



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TOPİRAMATIN YAĞ HÜCRESİ  
FARKLILAŞMASI VE BAZI KARBONİK  
ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ GEN  
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İN  
VİTRO İNCELENMESİ**

Ayşegül SÜMER

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. E.Edip KEHA

TRABZON - 2014





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TOPİRAMATIN YAĞ HÜCRESİ  
FARKLILAŞMASI VE BAZI KARBONİK  
ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ GEN  
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İN  
VİTRO İNCELENMESİ**

Ayşegül SÜMER

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. E.Edip KEHA

TRABZON - 2014

## ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ayşegül SÜMER'in hazırladığı "Topiramatin Yağ Hücreleri Farklılaşması ve Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin *In Vitro* İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. E. Edip KEHA

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. E. Edip KEHA

Doç. Dr. Ahmet ALVER

Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Tarih: 16/4/2014.

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağılı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24.03.2014

Ayşegül SÜMER

## **İthaf**

*Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca, bilimsel bakış açısı, akademik duruşu ve karakteri yönünden daima örnek olarak aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA' ya, tezimin planlanması, deneysel aşamalar ve teorik kısımlar dahil hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, bilimsel ve akademik geçmişimin oluşmasında, imkan, bilgi ve deneyimlerini büyük özveriyle benimle paylaşan Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE' ye, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilimsel ve manevi yönden yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANIZÖR KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN' a, aramızdan ayrılan, saygıyla andığımız değerli hocamız Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e, üniversitemiz eski öğretim üyelerinden Prof. Dr. Fahri Uçar'a, "3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Dönüşümüne Topiramatin Etkisi" adlı projemizi destekleyen KTÜ BAP birimi ve KTÜ Rektörlüğü'ne, bana her aşamada destek ve yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarıma, Rize ile Trabzon arasındaki yola beraber katlandığım dostlarım Arş. Gör. Selim DEMİR ve Müge KOPUZ' a bugünlere gelmemde katkıları büyük olan, sonsuz özveri ve emekleri için aileme, desteği ve sabrı için eşime teşekkür ederim.

Arş. Gör. Ayşegül SÜMER

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2009.114.001-4

**İÇİNDEKİLER****Sayfa****KABUL ve ONAY****BEYAN****TEŞEKKÜR****KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ****ix**

<b>1.</b>	<b>ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4.</b>	<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
4.1.	Yağ Dokusu (Adipoz Doku)	5
4.2.	Yağ Dokusunun Gelişimi	6
4.3.	Yağ Hücresi Farklılaşması (Adipogenez)	6
4.4.	Farklılaşma Modelleri	6
4.4.1.	3T3-L1 Hücreleri	7
4.5.	Yağ hücresi Farklılaşması Basamakları	8
4.5.1.	Yönlenme (Kommitment)	9
4.5.2.	Büyümenin Durması ve Mitotik Klonal Ekspansiyon	9
4.5.3	Terminal Diferansiyasyon	10
4.6.	Gen Ekspresyonunda Erken Değişiklikler	10
4.7.	Adipogenezin Düzenlenmesi	11
4.7.1.	Endokrin Faktörler	12
4.7.2.	Parakrin Faktörler	12
4.7.3.	Transkripsiyon Faktörleri	13
4.7.3.1.	C/EBP Ailesi	13
4.7.3.2.	PPAR Ailesi	14
4.7.3.3.	ADD1/SREBP1	15
4.7.3.4	Retinoid Reseptörleri	15
4.7.4.	Transkripsiyon Faktörleri Arasındaki Sinerji	15
4.8.	Yağ Dokusunun Endokrin Özellikleri	15



4.9.	Karbonik Anhidrazlar	17
4.9.1.	Karbonik Anhidraz I	17
4.9.2.	Karbonik Anhidraz II	18
4.9.3.	Karbonik Anhidraz III	18
4.9.4.	Karbonik Anhidraz VA ve VB	19
4.10.	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	20
4.11.	Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Antiobezite İlacı Olarak Kullanılması	21
4.12.	Topiramet	22
<b>5.</b>	<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>24</b>
5.1.	Kullanılan Cihaz ve Aletler	24
5.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
5.3.	Hücre Kültürü	26
5.3.1.	3T3-L1 Hücrelerinin Kültürlenmesi	26
5.3.2.	3T3-L1 Hücrelerinin Pasajlanması	27
5.3.3.	3T3-L1 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi	27
5.3.4.	3T3-L1 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması	28
5.3.5.	3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması	28
5.3.5.1.	Farklılaştırma Protokolü	29
5.3.6.	Yağ hücresine Farklılaşan Hücrelerin Boyanması	30
5.3.7.	Hücre Canlılığı ve Toksikite Testi	31
5.4.	Topirametin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi	32
5.5.	Topirametin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılmış 3T3-L1 Hücrelerinde Adiponektin Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi	33
5.6.	Topirametin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılması Esnasında Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (I, II, III, VA, VB) Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	33
5.6.1.	RNA İzolasyonu	34
5.6.2.	RT-PCR ile RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi	35
5.6.3.	Real Time PCR Yöntemi İle Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi	36

5.6.4.	Real Time PCR Protokolü	37
5.7.	İstatistiksel Yöntemler	390
<b>6.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>41</b>
6.1.	3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması	41
6.2.	Topiramatin 3T3- L1 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	42
6.3.	Topiramatin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşmasına Etkisi	42
6.4.	GW 9662'nin 3T3- L1 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	44
6.5.	GW 9662'nin 3T3- L1 Hücrelerinin Farklılaşması Üzerine Etkisi	44
6.6.	Farklılaşan Hücrelerde Adiponektin Düzeyleri	46
6.7.	Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (CA I, CA II, CA III, CA VA, CA VB) Gen Ekspresyonu Değişimi	46
6.8..	Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA I Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	47
6.9.	Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA II Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	49
6.10	Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA III Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	50
6.11.	Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA VA Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	52
6.12	Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA VB Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	53
<b>7.</b>	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>69</b>

## KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>ADD1/SREBP-1c</b>	Adiposit Tanımlama ve Farklılaşma-Bağımlı faktör 1/ Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein 1
<b>AEI</b>	Klorür/Bikarbonat Taşıyıcısı
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik Asit
<b>ASP</b>	Açilleme Uyarıcı Protein
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>bHLH</b>	Bazık Heliks Loop Heliks
<b>BMP4</b>	Kemik Morfogenik Protein-4
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>CA</b>	Karbonik Anhidraz
<b>CARP</b>	Karbonik Anhidraz İlişkili Protein
<b>C/EBP</b>	CCAAT/ Artırıcı Bağlayan Protein
<b>CoA</b>	Koenzim A
<b>DEX</b>	Deksametazon
<b>DMEM</b>	Dulbecco Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumu
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>GABA</b>	Gama-aminobütirik Asit
<b>HDL</b>	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HMSCS</b>	İnsan Mezensimal Kök Hücreleri
<b>IGF-1</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
<b>IL-6</b>	İnterlökin-6
<b>LPL</b>	Lipoprotein Lipaz
<b>MCP-1</b>	Monosit Kemoatraktan Protein

<b>MIF</b>	Migrasyon İnhibisyon Faktörü
<b>MIX</b>	Metilzobütiksantin
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MTT</b>	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>NBC1</b>	Sodyum/Bikarbonat Taşıyıcısı
<b>NHE1</b>	Sodyum/ Hidrojen Değişimcisi
<b>nm</b>	Nanometre
<b>PAI-1</b>	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
<b>PEP</b>	Fosfoenol Piruvat
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGI</b>	Prostaglandin I
<b>TGFβ</b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PPARγ</b>	Peroksizom Çoğaltıcı Aktiveleli Reseptör
<b>RBP-1</b>	Retinol Bağlayıcı Protein-1
<b>RT-PCR</b>	Real Time Protein Chain Reaction
<b>RT</b>	Reverse Transcriptase
<b>RXRs</b>	Retinoik Asit Reseptörleri
<b>SD</b>	Standart Sapma
<b>TNF-α</b>	Tümör Nekroz Faktör-α
<b>TPM</b>	Topiramet
<b>T<sub>3</sub></b>	Triiyodotronin
<b>μL</b>	Mikrolitre
<b>uM</b>	Mikromolar
<b>μM</b>	Mikromolar

**Simgeler**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu$	Mikro

**Formüller**

$\text{CO}_2$	Karbondioksit
$\text{H}_2\text{O}$	Su
$\text{HCO}_3^-$	Bikarbonat

## ÖZET

### **Topiramatin Yağ Hücresi Farklılaşması ve Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İn Vitro İncelenmesi**

Antiepileptik bir ilaç olan topiramatin, nöronlarda bilinen etkilerinin yanı sıra, karbonik anhidraz inhibisyonu ve kullanan kişilerde kilo kaybına sebep olma gibi etkilere de sahiptir, ancak bu etkinin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Obezite, vücutta yağ hücrelerinin sayıca ve hacimce artmasıyla seyreden bir hastalıktır. Son yıllarda, lipogenez, üregenez, glukoneogenez, tümorogenez gibi birçok metabolik süreçte görev alan karbonik anhidraz (CA) inhibitörlerinin de antiobezite ilacı olarak kullanılmasına dikkat çeken çalışmalar bildirilmiştir.

Bu çalışmada, topiramatin 3T3-L1 preadipositlerinin yağ hücresine farklılaşmasına ve karbonik anhidraz I, II, III, VA, VB izoenzimlerinin ekspresyonuna etkisi incelenmiş ve topiramatin kilo düşürücü etkisinin mekanizmasında, adipositlerin ve karbonik anhidraz izoenzimlerinin olası rollerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Farklılaşmaya olan etki, topiramatin farklı konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerde, Oil Red O boyaması metodu ile tespit edilmiştir. 1, 5, 10, 50 ve 100 µM topiramatin ile muamele edilen hücrelerde, topiramatin adipogenezini anlamlı şekilde artırdığı gözlenmiştir (P<0.0001). Karbonik anhidraz I, II, III, VA, VB izoenzimlerinin ekspresyonu Real Time PCR Yöntemi ile belirlenmiş ve adipogenezin uyarılmasıyla, tüm izoenzimlerin ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir (P=0.0001).

Sonuç olarak topiramatin 3T3-L1 hücrelerinde, adipogenezini uyardığı, düşük konsantrasyonlarda CA II, VA ve VB ekspresyonlarını fibroblastlara göre azalttığı, CA III ekspresyonunu artırdığı bulunurken, yüksek konsantrasyonlarda CA II, VA ve VB ekspresyonlarının artırdığı, CA III ekspresyonunu ise düşürdüğü bulunmuştur. CA III ekspresyonundaki değişim obez durumlarda izoenzimin sentezinin azalmasıyla uyumlu bulunurken, CA II, VA ve VB ekspresyonlarındaki bu değişimin hücrede bir telafi mekanizması olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler** : Topiramatin, Karbonik Anhidraz, 3T3-L1 Hücreleri, Adipogenez, Gen Ekspresyonu.

## SUMMARY

### **In Vitro Investigation of Effects of Topiramate on Adipocyte Differentiation and Gene Expression of Certain Carbonic Anhydrase Isoenzymes**

Topiramate, an antiepileptic drug, beside its known effects in neurons, it has effects such as carbonic anhydrase inhibition and weight loss in treated subjects, but, the mechanisms underlying this has not been yet identified. Obesity is characterised by an increase in number and volume of adipocytes of the body. Since carbonic anhydrase (CA) is involved in many biological processes including lipogenesis, ureagenesis, gluconeogenesis and tumorigenesis, certain inhibitors of this enzyme were proposed to be used as antiobesity drugs in some recent studies.

In this study, effects of topiramate on 3T3-L1 adipocyte differentiation and expressions of carbonic anhydrase I, II, III, VA, VB were investigated in order to determine possible roles of carbonic anhydrase isoenzymes and adipocytes in weight loss effect of topiramate. Effect of topiramate at different concentrations on differentiation of the 3T3-L1 cells was detected by Oil Red O staining. Adipogenesis was found to be induced in cells treated with 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu$ M topiramate ( $P < 0.0001$ ). Carbonic anhydrase I, II, III, VA, VB expressions were determined by Real-Time PCR method and all isoenzyme expressions were seen to increase significantly with the stimulation of adipogenesis without topiramate ( $P = 0.0001$ ).

