendirilmesi

Adiposit diferansiyasyon protokolü uyguladığımız hücrelerin 8. günde deney sonlandırıldı. Medyumları alınarak 5 dk %10'luk formalin uygulandı. Formalinleri alınarak taze formalin ile değiştirildi. Formalinde 1 saat süreyle inkübe edildi. Formalinler alındıktan sonra kuyucuklar %60'luk isopropanol ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kuyucuklar iyice kurutuldu. Daha önce hazırlanmış olan Oil Red O (ORO) çalışma solüsyonundan her kuyucuğa 200 µl konuldu. 10 dk inkübe edilen hücrelerden ORO çalışma solüsyonu hızlıca uzaklaştırılarak 4 defa ddH₂O ile yıkandı. Bu aşamada mikroskopta görüntü alındı. Daha sonra kuyucuklardaki su boşaltıldı ve iyice kurutuldu. Boyanan yağ hücrelerinin aldığı ORO çalışma solüsyonunu ortaya çıkarmak için %100 isopropanol konuldu ve 10 dk bekletildi. Bu aşamada isopropanolün iyice karışması için pipetaj yapıldı ve 96'lık kuyucuklara transfer edildi. ELISA okuyucu cihazda 490 nm optik adsorbansta ölçüm yapıldı³⁴⁷.

Diferansiyasyon Serileri

Adiposit diferansiyasyonu saptamak için ilk seride 17β-estradiol, estradiol-BSA ve progesteron farklı konsantrasyonlarda uygulandı. İkinci seride ise 17β-estradiol ve estradiol-BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisine Rho/Rho-kinaz yolağının aracılığını gösterebilmek için Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ve estrogen reseptörünün katkısını ortaya koyabilmek için ICI 182,780 ile kombine edilerek uygulandı. Ayrıca ikinci seride estrogen ve progesteron kombinasyonu uygulandı.

I. Seri Deneylerde

0-2., 0-4., 0-6., ve 0-8. günlerde

17β-Estradiol 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda n=4

Estradiol-BSA 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M konsantrasyonlarda n=4

Progesteron 10⁻⁸, 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlarda n=4

II. Seri Deneylerde

0-2., 0-4., 0-6., ve 0-8. günlerde

17 β -Estradiol 10 ⁻⁹ ve 10 ⁻⁸ M konsantrasyonlarda	n=4
17 β -Estradiol (10 ⁻⁹ ve 10 ⁻⁸ M) ve Y-27632 (10 ⁻⁵ M) kombinasyonu	n=4
17 β -Estradiol (10 ⁻⁹ ve 10 ⁻⁸ M) ve ICI 182,780 (10 ⁻⁶ M) kombinasyonu	n=4
Y-27632 (10 ⁻⁵ M)	n=4
ICI 182,780 (10 ⁻⁵ M)	n=4
Estradiol-BSA 10 ⁻⁹ ve 10 ⁻⁸ M konsantrasyonlarda	n=4
Estradiol-BSA (10 ⁻⁹ ve 10 ⁻⁸ M) ve Y-27632 (10 ⁻⁵ M) kombinasyonu	n=4
Estradiol-BSA (10 ⁻⁹ ve 10 ⁻⁸ M) ve ICI 182,780 (10 ⁻⁵ M) kombinasyonu	n=4
17 β -Estradiol (10 ⁻⁸ ve 10 ⁻⁷ M) ve progesteron (10 ⁻⁶ ve 10 ⁻⁵ M) kombinasyonu	n=4

ADİPOKİN DÜZEYLERİNİN TAYİNİ

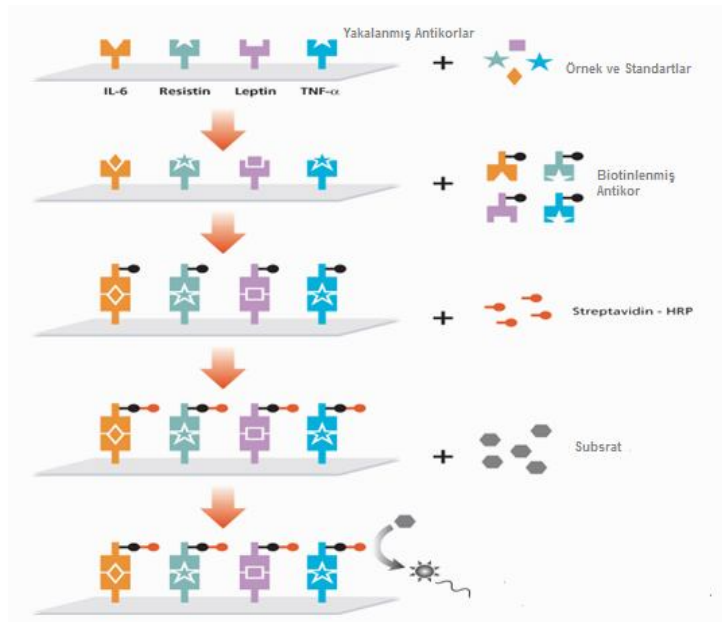
Estrojen (10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M) ve progesteronun (10⁻⁷, 10⁻⁶ ve 10⁻⁵ M) leptin, adiponektin, rezistin, TNF- α ve IL-6 salıverilmesi üzerine etkileri, ROCK inhibitörü Y-27632 (10⁻⁵ M) ve estrojen reseptör inhibitörü ICI 182,780 varlığında ve yokluğunda söz konusu sitokinlere ait kitler ile hücre medyumlarında ölçüldü. Bunun için adiposit diferansiyasyonunun 8. gününde deney sonlandırılarak 3T3-L1 hücrelerinin medyumları alındı.

Gruplar aşağıdaki şekilde planlandı:

1. 17 β -Estradiol (10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ M) n=5
2. 17 β -Estradiol (10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M) ve Y-27632 (10⁻⁵ M) kombinasyonu n=5
3. 17 β -Estradiol (10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M) ve ICI 182,780 (10⁻⁶ M) kombinasyonu n=5
4. Y-27632 (10⁻⁵ M) n=5
5. ICI 182,780 (10⁻⁵ M) n=5
6. Progesteron (10⁻⁸, 10⁻⁶ ve 10⁻⁵ M) n=5

7. 17β -Estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M) kombinasyonu
n=5

ELISA Yöntemi (Enzyme-linked immünosorbent assay): ELISA yöntemi, bir örnekte antikor veya antijen varlığını göstermek için kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. İki antikor kullanılır. Birinci antikor antijene spesifiktir, diğeri ise bir enzimle bağlıdır ve antijen-antikor kompleksi ile etkileşir. İkinci antikor sinyal üretimini sağlayan kromojenik veya florojenik substrat oluşumuna neden olur (şekil 15).



Şekil 15:ELISA yönteminin basamakları³⁴⁸.

Leptin tayini

Serum leptin düzeyleri sandviç ELISA yöntemi ile tespit edildi. Serum örnekleri, standartlar ve kontroller monoklonal anti-mouse leptin antikoruna ile kaplı mikrotest kuyucuklarının içine pipetlenerek inkübe edildi. İnkübasyon sırasında leptin antijeni bir bölgesinden kuyucuklara kaplanmış durumdaki antikora, ikinci bir bölgesinden de biyotinlenmiş antikora bağlanır. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki bağlı olmayan biyotinlenmiş antikor yıkanarak uzaklaştırıldı. Biyotinlenmiş antikora bağlanan streptavidin-horseradish peroxidaz (HRP) enzimi ile inkübasyondan sonra kuyucuklardaki bağlı olmayan enzim yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidin (TMB) substrat solusyonu eklendi. Bağlı leptininin miktarıyla orantılı olarak gözlenen renk değişimi stop solüsyonunun eklenmesi ile bu renk maviden sarıya dönüştü. Enzimatik aktivite sonucu oluşan rengin yoğunluğu 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü³⁴⁹.

Rezistin Tayini

Rezistin kiti (İnvitrogen) fare serumunda rezistin kantitatif saptanması için kullanılır. Fare rezistin için spesifik monoklonal antikor, 96'lık kuyucuk üzerinde kaplanmış olarak bulunur. Standart ve örnekler kuyucukların içine pipetlendi ve varolan rezistinler immobilize antikorlara bağlanır. Bağlı rezistinler biotinlenmiş anti-mouse rezistin poliklonal antikor tarafından yakalanır. HRP ile konjuge edilmiş streptavidin eklendi. Yıkamadan sonra substrat solüsyonu eklendi. Rezistin miktarının oranına göre gelişen rengin dansitesi ölçüldü³⁵⁰.

Adiponektin Tayini

Adiponektin kiti, monoklonal antikor fare adiponektini için spesifiktir ve 96'lık kuyucuk üzerinde kaplanmış olarak bulunur. Standart ve örnekler kuyucuklara pipetlendi ve bulunan adiponektin immobilize antikorlara bağlanır. HRP ile konjüge edilmiş streptavidin eklendi. Bağlı adiponektin miktarının oranına göre gelişen rengin dansitesi ölçüldü³⁵¹.

İnterlökin-6 (IL-6) Tayini

Fare IL-6 için spesifik monoklonal antikor, 96'lık kuyucuk üzerinde kaplanmış olarak bulunur. Standart ve örnekler kuyucuklar içine pipetlendi ve bulunan IL-6 immobilize antikorlara bağlanır. Yıkamadan sonra IL-6 için spesifik biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. Yıkamadan sonra streptavidin-peroksidaz (enzim) eklendi. Bağlanmamış enzim yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra substrat solusyonu eklendi. Bağlı rezistin miktarının oranına göre gelişen rengin dansitesi ölçülür³⁵².

TNF- α Tayini

Serumda TNF- α tayini sandviç ELISA (Enzyme Linked İmmünosorbent Assay) yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde serum örnekleri, standartlar

ve kontroller TNF- α için spesifik bir antikor ile kaplanmış olan mikrotest kuyucuklarına konarak inkübe edildi. Birinci inkübasyon sırasında örnekteki TNF- α antijeni biyotin ile işaretlenmiş antikora bağlanır. İkinci antikorun fazlası yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra streptavidin peroksidaz eklendi. Streptavidin-peroksidaz biyotinlenmiş antikora bağlanır. İkinci bir inkübasyondan sonra bağlanmamış enzim de yıkanarak uzaklaştırılır. Kuyucuklara substrat solüsyonu eklendi. Enzimatik aktivite sonucu oluşan rengin şiddeti 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü³⁵³.

ROCK-1, ROCK-2 ve RHO A EKSPRESYON TAYİNİ

Bu seride seks hormonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkilerine Rho/Rho-kinaz yolağının katkısını araştırmak için RhoA proteini ve alt efektörlerinden olan Rho-kinazın (ROCK-1, 2) ekspresyon düzeylerini göstermek amacıyla özel bir protein-protein hibridizasyon tekniği olan Western-Blot yöntemi kullanıldı. Bu amaçla iki grup oluşturuldu. 1. grup 3T3-L1 hücrelerine 2 gün, 2. gruba ise 8 gün süreyle estrogen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve kombinasyonları uygulandı.

Gruplar aşağıdaki şekilde planlandı:

1. Kontrol grubu (bazal şartlarda ilaç uygulanmamış)
2. Estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M): Estrojenik hormonun katkısını anlamak için
3. Progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M): Progesteron hormonunun katkısını anlamak için
4. Estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) + Progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M): Bu iki hormon arasında ne tür etkileşme olduğunu anlamak için

Birinci grupta deney 2. günün sonunda, ikinci grupta ise 8. günün sonunda sonlandırıldı ve ekim yapılan 25 mm'lik flaskların medyumları alındı. PBS ile flasklar yıkandıktan sonra hücre lizisi için flasklara RIPA lizis tamponu (50 mM Tris-HCL, 150 mM sodyum klorid, % 1 Igepal CA-630 (NP-40), % 0.5 sodyum deoksikolat ve % 0.1 sodyum deoksisülfat) konularak +4 °C'de 5 dk muamele edildi. Flasklardan elde edilen homojenatlar 200 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 10'ar μ l'si Bradford yöntemi ile protein tayini için

kullanıldı. Kalan proteinler ise Western-blot yönteminde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

Bradfort Yöntemi ile Protein Tayini

Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5-100 µg/ml); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorban verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorban vermesidir³⁵⁴. Standart olarak kullanılmak üzere 1 mg/ml sığır serum albumin (BSA) hazırlandı. Standartlar için; 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl standart solüsyonu (BSA) içeren ikişer adet ependorfun üzerleri distile su ile 100'er µl'ye tamamlandı. Ölçülecek olan örnekler de yine çift olarak hazırlandı ve 100'er µl'ye tamamlandı. Standart ve örnekler üzerine 1'er ml bradfort solüsyonu eklenerek vorteksledi. 595 (620) nm'ye ayarlı ELİSA okuyucuda kör tüpüne karşı örnekler okutuldu. Daha sonra elde edilen absorbanların her örnek için ayrı ayrı ortalamaları alınarak Prism programında µl deki protein miktarları belirlendi.

Western-Blot Yöntemi

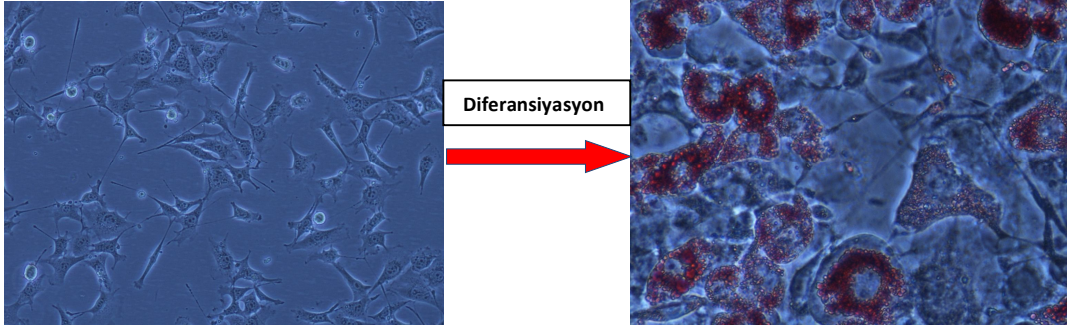
RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyonlarının göstermek için 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen homojenatlar, örnek tamponu (0.5 M Tris HCl pH 6.8 0.125 M, %10'luk SDS 0.14 M, gliserol % 20, 2-merkaptolanol 0.2 mM, bromfenol blue 0.03 mM) ile 1/3 oranlarında karıştırıldıktan sonra 5'er dakika kaynatıldı. Eşit miktarlarda protein % 8-12'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid (SDS-PAGE) jelle yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu ve jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Jelde büyüklüklerine göre ayrılan ve bantlar oluşturan proteinler elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz bir membrana aktarıldı. Membranlar yağsız süt tozu ve % 2'lik Tween-20 içeren Tris solüsyonu (TBS-T) ile 1 saat bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu sayede membranların proteinsiz kısımlarının spesifik olmayan bir proteinle tutunması sağlanarak protein yapıda olan primer antikorun bir sonraki aşamada membrana non-spesifik bağlanması engellenmiş oldu. Bir saatlik bloklama işleminden sonra

membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra ROCK enzimine özgü ROCK-2 (ROK α) antikoruna ile (1:2,000 dilüsyonda, 2 saat süre ile), ROCK-1 (ROK β) antikoruna ile (1:2,000 dilüsyonda, 2 saat süre ile) ve RhoA proteinine özgü RhoA antikoruna ile (1:500 dilüsyonda gece boyunca) muamele edildi. Bu şekilde primer antikorlar membranlara bağı olan hedef proteinler olan ROCK-1, ROCK-2 ve RhoA ile bağlanmış oldu. Bu işlem sonrasında da membranlar tekrar TBS-T solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar bu kez HRP (horseradish peroxidase) bağı sekonder antikor ile (1:2,000 dilüsyonda) bir saat muamele edildi ve bu şekilde sekonder antikorun primer antikorlara bağlanması gerçekleştirilmiş oldu. Bunun ardından membranlar tekrar 3 kez 10'ar dakika TBS-T içeren solüsyon ile yıkandı. Daha sonra membranlar ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit görüntüleme solüsyonu ile 10 dakika karanlıkta muamele edildi. Çeşitli sürelerde medikal röntgen filme basılarak görüntülendi.

İstatistik

Western Blot tekniğı ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programından faydalanıldı. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA'yı takiben Dunnet ve Bonferroni post hoc testi kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

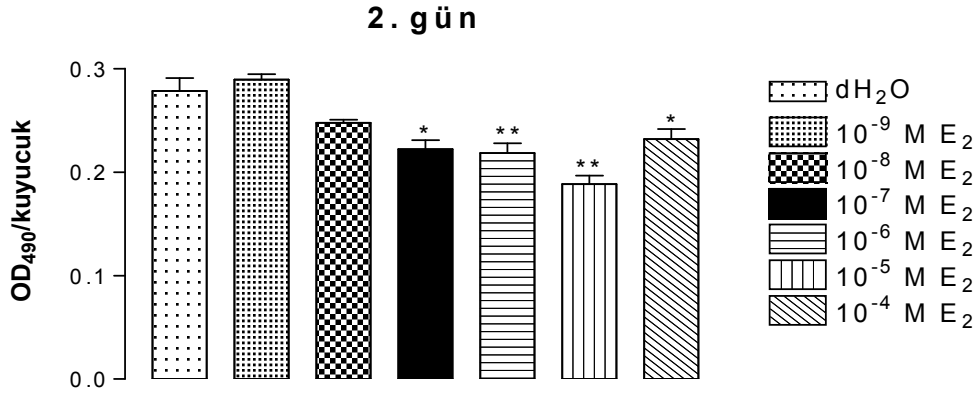


Şekil 16. 3T3-L1 hücreleri, diferansiyasyon medyumuna (IBMX, insülin ve deksametazon) maruz bırakılmadan önce fibroblastken ve diferansiyasyon medyumuna (IBMX, insülin ve deksametazon) maruz bırakıldıktan sonra 8. günde matür adipositken Oil Red O boyasıyla boyanarak inverted mikroskopta görüntü alındı. Şekilde fibroblastlar ve Oil red O ile boyanan lipid damlacıkları görünmektedir.

I. ADİPOSİT DİFERANSİYASYONUN DEĞERLENDİRİLDİĞİ SERİLER

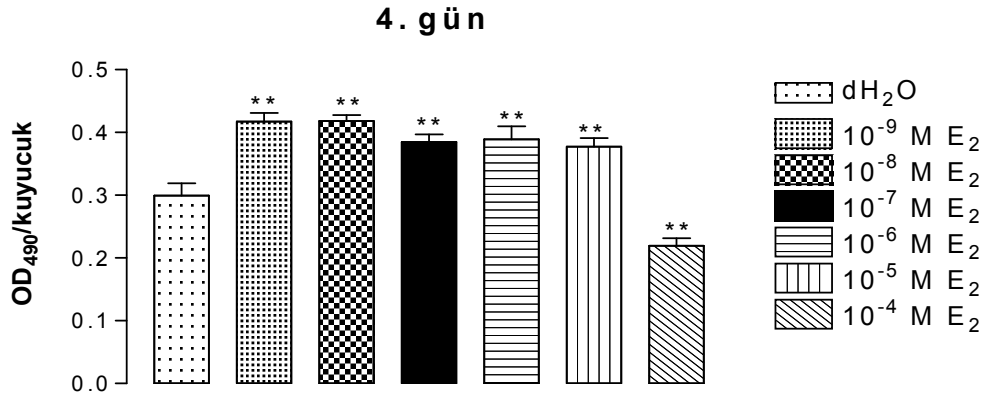
17β-Estradiol'ün Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi

17β-Estradiol'ün 0-2. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 2. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 17β-estradiol düşük konsantrasyonlarda (10^{-9} ve 10^{-8} M) değil fakat daha yüksek konsantrasyonlarda (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) adiposit diferansiyasyonunu azalttı (Şekil 17).



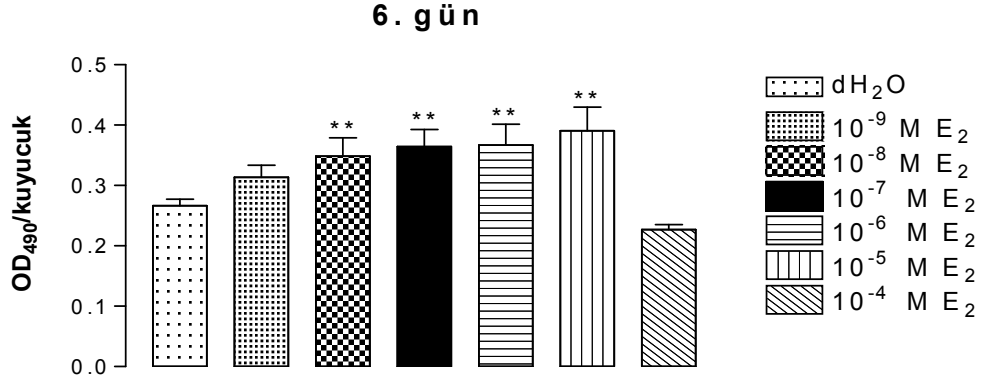
Şekil 17. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17β-estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücelere 48 saat (2 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$.

17 β -Estradiol'ün 0-4. gündeeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 4. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 4 gün süre ile uygulanan 17 β -estradiol 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda adiposit diferansiyasyonunu artırırken, en yüksek yüksek konsantrasyonda (10^{-4} M) adiposit diferansiyasyonunu azalttığı gözlemlendi (Şekil 18).



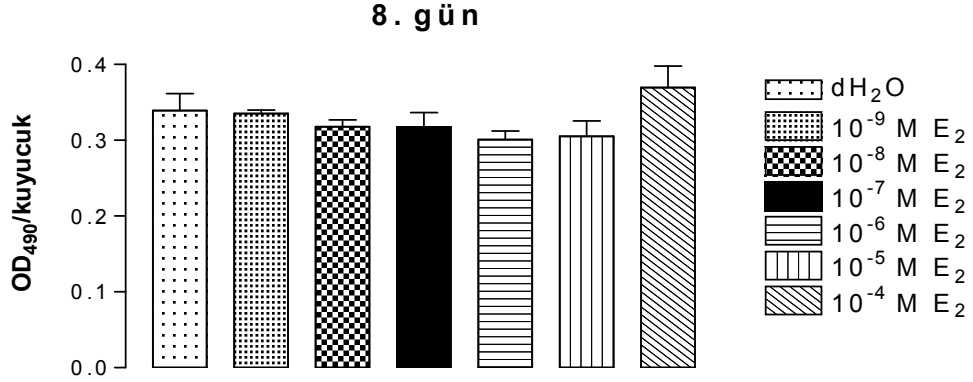
Şekil 18. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17 β -estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücelere 96 saat (4 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. **: $P < 0.01$.

17 β -Estradiol'ün 0-6. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 6. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 17 β -estradiol ara konsantrasyonlarda (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) adiposit diferansiyasyonunu arttırdı (Şekil 19).



Şekil 19. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17 β -estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücelere 144 saat (6 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama 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. **: $P < 0.01$.

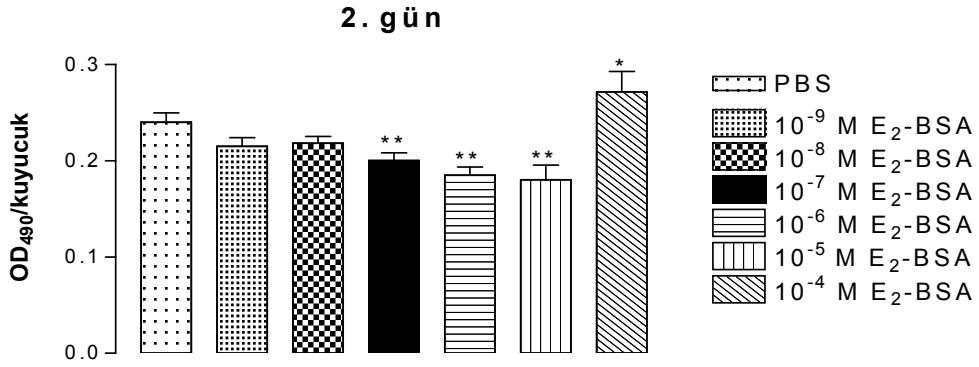
17 β -Estradiol'ün 0-8. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda 17 β -estradiol adiposit diferansiyasyonu üzerine anlamlı etki göstermedi (Şekil 20).



Şekil 20. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17 β -estradiol (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücelere 192 saat (8 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama 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.

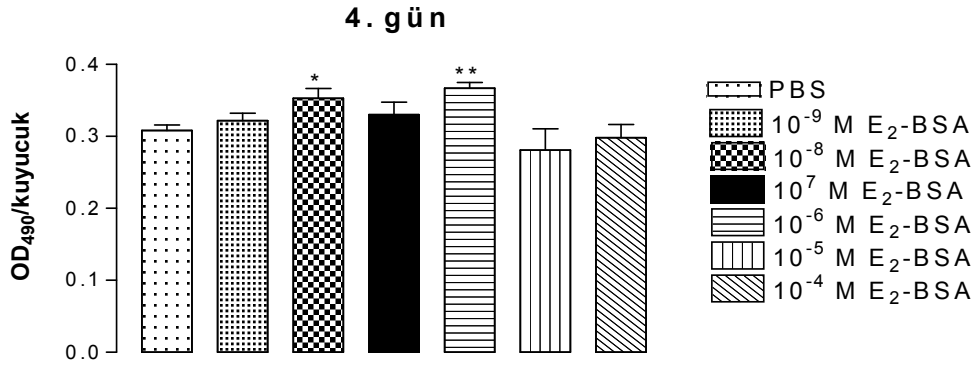
17β-Estradiol 6-(0-Carboxy-Methyl) oxime: BSA'nın Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi

Estradiol-BSA'nın 0-2. gündeki etkisi: Hücre içine giremeyen bir estrogen analogu olan sığır serum albumini (BSA) ile konjuge edilmiş estradiol'ün 3T3-L1 hücre diferansiyasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla preadipositler 2 gün boyunca estradiol-BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) ile muamele edildi. E₂-BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. E₂-BSA 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda adiposit diferansiyasyonunu azaltırken, yüksek konsantrasyonda (10^{-4} M) arttırdı (Şekil 21).