Consequently, compared to fibroblasts, a reduced CA II, VA and VB and an increased CA III expression were observed for adipogenesis of 3T3-L1 cells at low concentration topiramate stimulation, while CA II, VA and VB expressions were found to be elevated and CA III expression decreased at high topimarate concentrations. It was concluded that, changes in CA III expression was consistent with its reduction in obesity, alterations of CA II, VA and VB expressions could be attributed to a compensation mechanism of the cells.

**Keywords :** Topiramate, Carbonic Anhydrase, 3T3-L1 Cells, Adipogenesis, Gene Expression

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Yağ dokusu adipositler, preadipositler, makrofajlar gibi hücrelerden oluşan, fazla enerjiyi trigliserid şeklinde depolayan ve salgıladığı adipokin adı verilen faktörlerle enerji metabolizması, immun cevap, puberte ve ovulasyon, steroid metabolizması gibi fizyolojik olaylarda önemli rollere sahip olan bir dokudur. Adipsin ve leptinin keşfi, yağ dokusunun bilinen görevlerinden ziyade, daha dinamik ve kompleks fonksiyonel bir doku olduğunu göstermiştir (1,2).

Obezite, alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması durumunda, bu enerjinin yağ dokusunda birikmesiyle, yağ hücrelerinin sayıca ve hacimce arttığı ve beraberinde kardiyovasküler hastalıklar, tip II diabet gibi yaşam kalitesini düşüren klinik durumlara sebep olan bir hastalıktır. Obezitenin prevalansının artması, adipoz dokuya olan ilginin ve bu alandaki çalışmaların da artmasına sebep olmuş, ayrıca, alternatif tedavi yöntemleri için yeni hedeflerin arayışı içine girilmiştir (3,4). Özellikle, yağ hücresi öncüllerinin yağ hücresine farklılaşmaları esnasında gen ekspresyonundaki değişimler ve bunların incelendiği *in vivo* ve *in vitro* sistemler önemli çalışma konuları olmuştur. Bu amaçla, *in vitro* sistem olarak, 3T3-L1 preadiposit hücre serisi sıklıkla kullanılmaktadır (5).

Karbonik anhidraz memelilerde 16 farklı izoenzimi bulunan ve katalizlediği karbondioksit ve suyun bikarbonata dönüşüm reaksiyonuyla birçok fizyolojik olayda kritik görevleri olan bir enzimdir. Karbonik anhidrazlar kemik resorpsiyonu, glukoneogenez, lipogenez, üreogenez gibi biyolojik süreçlerde önemli roller üstlendiği için, enzimler biyomedikal uygulamalarla aktivatör ve inhibitör tasarımı için ilginç hedefler olmuştur (6). Özellikle son yıllarda, topiramid, zonisamid gibi bazı karbonik anhidraz inhibitörlerinin antiobezitik ilaç olarak kullanılabilenliğinden söz edilmiştir (7).

Topiramid epilepsi tedavisinde kullanılan ve yapısında sülfonamid grubu bulunan bir şekerdir. Diğer sülfonamid türevleri gibi karbonik anhidraz inhibitörü özelliği göstermektedir. Topiramid tedavisi alan kişilerde kilo kaybının gerçekleştiği görülmüş, ancak, bunun sebebi ve mekanizması henüz ortaya koyulmamıştır (8). Yan etki olarak görülen kilo kaybının bir nedeninin de lipogenez de görev alan izoenzimler olan CA II, VA ve VB'nin inhibisyonundan ileri geldiğini öne süren çalışmalar mevcuttur (9), ancak moleküler düzeyde bir çalışma henüz yapılmamıştır.



Bu tez çalışmasında, antiepileptik bir ilaç ve karbonik anhidraz inhibitörü olan topiramatin 3T3-L1 preadipositlerin, yağ hücresine farklılaşması ve karbonik anhidraz izoenzimlerinden adipoz doku ile ilişkili olan CA I, II, III VA ve VB' nin ekspresyonları üzerine olan etkisi incelenerek, topiramatin kilo düşürücü özelliğinin yağ dokusu üzerinden olup olmadığı ve CA izoenzimleri ekspresyonunun bu süreçteki muhtemel rolleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Yağ Dokusu (Adipoz Doku)

Memelilerde yağ dokusu özelleşmiş bir bağ doku olup hücre yapısı, yerleşimi, rengi, damarlanması ve fonksiyonlarına göre beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşittir (10).

Kahverengi yağ dokusu insanlarda daha çok yenidoğanda termogenez sürecini düzenlemekle görevli, multiloküler adipositler içeren, bol mitokondriye sahip ve ısı üretimi için özelleşmiş bir dokudur (11).

Beyaz yağ dokusu ise ökaryotik hücrelerde en büyük enerji rezervi olup, alınan fazla enerjiyi triaçilgliserol şeklinde depolamak ve ihtiyaç durumunda mobilizasyonunu sağlamakla görevlidir (12). Yağ dokusu esas olarak adipositler adı verilen içi yağ damlacıkları ile dolu hücreler olmak üzere, fibroblastlar, preadipositler, makrofajlar gibi hücrelerden oluşmaktadır. Ayrıca bağ dokusu matriksi, sinir dokusu ve stromal vasküler hücreleri de yapısında bulundurmaktadır (1).

Adipoz dokunun trigliseridlerin depo ve mobilizasyonunu sağlayan pasif bir doku olduğunu savunan geleneksel yaklaşım 1980'lerin ortalarında adipsinin (kompleman faktör D) bu dokudan salgılandığının bulunmasıyla geçerliliğini yitirmiştir (13). 1994 yılında leptinin tanımlanması ve karakterizasyonu ile yağ dokunun bilinen özelliklerinin haricinde endokrin bir organ olduğu kabul edilmektedir. Yağ dokusunun adipokinler adı verilen birçok biyoaktif peptidi eksprese ettiği ve salgıladığı ve böylelikle otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gösterdiği bilinmektedir (14).

Adipoz doku hücrelerinden salgılanan leptin, adiponektin, kemerin, apelin, IL-6, TNF- $\alpha$ , visfatin, MCP-1, RBP-1 gibi adipokinler aracılığıyla bahsedilen fonksiyonlarını yerine getirmekte ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir (15). Adipoz doku merkezi sinir sistemi dahil birçok organla iletişim halinde olmasını sağlayan metabolik özellikleri sayesinde enerji metabolizması, nöroendokrin ve immun fonksiyonlar gibi proseslere de dahil olabilmektedir (1)

## 4.2. Yağ Dokusunun Gelişimi

İnsanlarda yağ dokusu gebeliğin 14. İle 16. haftaları arasında tespit edilebilmektedir. Erken fetal yaşamda yağ depolamada cinsiyetin bir önemi yokken gebeliğin ikinci trimesteri adipogenez için önemli bir dönemdir. Bu dönemde mezenşimal hücrelerin agregasyonu ve kan damarlarının oluşumu adipogenezin ilk sinyallerini oluşturur. 23. Haftadan sonra yağ lobülleri karakteristik olarak akümüle oldukları yerde belirginleşirler. Sonraki haftalarda lobüller büyür ve adipositler görünür hale gelir. Üçüncü trimesterde ise yağ hücreleri vücutta yağ depolanmasının muhtemel olduğu bölgelerde bulunurlar ancak hacim olarak küçüktürler (16).

## 4.3. Yağ Hücresi Farklılaşması (Adipogenez)

Öncül yağ hücrelerinden (preadiposit) çeşitli faktörlerin etkisiyle olgun adipositlerin oluşması sürecine adipogenez denir. Adipositlerin farklılaşması süreci boyunca meydana gelen moleküler ve hücrel olayların anlaşılabilmesi için preadiposit hücre serileri ve adipoz kaynaklı stromal vasküler prekürsör hücrelerin primer kültürleri gibi çeşitli hücre kültürü modelleri mevcuttur (17). Bu amaçla primer kültürden ziyade hücre serileri tercih edilmektedir. Çünkü fibroblastları diğer fibroblast benzeri hücrelerden ayırt etmek oldukça güçtür ve yağ dokunun az bir kısmını oluşturdukları için çok miktarda doku örneğine ihtiyaç duyulur. Bunun yanında primer hücreler sınırlı yaşam süresine sahiptir (18, 19).

Adipogenez sırasında meydana gelen moleküler olayların ve bu süreci düzenleyen birçok faktörün incelenmesi hücre kültürü modelleri sayesinde gerçekleştirilmiştir. Bu modellerde hücreler homojendir, sonsuz sayıda pasajlanabilmektedirler (5).

## 4.4. Farklılaşma Modelleri

Farklılaşma ve adipoz doku çalışmalarında kullanılan sistemler; birçok farklı hücre tipine dönüşebilen pluripotent hücre serileri (10T1/2, Balb/c 3T3, 1246, RCJ3.1, CHEF/18) ve adiposit kökene yönlendirilmiş hücre serileri olan ( 3T3-L1, 3T3-F422A, Ob1771, 1246, TA1, 30A5) unipotent preadipositlerdir olup 3T3-L1, 3T3-F422A literatürde en çok tercih edilen seriler hücre serileridir (20).

#### 4.4.1. 3T3-L1 Hücreleri

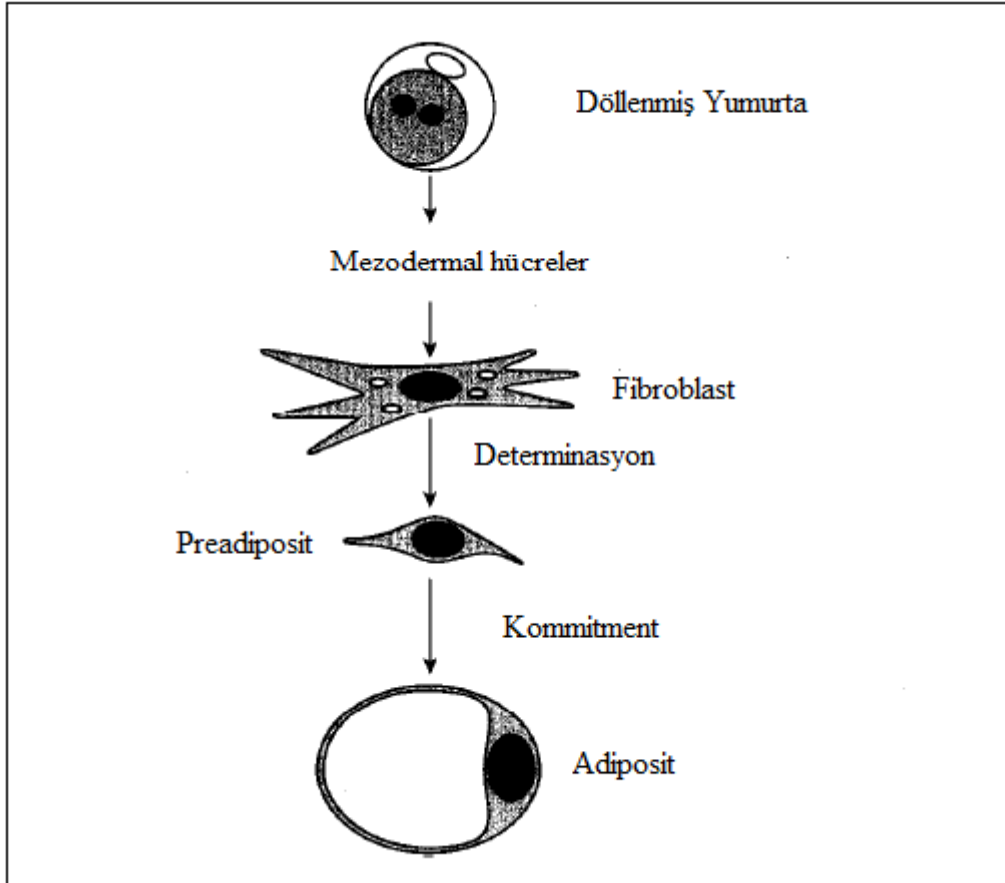
3T3-L1 hücreleri 17-19 günlük *mus musculus* embriolarından izole edilen ve tek tip hücre içeren hücre serileridir. Bu hücreler adipogenik kokteyl denen insülin, deksametazon ve izobütilmetilksantin içeren karışımla indüklendiğinde yağ hücresine farklılaşma özelliğine sahiptir. Bu hücre serileri adiposit farklılaşmasında görev alan anahtar moleküler belirteçler, transkripsiyon faktörleri ve etkileşimlerin çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Ölümsüz oldukları düşünülse de pasaj sayısı arttıkça farklılaşma yeteneklerini kaybettikleri bilinmektedir ( 21).

**Tablo 1 .** Adiposit farklılaşmasında in vitro modeller (22)

Hücre Serileri	Kökeni/Gelişim aşaması	Farklılaşma için kullanılan uyarıcı ajan
ESHücreleri	Fare blastositi	Retinoik asit
CH3 10T1/2	Fare embriyosu	Demetilasyon ajanı 5'-azasitidin
TA1	5'-azasitidin ile muamele edilmiş 10 T1/2 hücreleri	%10 FBS, insülin ve DEX
3T3-L1	17-19 günlük fare embriyosu	%10 FBS, DEX, MIX ve insülin
3T3-F442A	17-19 günlük fare embriyosu	%10 FBS, insülin
Ob17	Yetişkin ob/ob farenin epididimal yağ dokusu	%8 FBS, insülin ve T3
Primer Kültürler	Kaynak/Yaş	Farklılaşma için kullanılan uyarıcı ajan
Rat	Subkutan,epididimal, retroperitoneal/yenidoğan(48h), 4hf, veya yetişkin	İnsülin ( %10 FBS' de )
Fare	Subkutan /8-12 günlük	Serum yok, insülin, HDL, DEX
Tavşan	Perirenal/4haftalık	Serum yok, insülin, DEX
İnsan	Subkutan(abdominal)/değişen yaşlarda	İnsülin ve glukokortikoid

#### 4.5. Yağ hücresi Farklılaşması Basamakları

3T3-L1 hücreleri uygulanan farklılaşma kokteyli ile eşzamanlı bir şekilde adiposit karakteri kazanabilmektedir. Kokteyl içerisinde bulunan deksametazon bir glukokortikoid agonisti olup glukokortikoid reseptör yolağını uyarır. İzobütilmetilksantin, fosfodiesteraz inhibitörüdür ve hücre içi cAMP düzeyini artırarak cAMP bağımlı protein kinaz yolunu aktive eder. İnsulin ise hücre içine glukoz alınmasını sağlar. Preadipositlerde insülin reseptörü bulunmamakta ve insülin etkisini insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörleri üzerinden gösterir (23).



Şekil 1. Yağ Hücresi Farklılaşma Basamakları (21)

#### 4.5.1. Yönlendirme (Kommitment)

Embriyonik gelişim sürecinde tek bir döllenmiş yumurtadan 200 farklı çeşit hücre oluşur. Bu hücrelerden pluripotent kök hücreler meydana gelir. Bu kök hücrelerin daha sonra gerçek fonksiyonel hücre öncüllerine dönüşmesine “kommitment” denir. Yönlendirme süreci hakkında sınırlı bilgiler mevcut ise de vasküler stromada bulunan kök hücrelerin preadipositlere yönlendirilmesini kapsayan bir süreç olduğu bilinmektedir.

Multipotent kök hücrelerin adiposit köküne dönüşümüne yön veren sinyallerinden sorumlu gen faktörü henüz bilinmemektedir. Bazı görüşler, bu hücrelerin adiposit köküne yönlendirmelerinin olgun adipositler tarafından salgılanan sinyaller ile gerçekleştiğini savunmaktadır. Olgun yağ hücrelerinden salgılanan bazı faktörlerin preadiposit farklılaşması ve çoğalmasını tetiklemesi bu görüşü desteklemektedir. Bu faktörlerin herhangi biri ortaya konulamamıştır ancak bazı çalışmalarda bu süreçte BMP4'ün (kemik morfogenezik protein-4) rol oynadığı *in vitro* olarak gösterilmiştir. BMP4, TGF $\beta$  (dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$ ) ailesine ait bir reseptördür ve 10T1/2 hücrelerine uygulandığında preadiposit karakter kazanımlarına yol açmaktadır. Farklılaşma kokteyli uygulandığında ise bu hücrelerin yağ hücresine dönüştüğü görülmektedir (18, 25).

Ayrıca hücre yoğunluğu ve hücre şeklinin de köken yönlendirilmesinde rol aldığını destekleyen çalışmalar mevcuttur. McBeath ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada düşük yoğunlukta ekilen insan mezenkimal kök hücrelerin (HMSCS) büyük ölçüde osteoblasta dönüştüğü, yüksek yoğunlukta ekim yapıldığında ise adipositlere farklılaştığı bildirilmiştir (26).

#### 4.5.2. Büyümenin Durması ve Mitotik Klonal Ekspansiyon

Preadiposit hücre hatlarının adipogenik indükleyiciler tarafından farklılaşma için uyarılması ile preadipositler adiposit fenotipi ve adiposit genlerinin transkripsiyonel aktivasyonundan önce eşzamanlı bir şekilde hücre siklusuna girerler ve bir iki tur hücre bölünmesine maruz kaldıkları bu evreye mitotik klonal ekspansiyon denir. DNA replikasyonu ve kromatin yapısındaki değişikliklerin bu süreçte ortaya çıktığı düşünülmektedir (27). Mitotik klonal ekspansiyon aşamasının adipogenez için gerekliliği tam olarak açıklanamamakla beraber, bazı çalışmalar terminal farklılaşma

adımı için ön koşul olduğu, bazı çalışmalarda ise bu süreç olmadan da farklılaşmanın gerçekleşebileceği ifade edilmektedir (28).

#### **4.5.3. Terminal Diferansiyasyon**

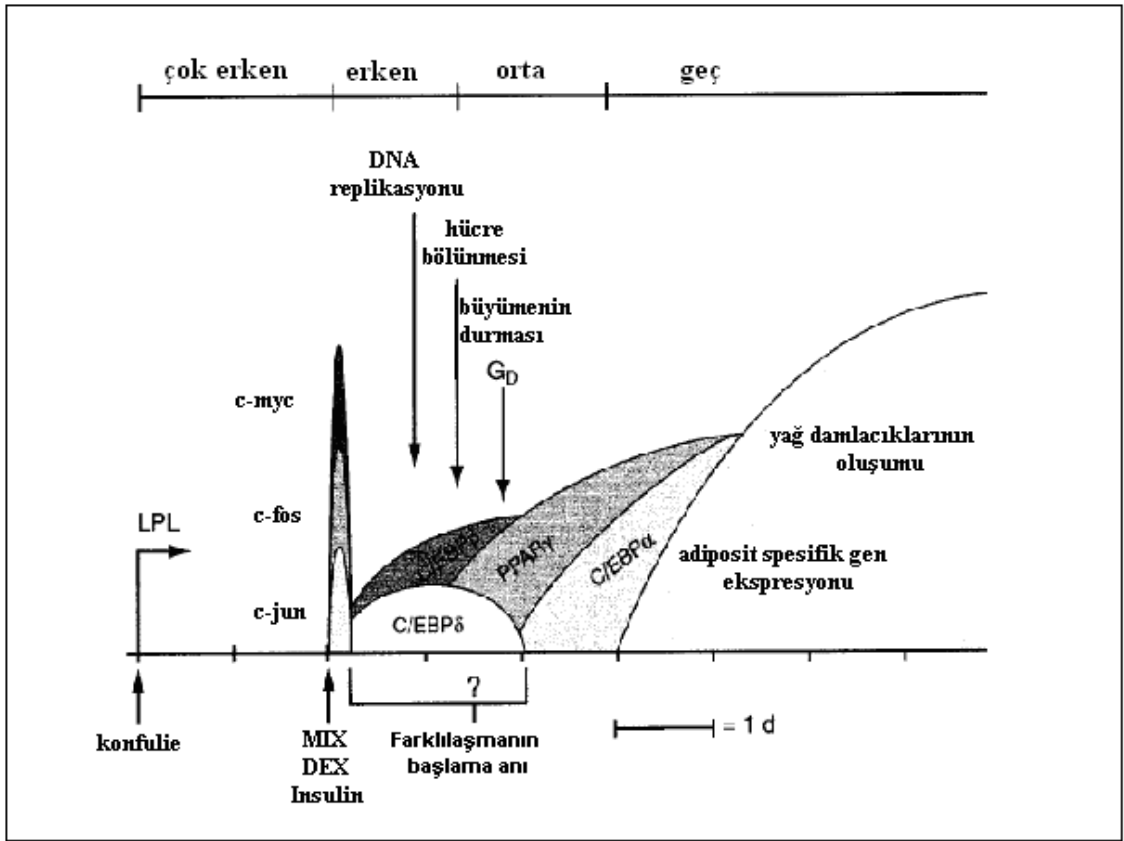
Hücreler klonal ekspansiyon basamağını tamamladıktan sonra, hücre siklusunun ( $G_D$ ) “growth arrest” basamağına girerler ve bu basamaktan sonra hücreler geri dönüşümsüz farklılaşmaya uğrarlar. Bu süreçte farklılaşmaya yönelmiş hücreler  $G_D$  fazına girene kadar farklılaşmamış durumlarına geri dönebilirler.  $G_D$  fazından çıktıktan sonra ise farklılaşmaya hazır hale gelirler. Terminal diferansiyasyonun sürdürülmesi C/EBP $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  ‘nın ekspresyonları ile mümkün olur. C/EBP $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  genlerin transkripsiyonunu sinerjik olarak aktive eder ve adiposit karakterin kazanılmasını sağlarlar (18).

#### **4.6. Gen Ekspresyonunda Erken Değişiklikler**

3T3-L1 hücreleri konflue olduklarında farklılaşmanın erken belirteçlerini eksprese ederler. Konflue hücrelerde hücre-hücre teması tip VI kollagen ve lipoprotein lipazın ekspresyonları indüklenir. Farklılaşma kokteyline bir saat maruz kalan hücrelerin c-fos, c-jun, c-myc gibi nükleer protoonkogenlerin ve CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein  $\beta$  ve  $\delta$  ‘yı eksprese ettikleri gözlenir.

Lipoprotein lipazın mRNA ekspresyonu adiposit farklılaşmasının erken belirteci olarak görülmektedir. Adiposit farklılaşması sürecinde hücreler fibroblastikten küresel şekle dönüşür, ekstraselüler matriks komponentlerinin tipi ve seviyesi, hücre iskeleti bileşenleri, hücre morfolojisinde önemli değişiklikler meydana gelir.

Adiposit fenotipinin kazanılması 200’den fazla genin ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Adipogenez sürecinde anahtar düzenleyici olarak görev alan birçok transkripsiyon faktör ailesi bulunmaktadır. Konflue hücrelere adipogenik kokteyl uygulandığında C/EBP $\beta$  ve C/EBP $\delta$  ekspresyonu indüklenir ve sırasıyla PPAR  $\gamma 2$  ve C/EBP $\alpha$  aktive olur. Adiposit determinasyon ve diferansiyasyon faktör-1/sterol regülatör element bağlayıcı protein-1c (ADD1/SREBP-1c) bir diğer anahtar transkripsiyon faktörü olup farklılaşmanın haricinde lipid metabolizması ve birçok karaciğer genlerinin transkripsiyonunda görev alır (17,18,21).



**Şekil 2.** 3T3-L1 preadiposit farklılaşma aşamaları (çok erken, erken, orta ve geç dönemde). LPL, lipoprotein lipaz; C/EBP, CCAAT/ enhancer binding protein; PPAR, peroksizom proliferatörlerince aktifleştirilen protein; MIX, metilizobutilksantin; DEX, deksametazon, 1d= 1 gün (21).

#### 4.7. Adipogenezin Düzenlenmesi

Kök hücrelerin adiposit kökene yönleneşi ve akabindeki farklılaşma embriyonik dönemde olduğu gibi erişkinlerde de görülmektedir. Embriyonik gelişim sırasında kommitment ve farklılaşma için ilk işaretleri parakrin sinyaller sağlamaktadır. Yetişkinlerde ise, bu proses, endokrin ve parakrin sinyaller tarafından yürütülür. Endokrin hücreler enerji dengesindeki değişimleri gösterir ve adipoz dokunun enerji depolama kapasitesinin artıp azalma durumuna karar verir. Enerji alınımı büyük oranlarda arttığı zaman adipositlerin de sayı ve boyutlarında artma gözlenir. Bu yeni adipositlerin adipoz dokunun vasküler-stroma progenitor hücre popülasyonundan ileri geldiği düşünülmektedir. Endokrin sinyallerin bu adipositleşme sürecini direk veya dolaylı bir şekilde kontrol ettiği öngörülmektedir (29).