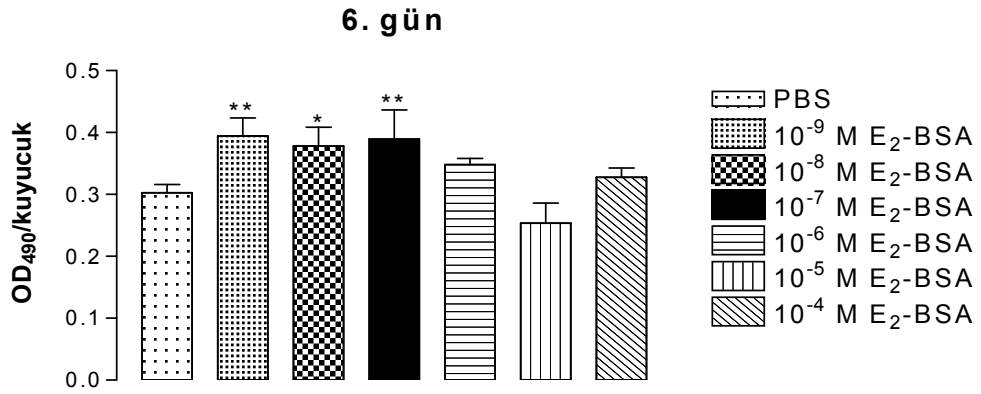
Şekil 21. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücrelere 48 saat (2 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$.

Estradiol-BSA'nın 0-4. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 4. güne kadar uygulanan estradiol-BSA'nın (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 10^{-8} ve 10^{-6} M estradiol-BSA adiposit diferansiyasyonunu artırırken diğer konsantrasyonlarda (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) anlamlı etki görülmedi (Şekil 22).



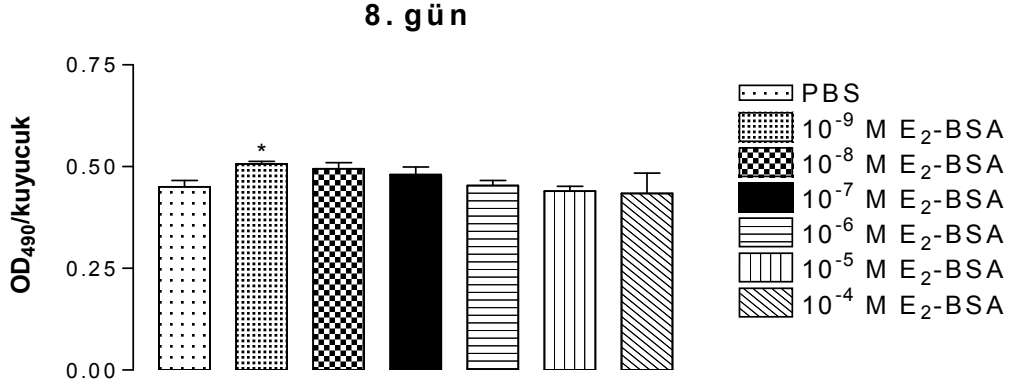
Şekil 22. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücelere 96 saat (4 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$.

Estradiol-BSA'nın 0-6. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 6. güne kadar uygulanan estradiol-BSA'nın (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. Estradiol-BSA düşük konsantrasyonlarda (10^{-9} , 10^{-8} ve 10^{-7} M) adiposit diferansiyasyonunu artırırken, diğer konsantrasyonlarda (10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) etki görülmedi (Şekil 23).



Şekil 23. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda hücelere 144 saat (6 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$.

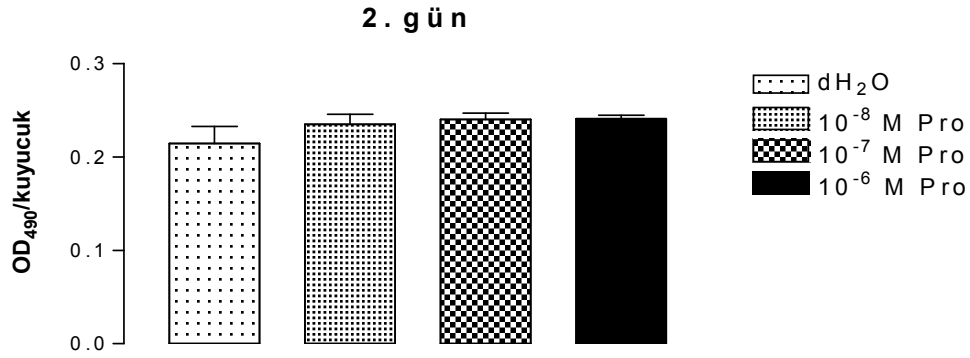
Estradiol-BSA'nın 0-8. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 8. güne kadar uygulanan estradiol-BSA'nın (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 10^{-9} M E₂-BSA adiposit diferansiyasyonunu artırırken, diğer konsantrasyonlarda (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) etki görülmedi (Şekil 24).



Şekil 24. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) hücelere 192 saat (8 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama 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. *: $P < 0.05$.

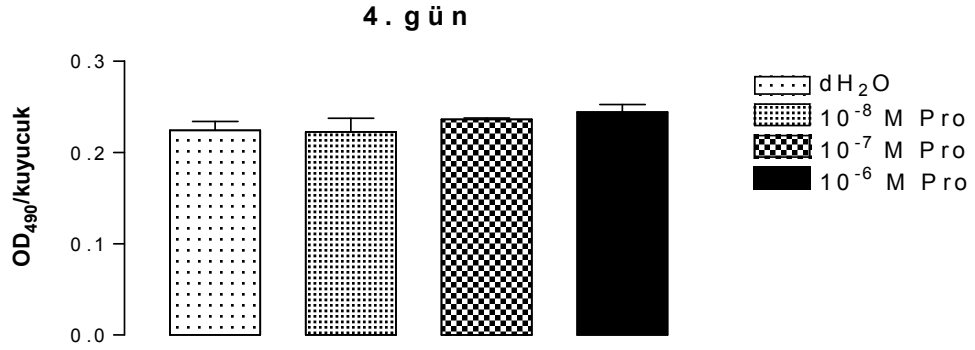
Progesteronun Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi

Progesteronun 0-2. gündeki etkisi: Post-konfluent hücrelere 0. günden 2. güne kadar uygulanan progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda progesteron, adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil 25).



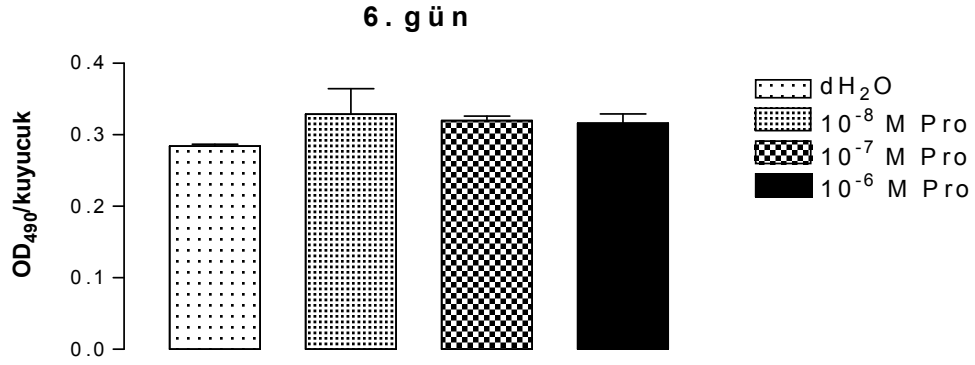
Şekil 25. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) hücrelere 48 saat (2 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

Progesteronun 0-4. gündeki etkisi: Post-konfluent hücrelere 0. günden 4. güne kadar uygulanan progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda progesteron adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil 26).



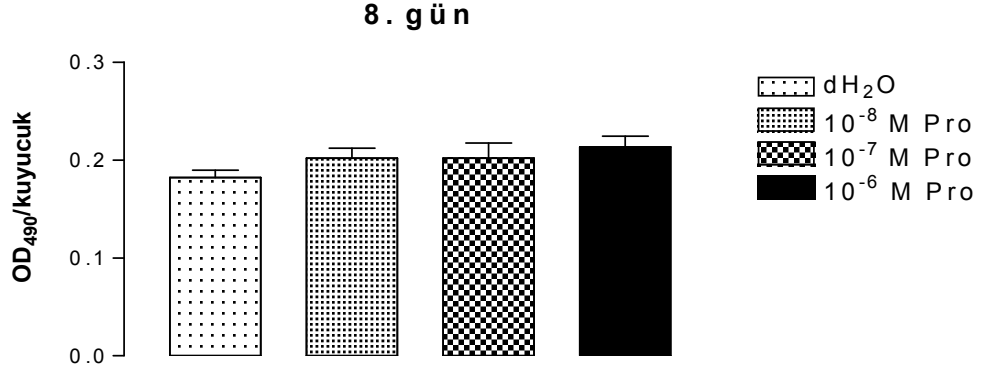
Şekil 26. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) hücrelere 96 saat (4 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

Progesteronun 6. gündeki etkisi: Post-konfluent hücrelere 0. günden 6. güne kadar uygulanan progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda progesteron, adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil 27).



Şekil 27. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) hücrelere 144 saat (6 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama 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.

Progesteronun 0-8. gündeki etkisi: Post-konfluent hücelere 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi.. Uygulanan konsantrasyonlarda progesteron, adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil 28).



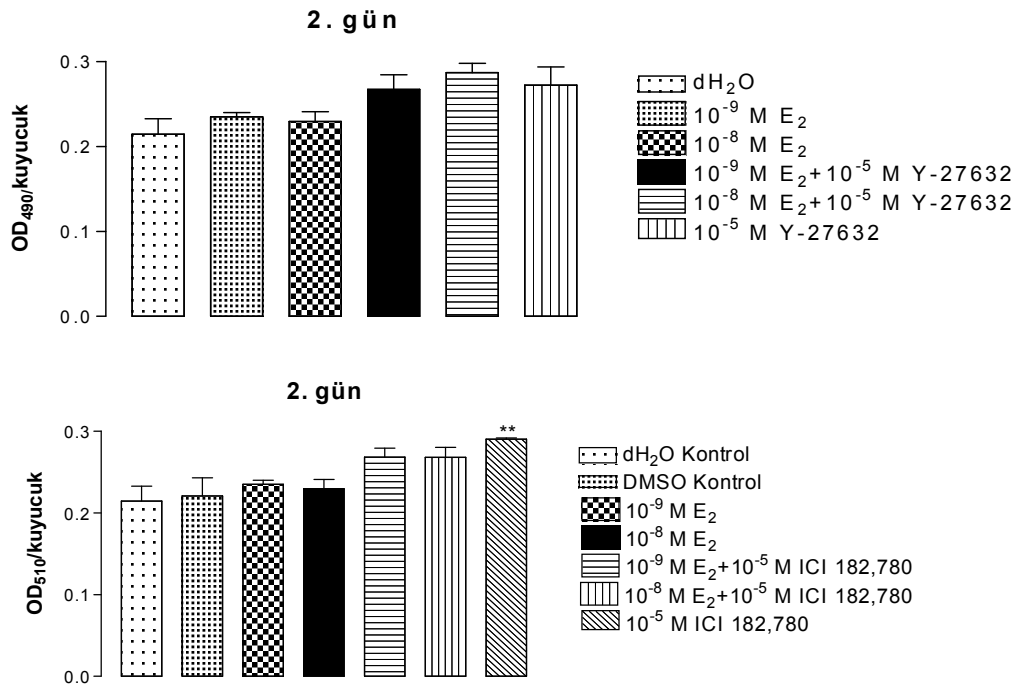
Şekil 28. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) hücelere 192 saat (8 gün) süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

17β-Estradiol ve Kombinasyonlarının Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi

17β-estradiol ve kombinasyonlarının 0-2. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 17β-estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 2. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi.

2 gün boyunca uygulanan 17β-estradiol, Y-27632 ve kombinasyonu adiposit diferansiyasyonu üzerine etki oluşturmadı.

17β-estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M), ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu, adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermezken, tek başına uygulanan ICI 182,780 adiposit diferansiyasyonunu arttırdı (Şekil 29).

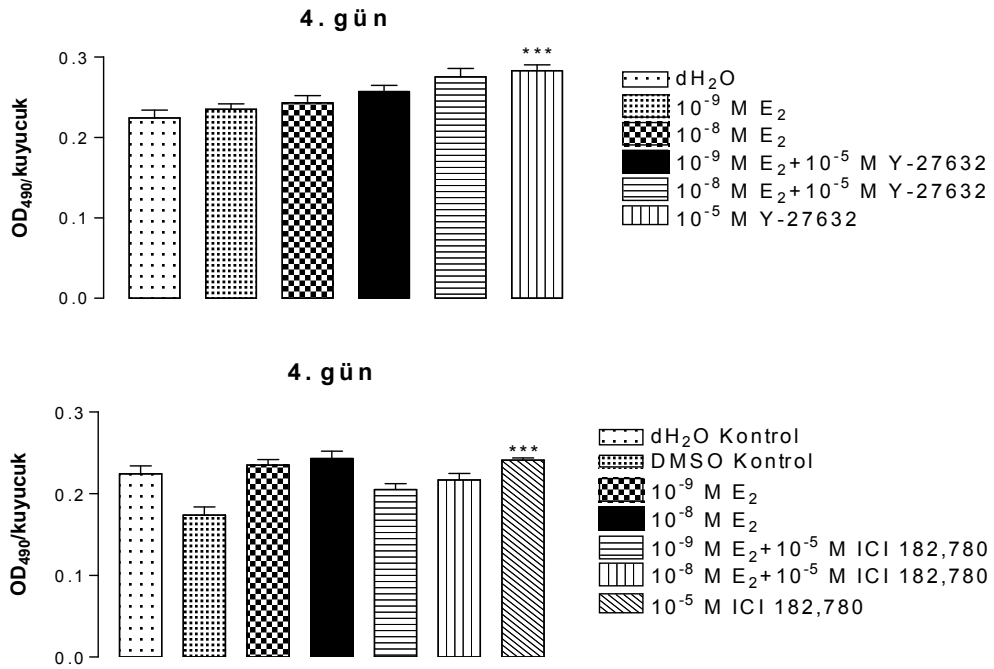


Şekil 29. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17β-estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 2 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. **: $P < 0.01$.

17 β -Estradiol ve kombinasyonlarının 0-4. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 17 β -estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 4. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi.

17 β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonu adiposit diferansiyasyonunu üzerine etki oluşturmazken, tek başına uygulanan Y-27632 (10^{-5} M) adiposit diferansiyasyonunu arttırdı.

Diğer taraftan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M), ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu, adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermezken, tek başına uygulanan ICI 182,780 adiposit diferansiyasyonunu arttırdı (Şekil 30).

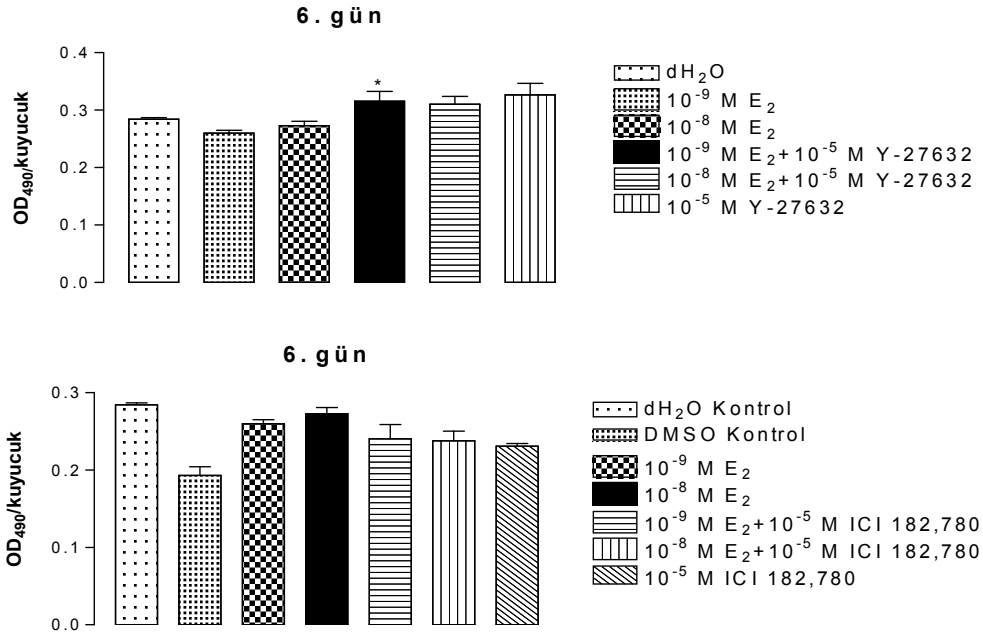


Şekil 30. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17 β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 4 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. ***: $P < 0.001$.

17 β -Estradiol ve Kombinasyonlarının 0-6. günde etkisi Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 17 β -estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 6. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi.

10^{-9} M 17 β -estradiol'ün Y-27632 (10^{-5} M) ile kombinasyonu adiposit diferansiyasyonunu artırırken, tek başına Y-27632 adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi.

17 β -estradiol, ICI 182,780 ve kombinasyonu adiposit diferansiyasyonu üzerine bir etki oluşturmadı (Şekil 31).

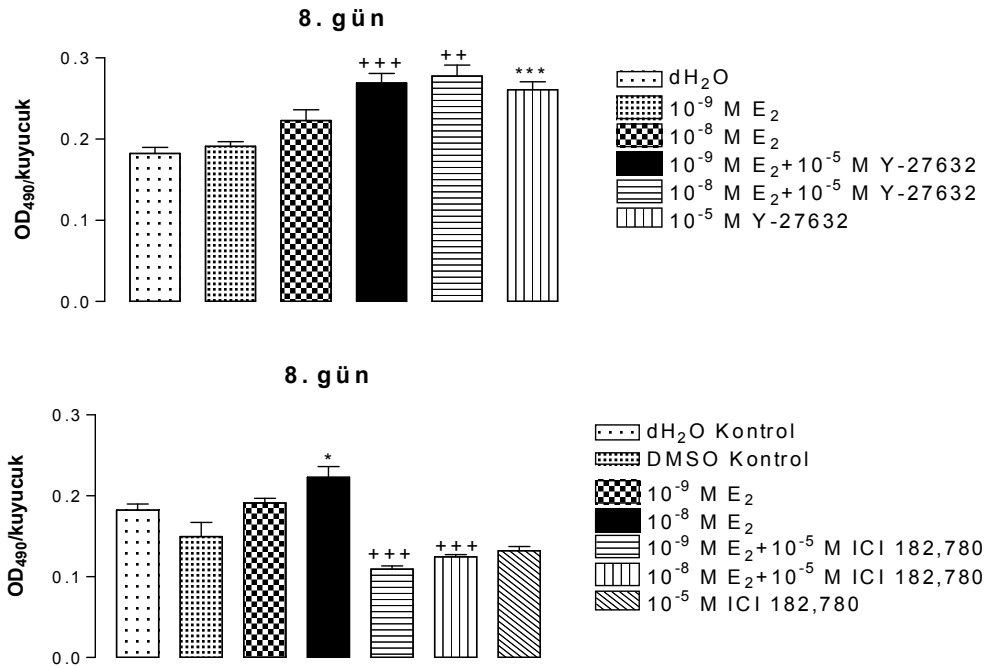


Şekil 31. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17 β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 6 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$.

17 β -Estradiol ve kombinasyonlarının 0-8. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 17 β -estradiolün (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 8. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi.

17 β -estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M) Y-27632 (10^{-5} M) ile kombinasyonu ve tek başına uygulanan Y-27632 (10^{-5} M) adiposit diferansiyasyonunu arttırdı.

10^{-8} M 17 β -estradiol uygulanması adiposit diferansiyasyonunu artırırken, 17 β -estradiol'ün (10^{-9} ve 10^{-8} M), ICI 182,780 ile kombinasyonu adiposit diferansiyasyonun azalttı. ICI 182,780'nin tek başına uygulanması adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi (Şekil 32).

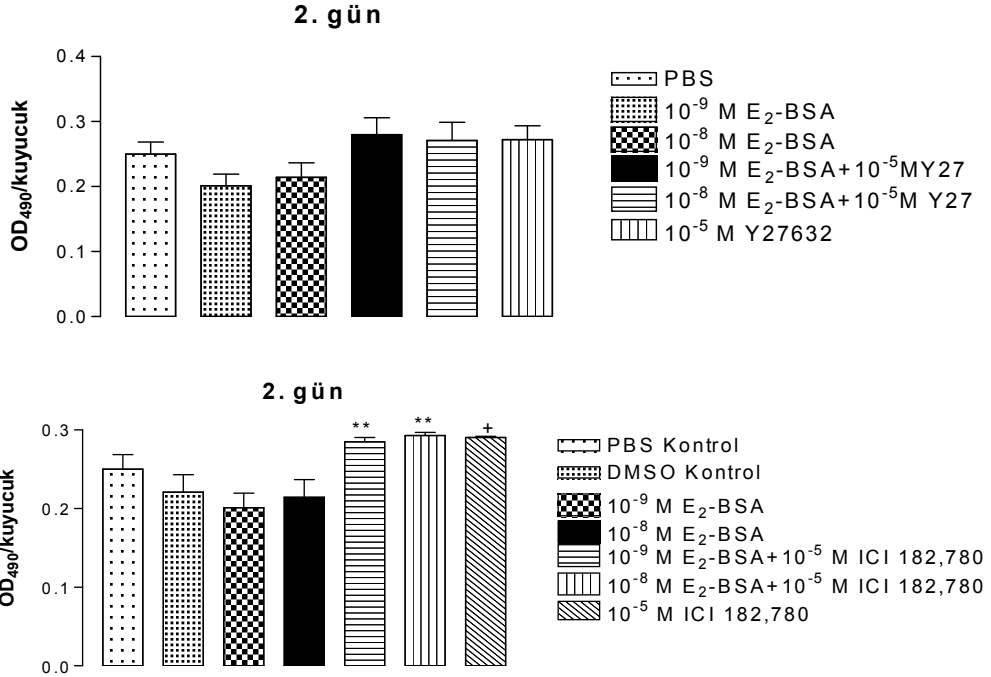


Şekil 32. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, 17 β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 8 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$.

17β-Estradiol 6-(0-carboxy-methyl) oxime: BSA'nın ve Kombinasyonlarının Adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi

Estradiol-BSA ve kombinasyonlarının 0-2. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 2. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Estradiol-BSA, Y-27632 ve kombinasyonu adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermedi.

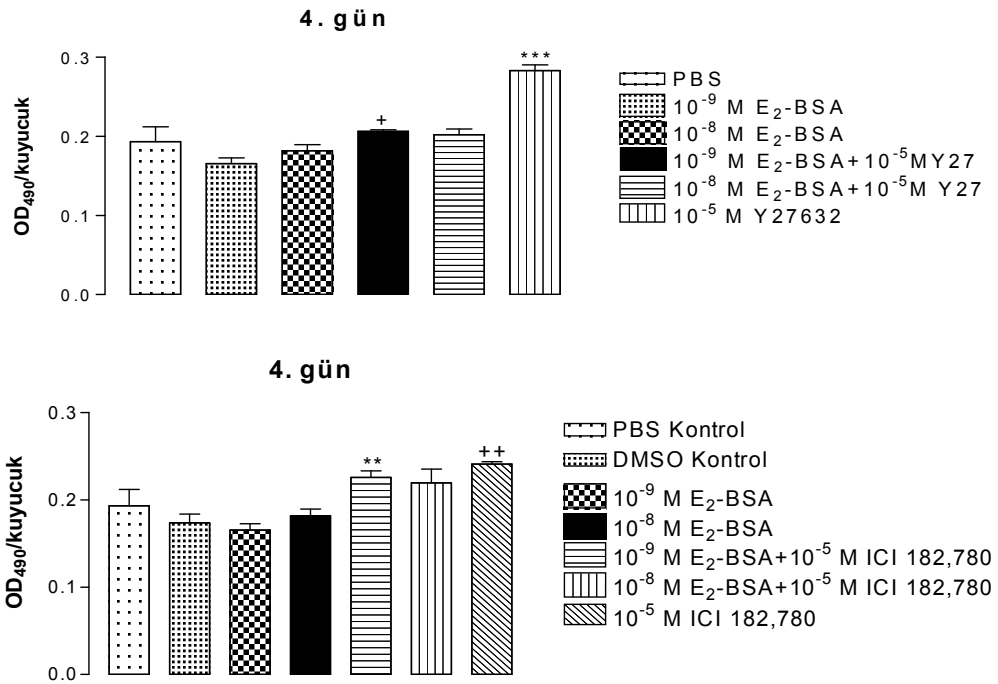
Estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) kombinasyonu ve tek başına uygulanan ICI 182,780 (10^{-5} M) adiposit diferansiyasyonunu arttırdı (Şekil 33).



Şekil 33. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 2 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$.

Estradiol-BSA ve Kombinasyonlarının 0-4. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) veya ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 4. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M) bir etki oluşturmadı. 10^{-9} M E-BSA ve 10^{-5} M Y-27632 kombinasyonu ve Y-27632'nin tek başına uygulanması adiposit diferansiyasyonu arttırdı.

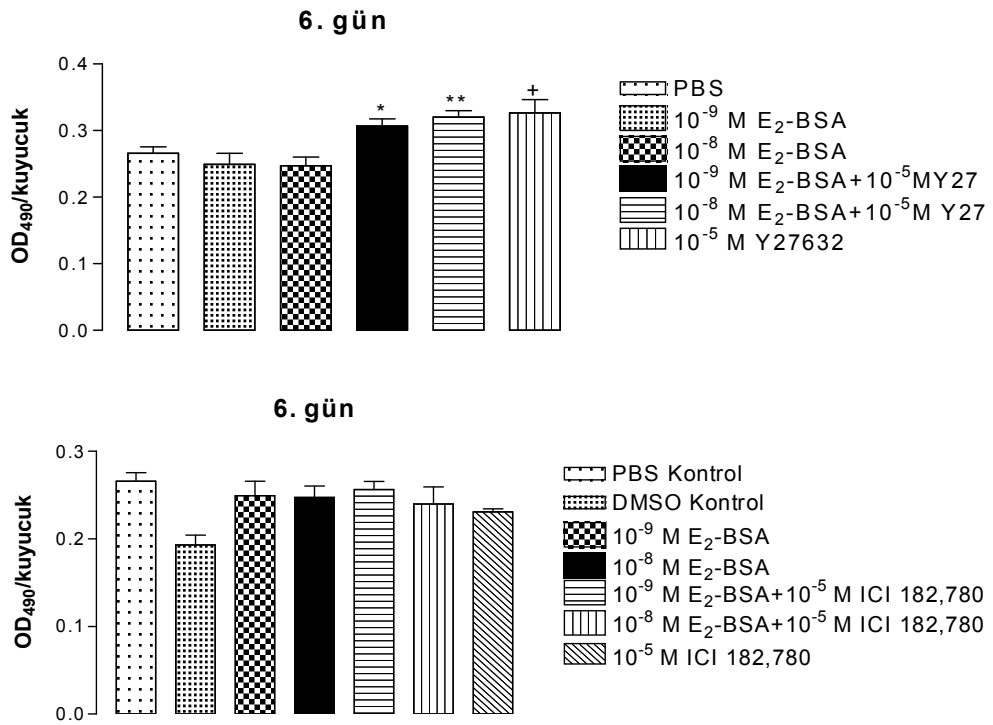
E-BSA (10^{-9} M) ve ICI 182,780'nin (10^{-5} M) birlikte ve ICI 182,780'nin tek başına uygulanması adiposit diferansiyasyonunu arttırdı (Şekil 34).



Şekil 34. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 4 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$.

Estradiol-BSA ve Kombinasyonlarının 0-6. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) veya ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 6. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Uygulanan konsantrasyonlarda (10^{-9} ve 10^{-8} M) estradiol-BSA bir etki oluşturmadı. E₂-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonu, Y-27632 (10^{-5} M) tek başına adiposit diferansiyasyonunu arttırdı.

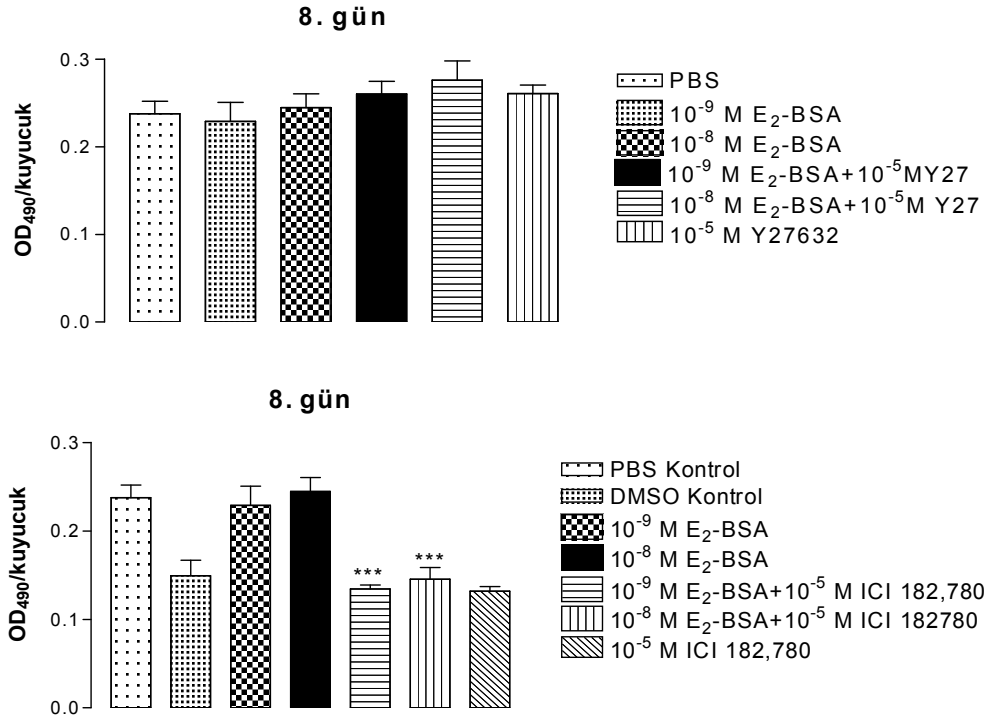
ICI 182,780'nin tek başına ve estradiol-BSA ile birlikte uygulanması adiposit diferansiyasyonu üzerine etki oluşturmadı (Şekil 35).



Şekil 35. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 6 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$.

Estradiol-BSA ve Kombinasyonlarının 0-8. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) ile kombinasyonu 0. günden 8. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Estradiol-BSA, Y-27632 ve kombinasyonu adiposit diferansiyasyonu üzerine etki oluşturmadı.

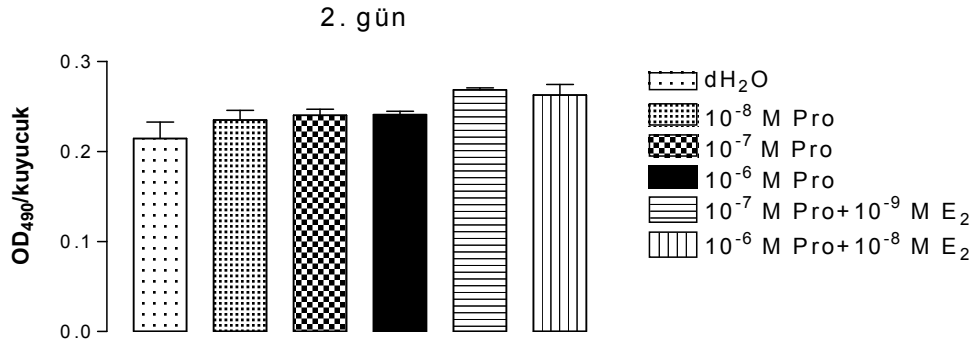
Estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) kombinasyonu adiposit diferansiyasyonunu azalttı (Şekil 36).



Şekil 36. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe, estradiol-BSA (10^{-9} ve 10^{-8} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 8 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. ***: $P < 0.001$.

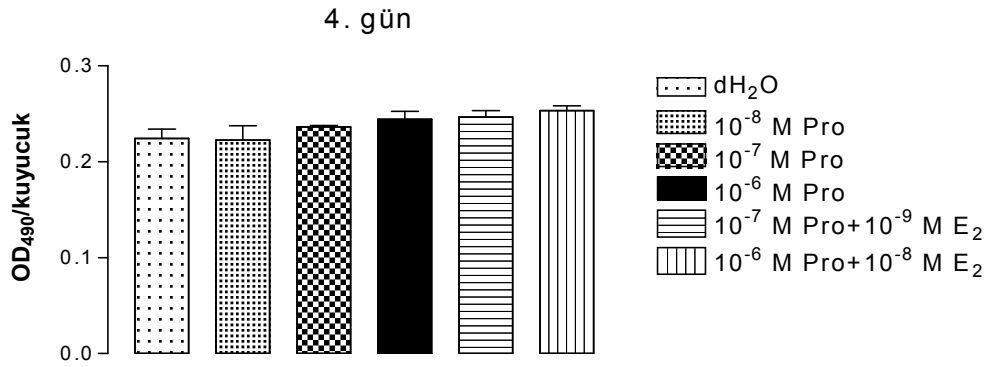
Progesteron ve Kombinasyonlarının Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi

Progesteron ve kombinasyonlarının 0-2. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) kombinasyonu 0. günden 2. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) ile kombinasyonunun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi görülmedi (Şekil 37).



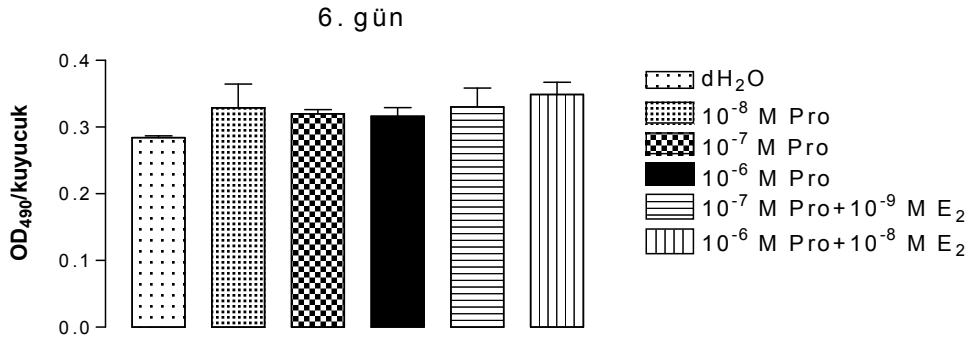
Şekil 37. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 2 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

Progesteron ve kombinasyonlarının 0-4. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) kombinasyonu 0. günden 4. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) ile kombinasyonunun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi görülmedi (Şekil 38).



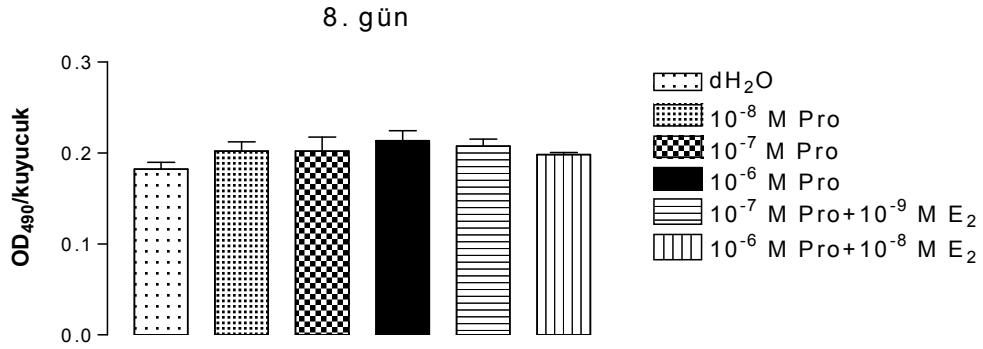
Şekil 38. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-7} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 4 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

Progesteron ve Kombinasyonlarının 0-6. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) kombinasyonu 0. günden 6. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) ile kombinasyonunun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi görülmedi (Şekil 39).



Şekil 39. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-7} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 6 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

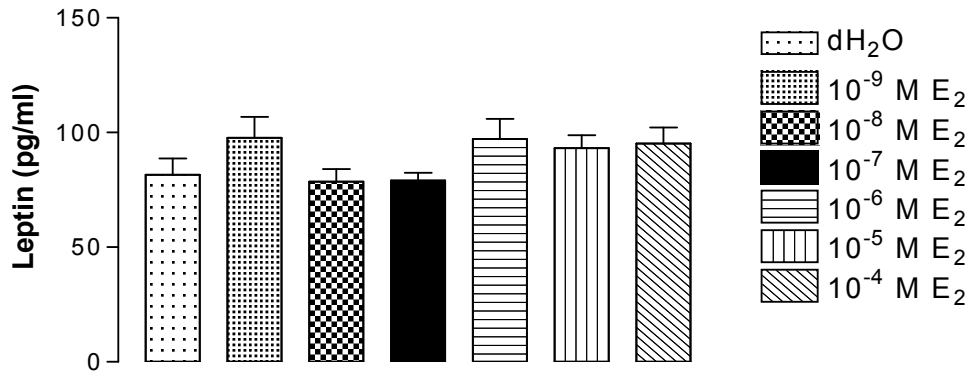
Progesteron ve Kombinasyonlarının 0-8. gündeki etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) kombinasyonu 0. günden 8. güne kadar uygulandı ve bu kombinasyonun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Progesteronun (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M) ile kombinasyonunun adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi görülmedi (Şekil 40).



Şekil 40. 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M), 17β -estradiol (10^{-9} ve 10^{-7} M) tek başlarına ve birlikte hücrelere 8 gün süreyle uygulandı (n=4). Takiben adiposit diferansiyasyonu Oil red O boyama ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

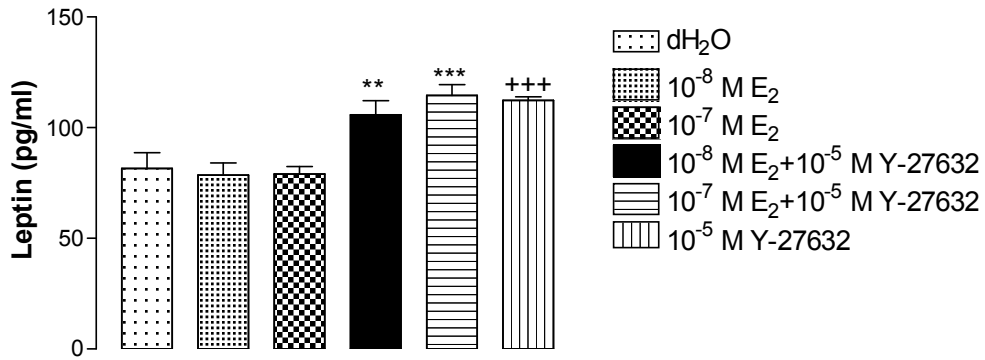
ESTROJEN VE PROGESTERONUN ADİPOZİTOKİN SALIVERİLMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ELISA YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

17 β -Estradiol'ün Leptin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) leptin saliverilmesi üzerine etkisi, leptine özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol, test edilen konsantrasyonların hiç birinde leptin saliverilmesi üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 42).



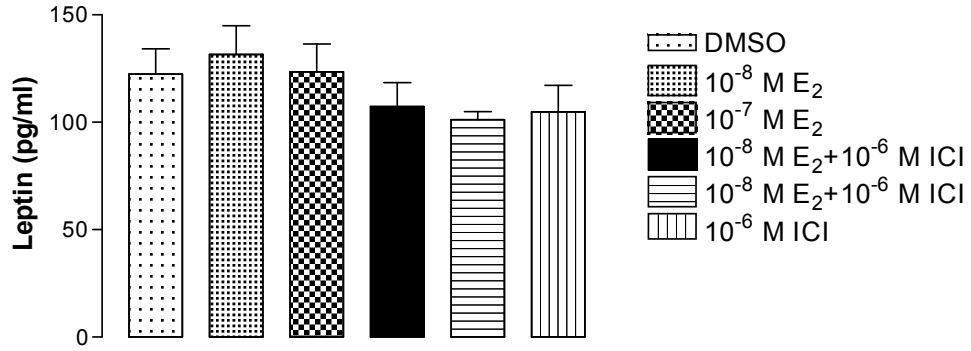
Şekil 42. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) leptin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

17 β -Estradiol ile Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Olan Y-27632 Kombinasyonunun Leptin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) leptin saliverilmesi üzerine etkisi selektif bir Rho-kinaz enzim inhibitörü olan Y-27632 (10^{-5} M) varlığında ve yokluğunda, leptine özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M), Y-27632 kombinasyonu ve tek başına uygulanan Y-27632 leptin düzeylerini arttırdı (Şekil 42).



Şekil 42. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve bunların kombinasyonunun leptin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. **: $P < 0.01$.***: $P < 0.001$.

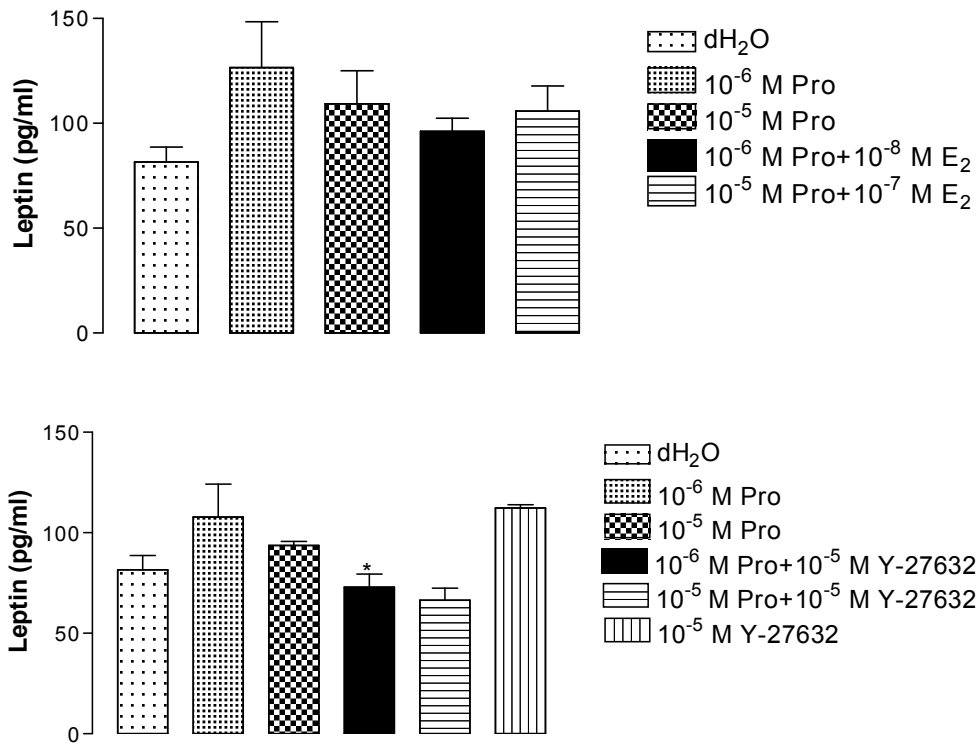
17 β -Estradiol ile Estrojen Reseptör Blokörü ICI 182,780 kombinasyonunun Leptin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) leptin saliverilmesi üzerine etkisi selektif estrojen reseptör blokörü olan ICI 182,780 (10^{-6} M) varlığında ve yokluğunda, leptine özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-6} M) ve kombinasyonu leptin saliverilmesi üzerine bir etki oluşturmadı (Şekil 43).



Şekil 43. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-6} M) ve bunların kombinasyonunun leptin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

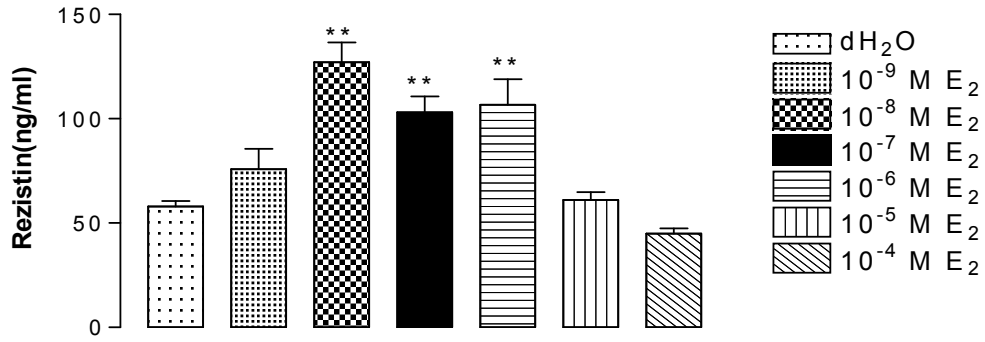
Progesteronun Leptin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun leptin saliverilmesi üzerine etkisi, leptine özgü kitler ile değerlendirildi.

Progesteron ve 17β -estradiol kombinasyonu leptin saliverilmesi üzerine etki göstermezken, progesteronun (10^{-6} M), Y-27632 ile kombinasyonu leptin düzeylerini azalttı (Şekil 44).



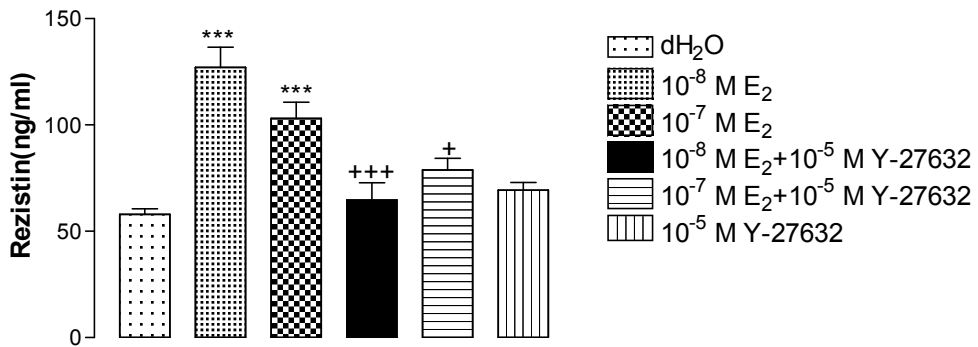
Şekil 44. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun leptin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$.

17β-Estradiol'ün Rezistin Salıverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) rezistin salıverilmesi üzerine etkisi, rezistine özgü kitler ile değerlendirildi. 17β-estradiol, 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda rezistin salıverilmesini artırırken, diğer konsantrasyonlarda (10^{-9} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 45).



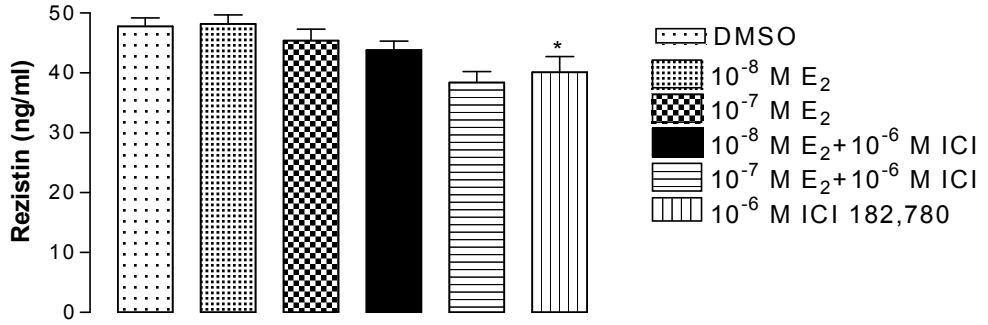
Şekil 45. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) rezistin salıverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. **: $P < 0.01$.

17 β -Estradiol ile Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Olan Y-27632 Kombinasyonunun Rezistin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) rezistin saliverilmesi üzerine etkisi, selektif bir Rho-kinaz enzim inhibitörü olan Y-27632 (10^{-5} M) varlığında ve yokluğunda, rezistine özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M) uygulanması ile artmış olan rezistin düzeylerini, Y-27632 (10^{-5} M) uygulanması ile azaldığı gözlemlendi (Şekil 46).



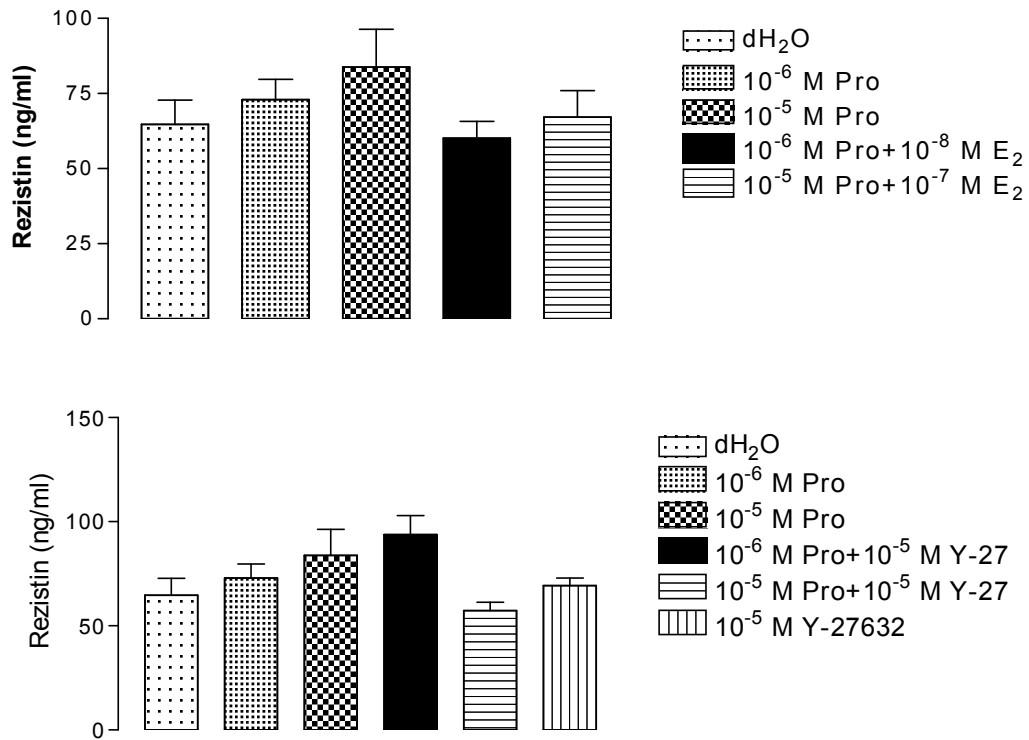
Şekil 46. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve bunların kombinasyonu rezistin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. ***: $P < 0.001$.