#### 4.7.1. Endokrin Faktörler

Adiposit farklılaşmasının hormonal indükleyicileri insulin, insulin benzeri büyüme faktörü-1 (ILGF-1), glukokortikoid, triiyodotironin (T<sub>3</sub>) ve cAMP olarak sıralanabilir. Preadipositlerde insulin reseptörü yok veya çok az sayıda olduğu için insulin etkisini ILGF-1 reseptörleri üzerinden gösterir ve ancak suprafizyolojik konsantrasyonlarda etkilidir.

Glukokortikoidler hücre kültürlerinde farklılaşmanın güçlü uyarıcısı olup, glukokortikoid agonisti kullanılarak benzer etki in vitro olarak oluşturulur. Glukokortikoid reseptörleri nükleer reseptörler olup transkripsiyonu direkt olarak etkileyebilmektedir. Etkilediği genler tam olarak aydınlatılamamakla beraber glukokortikoid agonisti olarak farklılaşma kokteylinde deksametazon bulunmaktadır.

Büyüme hormonunun fetal bovin serumdan immunodepleasyonu ile adipogenezin inhibe olduğunun bulunması farklılaşmaya olan etkisini kanıtlamıştır.

Tiroid hormonunun farklılaşma için gerekliliği Ob17 hücreleri ile yapılan çalışmalarda gösterilmekle beraber 8-bromo-siklik AMP ilavesi durumu telafi etmektedir. 3T3-L1 hücrelerinde ise hücre içi siklik AMP düzeyi fosfodiesteraz inhibitörü olan metilizobütiksantin ile normal düzeylerin üzerinde tutulmakta ve farklılaşma sağlanmaktadır (29).

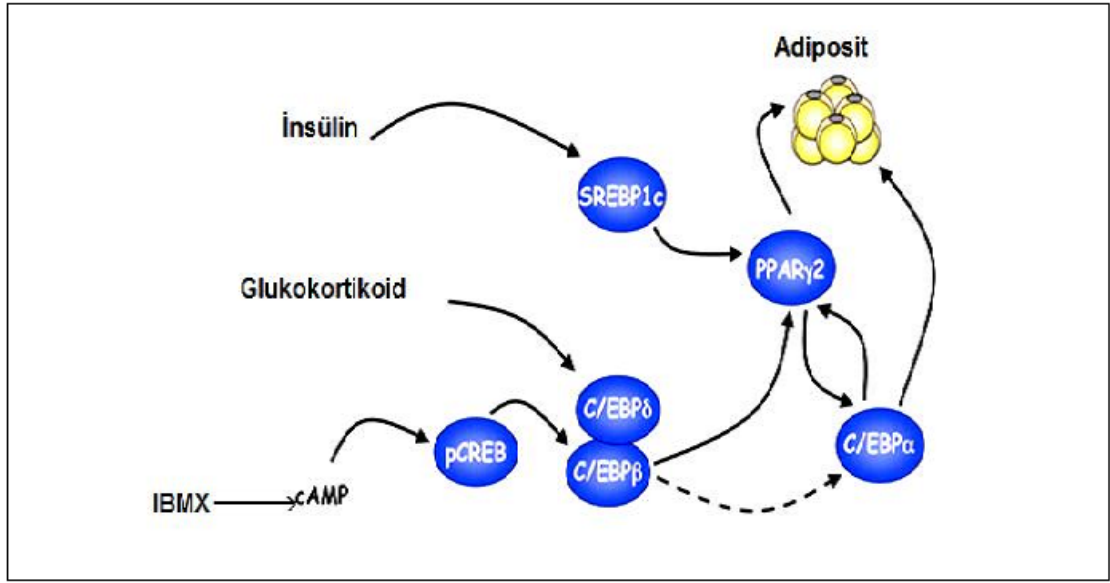
#### 4.7.2. Parakrin Faktörler

Açılma-uyarıcı protein (ASP) preadipositlerin adipositlere farklılaşmasını uyarır ve olgun adipositlerde triaçilgliserol sentezininin devamını sağlar. Adipositlerden salınan anjiyotensinojen yeni adipositlerin oluşumunu uyarır ve olgun adipositlerin fonksiyonlarını düzenler.

Adipoz dokuda sentezlenen TNF- $\alpha$  farklılaşmanın güçlü bir inhibitörüdür. Farklılaşmayı bloklamakla kalmayıp olgun adipositlerin adipoz fenotiplerini de baskılamaktadır. Delipidasyon, stearoil Co-A desaturaz enzimi, 422/aP2 ve GLUT4 ekspresyonlarını inhibe ederek etkisini gösterir. PGE<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> de adipogenezin parakrin inhibitörleri olarak görülmekte ve etkilerini PPAR  $\gamma$  üzerinden gösterdikleri düşünülmektedir (29).

### 4.7.3. Transkripsiyon Faktörleri

Adiposit farklılaşma programının C/EBP ve PPAR ailelerinin işbirliği ile dahil olduğu transkripsiyon faktörleri kaskadı ile düzenlendiği bilinmektedir. Bu faktörler adipoz spesifik genlerin indüksiyonu ve olgun adipoz fenotipinin korunmasında önemli rol oynarlar (30).



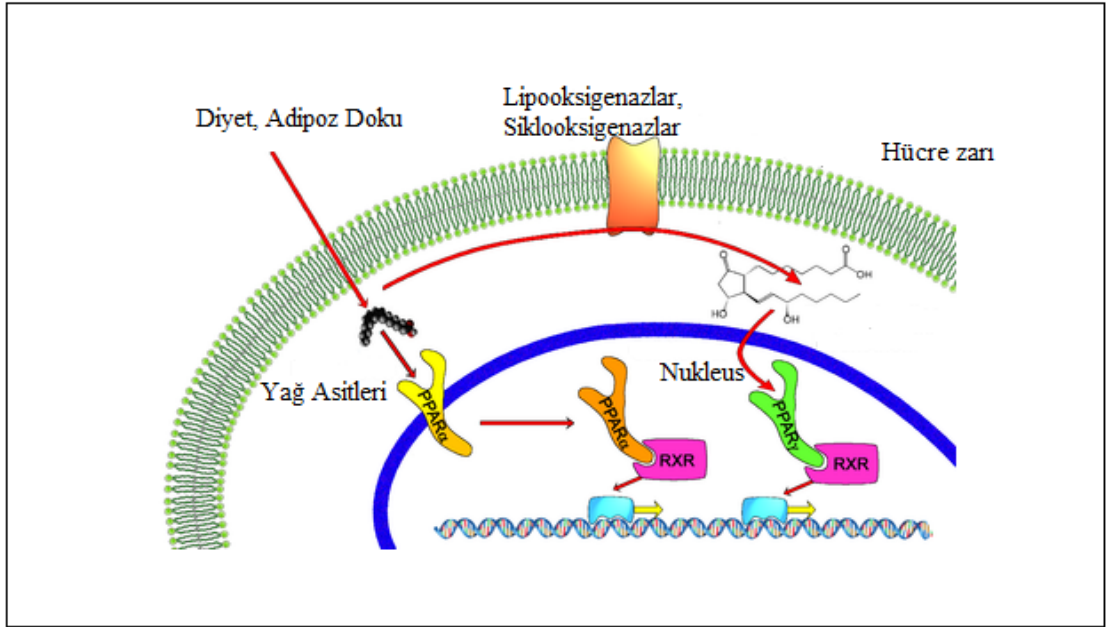
Şekil 3. Transkripsiyon faktörleri ile adipogenezin indüksiyonu (24)

#### 4.7.3.1. C/EBP Ailesi

Adiposit farklılaşmasında önemli role sahip olan transkripsiyon faktörü ailesi bZip sınıfı proteini olup lösin zipper dimerizasyon domaini ve DNA bağlanmasını düzenleyen temel bir domain içermektedir. C/EBPβ ve C/EBPδ'nin farklılaşmanın erken döneminde rol aldığı düşünülmektedir çünkü ekspresyonları farklılaşma programının başlamasıyla indüklenmekte ve sona doğru düşmektedir. C/EBPα'nın enerji homeostazisinde görev aldığı zannedilmektedir. Ekspresyonu daha çok terminal fazda birçok adipoz-spesifik genin ekspresyonundan hemen önce gerçekleşmektedir. Antimitotik özelliğinden dolayı farklılaşmanın klonal ekspansiyon fazını sonlandıran büyümenin durmasına sebep olduğu görüşü hakimdir (29, 30).

#### 4.7.3.2. PPAR Ailesi

Peroksizom proliferatör-aktivi reseptörler (PPARs) peroksizom proliferasyonunu indükleyen ajanlar tarafından aktivasyonu ile tanımlanmış nükleer hormon reseptörleridir. PPAR ailesi üyeleri retinoid X reseptörleri ile heterodimerik kompleksler oluşturarak PPAR sorumlu elementlere bağlanırlar. PEP karboksikinaz, lipoprotein kinaz, adiposit yağ asidi bağlayıcı protein 422/aP2 ve stearyl-coA desaturaz bahsedilen elementlerden adiposit genleridir. PPAR  $\lambda_1$  ve PPAR  $\lambda_2$  adipogenezle ilgili olup  $\lambda_2$  adipoz dokuya spesifiktir. Fonksiyonları arasında herhangi bir fark bulunmamaktadır (29,30).



Şekil 4. PPAR ailesinin etki mekanizması (31)

#### **4.7.3.3. ADD1/SREBP1**

ADD1/SREBP1, adiposit tanımlama ve farklılaşma-bağımlı faktör 1 (ADD1), sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 (SREBP1) bazik heliks-loop-heliks (bHLH) sınıfı transkripsiyon faktörüdür. DNA üzerinde E-kutusu ve sterol düzenleyici element adında iki farklı bölgeye bağlanarak transkripsiyonu aktive etmektedir. İkili DNA bağlama özelliğinin diğer bHLH proteinlerden farklı olarak rezidü 320'de bulunan atipik bir tirozinden ileri geldiği düşünülmektedir. Faktör lipoprotein lipaz, yağ asidi sentaz gibi genlerin ekspresyonlarını artırarak yağ asidi sentezi ve alınımını sağlar adiposit içinde yağ birikimini destekler (32).

#### **4.7.3.4. Retinoid Reseptörleri**

Retinoik asitin adipogenezini inhibe ettiği ve bu etkisini retinoik asit reseptörleri (RARs) ve retinoid X reseptörleri (RXRs) üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. RARs RXRs ile heterodimerler oluşturarak DNA'ya bağlanır. PPARs da RXRs ile heterodimerler oluşturduğu için RARs ile yarış içinde olmaları adipogenez üzerinde inhibisyon oluşturmaktadır (29).

#### **4.7.4. Transkripsiyon Faktörleri Arasındaki Sinerji**

Adipogenez, transkripsiyon faktörlerinin doğrudan veya birbirlerini etkilemek suretiyle farklılaşmanın düzenlendiği bir kaskat içerir. PPAR ve C/EBP farklılaşmada kooperatif role sahiptir. C/EBP $\beta$  ve C/EBP $\delta$ , PPAR $\gamma$  ve C/EBP $\alpha$ 'nın indüksiyonunu içeren bir mekanizmaya dahil olmaktadır. C/EBP $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  farklılaşmanın gelişiminde sinerjik olarak etkirler (29).

#### **4.8. Yağ Dokusunun Endokrin Özellikleri**

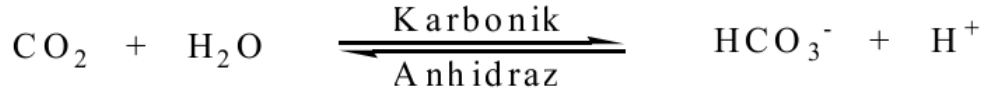
Adipoz dokunun pasif bir enerji deposu olduğunu savunan bakış açısı, cinsiyet hormonlarının metabolizması için öneminin anlaşılması ve adipsinin keşfi ile geçerliliğini yitirmiştir. 1994 yılında, leptinin karakterizasyonu ile adipoz dokunun endokrin bir organ olduğu konusu kesinlik kazanmıştır. Adipoz doku endokrin veya parakrin etkiye sahip birçok aktif peptidin sentez ve salgısını üstlenmektedir. Ayrıca diğer sistemlerden gelen sinyallere cevap verebilecek reseptörlerin sentezi de mevcuttur (1,2).