17 β -Estradiol ile Estrojen Reseptör Blokörü ICI 182,780 kombinasyonunun Rezistin Salıverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) rezistin salıverilmesi üzerine etkisi, selektif estrojen reseptör blokörü olan ICI 182,780 (10^{-5} M) varlığında ve yokluğunda, rezistine özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) kombinasyonu rezistin düzeylerini üzerine etki göstermezken, ICI 182,780'in tek başına uygulanması rezistin düzeylerini azalttı (Şekil 47).



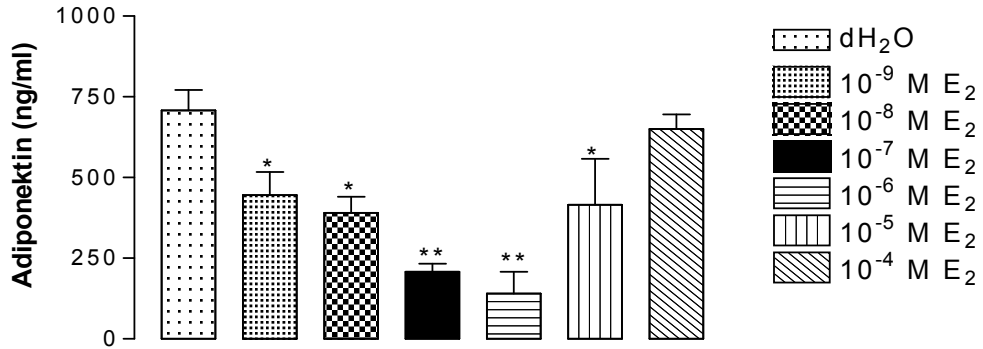
Şekil 47. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-5} M) ve bunların kombinasyonunun rezistin salıverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$.

Progesteronun Rezistin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun rezistin saliverilmesi üzerine etkisi, rezistine özgü kitler ile değerlendirildi. Progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M) tek başına veya 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve Y-27632 ile birlikte rezistin saliverilmesi üzerine etki oluşturmadı (Şekil 48).



Şekil 48. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun rezistin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

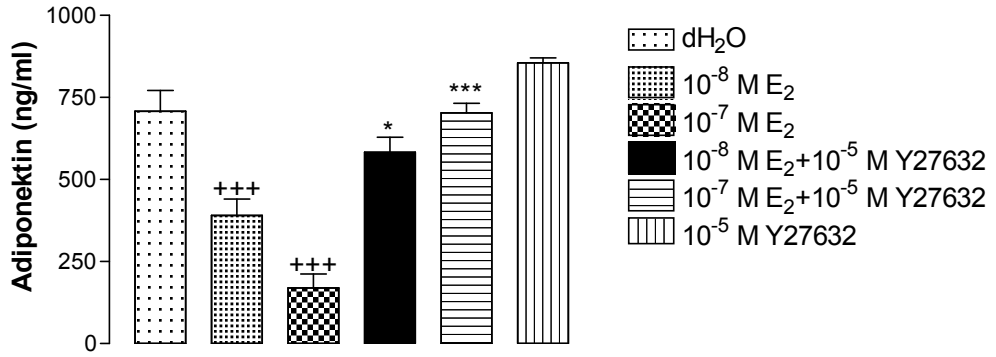
17 β -Estradiol'ün Adiponektin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi, adiponektine özgü kitler ile değerlendirildi. 10^{-4} M hariç 17 β -estradiol diğer konsantrasyonlarda adiponektin düzeylerini azalttı (Şekil 49).



Şekil 49. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$.

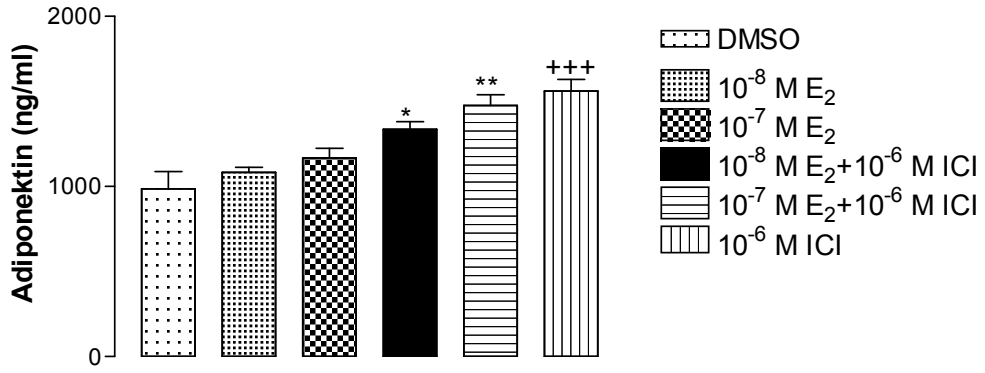
17β-Estradiol ile Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632

Kombinasyonunun Adiponektin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi, selektif bir Rho-kinaz enzim inhibitörü olan Y-27632 (10^{-5} M) varlığında ve yokluğunda, adiponektine özgü kitler ile değerlendirildi. Adiponektin saliverilmesini azaltan 17β-estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) ile kombinasyonu bu etkiyi geri döndererek adiponektin düzeylerini arttırdı (Şekil 50).



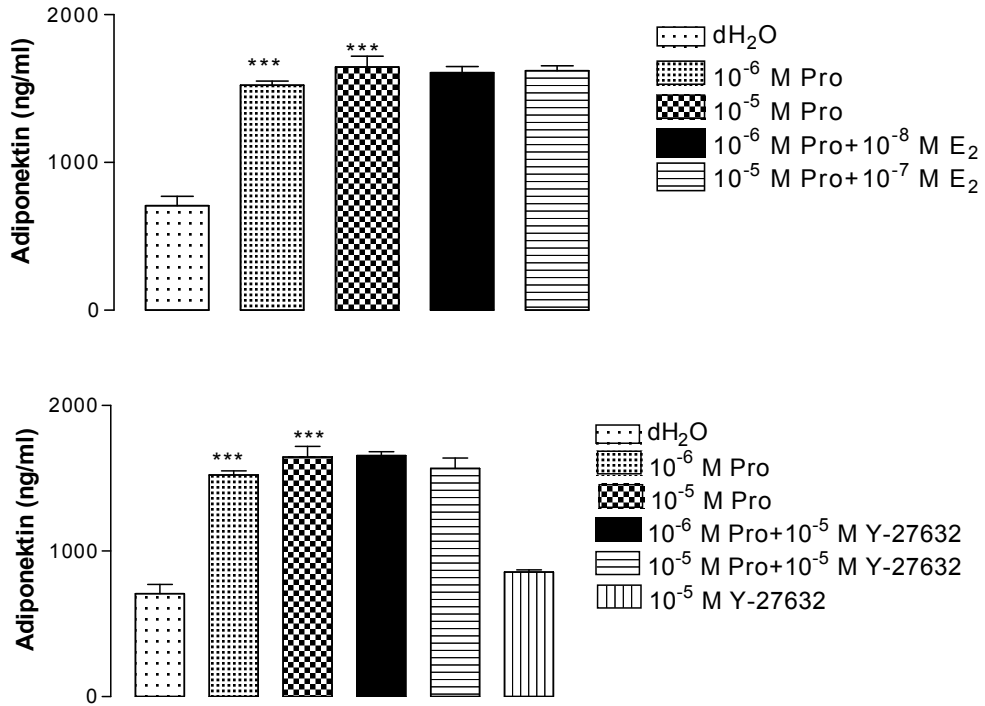
Şekil 50. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve kombinasyonunun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı *: $P < 0.05$ ***: $P < 0.001$.

17 β -Estradiol ile Estrojen Reseptör Blokörü ICI 182,780 kombinasyonunun Adiponektin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi, selektif estrojen reseptör blokörü olan ICI 182,780 (10^{-6} M) varlığında ve yokluğunda, adiponektine özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M) ve ICI 182,780 (10^{-6} M) kombinasyonu ve ICI 182,780'nin tek başına uygulanması adiponektin saliverilmesini arttırdığı gözlemlendi (Şekil 51).



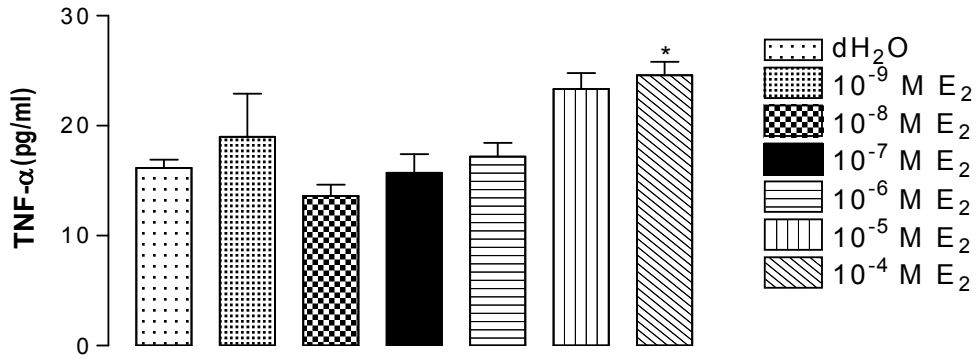
Şekil 51. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-6} M) ve bunların kombinasyonunun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$.

Progesteronun Adiponektin Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi, adiponektine özgü kitler ile değerlendirildi. Progesteron uygulanan konsantrasyonlarda adiponektin düzeylerini anlamlı olarak arttırırken, 17β -estradiol ve Y-27632 ile kombinasyonu bu etkiyi değiştirmede (şekil 52).



şekil 52. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun adiponektin saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. ***: $P < 0.001$.

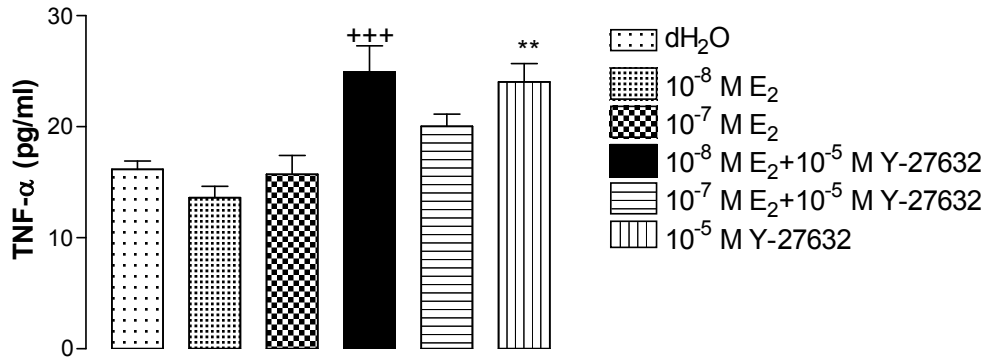
17β-Estradiol'ün TNF-α Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) TNF-α saliverilmesi üzerine etkisi, bu sitokine özgü kitler ile değerlendirildi. 17β-estradiol 10^{-4} M hariç test edilen konsantrasyonların hiç birinde TNF-α saliverilmesi üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 53).



Şekil 53. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) TNF-α saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$.

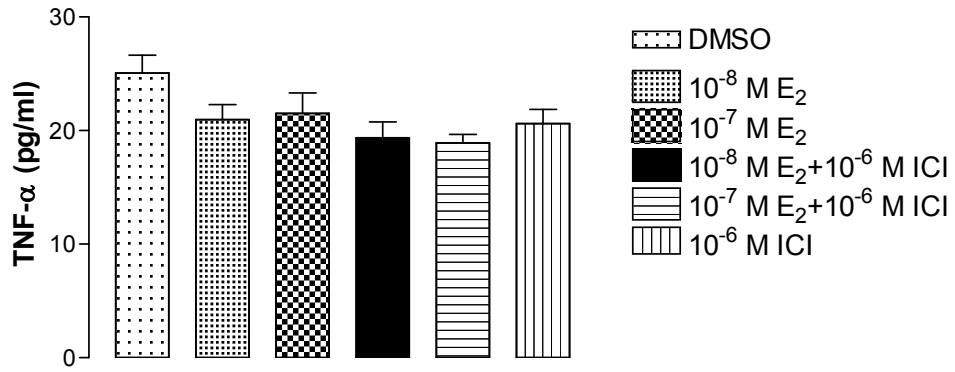
17β-Estradiol ile Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632

Kombinasyonunun TNF-α Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) TNF-α saliverilmesi üzerine etkisi, selektif bir Rho-kinaz enzim inhibitörü olan Y-27632 (10^{-5} M) varlığında ve yokluğunda, TNF-α'ya özgü kitler ile değerlendirildi. 17β-estradiol (10^{-8} M) ile Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonu ve tek başına uygulanan Y-27632 TNF-α saliverilmesini arttırdı (Şekil 54).



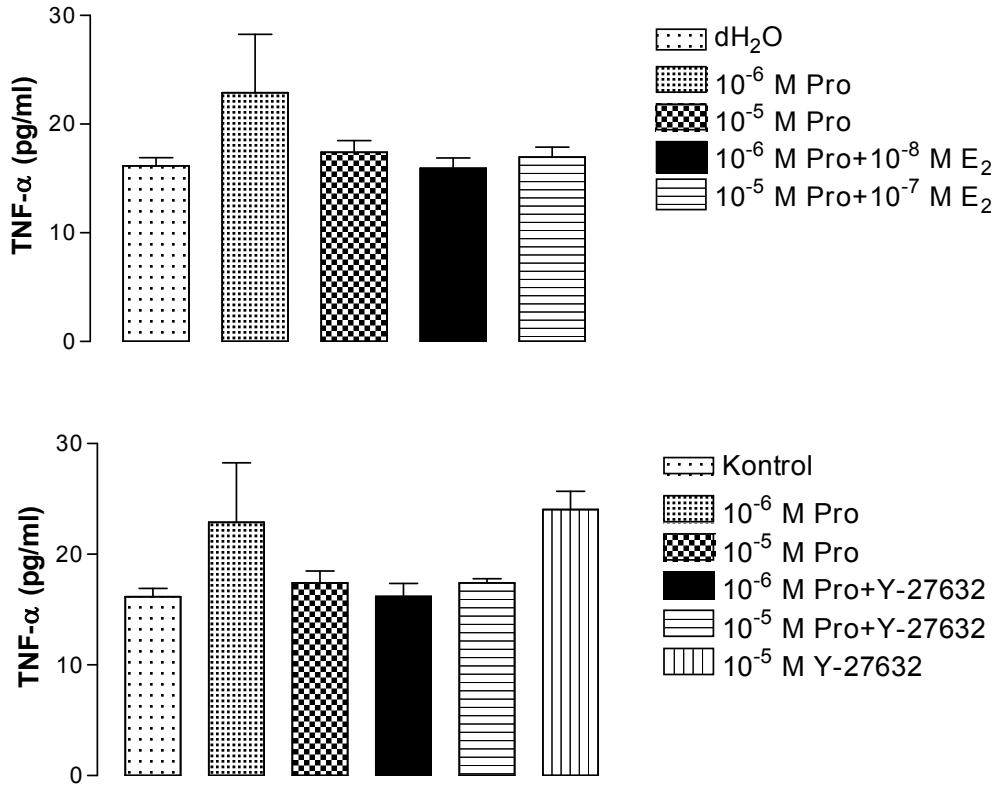
Şekil 54. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve bunların kombinasyonunun TNF-α saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. **: $P < 0.01$.***: $P < 0.001$.

17 β -Estradiol ile Estrojen Reseptör Blokörü ICI 182,780 kombinasyonunun TNF- α Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi, estrojen reseptör blokörü olan ICI 182,780 (10^{-6} M) varlığında ve yokluğunda, TNF- α 'ya özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-6} M) ve kombinasyonu TNF- α saliverilmesi üzerine bir etki oluşturmadı (Şekil 55).



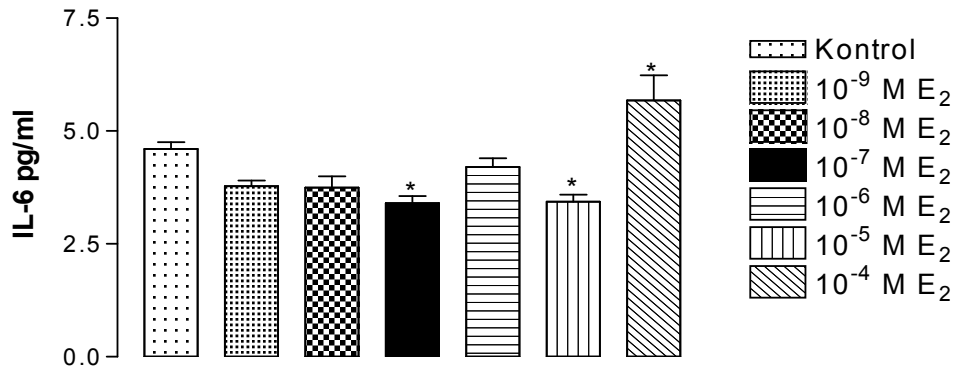
Şekil 55. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-6} M) ve bunların kombinasyonunun TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

Progesteronun TNF- α Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi, TNF- α 'ya özgü kitler ile değerlendirildi. Progesteron, 17β -estradiol ve Y-27632 kombinasyonu TNF- α saliverilmesi üzerine bir etki oluşturmadı (Şekil 56).



Şekil 56. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun TNF- α saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı.

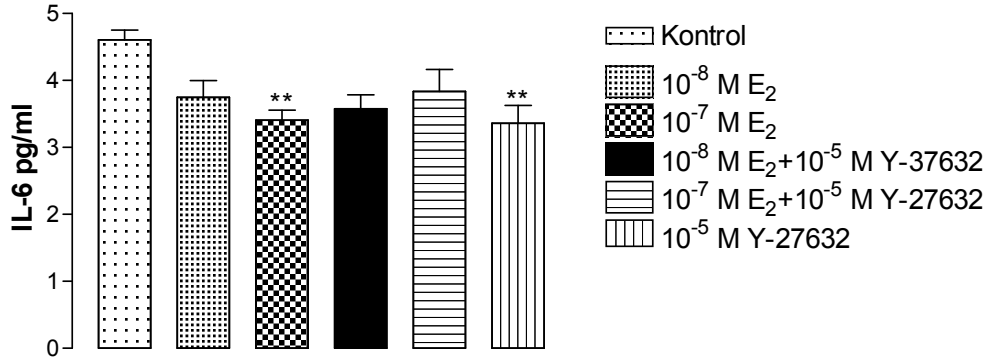
17 β -Estradiol'ün IL-6 Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) IL-6 saliverilmesi üzerine etkisi, IL-6'ya özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol, 10^{-7} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda IL-6 saliverilmesi azaltırken, 10^{-4} M konsantrasyonda arttırdı (Şekil 57).



Şekil 57. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) IL-6 saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. *: $P < 0.05$.

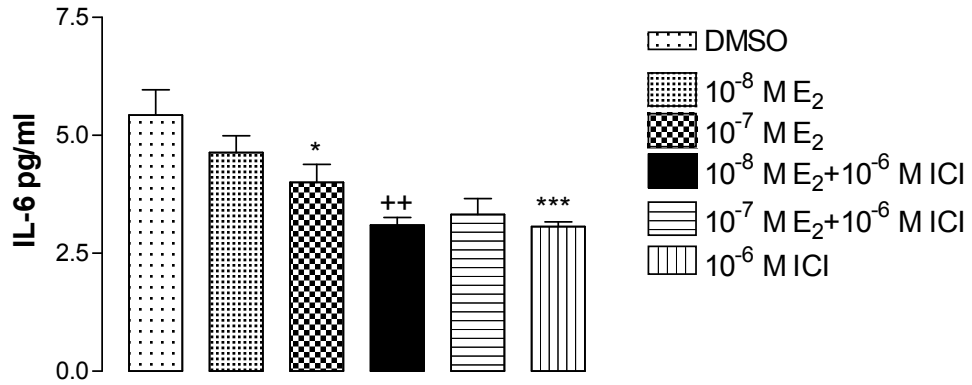
17β-Estradiol ile Rho-Kinaz Enzim İnhibitörü Y-27632

Kombinasyonunun IL-6 Salıverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi, selektif bir Rho-kinaz enzim inhibitörü olan Y-27632 (10^{-5} M) varlığında ve yokluğunda, IL-6'ya özgü kitler ile değerlendirildi. 10^{-7} M 17β-estradiol ve Y-27632 tek başına IL-6 salıverilmesini azalttı (Şekil 58).



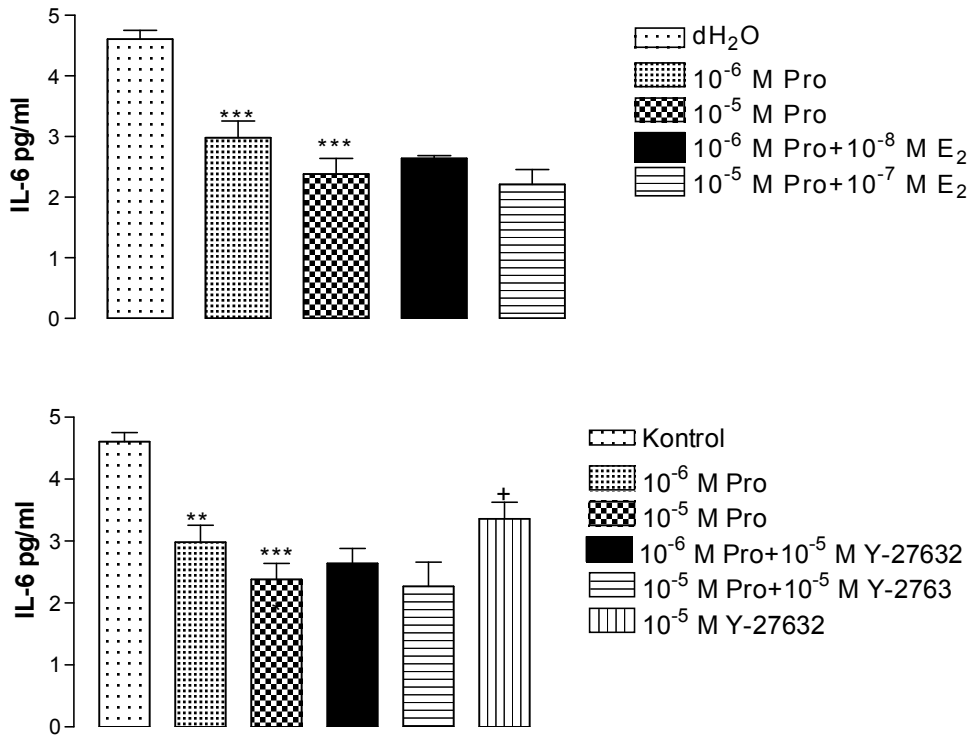
Şekil 58. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M), Y-27632 (10^{-5} M) ve kombinasyonunun IL-6 salıverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. **: $P < 0.01$.

17 β -Estradiol ile Estrojen Reseptör Blokörü ICI 182,780 kombinasyonunun IL-6 Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol'ün (10^{-8} ve 10^{-7} M) IL-6 saliverilmesi üzerine etkisi, estrojen reseptör blokörü olan ICI 182,780 (10^{-6} M) varlığında ve yokluğunda, IL-6'ya özgü kitler ile değerlendirildi. 17 β -estradiol (10^{-8} M) ve ICI 182,780 (10^{-5} M) kombinasyonu, tek başına uygulanan ICI 182,780, IL-6 düzeylerini azalttı (Şekil 59).



Şekil 59. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17 β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M), ICI 182,780 (10^{-5} M) ve bunların kombinasyonlarının IL-6 saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$.

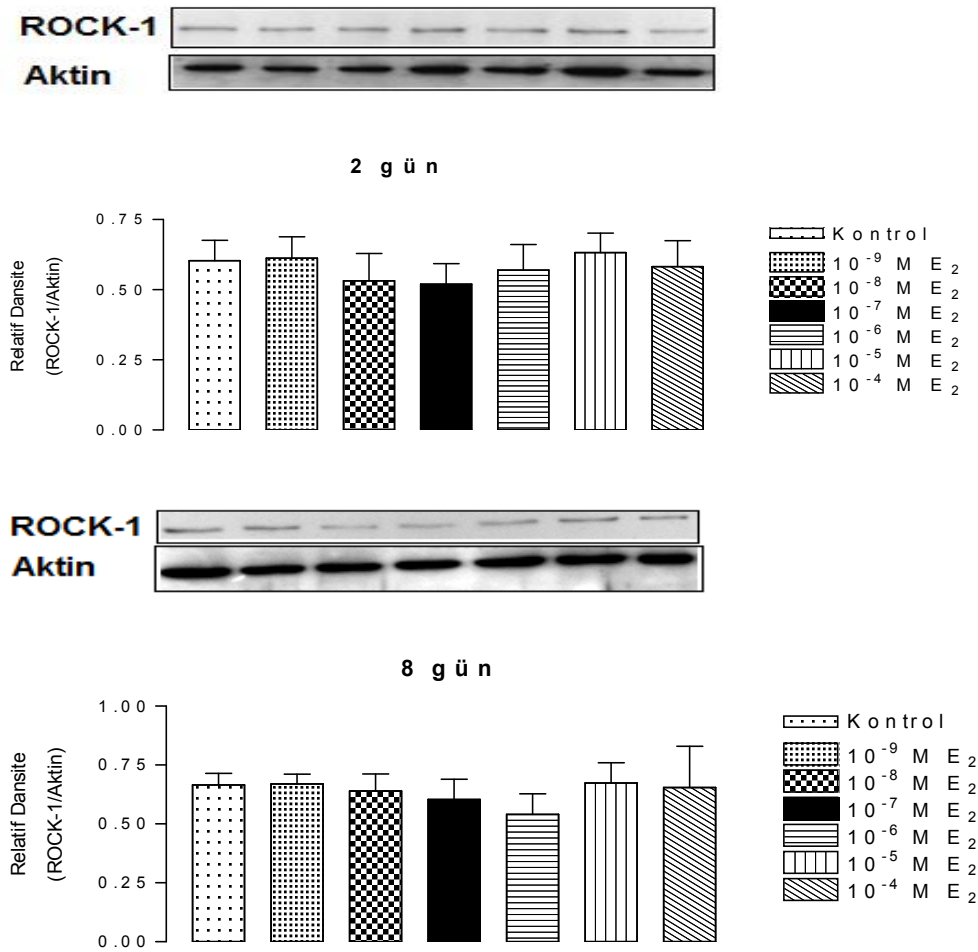
Progesteronun IL-6 Saliverilmesi Üzerine Etkisi: Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun IL-6 saliverilmesi üzerine etkisi, IL-6'ya özgü kitler ile değerlendirildi. Progesteron, uygulanan konsantrasyonlarda IL-6 düzeylerini azalttığı gözlemlendi. Bununla birlikte progesteronun, 17β -estradiol ve Y-27632 ile kombinasyonu IL-6 saliverilmesi üzerine etki göstermedi (Şekil 60).



Şekil 60. Post-konfluent 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0. günden 8. güne kadar uygulanan progesteron (10^{-6} ve 10^{-5} M), 17β -estradiol (10^{-8} M ve 10^{-7} M) ve Y-27632 (10^{-5} M) kombinasyonunun IL-6 saliverilmesi üzerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi (n=4). Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Bonferroni testi kullanıldı. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$.

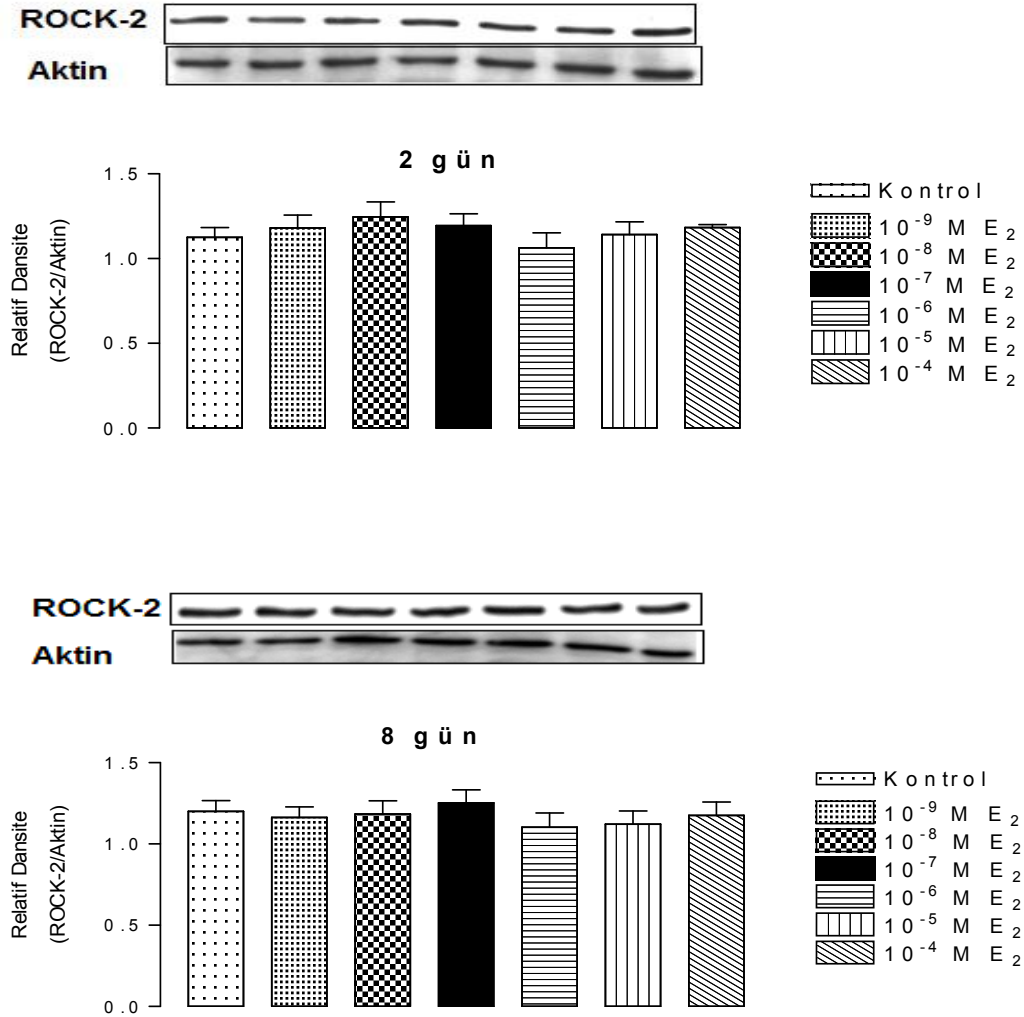
3T3-L1 PREADİPOZİTLERDE Rho A, ROCK 1 ve ROCK-2 EKSPRESYONUNUN GÖSTERİLMESİ

17 β -Estradiol'ün ROCK-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi: 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0-2 ve 0-8 gün süresince uygulanan 17 β -estradiolün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) Rho-kinaz (ROCK-1) enzim ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonlarda ve uygulanan sürede 17 β -estradiol, ROCK-1 protein düzeylerini değiştirmedir (şekil 61).



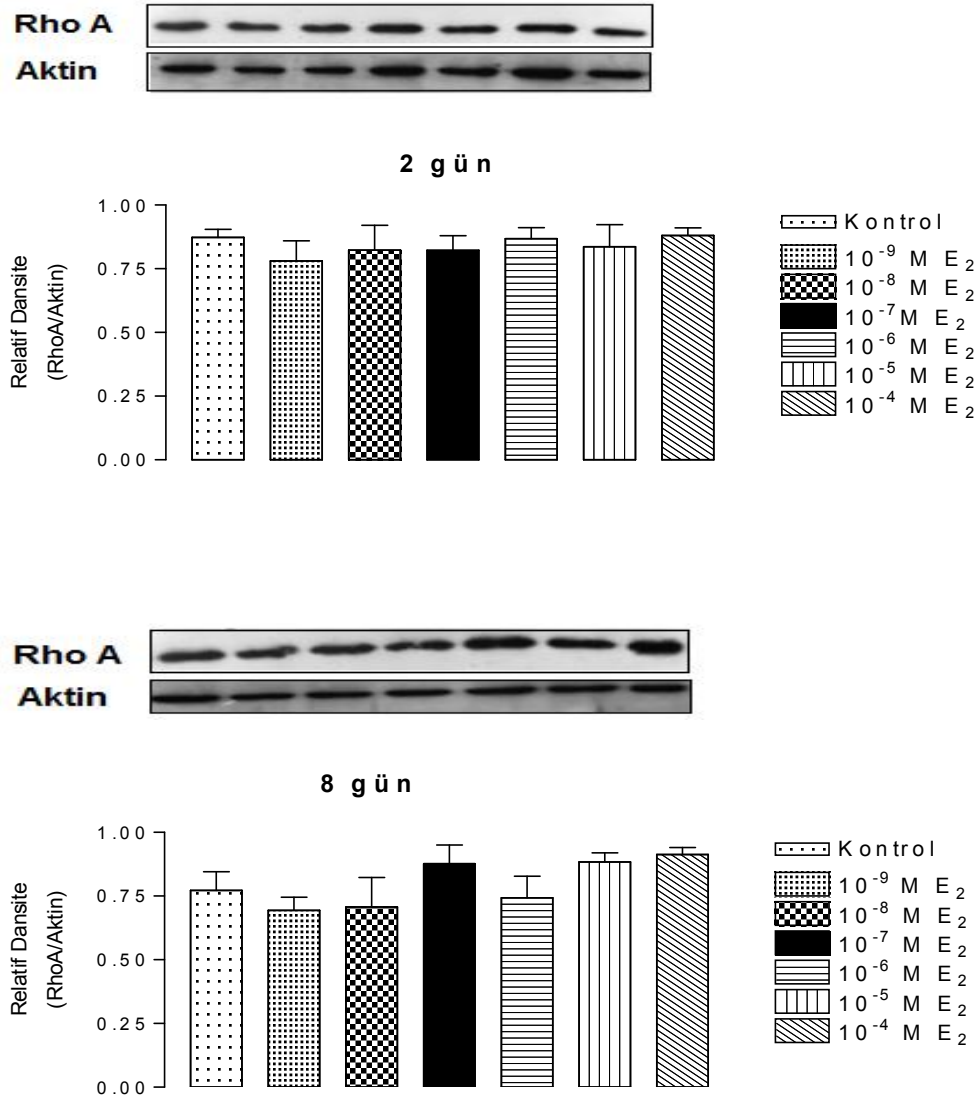
şekil 61. Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde 17 β -estradiol (E₂, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben Rho-kinaz-1 (ROCK-1) enzim ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

17 β -Estradiol'ün ROCK-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi: 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0-2. ve 0.8. günlerde uygulanan 17 β -estradiolün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) Rho-kinaz (ROCK-2) enzim ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonda ve uygulanan sürede 17 β -estradiol, ROCK-2 protein düzeylerini de \ddot{g} iştirmedi (Şekil 62).



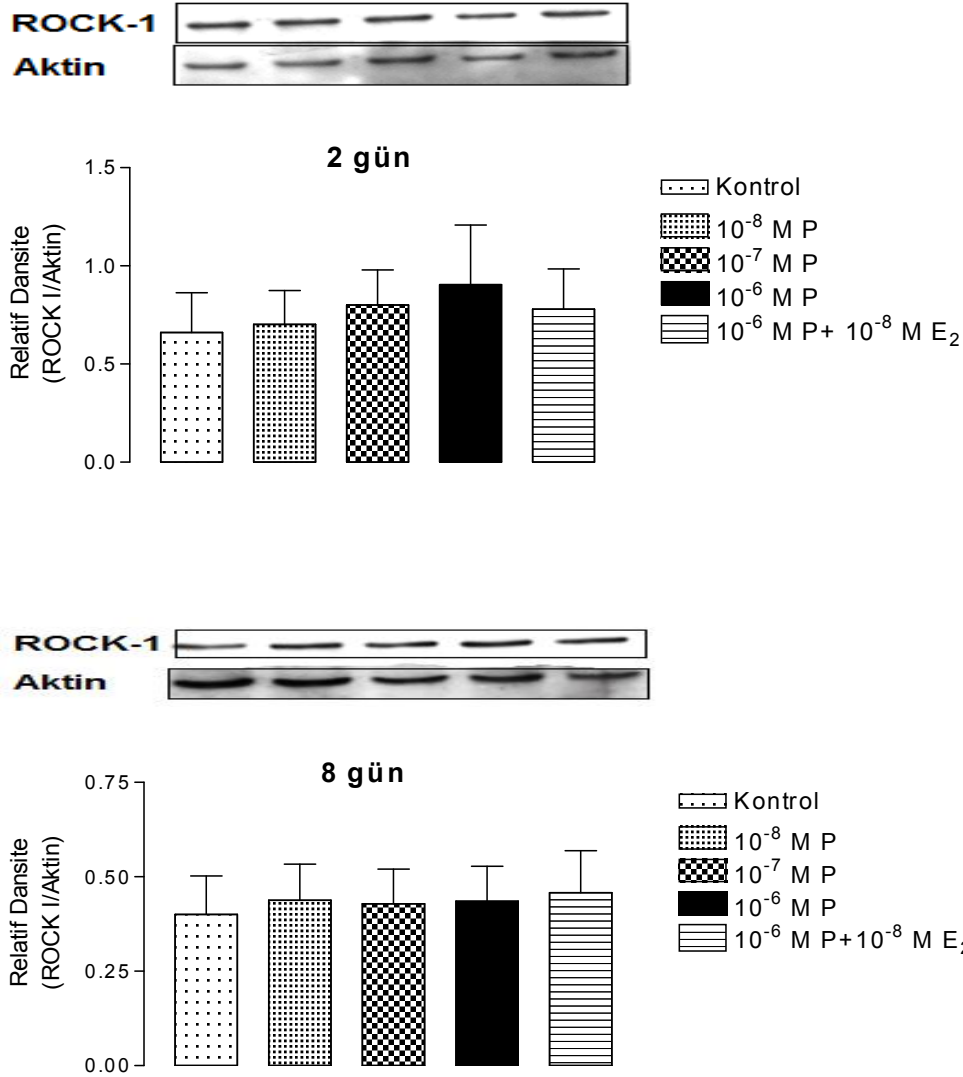
Şekil 62. Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde 17 β -estradiol (E₂, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben Rho-kinaz 2 (ROCK-2) enzim ekspresyonlarının Western-blot tekni \ddot{g} i ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

17 β -Estradiol'ün Rho A Ekspresyonu Üzerine Etkisi: 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0-2. ve 0.8. günlerde uygulanan 17 β -estradiolün (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M) Rho A ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonda ve uygulanan sürede 17 β -estradiol, Rho A protein düzeylerini de \ddot{g} iştirmedi (Şekil 63).



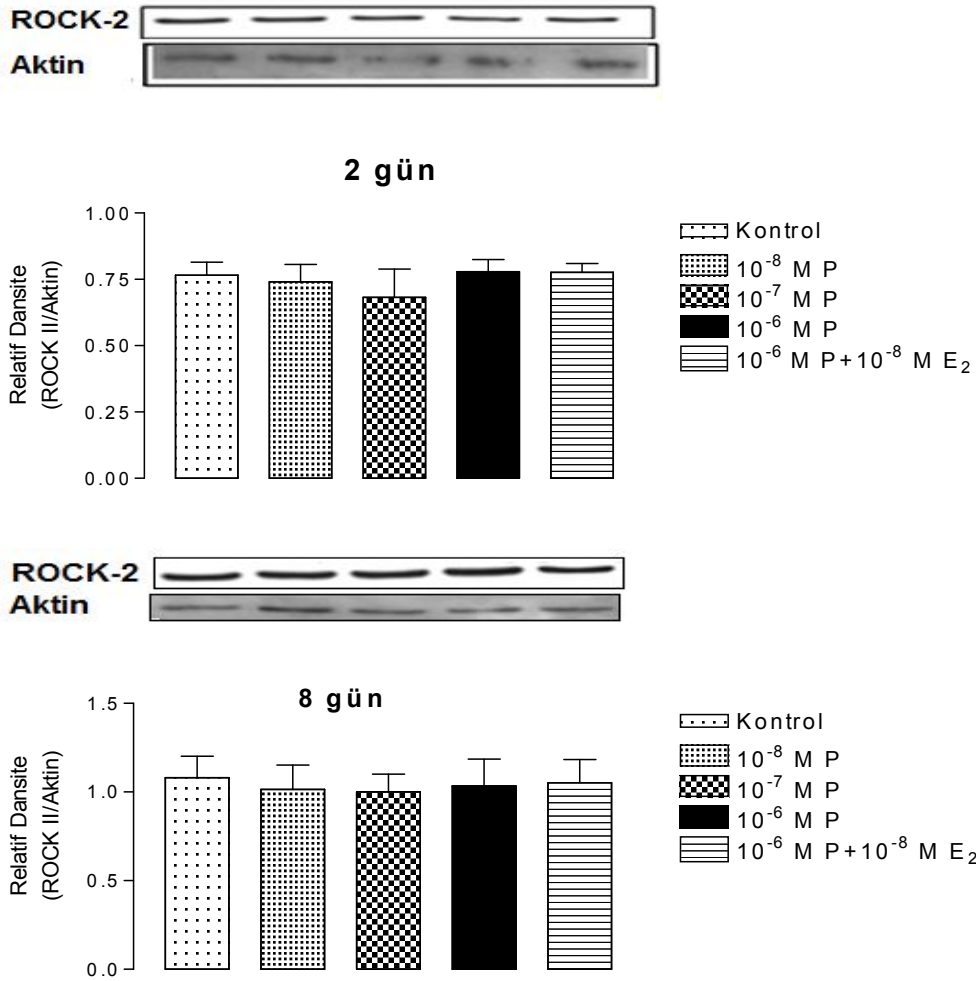
Şekil 63. Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde 17 β -estradiol (E_2 , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben RhoA ekspresyonlarının Western-blot tekni \ddot{g} i ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

Progesteronun ROCK-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi: 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0-2. ve 0-8. günlerde uygulanan progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-8} M) kombinasyonunun Rho kinaz (ROCK-1) enzim ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonda ve uygulanan sürede progesteron ve 17β -estradiol, ROCK-1 protein düzeylerini değiştirmedir (şekil 64).



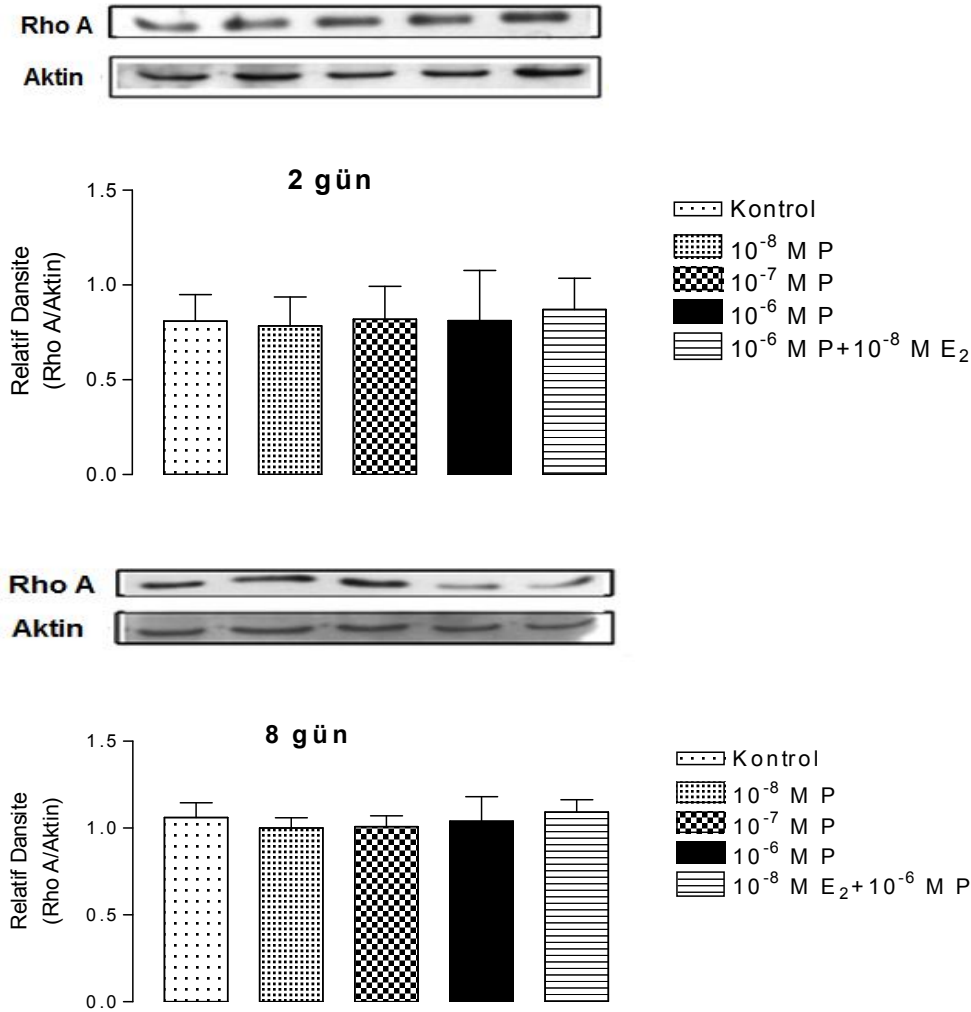
şekil 64. Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-8} M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben Rho kinaz-1 (ROCK-1) enzim ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

Progesteronun ROCK-2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi: 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0-2. ve 0-8. günlerde uygulanan progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-8} M) kombinasyonunun Rho kinaz (ROCK-2) enzim ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonda ve uygulanan sürede progesteron ve 17β -estradiol, ROCK-1 protein düzeylerini değiştirmede (şekil 65).



şekil 65. Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-8} M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben Rho kinaz-1 (ROCK-1) enzim ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

Progesteronun Rho A Ekspresyonu Üzerine Etkisi: 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 0-2. ve 0-8. günlerde uygulanan progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-8} M) kombinasyonunun RhoA ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonda ve uygulanan sürede progesteron ve 17β -estradiol, RhoA protein düzeylerini değiştirmede (Şekil 66).



Şekil 66. Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde progesteron (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M) ve 17β -estradiol (10^{-8} M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben RhoA ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı.

TARTIŞMA

Bu çalışmada başlıca seks steroid hormonu olan estrogen ve progesteronun kültüre edilmiş fibroblast kökenli preadiposit hücreler olan 3T3-L1 hücrelerinde diferansiyasyon ve adipositokin salıverilmesi üzerine etkileri ve bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının olası katkısı araştırıldı.

Estrojenin adiposit proliferasyonunu arttırdığına dair tutarlı bulgular olmasına rağmen, onun adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkileri net değildir. Estrojenin insan mezenkimal kök hücrelerinde, adipoz kökenli stromal hücrelerinde^{6,7} ve sıçan preadipositlerinde adiposit diferansiyasyonu stimüle ettiğine dair çalışmalar mevcuttur⁵. Bununla birlikte 3T3-L1 hücre hattında³⁵⁵ yapılan bir çalışmada ve estrogenin primer kemik iliği stromal hücre kültürlerinde ve kemik iliği stromal hücre hatlarında adiposit diferansiyasyonu üzerine inhibitör etkili olduğu gösterilmiştir⁸⁻¹⁰. Ancak bu çalışmalarda estrogenin adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkileri, bizim deney protokolümüzde olduğu gibi, farklı zaman dilimlerinde değerlendirilmemiştir.

Bu çalışmada farklı zaman dilimlerinde uygulanan estrogenin adiposit diferansiyasyonu üzerine farklı etkileri olduğu görüldü. Post-konfluent hücrelere 2 gün süreyle uygulanan 17β -estradiol, adiposit diferansiyasyonunu azaltırken, 4 ve 6 gün süreyle uygulanması adiposit diferansiyasyonunu arttırdı. 8 gün boyunca uygulanan estrogen diferansiyasyon üzerine etki göstermedi. Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde 3T3-L1 hücrelerinde adiposit diferansiyasyon sürecinin farklı basamaklarında (erken, orta ve geç) kullanılan fukoksantin adlı bir ajanın farklı etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur. Şöyle ki; erken dönemde PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c, aP2 ve adiponektin ekspresyonlarını arttırarak adiposit diferansiyasyonunu artırırken, orta ve geç dönemde ise PPAR γ , C/EBP α ve SREBP1c'nin ekspresyonlarını azaltarak adiposit diferansiyasyonu azalttığı gözlenmiştir³⁵⁶.

Lipoprotein lipaz (LPL) ekspresyonunun, büyüme durması aşamasını (G_D) yani erken diferansiyasyon basamağını yansıttığı, bundan dolayı adiposit diferansiyasyonunun erken belirteci olarak tanımlandığı bilinmektedir^{60,70}. Daha önceki çalışmalar estrogenin, lipogenezi azaltma yoluyla adipoz depolanmayı

direkt olarak inhibe edebileceğini ve bu etkinin adipositlere lipid alımını düzenleyen bir enzim olan lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesinin azaltılması yoluyla ortaya çıkabileceğine işaret etmektedir^{357,358}. Estrojenin lipoprotein lipaz üzerine olan bu etkisi, bizim çalışmamızdaki 2. günde görülen adiposit diferansiyasyonundaki azalma ile uyumlu görünmektedir.

Diğer taraftan preadiposit-adiposit dönüşüm sürecinin adipoz spesifik genlerin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla indüklendiği bilinmektedir. Bu süreçte yer alan genlerin transkripsiyonunun aktivasyonunda ve baskılanmasında yer alan PPAR γ 2, anahtar düzenleyici transkripsiyon faktörlerinden biri olarak tanımlanmakta ve adipoz dönüşüm sürecinde önemli rol oynamaktadır. Sıçan preadipositlerinde yapılan bir çalışmada estrojenin adipogenezini artırıcı etkisinin PPAR γ 2'nin ekspresyonunun artışıyla orantılı olduğu gösterilmiştir⁵. Bizim çalışmamızda 17 β -estradiol'ün 4-6 gün süreyle uygulanmasına bağlı görülen adiposit diferansiyasyonundaki artış, bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırmamasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak bu iddianın ayrı bir çalışma ile test edilmesi gerekmektedir.