**Tablo 2.** Yağ dokusu salgı ürünleri ve görevleri (19)

<b>Salgılanan ürünler</b>	<b>Fonksiyonları</b>
Leptin	Enerji homestazını düzenler ve yağ dokusu hakkında hipotalamusa bilgi verir
Rezistin	İnsülin direnci ve periferik doku insülin hassasiyeti ile ilgilidir.
TNF- $\alpha$	İnsülin reseptör sinyaline karışır ve obezlerde insülin direncine sebep olur.
Adiponektin	Ailevi hiperlipidemi patogenezinde yer alır ve insülin direnci ile ilgilidir.
Adipsin	Yağ dokusu metabolizmasından sorumludur.
IL-6	Vücut savunmasında, glukoz ve yağ metabolizmasında görev alır.
PAI-1	Fibronolitik sistemin en önemli inhibitörüdür.
TGF- $\beta$	Proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi süreçleri düzenler.
ASP	Trigliserid sentez hızını artırır.
IGF-1	Hücrelerde çoğalmayı uyarır ve büyüme hormonunun etkisine aracılık eder.
PGI <sub>2</sub> ve PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	İnflamasyon, pıhtılaşma, ovülasyon, menstrüasyon gibi süreçlerin düzenlenmesi
MIF	İnflamasyon öncesi süreçlerde ve immunitenin düzenlenmesi

#### 4.9. Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidrazlar ( CA, EC 4.2.1.1) prokaryot ve ökaryotlarda bulunan ve başlıca dört farklı ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$ ) gen ailesi tarafından kodlanan, çinko içeren metaloenzimlerdir. Basit ama fizyolojik olarak oldukça önemli bir reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonat ve protona hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemekte ve bu kataliz sayesinde birçok proseste önemli görevler üstlenmektedirler (33).



Memelilerde, bugüne kadar, farklı katalitik aktivite, hücresel yerleşim, doku dağılımı, fizyolojik ve patolojik roller ve inhibitör duyarlılığına sahip 16 izoenzimi tanımlanmıştır Bu onaltı izoenzimden CA I, II, III, VII, XIII sitozolik izozimler olup, CA IV, IX, XII, XIV, XV membrana bağlı formda, CA VI salgılanan formda, CA VA ve CA VB mitokondride bulunmakta, CA VIII, X, XI ise katalitik özelliği olmayan formlar olup CA ilişkili proteinler olarak adlandırılmaktadır(34, 35).

Enzim ailesi tüm organizmalarda, solunum ve karbondioksit/bikarbonat taşınımı, pH ve karbondioksit homeostazı, birçok doku ve organda elektrolit taşınımı, glukoneogenez, lipogenez ve ureogenez gibi biyosentetik prosesler, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tumorigenez, epileptogenez gibi birçok fizyolojik ve patolojik proseste önemli görevler üstlenmektedir (35,36). Bu nedenle son yıllarda CA izoenzimleri biyomedikal uygulama alanı olarak tümör belirteci ve ilaç dizaynı için hedef haline gelmiştir (37).

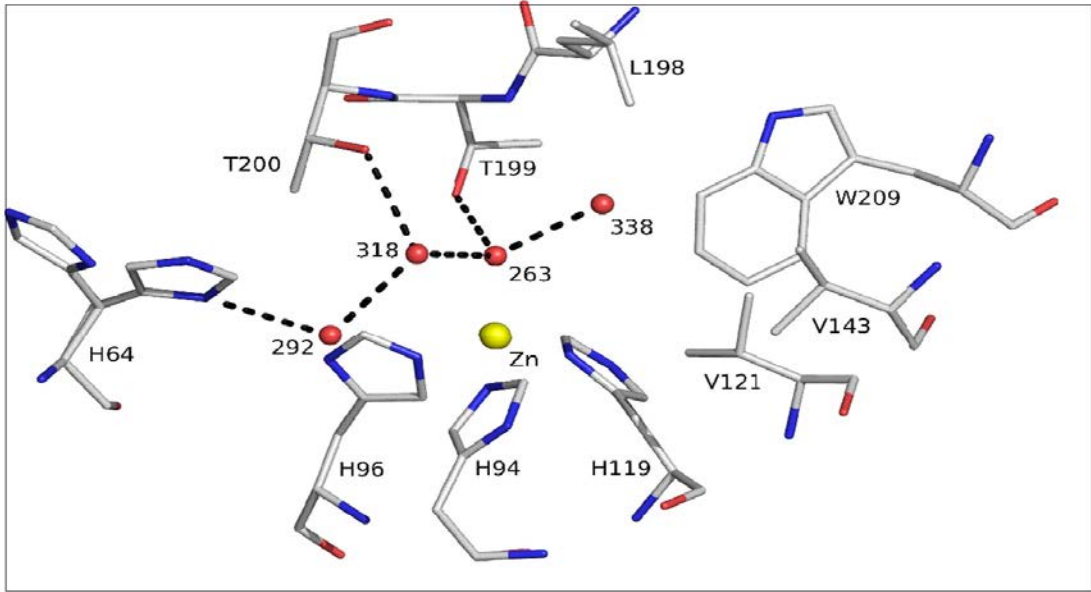
##### 4.9.1. Karbonik Anhidraz I

CA I eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan sitozolik proteindir. Ekspresyonu fazla olmasına rağmen toplam aktivitenin yaklaşık yarısını üstlenmektedir. CA I ayrıca kalın bağırsak ve kornea epitellerinde, lenfte, ter bezlerinde, miyoepitelyal hücrelerde, nötrofillerde ve yağ dokusunda da sentezlenmektedir. Aktivitesi CA II'ye göre düşük olan CA I 'in hemolitik anemi durumunda ekspresyonunun azalması hastalıkla ilgili önemli bir belirteç olabileceğini ve izoenzimin katalitik niteliklerinden ziyade fizyolojik özelliklerinin önemini göstermektedir (39).

#### 4.9.2. Karbonik Anhidraz II

CA II geniş bir doku dağılımına sahip olup yüksek aktiviteli bir izoenzimidir. CA I ve CA II dokulardan ve akciğerlerden karbondioksitin transport ve eliminasyonunda etkindir. CA II böbrekte bikarbonat akışını düzenlediği, böbrek interkalate hücreleri, proksimal tüp, henle kulpu ve toplama kanallarında da sentezlenmektedir. CA II eksikliği renal tübüler asidoz, osteoperoz, serebral kalsifikasyon ve büyüme geriliği görülen otozomal resesif bir durumdur.

Karbondioksit hidrasyonu fonksiyonunun yanı sıra, CA II membrana bağlı taşıyıcılar ile etkileşim halinde olup sitoplazmik pH dengesini korumakta da görevlidir. Transport metabolonu denilen bu taşıyıcılara Klorür/bikarbonat taşıyıcısı (AE1), sodyum/bikarbonat taşıyıcısı (NBC1) ve sodyum/ hidrojen değişimcisi (NHE1) örnek verilebilir (39).



Şekil 5. CA II'nin aktif merkez aminoasitleri ve çinko atomu (39)

### 4.9.3. Karbonik Anhidraz III

Hidrataz aktivitesi CA I ve II'nin yaklaşık % 2 'si kadar olan CA III metabolik olarak aktif dokular olan yağ dokusu, karaciğer ve yavaş kasılan iskelet kası fiberlerinde bol miktarda eksprese olmaktadır. Düşük hidrataz aktivitesine sahip olması hücrelerde başka fonksiyonları olabileceğini önermektedir. CA III glutatyon ile tersinir bir şekilde konjuge olabilen iki adet reaktif sülfidril grubuna sahiptir. Bu S-glutatyonilasyon reaksiyonunun, hücrede proteinleri dönüşümsüz oksidasyonlardan koruyan muhtemel savunma mekanizmalarından biri olabileceği düşünülmektedir. Hücreler oksidatif strese maruz kaldığında CA III hızlı bir şekilde glutatyonlanır ayrıca oksidize edici bir çevrede bulunduğunu düşündüren veri olarak rodent karaciğerinde en çok karbonillenen proteindir. Hücre kültürü deneylerinde CA III'ün hücreleri hidrojen peroksit indüklü proapoptotik ve antiproliferatif etkilerden koruduğu gösterilmiştir. Yaşlanmış ratlarda glutatyon düzeylerinin düşük olduğu ve buna bağlı olarak okside CA III miktarlarının arttığı görülmüştür. Bu bilgiler CA III'ün yaşlanma gibi oksidatif stres bağımlı olaylarda hücreleri oksidatif durumlara karşı koruma özelliği olabileceğini göstermektedir.

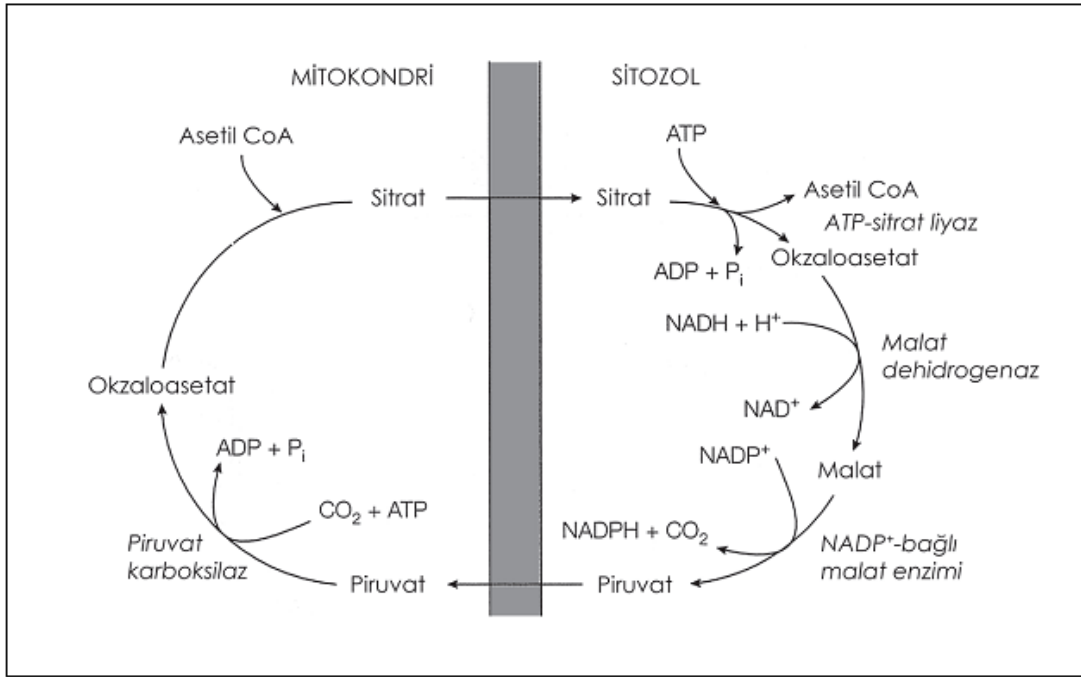
Preadipositlerde CA III ekspresyonu çok az olmakla beraber adipogenezle önemli ölçüde artmaktadır. CA III İnsan ve rodent yağ dokusunda toplam mRNA'nın yaklaşık %2'sini oluşturarak, yağ dokusunda en bol bulunan proteinlerden biri olma özelliğine sahiptir. Olgun adipositlerde tüm çözünür proteinlerin %24'ünü oluşturarak miktarı en fazla olan protein olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bilgiler CA III'ün oksidatif strese karşı koruma özelliğinden doğan adiposit ilişkili fonksiyonlarını akıllara getirmektedir. Bu özellikleriyle obezite gibi yağ dokusunun artışı ile karakterize ve oksidatif stresin arttığı hastalıklarda önemli rolleri olabileceğini düşündürmektedir. CA III'ün obez ve zayıf farelerde yağ hücrelerinde yağ asid sentezi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ancak izoenzimin adipositlerdeki asıl fonksiyonu ve adipogenez bağımlı upregülasyonunun açık mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (39-41)



#### 4.9.4. Karbonik Anhidraz VA ve VB

CA VA ve VB mitokondride bulunan tek izoenzimler olup omurgalı ve omurgasızlarda lipogenez, glukoneogenez, üregenez gibi biyosentetik süreçlerde görev almaktadır. CA II tarafından asiste edildiği düşünülen ve bu izoenzimlerce katalizlenen reaksiyon piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz, karbamoil fosfat sentetaz I ve II enzimlerinin dahil olduğu birçok biyosentetik proste yeterli bikarbonatın varlığından sorumludurlar (37).