17 β -estradiol'ün 8 gün süreyle uygulanması adiposit diferansiyasyonu üzerine etki göstermemiştir. Bu da, adiposit diferansiyasyon sürecinin özellikle ilk 4 günde oluşması, adiposit fenotipi kazanan hücrelerin diferansiyasyondan ziyade adipositlerde şekil ve boyutlarında değişikliğe bağlı moleküler olayların gelişmesinden kaynaklanabilir.

Estrojenlerin biyolojik etkileri asıl olarak estrojen reseptör α (ER α) ve estrojen reseptör β (ER β) aracılığıyla gerçekleşir, bunlar ligandla indüklenen transkripsiyon faktörleridir ve nükleer reseptör süperfamilyası arasında yer alır. Bu klasik estrojen reseptörlerin varlığı dişi ve erkek her iki cinsin subkütanöz ve visceral adipoz dokusunda gösterilmiştir¹⁹. Lipofilik estrojen, hücre membranını kolayca geçer ve estrojen reseptörlerine bağlanır ve reseptörlerde konformasyonel değişikliğe yol açar ve estrojen-ER komplekslerinin nükleer translokasyon ve homo/heterodimerizasyonuna izin verir²¹⁸. Böylece transkripsiyon mekanizması ile gen ekspresyonu düzenlenir, mRNA seviyelerinde artış veya azalma ve ilişkili protein üretimi ve fizyolojik yanıtlarla

sonuçlanır. Bu mekanizma genomik veya klasik mekanizma olarak adlandırılmaktadır²²⁰.

17 β -estradiol'ün etkilerinin klasik estrogen reseptörleri aracılığıyla olup olmadığını göstermek için çalışmamızda selektif estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 kullandık. İlginç olarak, ICI 182,780 estrogenin adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisini değiştirmezken, tek başına ICI 182,780, adiposit diferansiyasyonunu arttırdı. Bu sonuç estrogen reseptör antagonisti olarak bilinen ICI 182,780'in klasik estrogen reseptör blokajı dışında başka bir mekanizmayla etki gösterebileceğine işaret edebilir. Bu bağlamda, son zamanlarda estrogenin hızlı ve nongenomik etkilere aracılık eden yeni bir transmembran reseptörünün varlığı ortaya konmuştur. G protein kenetli reseptör 30 (GPR30, GPER) olarak adlandırılan bu yeni transmembranal reseptöre klasik estrogen reseptör antagonisti olarak bilinen ICI 182,780 bağlanarak agonist etki gösterebilmektedir³⁵⁹. Bu durum ICI 182,780'nin estrojenden bağımsız olarak oluşturduğu adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisini açıklayabilir. Bu bulgudan hareketle, söz konusu reseptörlerin daha selektif agonistlerinin kullanılmasıyla yukarıdaki hipotezin desteklenmesi gerekmektedir. İlginç olarak, GPR30'un adipoz dokuda eksprese edildiği daha önce yapılan gösterilmiştir^{360,361,362}. Bunun dışında estrogenin farklı dokularda da GPR30 aracılığıyla diferansiyasyonda yer aldığı bildirilmektedir³⁶³.

Hücre iskeleti organizasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gen regülasyonu gibi farklı hücresel olaylarda rol oynayan Rho proteinleri ile Rho kinaz enziminin birçok dokuda eksprese edildiği bilinmektedir^{59,322,324,326,335,336,364,365,366}. Ayrıca 3T3-L1 hücrelerinde Rho/Rho kinaz yolağının adipogenezde yer aldığı ve adipogenez sürecinde eksprese edildiği gösterilmiştir²⁹.

Rho/Rho kinaz yolağınının seks hormonlarının etkilerine katkısını araştırdığımız bu çalışmada Y-27632'nin estrogenin etkisini değiştirmediği fakat tek başına uygulandığında adiposit diferansiyasyonunu arttırdığını gözlemledik. Bu bulgu Rho/Rho kinaz yolağının adipogenezde yer aldığı ile ilgili literatürle uyumlu gözükmektedir^{22,24,25}. Estrogenin adiposit diferansiyasyonu üzerine olan

etkisinin hangi mekanizmalar ile gerçekleştiği daha önceki çalışmalar ile net olarak ortaya konmamıştı. Proliferasyonda ve diferansiyasyonda yer aldığı bilinen⁵⁹ ve birçok dokuda estrogenin etkilerine aracılık ettiği²²⁻²⁵ gösterilmiş olan Rho/Rho kinaz yolağı ile ilişkili çalışmalar estrogenin adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisinin bu yolak aracılığıyla olabileceğini düşündürmüştür. Fakat bulgularımız bu yolağının adipogenezde yer almasına rağmen, estrogenin etkilerine aracılık etmediğini göstermiştir. Bu durum, adiposit diferansiyasyonu üzerine estrogenin etkilerine başka mekanizmaların aracılık edebileceğini göstermekte ve bunların ortaya konulmasının obezite ve bununla ilişkili pek çok hastalığın gelişiminin önlenmesinde faydası olacağı için gerekli kılmaktadır.

Daha önce belirtildiği gibi estrogenin hızlı etkileri nükleer estrogen reseptörleri aracılı transkripsiyonel aktivasyondan bağımsız nongenomik mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. ER'leri aracılığıyla ortaya çıkan genomik olayların etkisini dışlayabilmek için araştırmacılar sıklıkla estrogenin membran impermeabl konjugatlarını (örn; E₂-BSA) kullanmışlardır. Bu konjugatlardan olan E₂-BSA, E₂'nin fonksiyonel eşdeğeri olarak kabul edilmektedir³⁶⁷. Biz de çalışmamızda estrogenin membranal reseptörler aracılığıyla etkisinin olup olmadığını test edebilmek için estrogenin membran geçemeyen analogu olan E₂-BSA kullandık. E₂-BSA'nın adipoz doku üzerine etkisini gösteren çalışma daha önce mevcut değildi. Çalışmamızda E₂-BSA'nın 2. günde adiposit diferansiyasyonunu azaltırken, 4 ve 6 günlerde ise arttırdığı gözlemlendi. 8. günde ise adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisiz bulundu. E₂-BSA'nın, adiposit diferansiyasyonu üzerine 17β-estradiol ile benzer etkiler göstermesi estrogenin etkilerinin membranal estrogen reseptörleri aracılığı ile ortaya çıkabileceğine işaret edebilir.

Ayrıca çalışmamızda E₂-BSA'nın etkilerine Rho/Rho kinaz yolağının aracılığını göstermek için Rho kinaz inhibitörü Y-27632 kullandık. Y-27632, E₂-BSA'nın adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisini değiştirmezken tek başına uygulandığında adiposit diferansiyasyonunu arttırdığı bulundu.

Çalışmamızda E₂-BSA'nın etkilerine estrogen reseptörünün katkısını anlamak klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 kullandık. ICI 182,780'in

E₂-BSA'nın etkisini değiştirmeyken, ortamda agonist olmadan tek başına uygulanması adiposit diferansiyasyonunu arttırdı. Bu sonuç yukardaki sonuçlarla uyumlu olarak ICI 182,780'in klasik estrogen reseptörleri dışında bir reseptör aracılığıyla etkisinin ortaya çıkabileceğine işaret etmektedir. ICI 182,780'in GPR30 agonisti olarak etki ettiğini sanmaktayız. Ancak bu durumun daha ileri çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

Progesteron tek başına değil, genellikle estrogenle sinerjist bir şekilde etkileşmek suretiyle, kendine özgü tesirler meydana getirdiği bilinmektedir. Estrojenlerle, progesteronlar arasındaki sinerjistik etkileşme tek yönlüdür. Progesteronlar estrogenlerin etkilerini artırırken estrogen progesteronun etkisini artırmaz, aksine antiestrogenik etkinlik gösterirler²¹⁶. Bu etkiden yola çıkarak çalışmamızda progesteron ve progesteron/estrogen kombinasyonunun adiposit diferansiyasyonu üzerine her iki seks hormonunun etkisini araştırdık. Adipoz doku üzerine önemli rolü olabileceği düşünölen progesteronun yağ birikimi üzerine olan rolü net olarak ortaya konmamıştır. Çalışmamızda progesteronun tek başına ve estrogenle birlikte adiposit diferansiyasyonu üzerine anlamlı etki oluşturmadığını fakat progesteron ve estrogenin sinerjistik etki ile adiposit diferansiyasyonunu artırmaya meyilli olduğunu gözlemledik. Bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak progesteronun adipoz doku üzerine etkisi olmadığına işaret eden çalışmalar mevcut iken³⁵⁷, tam tersi progesteronun, preadipositlerde steroid-aracılı diferansiyasyonu indüklediği ve LPL aktivitesindeki artış yoluyla ise yağ birikimi üzerine stimölatör etkili olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur¹¹⁻¹⁶. Ayrıca Bjorntorp ve ark., progesteronun abdominal adipoz dokuda anti-glukokortikoid etki aracılığıyla dişi yağ dağılımında yer alabileceğini ve progesteronun glukokortikoidle indöklenen vücut yağ birikimi ve yağ hücre diferansiyasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir^{17,18}.

Tüm dünyada obezite sıklığının ve eşlik eden metabolik sendrom sıklığının epidemik olarak artıyor olması, bir metabolik ve endokrin organ olan yağ dokusuna olan ilgiyi arttırmıştır³. Obezite artık "hafif dereceli inflamatuvar bir hastalık" olarak nitelendirilmiştir⁴⁶. Adipoz dokuda adipositlerin ve makrofajların sayısında artış ile birlikte adipoz doku fazla sayıda proinflamatuvar adipositokinler sekrete etmeye başlar. Bu durum insölin ihtiyacının artışına yol

açan sinyal yollarının stimülasyonu ile birlikte metabolik stres ve inflamasyon ile sonuçlanır. Bu süreçte birçok adipositokin (IL-6, TNF- α , leptin adiponektin, visfatin ve rezistin) rolü olduğu gösterilmiştir³⁶⁸. Obezite ve eşlik eden metabolik sendromun patogenezinde adipositokinlerin yer alması adipoz dokudan sekrete edilen bu maddelere karşı ilgiyi artırmış ve yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliğini ortaya koymuştur.

Estrojenin ve progesteronun adipositlerden sekrete edilen adipositokinler üzerine etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Fakat çalışmalarda bu hormonların etkilerine dair sonuçlar çelişkilidir ve bu etkilerine aracılık eden mekanizmalar ise net olarak ortaya konmamıştır.

Leptin ilk kez 1994 yılı sonunda adiposit kökenli sinyal faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu faktörün, kendi reseptörleri ile etkileşmesinden sonra vücut ağırlığı ve enerji tüketiminin denetimi gibi karmaşık bir yanıtı uyardığı, ayrıca üreme ve nöroendokrin sinyal oluşumunda da önemli işlev gördüğü bildirilmiştir^{92,109}. Leptin primer olarak yağ hücresinde ob geni tarafından mRNA'ya kodlanıp sentezlenmektedir⁹². Büyük kısmı beyaz yağ dokusunda, az bir bölümü de kahverengi yağ dokusunda sentez edilerek kana verilir⁹⁷. Genel olarak, serum leptin düzeylerinin beslenme ve hormonal faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. İnsanlarda serum leptin yoğunluğu cinse bağlı olarak da farklılık gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur¹⁰⁹. Bu da seks steroid hormonlarının leptin salınımı üzerine etkisinin olduğunu göstermektedir.

Birçok çalışmada estrojenlerin adipoz dokudan leptin salınımını artırdığına dair bulgular yer almaktadır^{369,370}. Ancak bizim çalışmamızda 17 β -estradiolün olgun adipositlerden leptin salınımına anlamlı bir etki yapmadığını gözlemledik. Bununla uyumlu olarak, estrojenin leptin salınımı üzerine etkisiz olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur³⁷¹⁻³⁷⁴. Ancak bazı çalışmalar vücut leptin konsantrasyonu üzerine seks hormonlarının etkisinin olmadığını, fakat leptin salınımının daha çok vücut kitle indeksiyle orantılı olduğunu göstermişlerdir. Bu durum bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularda olduğu gibi leptin salınımı üzerine 17 β -estradiol'ün etkisinin olmamasını açıklar görünmektedir^{372,374}.

17 β -estradiol'ün leptin saliverilmesi üzerine olan etkisine Rho/Rho kinaz yolağının aracılığının olup olmadığını Y-27632 kullanarak test ettik. Ancak estrogenin leptin düzeylerine etkisine Rho/Rho kinaz yolağının aracılığının olmadığını gösterdik. Bununla birlikte, Y-27632'nin tek başına uygulanması leptin saliverilmesini anlamlı olarak arttırdı. Bu gözlem, post-konfluent preadipositlerin diferansiyasyon medyumuna maruz bırakılması sonucu bu yolak üzerinden leptin saliverilmesini kontrol edebileceği fikrini doğurmuştur. Nitekim bu Rho-kinaz enzim inhibitörü, preadipositlerin diferansiyasyonunu arttırmıştır. Yani, Y-27632 daha kısa süre içinde adiposit diferansiyasyonu yaptığı için ve leptin de olgun adipositlerden salıverildiği için Y-27632 varlığında leptin düzeyleri yükselmiş olabilir.

Diğer taraftan, birçok dokuda leptinin etkilerine Rho/Rho kinaz yolağının aracılığı gösterilmiştir^{405,406}. Bununla birlikte adipoz dokudan leptin saliverilmesi üzerine Rho/Rho kinaz yolağının etkisi değerlendirilmemiştir. Leptinin yağ dokusu artışı ve obezite ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Rho/Rho kinaz yolağının obezitede yer alıp almadığına dair yapılan bir çalışmada vücut ağırlığının artışı ile birlikte Rho kinaz aktivitesinin arttığı, bu yolağın inhibisyonunun ise vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir⁴⁰⁷. Y-27632 Rho/Rho kinaz yolağının inhibe ederek leptin salınımını artırıyor olabilir.

Araştırdığımız diğer bir sitokin olan adiponektin, adipositlerden sentezlenen protein yapıda bir moleküldür ve plazmada diğer hormonlara ve sitokinlere göre oldukça yüksek konsantrasyonda bulunur¹³⁴. Adiponektin eksikliği insülin direnci, glikoz metabolizması bozukluğu ve kalp yetmezliğinin şiddeti ile ilişkili bulunmuştur¹⁵². Adiponektin ekspresyonu ve salınımı örneğin insülin, glukokortikoidler ve androjenler gibi hormonlar tarafından düzenlenir^{157,158}.

Adiponektin salınımı üzerine seks hormonlarının etkilerine dair yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bizim çalışmamızda estrogenin farklı konsantrasyonlarda uygulanması, adiponektin salınımını azaltmıştır. Bizim bulgularımızı destekleyen çalışmalar mevcut iken³⁷⁵⁻³⁷⁷, estrogenin adiponektin salınımı üzerine etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır³⁷³.

17 β -estradiol'ün adiponektin salınımı üzerine olan etkisine Rho/Rho-kinaz yolağının aracılığını göstermek için Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 kullandık. Adiponektin salınımını anlamlı olarak azaltan 17 β -estradiol, Y-27632 ile kombinasyonu bu etkiyi tersine çevirdi. Bu sonuç 17 β -estradiol'ün adiponektin salınımı üzerine olan etkisine Rho/Rho kinaz yolağının katkısının olabileceğini göstermektedir. Rho-kinaz inhibitörleri olan Y-27632 ve fasudil ile yapılan iki çalışmada Y-27632'nin adiponektin ekspresyonu üzerine etkisiz olduğu³⁷⁸, bizim çalışmamızla uyumlu olarak fasudilin ise adiponektin konsantrasyonunun arttırdığı gösterilmiştir³⁷⁹.

Bilindiği gibi estrogen farklı mekanizmalar ile^{19,213,408,409} Rho/Rho-kinaz yolağı ise insülin sinyalinin inhibisyonu yoluyla insülin rezistansının gelişimine neden olabileceği³⁷³ gösterilmiştir. Olasılıkla adiponektin salınımının azaltılması estrogenin ve Rho/Rho-kinaz yolağının insülin rezistansına neden olan etkilerine aracılık ediyor olabilir çünkü adiponektini insülin duyarlılığını artıran sitokin olarak bilinmektedir¹⁵². Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonu adiponektin salınımını arttırarak insülin duyarlılığının gelişimine katkı sağlayabileceği için tedavi yaklaşımlarına farklı bir bakış açısı kazandıracaktır.

Ayrıca çalışmamızda 17 β -estradiol'ün etkilerine klasik estrogen reseptörlerinin katkısını göstermek için kullandığımız ICI 182,780'in 17 β -estradiol'ün etkisini değiştirmediği gözlemlendi. Bununla birlikte tek başına uygulanan ICI 182,780'in adiponektin düzeylerini arttırdığı görüldü. Bu etki klasik estrogen reseptörlerinden bağımsız, membranal estrogen reseptörleri aracılığıyla gerçekleşiyor görünmektedir. Yeni bir membran reseptörü olarak tanımlanan GPR30'un agonisti olarak bilinen ICI182,780'in adiponektin salınımı üzerine olan etkisine olasılıkla GPR30'un aracılık ediyor olabilir³⁵⁹.

Rezistin son yıllarda keşfedilen, yağ hücresinden salgılanan bir hormondur¹⁵⁹. Farelerde rezistin, yağ dokusu miktarı ve adiposit farklılaşmasına bağlı olarak primer beyaz yağ dokusunda eksprese edilir³⁸⁰. İnsanda ise adipositlerden eksprese edilmediği, kemik iliği ve periferik mononükleer hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese edildiği ve salgılandığı saptanmıştır¹⁶⁴. Rezistin, antidiyabetik bir ilaç olan tiazolidinedionların (TZD) mekanizması

araştırılırken bulunmuştur¹⁶⁷. Rezistin, obez ve insüline dirençli farelerde insülin duyarlılığını düzenlemektedir. Rezistin hayvan modellerinde proinflamatuvar sitokinleri upregüle ettiği ve inflamasyonu uyardığı görülmüştür¹⁷⁶. Ayrıca rezistin ateroskleroz patogeneğinde direkt rolü olduğu gösterilmiştir¹⁷⁷.

Çalışmamızda 17 β -estradiol'ün rezistin salınımını özellikle 10⁻⁸, 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlarda anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi. Bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak estrogen ve rezistin düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur³⁸¹. Bununla birlikte, estrogenin rezistin salınımı üzerine etkisiz olduğunu^{370,373} veya negatif korelasyon³⁸² olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur. Bilindiği gibi rezistin insülin rezistansına neden olan adipoz dokudan sekrete edilen önemli hormonlardan biridir. Estrogenin birkaç çalışmada farklı mekanizmaları kullanarak insülin rezistansına neden olduğu gösterilmiştir^{19,213,408,409}. Bizim çalışmamızın bulguları 17 β -estradiol'ün insülin rezistansı gelişimine neden olabilecek mekanizmalardan birinin rezistin salınımını arttırarak olabileceğine işaret etmektedir.

Ayrıca çalışmamızda Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632'nin 17 β -estradiol'ün rezistin düzeylerini arttırıcı etkisini geri çevirdiği gözlemlendi. Rezistin düzeyleri ile Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan 3T3-L1 hücrelerinde Rho-kinaz enziminin rezistin salıverilmesine olan katkısının gösterildiği ilk bulgudur. Rho/Rho-kinaz yolağının insülin sinyalinin inhibisyonu yoluyla insülin rezistansının gelişimine neden olduğu ve bu yolağın inhibisyonunun insülin duyarlılığın gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir³⁷³. İnsülin rezistansının gelişiminde rol oynayan rezistin düzeylerinin azaltılması insülin duyarlılığının gelişimine katkı sağlayacağı için bu bulgu önemlidir çünkü Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonu metabolik sendroma eşlik eden diyabet hastalığının gelişimine katkısı olan rezistin düzeylerini azaltarak, bu sitokin yer aldığı diyabet, ateroskleroz ve inflamasyon gibi patolojilerin tedavisinde yeni bir terapötik hedef olabilir

Yukarıda belirttiğimiz gibi 17 β -estradiol ve Y-27632'nin adiponektin ve rezistin düzeyleri üzerine olan etkileri birbiri ile tutarlı görünmektedir çünkü rezistin ve adiponektin birçok bakımından birbirinin tersi etkiler ortaya

koymaktadır (insülin rezistansı-insülin duyarlılığı, aterojenik-antiaterojenik gibi). Bu sonuçlar obezite ve buna bağlı olarak gelişen insülin direnci ve metabolik sendromun tedavisine yeni bir bakış açısı getireceği için önemli görünmektedir.

Çalışmamızda uyguladığımız klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780, 17 β -estradiol'ün rezistin salıverilmesi üzerine etkisini değiştirmedii fakat tek başına uygulanan ICI 182,780 rezistin düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Bu etki klasik estrogen reseptörlerinden bağımsız gibi görünmekte ve farklı membranal reseptörleri aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir. Bizim bu sonuçlarımızla uyumlu olarak yapılan bir çalışmada ICI 182,780'in rezistin salınımını tek başına anlamlı olarak azalttığını göstermektedir⁴¹⁰.

TNF- α , kaşektin olarak da adlandırılan proinflamatuvar bir sitokindir¹⁷⁹. Özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere fibroblast, endotel hücreleri, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından sentezlenmektedir¹⁸⁰. Aterosklerotik damarlarda aterom plaklarında, makrofaj köpük hücreleri ve düz kas hücrelerinde TNF- α 'nın artmış oranda bulunması ateroskleroz patogeneğinde TNF- α 'nın rolü olduğunu düşündürmektedir¹⁹³. TNF- α 'nın adipoz dokudan da salındığı gösterilmiştir. Obezitede TNF- α seviyesinin arttığı bilinmektedir. Vücut kitle indeksi ve adipoz doku TNF- α mRNA seviyesi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir^{191,192}.

Estrojenin genel olarak antiinflamatuvar özellikte bir hormon olduğu ve birçok dokuda inflamatuvar sitokinlerin düzeylerini azalttığı bildirilmektedir^{411,412}. Obezite hafif dereceli inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmakta ve bu durum adipositlerin sayısında ve makrofajların sayısındaki artışla karakterize edilmektedir. Oysa çalışmamızda 17 β -estradiol TNF- α seviyelerini değiştirmedii. Bununla uyumlu olarak, estrogen uygulanmış sıçanların adipoz dokularında TNF- α protein seviyeleri veya ekspresyonlarında bir değişiklik bulunmadığı bildirilmiştir³⁸³. 17 β -estradiolün TNF- α seviyelerini değiştirmemesi araştırılan doku/hücre farklılıklarına bağlı olabilir. Yine de bu farklılığın tam olarak ortaya konulması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Rho-kinaz aktivasyonunun, vasküler inflamasyon ve septik organ hasarının patogeneğinde yer aldığı saptanmıştır. Rho-kinazın fasudil ve Y-

27632 ile inhibisyonunun kalp, beyin ve böbrekte iskemi/reperfüzyon ile indüklenen doku hasarının sınırlandırılmasında yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiş ve TNF- α düzeyleri Y-27632 tarafından azaltılmıştır⁴¹³. Bizim çalışmamızın bulguları ise bu çalışmanın bulgularının tersi olup Y-27632 uygulanması TNF- α düzeylerini arttırmıştır.

Son olarak, 3T3-L1 hücrelerinde 17 β -estradiol ve progesteron ile düzeyleri araştırılan son sitokin, IL-6'dır. IL-6, çok yönlü işleve sahip bir sitokin olarak hematopoezi, akut faz reaktanlarını, immün yanıtı düzenler ve konağın savunma mekanizmasında merkezi rol oynar. Viral enfeksiyonlar, lipopolisakkaritler ve çeşitli sitokinlerin uyarısı ile salgılanır. Travma, inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve çeşitli malignitelerde serum düzeyleri artar^{197,384}. IL-6 sekresyonu, yağ hücresi artışı ile birlikte artar. Dolaşımdaki IL-6 konsantrasyonu, vücut yağ yüzdesi ile ilişkilidir. Humoral (insülin, glukokortikoidler), nöral (sempatik sinir sistemi aktivitesi) ve parakrin (IL-1 β , TNF α) sinyallerin hepsinin yağ dokusundan IL-6 üretimini düzenlediği gösterilmiştir²⁰⁴.

Estrojenin, adipoz dokudan salgılanan IL-6 düzeyleri üzerine etkisini gösteren fazla çalışma mevcut değildir. Yaptığımız çalışmada birçok çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak antiinflamatuvar özellikte bir hormon olduğu ve birçok dokuda inflamatuvar sitokinlerin düzeylerini azalttığı bildirilen^{411,412} 17 β -estradiol'ün IL-6 salıverilmesini azalttığını gözlemledik. Farelerde, estrojenin IL-6 üretimini³⁸⁷ ve stimüle edilmiş ve edilmemiş sitokin düzeylerini azalttığı ve progesteronun arttırdığı gözlenmiş ve bu etkileri antagonistler ile tamamen geriye dönderilmiştir (E₂ antagonisti ICI 182,780). Bununla birlikte, menstrual siklus boyunca birçok proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin değişmesine rağmen IL-6 seviyelerinin siklus boyunca değişmediği, yine insanlarda yapılan bir çalışmada estrojen ve IL-6 seviyeleri arasında korelasyon olmadığı³⁸⁵, postmenapozal dönemde estrojen ve progesteron tedavisinin IL-6 düzeyleri üzerine etkisiz olduğu gösterilmiştir³⁸⁶. Bu çalışmalarda tek başına uygulanan ICI 182,780'in etki göstermediği gözlenmiştir^{388,389}. Bizim çalışmamızda ise ICI 182,780, 17 β -estradiol'ün etkisini

değiştirmeyken, tek başına uygulanması IL-6 düzeylerini azalttığı gözlemlendi. Bu durum, yukarıda bahsettiğimiz olası membranal reseptörlerin aracılığına işaret edebilir.