Piruvatın okzaloasetata dönüşümü bikarbonat ve piruvat karboksilaz varlığında gerçekleşir. Bu oluşum için gerekli bikarbonat CA VA ve/veya VB tarafından sağlanır. Mitokondri membranı okzaloasetat ile birleşip sitratı oluşturacak olan asetil Co A için geçirgen değildir. Sitrat trikarboksilik asit taşıyıcısı ile sitoplazmaya taşınır ve burada sitrat liyaz enzimi ile tekrar okzaloasetat ve asetil CoA'ya dönüştürülür. Mitokondri membranı okzaloasetata geçirgen olmadığı için dekarboksilasyonla tekrar piruvata dönüşür ve piruvat taşıyıcısı ile mitokondri içine alınır. Önce okzaloasetat malat'a indirgenir ve malat dikarboksilat taşıyıcısı ile mitokondriye taşınır veya sitoplazmada malik enzim tarafından piruvat ve CO<sub>2</sub>'ye dönüşür ve piruvat mitokondriye geçer. Sitolde oluşan asetil CoA asetil CoA karboksilaz ve bikarbonat varlığında malonil CoA oluşumu ile *de novo* lipogenez için kullanılır. Bu dönüşüm için gerekli bikarbonat CA II izoenzimi ile sağlanır (37).



**Şekil 6.** De novo lipogenez için Asetil CoA'nın sitozole transportu. Bikarbonat içeren her adımda CA izoenzimleri görev almaktadır (42).

#### 4.10. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri, metal kompleksi oluşturan anyonlar sülfonamid ve onların biyoesterleri olmak üzere iki ana sınıfta incelenebilirler. Etkilerini aktif bölgelerindeki  $Zn^{2+}$  iyonuna bağlanarak nonprotein-çinko ligandı oluşturarak ya da metal koordinasyon küresine eklenme yoluyla trigonal bipiramidal türler oluşturarak gösterirler. Sülfonamidler, deprotonlanmış durumda  $Zn(II)$  ile koordine sülfonamid kalıntısının azot atomu ve Thr 199 ve Glu 106 rezidülerinin katıldığı hidrojen bağı ağı ile  $Zn(II)$ 'nin tetrahedral geometrisine bağlanırlar. İnhibitörün aromatik/heterosiklik kısmı boşluğun hidrofilik ve hidrofobik rezidüleri ile etkileşir. Anyonlar ise metal iyonunun tetrahedral geometrisine ya da trigonal bipiramidal eklentilere bağlanabilmektedirler (37).

Karbonik anhidrazların inhibisyonu solunum, pH düzenlenmesi, sodyum tutulumu, kalsifikasyon, tumorogenez, elektrolit sekresyonu, glukoneogenez, ürogenez ve lipogenez gibi çeşitli fizyolojik reaksiyonların dahil olduğu bir çok alanda uzun farmakolojik bir tarihe sahiptir. Bu nedenle CA inhibitörleri antikonvülzanlar, topikal etkili antiglokom ajanları olarak kullanılmakta ve son yıllarda antitumoral, anti ağrı ve

anti obezite ilaçları olarak da umut vaat etmektedirler. Ayrıca antifungal ve antibakteriyal etkilerinin gösterildiği çalışmalar da mevcuttur (39).

Asetazolamid, metazolamid, etokzolamid, sültiam ve diklorofenamid gibi klinik olarak kullanılan ve ilk olarak 1950 ve 60'larda yeni diüretik ve antiepileptik olarak geliştirilen bileşiklerdir. Diüretik kullanımları yaygın olmamasına rağmen bu inhibitörlerin glokomun sistemik tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmüştür. Dorzolamid ve brinzolamid 90'larda geliştirilen ve oftalmolojide kullanılan inhibitör bileşiklerdir. Farklı izoenzimlerin ayrı inhibisyon profilleri karbonik anhidraz inhibitörlerinin diüretik ve antiglokom ajanlarından antikanser, antiobezite ve antiepileptik ilaç olarak kullanılabilmesini açıklamaktadır. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin ilaç dizaynında karşılaşılan en büyük problem olarak, bu farmakolojik ajanların klinik uygulamaları için izozim-selektif inhibitörlerin elde edilmesi görülmektedir (37).

#### **4.11. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Antiobezite İlacı Olarak Kullanılması**

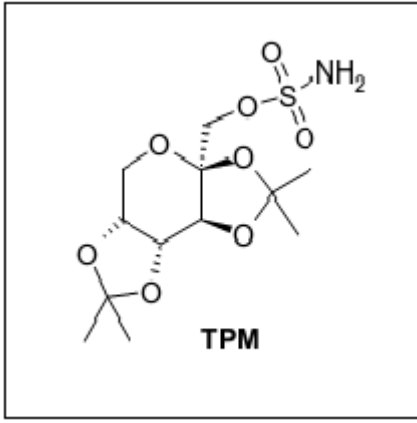
Obezitenin sebebi pozitif enerji dengesinin artması olarak görülse de etiyojisi tam olarak netleştirilememiştir. Enerji dengesi üzerindeki etkiye bakılarak antiobezite ilaçları, enerji alımını azaltan ve enerji harcanmasını artıranlar olarak iki grupta incelenebilir. Birinci gruptaki ilaçlar daha çok yemek alımını azaltarak veya gastrointestinal yoldaki absorpsiyonunu minimize ederek etki ederken, ikinci gruptaki ilaçlar enerji harcanmasını kolaylaştıracak metabolik prosesler üzerinde etkilidir. Bu amaçla ferntermin, sibutramin, orlistat ve riminoabant bu amaçlarla geliştirilen ilaçlardır.

Son yıllarda obeziteye karşı geliştirilen farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçlar söz konusudur. Bunlar leptin/insülin/ merkezi sinir sistemi yolaklarını ve insülin metabolizması ve aktivitesini etkileyen ilaçların geliştirildiği bilinmektedir. Ayrıca *de novo* lipogenezin birçok basamağında yer alan karbonik anhidraz izoenzimlerinin inhibisyonuna dayalı obezite tedavi yaklaşımları tartışılmaktadır.

CA VA ve VB mitokondride, CA II sitozolde yağ asidi biyosentezi için önem taşımaktadır. Bu gerçekler bu izoenzimlerin antiobezite ilaçlarının gelişiminde potansiyel hedefler olabileceğini göstermektedir. Topiramet ve zonisamid bu amaçla birçok çalışmaya konu olmuş CA inhibitörleridir (37)

#### 4.12. Topiramate

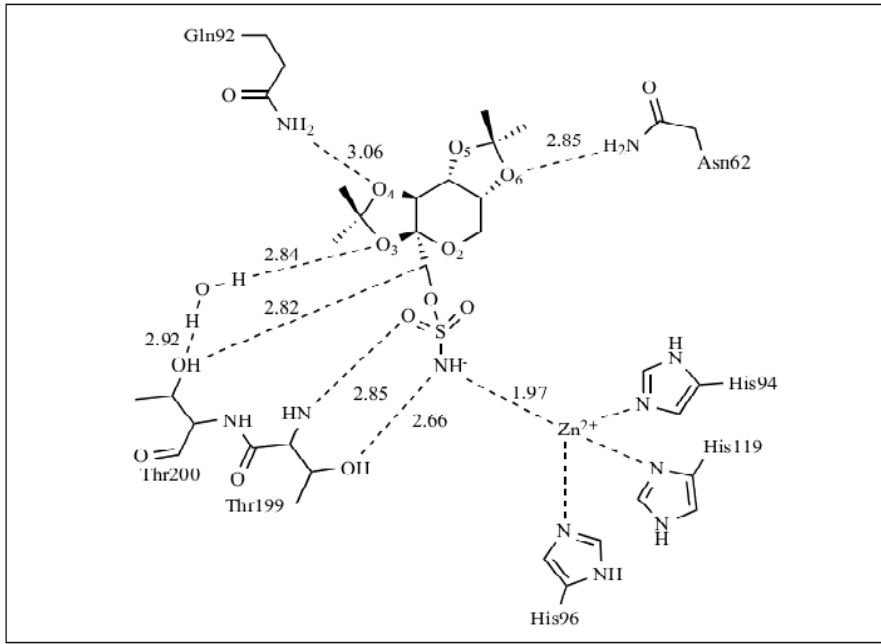
Topiramate (TPM) sistematik adı [2,3:4,5-bis-O-(1-metil-etiliden)- $\beta$ -D-fruktopiranoz sülfamat] olan, 1996 yılında FDA tarafından epilepsi tedavisi için onaylanan ve aşırı yeme hastalığı, bipolar bozukluk, migren gibi nörolojik hastalıkların tedavisi için değerlendirilmeye çalışılan bir monosakkarit türevidir (8). İlk olarak fruktoz-1,6-difosfatazı ve dolaylı olarak glukoneogenezi inhibe edici fruktoz-1,6-difosfat analogu olarak araştırılmıştır. Bilinen başlıca etki mekanizmaları, GABA transmisyonu, AMPA/kainate reseptörlerinin ve voltaj bağımlı sodyum ve kalsiyum kanallarının inhibisyonu, potasyum akımını artırması ve bazı karbonik anhidraz izoenzimlerinin inhibisyonu olarak sıralanabilir.



Şekil 7. Topiramate (44).

Topiramate tedavisi alan kişilerde kilo kaybı gözlemlendiği bildirilmiştir (43). Obez kişilerde kiloya etkisi randomize çalışmalarla araştırılmıştır. Kilo kaybı etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bazı hayvan deneyleri bunu artan enerji harcanmasına, azalan enerjetik verime ve iştah baskılayıcı özelliğe sahip olmasından dolayı kalori alımını azalttığını savunmaktadır. Karbonik anhidraz inhibitörü olduğu için, lipogenezi engelleyebileceği görüşleri de mevcuttur. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin kilo kaybı ile ilişkili olduğu bilindiğinden bu etkinin lipid biyosentezine katkıda bulunan CA izoenzimlerinin inhibisyonuna dayanabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezin desteğiyle topiramatin sitozolik CA II ( $K_I = 13.8\text{nM}$ ) ve mitokondriyal CA VA 'nın ( $K_I = 25.8\text{nM}$ ) güçlü inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Topiramatin izoenzimler bağlanma dinamiği incelenmiş ve diğer sülfamat/CA kompleksleri gibi, topiramatin sülfamat kısmı enzimin çinko iyonuna deprotonlanmış azot atomu ve Thr199 rezidüsü

ile hidrojen bağı yoluyla tetrahedral olarak koordine olduğu görülmüştür. İnhibitörün şeker iskeleti ve proteinin Asn62, Gln92 ve Thr200 rezidüleri arasındaki polar etkileşimler incelendiğinde hidrojen bağı ağının kompleksi stabilize ettiği ve ilacın CA II üzerindeki güçlü inhibisyonunu açıkladığı görülmüştür. CA VA ile oluşturduğu kompleks incelendiğinde CA II'ye benzer bir dinamik gösterdiği görülmüştür. Sadece şeker çatısı ile oluşturduğu kompleks farklılık göstermektedir (37).



**Şekil 8.** Topiramatin hCA II izoenzimi aktif bölgesine bağlanması (44).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasının bütün aşamalarında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 3'te sıralanmıştır.

**Tablo 3.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

<b>Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme</b>	<b>Marka / Model</b>
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
Fotograf makinesi bağlı invert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO <sub>2</sub> inkübatörü	Thermo Forma 381
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Hücre kültür pleyti( 6 kuyucuklu)	Nunc, nunclon
Otomatik pipetler	Eppendorf, Socorex
Aspiratörlü pipet	JetPip Pipette Aid
Mikro santrifüj	Thermo EC Micromax Eppendorf 5810
Spektrofotometre	Shimadzu, UV – 1601
Membran filtreleri	Agilent Econofilter 0.2µm
Mikropleyt Okuyucu	VERSAmax molecular devices
15 mL' lik ve 50 mL'lik steril falkon	TPP, Greiner
10 mL' lik steril disposable pipetler	Grenierbio-one, 607 180
DNAaz, RNAaz free pipet uçları (0,5-10, 1-200, 100-1000 µL )	Axygen, Greiner
Thermocycle	Aplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
Real Time PCR Cihazı	Roche Light cyclers 480 II
Nanodrop spektrofotometre	Thermo Scientific

## 5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.** Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri

<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı</b>
Topiramet	Sigma, T0575-10MG
GW9662	Sigma, E0211-5MG
Tripure RNA İsolation Reagent	Roche, Cat. No.: 11 667 165 001(200mL)
PBS Tablet	Medicago
İnsulin, from bovine pancreas	Sigma, I6634-50MG
Deksametazon(DEX)	Sigma, D4902-25MG
3-İzobütül-1-metilksantin(İBMX)	Sigma, I5879-250MG
Biotin	Sigma, B4501
Oil Red O	Sigma, O0625
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür	Sigma, M2128-1G
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Merck, 1.00986, absolute
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ATCC, Cat. No. 4-X-5
Penisilin+Streptomisin	Gibco 15140
Fetal Bovine Serum	Biochrom S0113
Tripsin/ EDTA çözeltisi	ATCC 30-2101
Tryphan Blue	Sigma, T8154
DMEM	Lonza,ATCC

### 5.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü laboratuvarında bulunan laminar flow steril kabinde gerçekleştirildi. Bütün deneylerden önce kullanılacak malzemeler teknik alkol ile silindi. Çalışma sonunda ise malzemeler ve kabin tekrar silindi, kabin ve hücre kültürü laboratuvarı UV ışın ile steril edildi.

#### 5.3.1. 3T3-L1 Hücrelerinin Kültürlenmesi

3T3-L1 hücrelerinin kültürlenmesi ve çoğaltılması için gereken çözeltiler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

##### ***Besiyeri çözeltisi (%10 FBS, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM)***

Yüksek glukoz içerikli DMEM 'in 445 mL'sine 50 mL FBS ve 5 mL penisilin/streptomisin çözeltileri ilave edilerek hazırlandı.

##### ***PBS (Phosphate Buffer Saline ), 0.01 M, pH 7.4***

10 adet PBS tableti içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözüldü ve çözeltinin pH'sı pH metrede 7.4' e ayarlandı. pH'sı ayarlanan çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanarak otoklavlandı ve çalışmalarda kullanıldı.

- Çalışmalarda ATCC (American Type Culture Collection) 'den temin edilen 9597 lot numaralı 3T3-L1 hücreleri kullanıldı Kriyovialler içerisinde bulunan 1mL hücre süspansiyonunun öncelikle kısa sürede çözünmesi sağlandı.
- Hücreler 15 mL'lik falkona alınarak hacmi besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı ve 130 g'de 6 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından süpernatant atılarak kalan 1 mL besiyeri içinde hücre pelleti pipetaj ile çözüldü.
- Süspanse edilen hücreler T-25 ve T-75'lik flaslara alındı, yeterli miktarda besiyeri eklendi ve % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C ortamındaki inkübatöre kaldırıldı.



### 5.3.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Pasajlanması

Çoğalmaya bırakılan hücreler flask tabanının %70-80' lik kısmını kapladıktan sonra pasajlama işlemine tabi tutuldu.

- Pasajlama işlemi için öncelikle flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler, PBS ile yıkanarak 25' lik flasklara 1 mL, 75'lik flasklara 3 mL tripsin eklenerek beş dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından tripsinin etkisini durdurmak için flasklara üç katı hacimde besiyeri eklendi.
- Flasklardaki hücre süspansiyonu falkonlara aktarıldı ve 130 g'de 6 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1 mL besiyerinde pipetaj ile çözüldü. Hücre sayımı yapılarak flasklara ekim yapıldı.

### 5.3.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi

- Tripsinizasyon sonrası falkonlara alınan hücrelerin 10  $\mu$ L'si 10  $\mu$ L trypan blue boyası ile pipetaj ile karıştırıldı ve neubauer hematositometre lamına aktarıldı.
- Işık mikroskopu altında 10X büyütme kullanılarak canlı hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  ATPaz pompası ile boya membran tarafından içeri alınmakta ve dışarı verilememektedir, dolayısıyla hücreler mavi renkte, canlı hücreler ise sarı-yeşil olarak gözükmektedir. Bu sayede canlı ve ölü hücreler ayırt edilebilmektedir.
- Mikroskop ile bakıldığında hematosimetre lamı üzerinde 16' ya bölünmüş dört ayrı kare vardır. Çapraz kareler içersinde bulunan canlı hücreler sayıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı sayılan hücre sayısı X seyreltme oranı X  $10^4$  formülü kullanılarak hesaplandı (45).

#### 5.3.4. 3T3-L1 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

- Flasklara ekilmiş ve çoğaltılmış hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile muamele edildi ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- DMEM eklenerek reaksiyon durduruldu ve flask yüzeyinden kaldırılan hücreler süspansiyon halinde falkonlara aktarıldı.
- 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi, supernatan uzaklaştırıldı ve kalan hücre pelleti 1mL DMEM içinde çözülerek hücre sayımı işlemine geçildi.
- Hücre sayısı mililitrede  $10^6$  olacak şekilde besiyerinde kriyoviyallere alındı. Son konsantrasyonu %10 olacak şekilde DMSO eklenerek karışması sağlandı.
- Kapaklanan kriyoviyaller önce -20 daha sonra -80 °C buzdolabına daha sonra kullanılmak üzere kaldırıldı. Uzun süre kullanılmayacak hücreler azot tankında saklandı.

#### 5.3.5. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması

3T3-L1 hücrelerinin yağ hücresine farklılaştırılmasında kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı.

##### ***0.25 M Deksametazon***

49 mg DEX tartıldı, bir miktar DMSO'da çözüldü. Son hacmi DMSO ile 0.5 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

##### ***0.5 M İzobütilmetilksantin***

111.12 mg IBMX tartıldı, bir miktar DMSO'da çözüldü. Son hacmi DMSO ile 1 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

##### ***1 mg/mL Biotin***

20 mg biotin tartıldı, bir miktar 0,1M NaOH çözeltisinde çözüldü. Son hacmi 0.1M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlandı. Ardından 1mg/mL konsantrasyondaki biotin çözeltisinden 200 µL alındı ve hacmi 0.1M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 100 kat seyreltildi. Böylece 10 µg/mL konsantrasyonda ara stok hazırlandı. Hazırlanan her iki biotin stok çözeltileri ependorflara bölünerek -20°C'de saklandı.

### ***1 mg/mL İnsülin***

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

### ***Farklılaştırma Kokteyli***

10 µL stok DEX çözeltisi (0.25M) az miktarda % 10 FBS içeren DMEM'e eklendi ve hızla vortekslendi. Üzerine 10 µL stok IBMX çözeltisi (0.5M) eklendi ve vortekslendi. Karışımın üzerine 100 µL stok insülin çözeltisi (1mg/mL) eklendi ve vortekslendi. Son olarak 100 µL ara stok biotin çözeltisi (10 µg/mL) eklendi ve vortekslendi. Son hacim %10 FBS içeren DMEM ile 10 mL'ye tamamlandı. Elde edilen farklılaştırma DMEM'i 0.25 µM DEX, 0.5M IBMX, 10 µg/mL insülin ve 100 ng/mL biotin içermektedir.

#### **5.3.5.1. Farklılaştırma Protokolü**

- Hücreler, sayıldıktan sonra her bir kuyucuğa  $10^5$  hücre gelecek şekilde 4 mL besi yeri içeren altı kuyucuklu pleytlere ekildi.
- Kuyucuklarda çoğalan hücreler kuyucuk yüzeyinin tamamını kaplayana kadar iki günde bir besi yeri değiştirildi. Bu süreç yaklaşık altı gün sürdü.
- Altı günlük sürenin sonunda mikroskopta incelenen hücrelerin tamamen konflue olmuş ve farklılaşmaya hazır olduğu kanısına varıldı. Farklılaşma için ayrılmış kuyucuklara içindeki besi yeri uzaklaştırılarak 4 mL 0.25 µM DEX, 0.5 M IBMX, 10 µg/mL insülin ve 100 ng/mL biotin içeren DMEM 'den oluşan farklılaştırma kokteyli eklendi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun sonunda farklılaştırma kokteyli içeren besiyeri uzaklaştırıldı tüm kuyucuklara klasik besi yeri eklendi. Hücrelerin adiposit karakteri kazanması yaklaşık altı gün sürdü. Bu süre içerisinde, iki günde bir besi yeri değişimi yapıldı.

### **5.3.6. Yağ Hücrelerine Farklılaşan Hücrelerin Boyanması**

Adipositlerin boyanması için gerekli çözeltiler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

#### ***Stok Oil Red O Çözeltisi***

0.7 g Oil Red O tartılarak 200 mL 2-propanolde çözüldü ve bir gece manyetik karıştırıcıda bekletildi. 0.22 µm filtreden geçirilerek buzdolabında saklandı.

#### ***Oil Red O Çalışma Çözeltisi***

6 mL Oil Red O stok çözeltisi 4 mL steril destile su ile karıştırıldı ve 0.22 µm filtreden geçirildi.

#### ***% 10' luk Formaldehit***

27 mL %37'lik formaldehit alınarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

#### ***% 60'lık 2-propanol***

60 mL 2-propanol alınarak hacmi 100 mL 'ye tamamlandı.

- Tüm kuyucuklarda bulunan besi yeri uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklara 2.4 mL %10'luk formaldehit eklendi ve beş dakika bekletildi ve ortamdaki formaldehit uzaklaştırıldı. Kuyucuklara tekrar 2.4 mL %10'luk formaldehit eklendi ve oda sıcaklığında bir saat bekletildi.
- Sürenin sonunda kuyucuklar 2.4 mL% 60'lık 2-propanol ile yıkandı.
- Pleytler tamamen kuruyuncaya kadar 37 °C 'de bekletildi.
- Propanolü uzaklaşmış kuyucuklara Oil Red O çalışma çözeltisinden 1 mL eklendi oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Boya çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar saf su ile 5-6 defa yıkandı ve kurumak üzere pleytler 37 °C etüve kaldırıldı.
- Kuruyan pleytlere 3.6 mL % 100'lük 2-propanol eklendi ve pipetajla hücre içindeki oil red boyasının alkol fazına geçmesi sağlandı.
- 1 mL karışım küvete alındı ve spektrofotometrede 520 nm' de absorbans ölçümü yapıldı.

### 5.3.7. Hücre Canlılığı ve Toksikite Testi

#### *Topiramate stok çözeltisi (1mM)*

5,2 mg topiramate tartılarak 15, 32 mL DMEM'de çözüldü. Stok çözelti kullanılarak 750, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 1 µM konsantrasyondaki topiramate çözeltileri DMEM içerisinde hazırlandı.

#### *GW9662 Stok Çözeltisi (6.02 mM)*

Farklılaşma deneylerinde, negatif kontrol olarak bir PPAR  $\gamma$  antagonisti ve dolayısıyla farklılaşma inhibitörü olan GW9662 maddesi kullanıldı. Çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi ve maddenin 3T3-L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, MTT testi gerçekleştirildi. Test sonucunda, çalışma konsantrasyonu 1 µM olarak belirlendi. 5 mg GW9662 3 mL'de çözüldü ve çalışma konsantrasyonları 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 µM bu stoktan hazırlandı.

Topiramatin ve GW9662'nin hücrelerin canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile değerlendirildi (22). Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanır. Canlı hücreler mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyası mor renkli formazan ürününe dönüştürülür. Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi için aşağıdaki işlemler uygulandı.

- Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200 µL besi yeri içinde  $1 \times 10^4$  hücre ekildi.
- 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı ve topiramate (750, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 1 µM) ve GW9662'nin (100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 µM) her konsantrasyonu için ayrılan üç kuyucuğa 200 µL farklı konsantrasyonlarda TPM ve GW9662 eklendi. 72 saat 37 °C' de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek kalan besi yerinin uzaklaştırılması sağlandı.

- Her kuyucuğa 200 µL DMEM eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde 10 µL MTT boyası eklendi ve 2 saat 37 °C' de inkübe edildi.
- Pleyt içeriği uzaklaştırılarak tüm kuyucuklara 200 µL DMSO eklendi ve pleyt 20 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
- İvert mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edildi.
- Oluşan mor renkli bileşiğin absorbansı mikropleyt okuyucusunda 570 nm dalga boyunda 620 nm referans dalga boyuna karşı okundu. Her TPM ve GW9662 konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı.