Ayrıca birçok çalışmada inflamatuvar mediyatörlerin artışına eşlik eden Rho/Rho-kinaz yolağının inhibisyonunun antiinflamatuvar özelliği olduğu gösterilmiştir. Bizim bulgularımızda da Rho-kinaz yolağının Y-27632 ile inhibisyonunun IL-6 düzeylerini azalttığı gözlemlendi^{418,419}.

Bilindiği üzere obezite, hipertansiyon, dislipidemi, tip 2 diyabet, koroner arter hastalığı, inme, osteoartrit ve endometrial, meme ve kolon kanserleri gibi birçok hastalığa eşlik etmektedir³⁹⁰. Özellikle obezite ile meme kanseri riski arasındaki ilişkinin adipositokinler yoluyla açıklanabileceğini, azalmış serum adiponektin seviyesi ile artmış leptin ve rezistin seviyesinin meme kanseri gelişiminde yeni bir risk olduğunu belirtmiřlerdir³⁹¹. Bu durum obezitenin tedavisine kazandırılacak yeni yaklaşımların sadece obezite değil birlikte birçok hastalığın gelişiminde ve tedavisinde faydası olacağı için oldukça önemlidir.

Ayrıca alışmamızda progesteron, progesteron/estrogen ve progesteron/Y-27632 (Rho-kinaz inhibitörü) kombinasyonunun adipositokinler üzerine olan etkisini araştırdık. Özellikle estrogen ile progesteron ve estrogen ile Y-27632 kombinasyonunun adipoz dokudan salınan adipokinler üzerine etkisini gösteren fazla çalışma mevcut değildi.

Progesteronun, leptin sekresyonu üzerine etkisini ortaya koyabilmek için yapılan çalışmaların çoğunda bizim çalışmamızla uyumlu olarak progesteronun leptin salınımı üzerine etkisiz olduğu gösterilmiştir^{19,372,374,392}. Hatta bir çalışmada estrogen ve progesteron kombinasyonu uygulanarak leptin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiş, fakat progesteronun etkisiz olduğu gözlemlenmiřtir³⁹³.

Rezistin düzeyleri üzerine progesteronun etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda progesteron ve progesteron/estrogen kombinasyonunun rezistin salınımı üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığını gözlemledik. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak 3T3-L1 hücrelerinde progesteronun rezistin

düzeleleri üzerine etkisiz olduğu görülmüştür³⁹⁴. Ayrıca progesteronun retroperitoneal beyaz adipoz dokuda rezistin ekspresyonunu artırdığı fakat parametrial ve subkütanöz depolarda etki göstermediği bildirilmiştir³⁹⁵.

Diğer çalışmaların aksine bizim çalışmamızda progesteronun adiponektin düzeylerini arttırdığını gözlemledik. Bu artışa progesteronun 17β-estradiol ve Y-27632 kombinasyonunun etkisi olmadı. Progesteronun kadınlarda doz bağımlı olarak adiponektin seviyelerini azalttığını³⁹⁶ ve diğer bir çalışmada da progesteron ve adiponektin seviyeleri arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir³⁷⁷. Ancak estrojen ve progesteron ile adiponektin konsantrasyonları arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir⁴¹⁴. Bizim çalışmamızda progesteronun adiponektin düzeylerini arttırması, yine test edilen doku/hücre veya deneysel modellerden (in vitro, in vivo) kaynaklanabilir. Ayrıca, 17β-estradiol'ün adiponektin düzeylerini azalttığı bulgusundan hareketle belki de progesteron antiestrojenik etki ile adiponektin düzeylerini arttırmış olabilir. Bunun test edilmesi için daha ileri çalışmalar gerek vardır.

Yine adipoz dokudan salınan ve proinflatuvar bir sitokin olan TNF-α düzeyleri üzerine progesteronun etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda progesteron ve kombinasyonlarının TNF-α düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını gözlemledik. Estrojenin birçok dokuda proinflatuvar sitokinlerin salınımı üzerine inhibe edici etkisinin olduğu, progesteronun ise estrojenin tersine proinflatuvar sitokinlerin sekresyonunu arttırdığı gözlenmiştir^{383,385,397}.

Ayrıca diğer bir sitokin olan IL-6 salınımı üzerine progesteronun etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda progesteronun IL-6 düzeylerini azalttığını gözlemledik. İlginç olarak bu etki birlikte uygulanan 17β-estradiol tarafından tersine çevrilmedi. Diğer taraftan progesteronun IL-6 düzeylerini azaltıcı etkiye Rho-kinaz enziminin bir rolü ihtimal dışı gibi görünmektedir zira Rho-kinaz inhibitörü Y-27632, progesteronun etkisini değiştirmede. Bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak endometrial stromal hücre kültüründe, fare fibroblast hücrelerinde ve diğer bir çalışmada lipopolisakkaridle indüklenen IL-6 konsantrasyonunun progesteron uygulanması ile azaldığı gözlenmiştir^{415,416,417}. Bununla birlikte kadınlarda yapılan estrojen ve progesteronun birçok proinflatuvar sitokin üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada ilginç

olarak progesteron ile IL-6 arasında korelasyon olmadığı gösterilmiştir³⁹⁸. Bununla birlikte inflamasyonun eşlik ettiği doku hasarlarında progesteronun IL-6 düzeylerini arttırdığı bulunmuştur³⁹⁷.

Seks steroid hormonların adipoz dokunun dağılımı ve miktarının düzenlenmesinde yer aldığı bilinmektedir. Fakat bu etkilere hangi mekanizmaların aracılık ettiği tam olarak bilinmemektedir. Olası mekanizmalardan biri genomik seviyede adipoz dokuda anahtar proteinlerin düzenlenmesi olabilir. Bu adipoz dokuda steroid reseptörlerin bulunmasını gerektirir ve kanıtlar estrogen reseptörlerinin ve progesteron reseptörlerinin adipoz dokuda varlığını göstermektedir¹⁹. Diğer olası mekanizma nongenomik etkiler yoluyla hücre membranında ikincil mesajcılarının düzenlenmesi olabilir. Estradiol, hızlı, nongenomik biyolojik etkileri membran bağımlı ER α , ER β ve yeni tanımlanan G protein kenetli reseptör 30 (GPR30) aracılığıyla gerçekleştirir^{399,400}. Birçok dokuda seks steroidleri yoluyla düzenlemede genomik ve nongenomik mekanizmaların kombinasyonu yer alabilir⁴⁰¹. Bu ikincil mesajcılar arasında G protein sinyali, cAMP, fosfoinozitol-3 kinaz ve protein kinaz C (PKC) kaskadı yer alır. Küçük GTP-bağı proteinlerinin (G proteinleri) hücre içi sinyalleme yollarında önemli role sahip olduğu bilinmektedir. G proteinleri (20-35 kDa) hücre farklılaşması, bölünmesi, hücre iskeletinin kontrolü gibi çeşitli hücreyel olaylarda görev alır²⁶². Birçok dokuda estrogen ve progesteronun etkisine Rho/Rho-kinaz yolağının aracılık ettiği gösterilmiştir²²⁻²⁵.

Seks hormonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkilerine Rho/Rho-kinaz yolağının katkısını araştırmak için RhoA proteini ve alt efektörlerinden olan ROCK-1 ve ROCK-2 ekspresyon düzeylerini ölçtük. Rho A, ROCK-1 ve ROCK-2'nin 3T3-L1 preadipositlerde ve matür adipositlerde eksprese olduğu fakat uygulanan konsantrasyonlarda estrogen ve progesteronun bu proteinlerin ekspresyon düzeylerini değiştirmede gözlemledik. Bununla birlikte bizim laboratuvarımızda sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada 17 β -estradiol'ün ROCK-2 enzim ve RhoA protein ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi⁴⁰². Çalışmamızda estrogen ve progesteronun RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyon düzeylerine bir etkisinin olmaması, bu hormonlar ile ilgili sinyal transdüksiyon mekanizması

arasında bir etkileşmenin olmadığı anlamına gelmemektedir zira biz sadece protein ekspresyonlarını araştırdık. Oysa Rho-kinaz aktivasyonu da araştırılabilirdi. Ancak bizim deney protokolümüzde estrogenin kronik etkileri incelendiği için aktivasyondan ziyade ekspresyonları değerlendirildi. Rho-kinaz aktivasyonu araştırmak için çok farklı bir deney protokolü oluşturmak gerekir ve bu da ayrı bir çalışma konusudur.

Sonuç ve Öneriler

1. Estrojen, adiposit diferansiyasyon sürecinde maruziyet süresine göre farklı etkiler ortaya koymaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin eksprese edildiği ilk günlerde 17β -estradiol, adiposite olan diferansiyasyonu inhibe etmektedir. Buna karşılık ara dönemde ise tam tersine diferansiyasyonu arttırmaktadır. Ancak, terminal dönemde ise etkisiz bulunmuştur. Benzer şekilde hücre membranından geçemeyen bir estrojen analogu olan sığır serum albumini ile konjüge edilmiş 17β -estradiol (E_2 -BSA), diferansiyasyonu erken dönemde inhibe etmektedir. E_2 -BSA'nın etkileri kısa süreli nongenomik etkiler olabildiği gibi, ayrıca membranal reseptörler aracılığıyla ortaya çıkan genomik etkiler de olabilir⁴⁰³. İlginç olarak, sıçan koroner endotel hücrelerinde yaptığımız son çalışmada GPR30 (GPER) agonisti, G1 maddesi ROCK-2 proteinini up-regüle etmiştir⁴⁰². Bununla birlikte GPR30 antagonisti olan G15 maddesi, estrojenin bu etkisini inhibe etmiştir. Buradan hareketle, bir başka çalışmada 17β -estradiol ve E_2 -BSA'nın etkilerinin membranal GPR30 reseptörleri üzerinden olup olmadığını test etmek için GPR30 agonisti G1 ve antagonisti G15'in kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2. Diğer taraftan progesteronun preadipositlerin adipositlere olan diferansiyasyon sürecine katkı yapmadığı görünmektedir.

3. Bu tezin bir başka sonucu, 17β -estradiolün adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkisine Rho/Rho kinaz yolağı aracılık etmediği şeklindedir.

4. Klasik estrojen reseptörlerini ($ER\alpha$ ve $ER\beta$) bloke etmek amacıyla literatürde yaygın olarak kullanılan ve bizim de bu çalışmada kullandığımız ICI 182,780, esasında bir GPR30 (GPER) agonisti gibi davranmış olabilir; bunun da test edilmesi için ayrı bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

5. Adipoz dokudan salınan ve obezitenin gelişiminde önemli yeri olduğu bilinen leptinin hücre kültür medyumunda seviyelerinin estrojen ve progesteronun tarafından değiştirilmemesi bu adipositokinin sentez/salınma mekanizmasında estrojen ve progesteronun önemli bir katkı

yapmadığını düşündürmektedir. Ancak literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Tek başına test edilen klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780'in etkisiz bulunması, 17 β -estradiolle elde edilen bulguyu destekleyebilir. Diğer taraftan tek başına kullanılan Y-27632'nin leptin salıverilmesini artırıyor olması bu sitokinin sentez/salıverilmesinde bir şekilde Rho-kinaz enziminin rolünü düşündürebilir. Ancak Y-27632'nin genel bir antiinflamatuvar etkisinin bildirilmiş olduğu göz önüne alınırsa bu bulgunun rafinerize edilmesi için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

6. Bu tezin en çarpıcı ve inovatif bulgularından birisi de, 17 β -estradiolün adiponektin ve rezistin düzeyleri üzerine olan etkisi ve bu etkilere Rho/Rho kinaz yolağının katkısının bulunmasıdır. Bu bulgunun klinik önemi olabilir zira her iki sitokin de insülin direncinin gelişmesini veya önlenmesini kontrol eden iki balans maddedir. Bu sayede obezite, obeziteye eşlik eden diyabet ve metabolik sendromun tedavisine yeni bir bakış açısı getirilebilir.

7. Çalışmamızda estrogenin ve progesteronun proinflamatuvar mediyatörler olarak bilinen TNF- α ve IL-6 sentez/salıverilmesi üzerine herhangi bir etki oluşturmadı. Buna karşılık, Y-27632 tek başına IL-6 düzeylerini değiştirmezken TNF- α düzeyini anlamlı olarak arttırdı. Diğer taraftan klasik estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 ise tek başına TNF- α seviyelerini değiştirmedi fakat IL-6 düzeylerini dramatik olarak azattı, bu da ICI 182, 780'in bilinen reseptör/mekanizmalardan farklı bir şekilde etki ettiğini gösterebilir. Bu hipotezin test edilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. Bu tezin bir başka sonucu, 3T3 L1 hücrelerinde gerek estrogenin gerekse progesteronun RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyonlarını değiştirmemesidir. Başka hücrelerde örneğin sıçan koroner vasküler hücre kültüründe ise bu bulgunun aksine 17 β -estradiolün, ROCK-2 protein ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığını bulduk⁴⁰². Bu farklılık, kullanılan hücre tipinden, bu hücrelerdeki estrogen reseptör çeşitliliğinden veya dansitesinden kaynaklanabilir.

9. Çalışmamızda eksik bir nokta, Rho-kinaz etkinliğini araştırmamış olmamızdır. Rho-kinaz aktivitesi esasında genellikle kısa süreli deney

protokollerinde incelenmektedir zira aktivitenin göstergesi olarak genellikle hedef proteinlerin fosforilasyonu ölçülmektedir çünkü daha uzun süre incelenecekse fosforilasyonlar ortadan kalkmaktadır. Bu bakımdan biz bu tezde, hormonların daha ziyade uzun süreli etkilere aracılık ettiği bilindiği için, estrogen ve progesteronun uzun süreli etkilerini test ettik. Aktivasyon için tamamen farklı bir deney protokolü gerekmektedir ve bu bizim amacımızın dışındaydı

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 SP, Heine AP, Taylor AJ, et al. The role of estrogen and estrogen receptor- α in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:147-154.
3. Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, et al. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infect Disord Drug Targets* 2008;81:52-60.
4. Canhoroz M. Serum Adiponektin Seviyesinin Glisemik Kontrol Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi 2005. İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi.
5. Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, et al. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Endocrinology* 2000;141:649-56.
6. Hong L, Colpan A, Peptan IA. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006;12:2747-53.
7. Hong L, Colpan A, Peptan IA, et al. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2007;13:1197-203.
8. Heim M, Frank O, Kampmann G, et al. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004;145:848-859.
9. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 2002;143:2349-2356.
10. Dang ZC, van Bezooijen RL, Karperien M, et al. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res* 2002;17:394-405.

11. Mendes AM, Madon RJ, Flint DJ. Effects of cortisol and progesterone on insulin binding and lipogenesis in adipocytes from normal and diabetic rats. *J. Endocrinol* 1985;106:225-231.
12. Monjo M, Rodriguez AM, Palou A, et al. Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinology* 2003;144:4923-4930.
13. Steingrimsdottir L, Brasel J, Greenwood MR. Hormonal modulation of adipose tissue lipoprotein lipase may alter food intake in rats. *Am J Physiol* 1980; 239: E162-7.
14. Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, et al. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:11512-11516.
15. Shirling D, Ashby JP, Baird JD. Effect of progesterone on lipid metabolism in the intact rat. *J Endocrinol* 1981;90:285-94.
16. Wiper-Bergeron N, Wu D, Pope L, et al. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J* 2003;22:2135-2145.
17. Pedersen SB, Kristensen K, Richelsen B. Anti-glucocorticoid effects of progesterone in vivo on rat adipose tissue metabolism. *Steroids* 2003;68:543-550.
18. Xu XF, Hoebeke J, Bjorntorp P. Progestin binds to the glucocorticoid receptor and mediates antiglucocorticoid effect in rat adipose precursor cells. *J. Steroid Biochem* 1990;36:465-471.
19. Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004;5:197-216.
20. Sutter-Dub MT. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 2002;67:77-93.
21. Jaubert AM, Mojaat NM, Lacasa D, et al. Nongenomic Estrogen Effects on Nitric Oxide Synthase Activity in Rat Adipocytes. *Endocrinology* 2007;148:2444-2452.

22. Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, et al. Estrogen Receptor α Interacts with G α 13 to Drive Actin Remodeling and Endothelial Cell Migration via the RhoA/Rho Kinase/Moesin Pathway. *Mol Endocrinol* 2006;20:1756-1771.
23. Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, et al. Progestogens regulate endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod* 2008;14:225-234.
24. Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, et al. Extra-Nuclear Signalling of Estrogen Receptor to Breast Cancer Cytoskeletal Remodelling, Migration and Invasion. *PLoS ONE* 2008; 30: 3(7):e2790.
25. Chrissobolis S, Budzyn K, Marley DP, et al. Evidence That Estrogen Suppresses Rho-Kinase Function in the Cerebral Circulation In Vivo. *Stroke* 2004;35:2200-2205.
26. Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 2008;39:715-28.
27. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-7.
28. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000;130:3122S-3126S.
29. Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, et al. Genetic And Pharmacological Inhibition Of Rho-Associated Kinase II Enhances Adipogenesis. *J Biol Chem* 2007;282:29574-29583.
30. Dragunow M, Cameron R, Narayan P, et al. Image-based high-throughput quantification of cellular fat accumulation. *J Biomol Screen* 2007;12:999-1005.
31. Fruhbeck G, Gomez-ambrosi J, Muruzabal FC, et al. The adipocyte: A model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-E8.
32. Miller WH Jr, Faust IM, Goldberger AC, et al. Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat. *Am J Physiol* 1983;245:74-80.
33. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:847-50.

34. Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 2000;49:883-8.
35. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and adipokines in health and disease. Humana Press Inc. 2007. 999 Riverview Drive, Suite 2008.
36. Sorisky A, Gagnon AM. Clinical Implications of Adipose Tissue Remodelling: Adipogenesis and Apoptosis. *Can J of diabetes* 2002;26:232-240.
37. Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr* 2010;91:280S-283S.
38. Fernández-López JA, Remesar X, Foz M, et al. Pharmacological approaches for the treatment of obesity. *Drugs* 2002;62:915-44.
39. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:S192-203.
40. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:242S-249S.
41. Misso ML, Jang C, Adams J, et al. Adipose aromatase gene expression is greater in older women and is unaffected by postmenopausal estrogen therapy. *Menopause* 2005;12:210-5.
42. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-56.
43. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004;53:S143-51.
44. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* 2005;54:133-40.
45. Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:282-9.
46. Cousin B, Munoz O, Andre M, et al. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J* 1999;13:305-12.
47. Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obesity Rev* 2007;8:41-44.
48. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity primarily due to nonfat cells. *Vitamin Horm* 2006;74:44-47.
49. Sharma AM, Staels B. Review: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:386-395.

50. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:145-71.
51. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 1994;14:99-129.
52. G elo en A, Roy PE, Bukowiecki LJ. Regression of white adipose tissue in diabetic rats. *Am J Physiol* 1989;257:E547-53.
53. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005;40:229-42.
54. Lau DC, Shillabeer G, Wong KL, et al. Influence of paracrine factors on preadipocyte replication and differentiation. *Int J Obes* 1990;3:193-201.
55. Considine RV, Nyce MR, Morales LM, et al. Paracrine stimulation of preadipocyte-enriched cell cultures by mature adipocytes. *Am J Physiol* 1996;270:E895-9.
56. Marques BG, Hausman DB, Martin RJ. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol* 1998;275:R1898-908.
57. Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9607-11.
58. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
59. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6:483-95.
60. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;64:345-73.
61. MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:5-11.
62. Scott RE, Florine DL, Wille JJ Jr, et al. Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:845-9.
63. Morrison RF, Farmer SR. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* 1999;274:17088-97.

64. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994c;79:1147-1156.
65. Cornelius P, Enerback S, Bjursell G, et al. Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumour necrosis factor. *Biochem J* 1988;249:765-9.
66. Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:472-92.
67. Ailhaud G. Early adipocyte differentiation. *Biochem Soc Trans* 1996;24:400-2.
68. Grégoire FM, Johnson PR, Greenwood MR. Comparison of the adipogenesis of preadipocytes derived from lean and obese Zucker rats in serum-free cultures. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:664-70.
69. Grégoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809.
70. Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, et al. Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines. *Cytokine* 1996;8:525-33.
71. Brun RP, Kim JB, Hu E, et al. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:826-32.
72. Chawla A, Lazar MA. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1786-90.
73. Spiegelman BM, Farmer SR. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 1982;29:53-60.
74. Selvarajan S, Lund LR, Takeuchi T, et al. A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol* 2001;3:267-75.
75. Guo X, Liao K. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 2000;251:45-53.

76. Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:1008-20.
77. Tong Q, Dalgin G, Xu H, et al. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 2000;290:134-138.
78. Ross SE, Hemati N, Longo KA, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 2000;289:950-3.
79. Sul HS, Smas C, Mei B, et al. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:S15-S19.
80. Girard J, Perdereau D, Fougere F, et al. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 1994;8:36-42.
81. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998;138:482-91.
82. Reed BC, Lane MD. Expression of insulin receptors during preadipocyte differentiation. *Adv Enzyme Reg* 1979;18:97-117.
83. Smas CM, Chen L, Sul HS. Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 1997;17:977-88.
84. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 2006;4:263-73.
85. Liu J, Farmer SR. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3 beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. *J Biol Chem* 2004;279:45020-7.
86. Sul HS. Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol* 2009;23:1717-25.
87. Adams M, Reginato, MJ, Shao D, et al. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997;272:5128-32.
88. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:10811-16.

89. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.
90. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:4-12.
91. Frühbeck G, Jebb SA, Prentice AM. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 1998;18:399-419.
92. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737-42.
93. Leibel RL, Chung WK, Chua SC Jr. The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem* 1997;272:31937-40.
94. Robaczyk M, Smiarowska M, Krzyzanowska-Swiniarska B. The ob gene product (leptin)-a new hormone of adipose tissue. *Przegl Lek* 1997;54:348-52.
95. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the Mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432.
96. Nicola NA, Hilton DJ. General classes and functions of four-helix bundle cytokines. *Adv Protein Chem* 1998;52:1-65.
97. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-331.
98. Cancellato R, Tounian A, Poitou CH, et al. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab* 2004;30:215-227.
99. Bado A, Levasseur S, Attoub S, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394: 790-793.
100. Wang J, Lie R, Hawkins M. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 1998;393:384-388.
101. Casabielle X, Hawkins M, Tome MA, et al. 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;82:4270-73.
102. Considine RV. Regulation of leptin production. *Rev Endocrinol Metab Disord* 2001;2:357-363.
103. 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.

104. Gonzalez RR, 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;85:12:4883-88.
105. Long J, Shuya Z, Bartolome G. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000;141:333-39.
106. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11073-11078.
107. Cumin F, Bawm HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes* 1996;20:1120-1126.
108. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, et al. Circulating leptin in women a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol Oxford* 1997;47:101-106.
109. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999;130:671-80.
110. Blum WF, Englaro P, Hanithsch S, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: Dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2904-2910.
111. Garcia Mayor RV, Andrade MA, Rios M. Relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2849-2855.
112. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell* 1995; 83:1263-1271.
113. Yeğen BÇ. İnfeksiyon ve inflamasyonda leptin. *Genel Tıp Dergisi* 2003;Haziran 2.
114. Wang MY, Zhou YT, Newgard GB, et al. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 1996;392:87-90.
115. Reichlin S. Is leptin a secretion of the brain. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2267-9.
116. <http://www.biochemj.org/bj/393/0007/bj3930007f03.htm>.

117. Mistry AM, Swick AG, Romsos DR. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabol rates in lean and ob/ob mice. *J Nutr* 1997;127:2065-2072.
118. Sandoval DA, Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications* 2003;17:108-113.
119. Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, et al. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur J Pharmacol* 1999;365:273-9.
120. Schneider R, Bornstein SR, Chrousos GP, et al. Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor. *Horm Metab Res* 2001;33:1-6.
121. Dieudonne MN, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, et al. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:622-8.
122. O'brien SN, Welter BH, Price TM. Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:695-8.
123. Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, et al. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1810-3.
124. Catalano S, Mauro L, Marsico S, et al. Leptin Induces, via ERK1/ERK2 Signal, Functional Activation of Estrogen Receptor alpha in MCF-7 Cells. *J Biol Chem* 2004;279:19908-15.
125. Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 2001;50:443-59.
126. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996;382:250-252.
127. Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, et al. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: Implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:670-675.
128. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel hormon: Leptin. *Uludağ Ü. Tıp Fak Dergisi* 2004;30:113-118.
129. Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 2002;440:85-98.

130. Touminen JA, Ebeling P, Heiman ML, et al. Leptin and thermogenesis in humans. *Acta Physiol* 1997;160:83-87.
131. Van Marken Lichtenbelt WD, Daanen HA. Cold-induced metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:469-75.
132. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24: 225-253.
133. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996;45:1455-1462.
134. Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl* 2005;6:7-14.
135. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, et al. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003;26:2442-2450.
136. Emral R. Adiponektin ve Diğer Sitokinler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006;26:409-420.
137. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, et al. Genomic structure and mutations in adipospecific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:861-868.
138. Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14478-14483.
139. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003;148: 293-300.
140. Pajvani UB, Du X, Combs TP, et al. Structure-function studies of the adipocyte secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003;278:9073-9085.
141. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-9.
142. Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, et al. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2004;558:27-32.
143. Hug C, Wang J, Ahmad NS, et al. T Cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10308-10313.

144. Capeau J. The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. *J Hepatol* 2007;47:736-8.
145. Chinetti G, Zawadski C, Fruchart JC, et al. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPAR α , PPAR γ , and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:151–158.
146. Karbowska J, Kochan Z. Effect of DHEA on endocrine functions of adipose tissue, the involvement of PPAR gamma. *Biochem Pharmacol* 2005;70:249-57.
147. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:30817–30822.
148. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2005-10.
149. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-946.
150. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 2005;579:5163-5169.
151. Shibata R, Ouchi N, Ito M, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med* 2004;10:1384-1389.
152. Karbowska J, Kochan Z. Role of Adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *J Physiol Pharmacol* 2006;57:103-113.
153. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, et al. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci* 2002;103:137-142.
154. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-1599.

155. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001;103:1057-1063.
156. Garaulet M, Hernández-Morante JJ, de Heredia FP, et al. Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutr* 2007;10:1145-50.
157. Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin-its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 2002;34:469-474.
158. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, et al. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1084-1089.
159. Stepan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:18-23.
160. Stepan CM, Brown EJ, Wright CM. Family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:502-506.
161. Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001;276:25970-25973.
162. Vale A, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr* 2007;83:192-203.
163. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.
164. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:472-476.
165. Yura S, Sagawa N, Itoh H. Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1394-1397.
166. Minn AH, Patterson NB, Pack S. Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:641-645.
167. Berger A. Resistin: a new hormone that links obesity with type 2 diabetes. *BMJ* 2001;322:193.

168. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, et al. Isoproterenol inhibits resistin gene expression through a Gs-protein-coupled in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 2001;500:60-63.
169. Haugen F, Jorgensen A, Drevon CA, et al. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 2001;507:105-108.
170. Rea R, Donnelly R. Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity? *Diabetes Obes Metab* 2004;6:163-170.
171. Hotta K. 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.
172. Rajala MW, Qi Y, Patel HR. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004;53:1671-1679.
173. Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 2003;46:1594-603.
174. Chen YH, Hung PF, Kao YH. IGF-1 down-regulates resistin gene expression and protein secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E1019-27.
175. Gerber M, Böttner A, Seidel B. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4503-4509.
176. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;174:5789-5795.
177. Verma S, Li SH, Wang CH. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108:736-740.
178. Satman İ, Yılmaz MT, Sengül A. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: Result of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002;25:1551-1556.
179. Schäffler A, Schölmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol* 2010;31:228-35.
180. Anderson WH, Davidson TM, Broide DH. Mast cell TNF mRNA expression in nasal mucosa demonstrated by in situ hybridization: a comparison of mast cell detection methods. *J Immunol Methods* 1995;189:145-155.

181. Das UN. GLUT-4, tumour necrosis factor, essential fatty acids and daf-genes and their role in glucose homeostasis, insulin resistance, non-insulin dependent diabetes mellitus, and longevity. *J Assoc Physicians India* 1999;47:431-435.
182. Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:168-175.
183. Wellen KE, Uysal KT, Wiesbrock S. Interaction of tumor necrosis factor alpha and thiazolidinedione-regulated pathways in obesity. *Endocrinology* 2004;145:2214-2220.
184. Cariou B, Capitaine N, Le Marcis V. Increased adipose tissue expression of Grb14 in several models of insulin resistance. *FASEB J* 2004;18:965-967.
185. Pang XP, Yoshimura M, Hershman JM. Suppression of rat thyrotroph and thyroid cell function by tumor necrosis factor-alpha. *Thyroid* 1993;3:325-330.
186. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994; 43: 1271-1278.
187. Barrett KE. Cytokines: sources, receptors, and signaling. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996;10:1-15.
188. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
189. Kern PA, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and IL-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:745-751.
190. Altomonte J, Harbaran S, Richter A, et al. Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metabolism* 2003;52:958-963.
191. Sheu WHH, Lee WJ, Chang RL, Chen YT. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and insulin sensitivity in hypertensive subjects. *Clin Exp Hypertens* 2000;22:595-606.
192. Samad F, Uysal KT, Wiesbrock SM, et al. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6902-6907.

193. Collins T: Acute and chronic inflammation: Robbins Pathologic Basis of Disease. Altıncı baskı. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Bobbins SL (eds) WB Saunders, Philadelphia 1999;S:56-88.
194. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10:19-29.
195. Hotamisligil GS. The role of TNF alpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999;245:621-625.
196. LeBoeuf RC, Schreyer SA. The role of tumor necrosis factor-alpha receptors in atherosclerosis. *Trends Cardb/asc Med* 1998;8:131-138.
197. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of Interleukin 6. *İmmünol Today* 1990;11:443-449.
198. Jelinek DF. Mechanisms of myeloma cell growth control. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999;13:1145-1157.
199. Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, et al. Receptor synergy of interleukin-6(IL-6) and insulin-like growth factor-I that highly express IL-6 receptor α myeloma cells. *Blood* 2004;103:2291-2298.
200. Dalmon J, Laurent M, Courtois G. The human beta fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. *Mol Cell Biol* 1993;13:1183-93.
201. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, et al. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor- α . *J İmmünol* 1996;157:12-20.
202. Kern PA, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E745–E751.
203. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11924-11928.
204. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2792-2800.

205. De Maat MP, Pietersma A, Kofflard M, et al. Association of plasma fibrinogen levels with coronary artery disease, smoking and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 1996;121:185-91.
206. Piconi L, Quagliario L, Da Ros R. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Thromb Haemost* 2004;2:1453-1459.
207. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002;8:75-79.
208. Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, et al. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989;125:575-577.
209. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue release IL-6, but not tumor necrosis factor alpha, *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4196-4200.
210. Van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, et al. IL-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3005-3010.
211. Dikmen N, Özgünen T. Harper'ın Biyokimyası. Nobel Tıp Kitapevleri, 2004:594-599.
212. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* 1992;44:275-283.
213. Wen Y, Wang H, MacLaren R, et al. Sex steroid hormones induce acylation stimulating protein resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 2008;105:404-13.
214. Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* 2007;25:139-153.
215. <http://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen>
216. Kayaalp O Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 2002;10. Baskı: 1314-1340. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.
217. Ellmann S, Sticht H, Thiel F, et al. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2405-26.
218. Fu XD, Simoncini T. Extra-nuclear Signaling of Estrogen Receptors. *IUBMB Life* 2008;60:502-10.

219. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925-30.
220. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561-70.
221. Speroff L. A clinical understanding of the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:26-39.
222. <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~pkelicen>.
223. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids* 2008;73:874-9.
224. McCarty MF. Modulation of adipocyte lipoprotein lipase expression as a strategy for preventing or treating visceral obesity. *Med Hypotheses* 2001;57:192-200.
225. Manolagas SC, Kousteni S. Perspective: nonreproductive sites of action of reproductive hormones. *Endocrinology* 2001;142:2200-4.
226. Thompson LP, Weiner CP. Long-term estradiol replacement decreases contractility of guinea pig coronary arteries to the thromboxane mimetic U46619. *Circulation* 1997;95:709-714.
227. Teoh H, Leung SW, Man RY. Short-term exposure to physiological levels of 17-beta-estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery. *Cardiovasc Res* 1999;42:224-31.
228. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, et al. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:847-55.
229. Otter D, Austin C. Effect of 17 β -estradiol on rat isolated coronary and mesenteric artery tone; involvement of nitric oxide. *J Pharm Pharmacol* 1998;50:531-538.
230. Jovanović A, Jovanović S. Estrogen and vascular system: more questions for the future. *Cardiovasc Res* 1999;42:9-11.
231. Markou A, Duka T, Prelevic GM. Estrogens and brain function. *Hormones* 2005;4:9-17.
232. Gee KW. Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore. *Mol Neurobiol* 1988;2:291-317.

233. McEwen BS. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:141-7.
234. Vincens M, Shu C, Moguilewsky M, et al. A progesterone metabolite enhances the activity of the GABA A receptor complex at the pituitary level. *Eur J Pharmacol* 1989;168:15-21.
235. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, et al. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 1997;138:4030-4033.
236. Aloysi A, Van Dyk K, Sano M. Women's cognitive and affective health and neuropsychiatry. *Mt Sinai J Med* 2006;73:967-75.
237. Genazzani AR, Stomati M, Monteleone P, et al. Effect of HRT on cognitive function and mood. *J Menopause* 2000;2:9-11.
238. Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS. Novel mechanism of antiprogestin action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:9-17.
239. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, et al. Differential gene regulation by the two PR isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:5209-18.
240. Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, et al. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human PR are due to differential cofactor binding. *Molec Cellular Biol* 2000;20:3102-15.
241. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, et al. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:339-355.
242. Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, et al. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the PRB isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9744.
243. Kayaalp O. Estrojenler, Progestinler ve Antagonistleri. *Tıbbi Farmakoloji Ankara: 2000:1387-1413.*
244. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003;148:281-92.
245. Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 1977;265:69-72.

246. Valverde MA, Rojas P, Amigo J, et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 1999;285:1929-1931.
247. Kelly MJ, Wagner EJ. Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1999;10:369-374.
248. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO Journal* 1996;15:1292-1300.
249. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, et al. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 1997;138:4030-3.
250. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad USA* 1994;91:8517-8521.
251. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* 1997;272:11902-11907.
252. Tesarik J, Moos J, Mendoza C. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 1993;133:328-335.
253. Grosse B, Kachkache M, Le Mellay V, et al. Membrane signalling and progesterone in female and male osteoblasts I. Involvement of intracellular Ca(2+), inositol trisphosphate, and diacylglycerol, but not cAMP. *J Cel Biochem* 2000;79:334-345.
254. Machelon V, Nome F, Grosse B, et al. Progesterone triggers rapid transmembrane calcium influx and/or calcium mobilization from endoplasmic reticulum, via a pertussisin sensitive G-protein in granulosa cells in relation to luteinization process. *J Cell Biochem* 1996;61:619-628.
255. Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE Jr. The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 2001;276:37708-37714.

256. Watson CS. Signaling themes shared between peptide and steroid hormones at the plasma membrane. *Sci STKE* 1999;1999(12):PE1.
257. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, et al. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J* 1999;18:2500-2510.
258. Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, et al. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem* 2001;276:27071-27076.
259. Burger K, Fahrenholz F, Gimpl G. Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Letters* 1999;464:25-29.
260. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002;16:2181-2187.
261. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990;348:125-32.
262. Casey PJ, Seabra MC. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 1996;271:5289-92.
263. Barandier C, Ming XF, Yang Z. Small G Proteins as Novel Therapeutic Targets in Cardiovascular Medicine. *News Physiol Sci* 2003;18:18-22.
264. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420:629-35.
265. Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett* 2001;165:1-10.
266. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81:153-20.
267. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118:843-846.
268. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell* 1985;41:31-40.
269. Barandier C, Ming XF, Rusconi S, et al. PKC is required for activation of ROCK by RhoA in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:714-9.

270. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000;348:241-55.
271. Sorokina EM, Chernoff J. Rho-GTPases: new members, new pathways. *J Cell Biochem* 2005;94:225-31.
272. Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;12:357-8.
273. Ridley AJ, 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;70:389-99.
274. Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, et al. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* 1990;111:1001-7.
275. Tominaga, T, Sugie K, Hirata M, et al. Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation by ADP ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, rho. *J Cell Biol* 1993;120:1529-37.
276. Takaishi K, Sasaki T, Kato M, et al. Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* 1994;9:273-279.
277. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 1992;267:8719-22.
278. Nishiki T, Narumiya S, Morii N, et al. ADP-ribosylation of the rho/rac proteins induces growth inhibition, neurite outgrowth and acetylcholine esterase in cultured PC-12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167:265-72.
279. Mabuchi I, Hamaguchi Y, Fujimoto H, et al. A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs. *Zygote* 1993;1:325-31.
280. Somlyo AV. New roads leading to Ca^{2+} sensitization. *Circ Res* 2002;91:83-8.
281. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247-269.
282. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research* 2000;261:44-51.

283. Gong MC, Iizuka K, Nixon G. Role of guanine nucleotide binding proteins –ras- family of trimeric proteins or both Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:1340-1345.
284. Cleber E, Teixeira R, Clinton W. Targeting the vascular RhoA-Rho-kinase signaling pathway in hypertension. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2005;3:193-199.
285. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, et al. 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.
286. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 1996;392:189-193.
287. Amano M, Chihara K, Nakamura N, et al. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem* 1999;274:32418–32424.
288. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 1988;241:42–52.
289. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al. Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 1996;15:2208-2216.
290. Leung T, Chen XQ, Manser E, et al. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 1996;16:5313-5327.
291. Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, Saito Y, Narumiya S. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:23022-23028.
292. Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, et al. Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J Biol Chem* 1998;273:18943-9.
293. Wibberley A, Chen Z, Hu E, et al. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;138:757–766.

294. Wei L, Roberts W, Wang L, et al. Rho kinases play an obligatory role in vertebrate embryonic organogenesis. *Development* 2001;128:2953-2962.
295. Chen XQ, Tan I, Ng CH, et al. Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha implication of the pleckstrin homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. *J Biol Chem* 2002;277:12680-12688.
296. Chevrier V, Piel M, Collomb N, et al. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J Cell Biol* 2002;157:807-817.
297. Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996;271:20246-20249.
298. Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273:245-248.
299. Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, et al. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* 1997;404:118-124.
300. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, et al. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 2000;150:797-806.
301. Kaneko T, Amano M, Maeda A, et al. Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:110-116.
302. Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, et al. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* 2000;275:3577-3582.
303. Matsui T, Maeda M, Doi Y, et al. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 1998;140:647-657.
304. Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, et al. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol* 1999;145:347-361.
305. Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, et al. p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J* 1998;17:4712-4722.

306. Hagerty L, Weitzel DH, Chambers J, et al. ROCK1 phosphorylates and activates ZIP kinase. *J Biol Chem* 2007;282:4884-4893.
307. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, et al. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 1998;140:627-636.
308. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001;3:339-345.
309. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387-390.
310. Begum N, Sandu OA, Ito M, et al. Active Rho kinase (ROK-alpha) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277:6214-6222.
311. Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, et al. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005;2:119-129.
312. Riento K, Ridley AJ. Kinases in cell behaviour. *Nature* 2003;4:446-456.
313. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:32-9.
314. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990-4.
315. Kamai T, Arai K, Sumi S, et al. The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *BJU Int* 2002;89:445-449.
316. Honjo M, Tanihara H, Inatani M, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:137-144.
317. Moran CJ, Friel AM, Smith TJ, et al. Expression and modulation of Rho kinase in human pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod* 2002;8:196-200.
318. Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, et al. Human and Rabbit Cavernal Smooth Muscle Cells Express Rho-kinase. *Int J Impot Res* 2002;14:1-7.
319. Wang H, Eto M, Steers WD, et al. RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J Biol Chem* 2002;277:30614-30621.

320. Büyükafşar K, Un I. Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2003;472:235-8.
321. Büyükafşar K, Levent A, Ark M. Expression of Rho-kinase and its Functional role in the Contractile Activity of the Mouse Vas Deferens. *Br J Pharmacol* 2003;140:743-749.
322. Levent A, Büyükafşar K. Expression of Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) and its substantial role in the contractile activity of the sheep ureter. *Br J Pharmacol* 2004;143:431-437.
323. Turna B, Cinar MG, Canda AE, et al. Role of Rho-kinase in contractions of ureters from rabbits with unilateral ureteric obstruction. *BJU Int* 2007;100:1166-71.
324. Büyükafşar K, Akça T, Nalan Tiftik R, et al. Contribution of Rho-kinase in human gallbladder contractions. *Eur J Pharmacol* 2006;540:162-7.
325. Sahan-Firat S, Tiftik RN, Nacak M, et al. Rho kinase expression and its central role in ovine gallbladder contractions elicited by a variety of excitatory stimuli. *Eur J Pharmacol* 2005;528:169-75.
326. Büyükafşar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:777-81.
327. Chiba Y, Sato S, Hanazaki M, et al. Inhibition of geranylgeranyltransferase inhibits bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:984-91.
328. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, et al. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:494-499.
329. Köksel O, Yildirim C, Tiftik RN, et al. Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol* 2005;510:135-42.
330. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho-kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:387-398.

331. Nikolic M. The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:731-745,
332. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:173-180.
333. Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, et al. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res* 2007;1154:215-24.
334. Tachibana E, Harada T, Shibuya M, et al. Intra-Arterial Infusion of Fasudil Hydrochloride for Treating Vasospasm Following Subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 1999;141:13-19.
335. Büyükaşar K, Yalçın I, Kurt AH, et al. Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *Eur J Pharmacol* 2006;541:49-52.
336. Inan S, Büyükaşar K. Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. *Br J Pharmacol* 2008;155:44-51.
337. Büyükaşar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:777-781.
338. Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al. Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001;38:100-4.
339. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, et al. Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:868-73.
340. Kawamura H, Yokote K, Asaumi S, et al. High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:276-281.
341. Büyükaşar K, Arıkan O, Ark M, et al. 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;498:211-7.
342. Uchata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990-4.

343. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, et al. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm *Cardiovasc Res* 1999;43:1029-39.
344. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003;93:767-75.
345. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;106:57-62.
346. Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley and Sons 1998;57-61:62-64.
347. Ambati S, Kim HK, Yang JY, et al. Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Pharmacol* 2007;73:378-384.
348. <http://withfriendship.com/user/kalaikumar/elisa.php>.
349. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KMC2281_revA3.pdf
350. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KMP0051_revA4.pdf.
351. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KMP0041_revA6.pdf.
352. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KMC0061C_revB8.pdf.
353. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KMC3011_Rev1.pdf.
354. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/BioRad_proteinassay.
355. Lea-Currie YR, Monroe D, McIntosh MK. Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123;17-25:1999.
356. Kang SI, Ko HC, Shin HS, et al. Fucoxanthin exerts differing effects on 3T3-L1 cells according to differentiation stage and inhibits glucose uptake in mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;409:769-74.
357. Hamosh M, Hamosh P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 55:1132–1135, 1975.
358. Cooke PS, Naaz A. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Exp Biol Med* 2004;229:1127-1135.
359. Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol* 2011 Jul 5. [Epub ahead of print].

360. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, et al. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 2008;116, 1642-1647.
361. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, et al. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 2009;587:5031-5037.
362. Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Media* 2009 89:89-97.
363. Chimento A, Sirianni R, Zolea F, et al. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *Int J Androl* 2010 Sep 21. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01100.x.
364. Iwamoto H, Nakamuta M, Tada S, et al. A p160ROCK-specific inhibitor, Y-27632, attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Hepatol* 2000;32:762-70.
365. Takano H, Komuro I, Oka T, et al. The Rho family G proteins play a critical role in muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1580-9.
366. Sordella R, Jiang W, Chen GC, et al. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003;113:147-58.
367. Stevis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, et al. Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology* 1999;140:5455-8.
368. Zak KP, Kondratskaia IN, Popova VV. Hormones of adipose tissue in diabetes mellitus and its complications *Lik Sprava* 2010;(5-6):39-55).
369. Casabiell X, Piñeiro V, Peino R, et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2149-55
370. Hong SC, Yoo SW, Cho GJ, et al. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause* 2007;14:835-40.

371. Monjo M, Pujol E, Roca P. alpha2- to beta3-Adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17beta-estradiol, and progesterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E145-50.
372. Bednarek-Tupikowska G, Filus A, Kuliczowska-Płaksej J, et al. Serum leptin concentrations in pre- and postmenopausal women on sex hormone therapy. *Gynecol Endocrinol*. 2006;22:207-12,
373. Yi KW, Shin JH, Seo HS, et al. Role of estrogen receptor-alpha and -beta in regulating leptin expression in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2393-9.
374. Lappas M, Yee K, Permezel M, et al. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* 2005;186:457-65.
375. Merki-Feld GS, Imthurn B, Rosselli M, et al. Serum concentrations of high-molecular weight adiponectin and their association with sex steroids in premenopausal women. *Metabolism* 2011;60:180-5.
376. Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4823-31.
377. Leung KC, Xu A, Craig ME, et al. Adiponectin isoform distribution in women--relationship to female sex steroids and insulin sensitivity. *Metabolism* 2009;58:239-45.
378. Nakayama Y, Komuro R, Yamamoto A, et al. RhoA induces expression of inflammatory cytokine in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379:288-92.
379. Kikuchi Y, Yamada M, Imakiire T, et al. A Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents development of diabetes and nephropathy in insulin-resistant diabetic rats. *J Endocrinol* 2007;192:595-603.
380. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.
381. Chen YH, Lee MJ, Chang HH, et al. 17 beta-estradiol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor, extracellularly

- regulated kinase, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha pathways. *Endocrinology* 2006;147:4496-504.
382. Huang SW, Seow KM, Ho LT, et al. Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 2005;579:449-454.
383. Bruun JM, Nielsen CB, Pedersen SB, et al. Estrogen reduces pro-inflammatory cytokines in rodent adipose tissue: studies in vivo and in vitro. *Horm Metab Res* 2003;35:142-6.
384. Trikha M, Corringham R, Klein B, et al. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* 2003;9:4653-65.
385. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007;317:121-4.
386. Huang H, He J, Yuan Y, et al. Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages. *J Med Invest* 2008;55:133-41.
387. Yuan Y, Shimizu I, Shen M, et al. Effects of estradiol and progesterone on the proinflammatory cytokine production by mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2008;14:2200-2207.
388. O'Brien SM, Fitzgerald P, Scully P, et al. Impact of gender and menstrual cycle phase on plasma cytokine concentrations. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14:84-90.
389. Edwards KM, Mills PJ. Effects of estrogen versus estrogen and progesterone on cortisol and interleukin-6. *Maturitas* 2008;61:330-3.
390. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA* 2006;295:1549-1555.
391. Wei-kai H, Yu-xin X, Ting Y, et al. Adipocytokines And Breast Cancer Risk. *Chin Med J* 2007;120:1592-1596.
392. Luukkaa V, Savontaus E, Rouru J, et al. Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat. *Gynecol Endocrinol* 2001;15:103-12,

393. Brann DW, De Sevilla L, Zamorano PL, et al. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 1999;64:659-63.
394. Fujinami A, Ohta K, Matsui H, et al. Resistin concentrations in murine adipose tissue and serum measured by a new enzyme immunoassay. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:199-205.
395. Caja S, Puerta M. Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. *Horm Metab Res* 2007;39:501-6.
396. Tankó LB, Christiansen C. Adipose tissue, insulin resistance and low-grade inflammation: implications for atherogenesis and the cardiovascular harm of estrogen plus progestogen therapy. *Climacteric* 2006;9:169-80.
397. Toyoda Y, Miyashita T, Endo S, et al. Estradiol and progesterone modulate halothane-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett* 2011;204:17-24.
398. O'Brien SM, Fitzgerald P, Scully P, et al. Impact of gender and menstrual cycle phase on plasma cytokine concentrations. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:84-90.
399. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, et al. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 2005;280:35983-91.
400. Pietras RJ, Nemere I, Szego CM. Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine* 2001;14:417-427.
401. Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:369-381.
402. Hakan Kurt. Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Androjenik ve Estrojenik Hormonların Rho-Kinaz Enzim Ekspresyonu Üzerine Etkisi. 2007: Yüksek lisans Tezi.
403. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:27008-16.
404. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:1784-92.

405. Zeidan A, Javadov S, Karmazyn M. Essential role of Rho/ROCK dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2006;72:101-11.
406. Zeidan A, Paylor B, Steinhoff KJ, et al. Actin cytoskeleton dynamics promotes leptin-induced vascular smooth muscle hypertrophy via RhoA/ROCK- and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-dependent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:1110-6.
407. Hara Y, Wakino S, Tanabe Y, et al. Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. *Sci Signal* 2011;25;4(157):ra3.
408. Collison M, Campbell IW, Salt IP, Dominiczak AF, Connell JM, Lyall H, Gould GW. Sex hormones induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by reducing cellular content of IRS proteins. *Diabetologia* 2000;43:1374-1380.
409. Muraki K, Okuya S, Tanizawa Y. Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J* 2006;53:841-851.
410. Lee MJ, Lin H, Liu CW, et al. Octylphenol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1542-51.
411. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:385-409.
412. Thor D, Zhang R, Anderson L, et al. Effects of 17 β -estradiol on lipopolysaccharide-induced intracellular adhesion molecule-1 mRNA expression and Ca²⁺ homeostasis alteration in human endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2010;53:230-8.
413. Int J Santen S, Wang Y, Laschke MW, et al. Rho-kinase signalling regulates CXC chemokine formation and leukocyte recruitment in colonic ischemia-reperfusion. *Colorectal Dis* 2010;25:1063-70.

414. Hall N, White C, O'Sullivan AJ. The relationship between adiponectin, progesterone, and temperature across the menstrual cycle. *J Endocrinol Invest* 2009;32:279-83.
415. Gotkin JL, Celver J, McNutt P, et al. Progesterone reduces lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, and maternal mononuclear cells. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1015-9,
416. Koubovec D, Vanden Berghe W, Vermeulen L, et al. Medroxyprogesterone acetate downregulates cytokine gene expression in mouse fibroblast cells. *Mol Cell Endocrinol* 2004;221:75-85,
417. Yang JH, Chen MJ, Wu MY, et al. Decreased suppression of interleukin-6 after treatment with medroxyprogesterone acetate and danazol in endometrial stromal cells of women with adenomyosis. *Fertil Steril* 2006;86:1459,
418. Henry PJ, Mann TS, Goldie RG. A rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice. *Pulm Pharmacol Ther* 2005;18:67-74.
419. Li Y, Yao JH, Hu XW, et al. Inhibition of Rho kinase by fasudil hydrochloride attenuates lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2011;88:104-9.