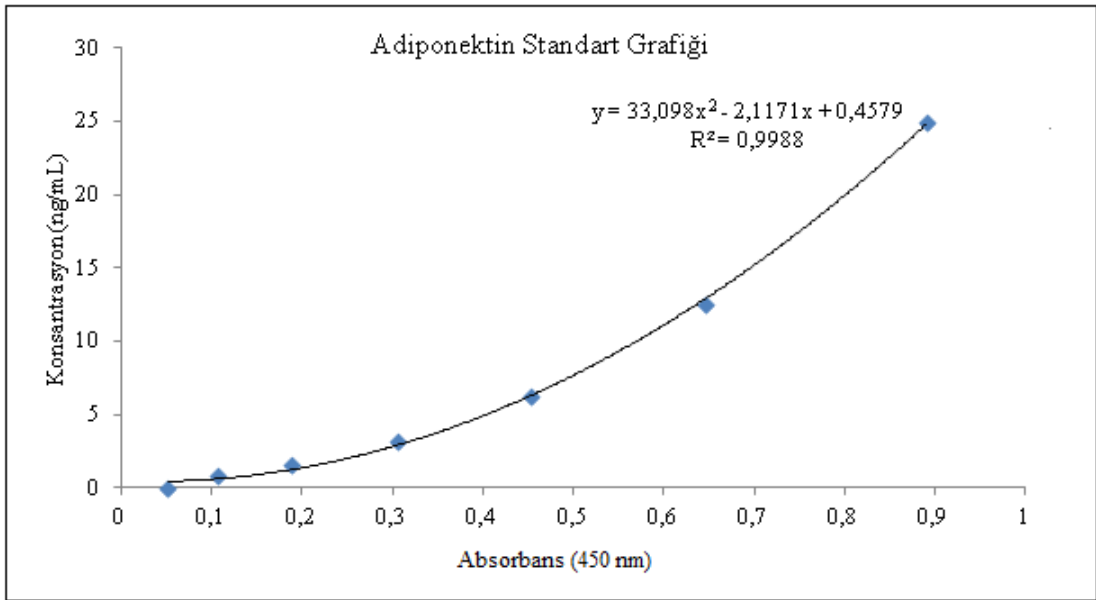
#### **5.4. Topiramatin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi**

Hücreler sayıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100.000 hücre gelecek şekilde 4 mL besi yeri içeren altı kuyucuklu pleytlere ekildi.

- Kuyucuklarda çoğalan hücreler kuyucuk yüzeyinin tamamını kaplayana kadar iki günde bir besi yeri değiştirildi. Bu süreç yaklaşık altı gün sürdü.
- Altı günlük sürenin sonunda mikroskopta incelenen hücrelerin tamamen konflue olmuş ve farklılaşmaya hazır olduğu kanısına varıldı. Farklılaşma için ayrılmış kuyucuklar içindeki besi yeri uzaklaştırılarak 4 mL 0.25 µM DEX, 0.5 M IBMX, 10 µg/mL insülin ve 100 ng/mL biotin içeren DMEM'den oluşan farklılaştırma kokteyli ve çalışma konsantrasyonları olan 1, 5, 10, 50 100 µM topiramatin ile muamele edildi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.
- Farklılaştırma uygulanan bazı kuyucuklar negatif kontrol olarak farklılaştırma kokteyli ile birlikte GW9662 ile muamele edildi (46). Bazı kuyucuklar ise sadece farklılaştırma uygulanarak herhangi bir ilaç uygulanmadı.
- İnkübasyonun sonunda besiyerleri uzaklaştırıldı tüm kuyucuklara klasik besiyeri eklendi. Hücrelerin adiposit karakteri kazanması yaklaşık altı gün sürdü. Bu süre içerisinde iki günde bir besiyeri değişimi yapıldı.
- Farklılaşması tamamlanan hücrelere adiposit boyama protokolü uygulandı ve her bir örneğe ait absorbanslar ölçüldü

### 5.5. Topiramatin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılmış 3T3-L1 Hücrelerinde Adiponektin Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi

Topiramatin adiponektin düzeylerine etkisinin incelenmesi için farklılaşması tamamlanmış hücrelerin besi yerleri uzaklaştırıldı ve hücrelere FBS içermeyen besi yeri ilave edildi. Daha sonra 6, 12 ve 24. saatlerde hücre kültür sıvılarından örnekler alındı. Alınan örneklerde ELISA yöntemi ile adiponektin düzeyleri ölçüldü. Adiponektin konsantrasyonları Assay Pro Mouse Adiponectin ELISA kiti ( Cat No: EMA 2500-1, Lot No: 071041003) ile üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda belirlendi. Sonuçlar çizilen standart grafiği yardımı ile hesaplandı ve ng/mL olarak ifade edildi.



Şekil 9. Adiponektin standart grafiği

### 5.6. Topiramatin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılması Esnasında Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (I, II, III, VA, VB) Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Farklılaştırma işlemi uygulandıktan sonra adiposit karakteri kazanan hücreler RNA izolasyonu işlemine tabi tutuldu. Elde edilen RNA örnekleri reverse transkriptaz yöntemi ile cDNA'ya dönüştürülerek Real Time PCR işleminde kullanılmak üzere saklandı.

### 5.6. 1. RNA İzolasyonu

Olgun adipositlerden RNA izolasyonu TriPure Isolation Reagent (Roche) kullanılarak yapıldı.

- Farklılaşması tamamlanan kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklara 1mL TriPure Isolation Reagent eklendi ve pipetajla iyice karışması sağlandı.
- Elde edilen içerik hacminin iki katı hacme sahip polipropilen santrifüj tüpüne alındı.
- Homojenize örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek nükleoproteinlerin ayrılması sağlandı.
- Her örneğin üzerine 0,2 mL kloroform eklendi, ağzı kapatıldı, 15 saniye karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Karışım 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi ve üç faza ayrılması sağlandı.
- En üstteki faz ayrı polipropilen tüpe alındı ve üzerine 0,5 mL izopropil alkol eklendi, ağzı kapatıldı ve 10-20 s vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 7 dakika bekletilerek RNA çökeleği oluşması sağlandı.
- Çökeleğin ayrılması için 12000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve ardından süpernatant atıldı.
- Pellet üzerine 1 mL %75'lik etanol eklendi ve hafifçe vortekslendi.
- 7500 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Tamamen kurummasına müsaade edilmeden fazla etanol uzaklaştırıldı.
- RNA pelleti Dietil piro karbonatlı (DEPC) su ile pipetaj yapılarak tekrar çözüldü ve 55°C'da 10-15 dakika bekletildi.
- Elde edilen RNA örnekleri 1/25 oranında (2 µL RNA + 48 µL DPEC'li su)DPEC'li su ile seyreltilerek 260/280 nm'de konsantrasyonları ve absorbans oranları belirlendi (Elde edilen RNA'nın saflığı 260/280 absorbans oranına bağlıdır ve iyi bir RNA izolasyonu için bu oranın 1.6-1.9 arasında olması gerekir).
- RNA örneklerinden Reverse Transkripsiyon ile cDNA elde edildi.



### 5.6.2. Reverse Transcriptase-PCR ile RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi

cDNA elde etmek için Promega (catalog no: A3500, promega corporation, Madison, WI, USA) ticari RT-PCR kiti kullanıldı ve aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı. Oligo (dT) 15 primer kullanıldı.

**Tablo 5.** RNA örneklerinin reverse transcriptase-PCR işlemine hazırlanması

<b>Reaktifler</b>	<b>Hacim</b>	<b>50 Örnek İçin Hacim</b>
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µL	200 µL
RT 10x tampon	2 µL	100 µL
dNTP karışımı 10mM	2 µL	100 µL
Recombinant RNAaz inh.	0.5 µL	25 µL
Enzim(AMV) Rev.Tr.	0.7 µL	35 µL
Oligo(dT) <sub>15</sub> primer	1 µL	50 µL
RNA	2 µL	
Nükleaz içermeyen su	7.8 µL	0

Her bir örnek için Tablo 5'e göre pipetlemeler yapıldı ve Tablo 6'daki prosedürler uygulanarak total RNA karışımından cDNA örnekleri elde edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -80 °C'de Real-Time PCR yapılana kadar saklandı.

**Tablo 6.** Reverse transcriptase-PCR protokolü

<b>Sıcaklık °C</b>	<b>Süre (dak)</b>	<b>Amaç</b>
42	15	
95	5	
4	5	Alfa mozaik alfavirus(AMV) Rev.Tr. inaktive etmek ve cDNA'ya bağlanmasını engellemek

### 5.6.3. Real Time PCR Yöntemi İle Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

Gen ekspresyon analizleri SYBR Green floresans sinyalindeki değişimin ölçülmesi ile yapıldı. SYBR Green moleküler biyolojide kullanılan nükleik asitleri boyayan asimetrik bir siyanin boyasıdır. DNA'ya bağlandığında oluşan DNA-boya kompleksi 497 nm'deki ışığı absorblar ve 520 nm'de bir ışık yayar. PCR işlemi boyunca SYBR Green floresans ışımadaki artış üretilen çift zincirli DNA oranına bağlı olarak artmaktadır (22). Real Time PCR işlemi Roche LightCycler 480 II marka cihazda katalog no: 11782-200/01K olan invitrogen Universal EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapıldı. Bu kit yüksek performans, güvenilir, verimlilik ve düşük kontaminasyon riskine sahiptir. Bu kit kullanılırken örnek olarak cDNA ve ekspresyonu incelenecek proteinlerin PCR primerleri gerekmektedir. Real Time PCR işleminde kullanılan primerler ve dizileri Tablo 7'deki gibidir.

**Tablo 7.** Real Time PCR'da kullanılan primer ve dizileri (47).

Primer Adı	Primer Dizisi
Karbonik Anhidraz I (CA I)	F : 5' - TTG ATG ACA GTA GCA ACC - 3' R: 5' -CCA GTG AAC TAA GTG AAG - 3'
Karbonik Anhidraz II (CA II)	F: 5' - CAA GCA CAA CGG ACC AGA - 3' R: 5' - ATG AGC AGA GGC TGT AGG - 3'
Karbonik Anhidraz III (CA III)	F: 5' - GCT CTG CTA AGA CCA TCC - 3' R: 5' - ATT GGC GAA GTC GGT AGG - 3'
Karbonik Anhidraz VA (CA VA)	F: 5' - AAC AAA GCA AGG GCA TAC AG - 3' R: 5' - TGG CAC AGA GAA GTC CCA CA - 3'
Karbonik Anhidraz VB (CA VB)	F: 5' - AAT GGC TTG GCT GTG ATA GG - 3' R: 5' - GGC GTA GTG AGA GAC CCA GA - 3'
β-Aktin	F: 5' - GAG ACC TTC AAC ACC CC- 3' R: 5' - GTG GTG GTG AAG CTG TAG CC- 3'

#### 5.6.4 Real Time PCR Protokolü

Amplifikasyon aşamasında reaksiyon karışımında denatüre DNA primerleri ve SYBR Green boyası bulunmaktadır.

Annealing aşamasında primerlerin ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşmesi ve tekrar ayrışması sonrasında, çok az boya molekülü çift zincire bağlanabilir. DNA'ya bağlanma sonucunda uyarıma bağlı olarak SYBR Green moleküllerinin ışığı yaymasında önemli bir artış olur.

Elongasyon sürecinde, daha çok boya yeni sentezlenen DNA'ya bağlanır. Gelecek ısıtma döngüsü için DNA denatürasyonuna bağlı olarak boya molekülleri salınırlar ve flouresans ışımaya sinyali düşer.

Her PCR döngüsünün elongasyon basamağının sonunda flouresans ışık şiddeti ölçümü amplifiye olmuş DNA'nın miktarındaki artışı monitörden izleyebilmek için yapılır. Sadece istenen PCR ürününün amplifiye olduğundan emin olmak için erime eğrisi analizi PCR'dan sonra yapılabilir. Erime eğrisi analizinde reaksiyon karışımı yavaşça 95 C°'ye kadar ısıtılarak çift zincirli DNA eritilir ve SYBR Green I flouresansındaki sürekli azalış tespit edilir. Flouresans ışık şiddetindeki bu azalış erime piki olarak monitörden görülebilir. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını (T<sub>m</sub>) gösterir. T<sub>m</sub> sıcaklığında DNA'nın %50'si çift zincirli %50'si tek zincirlidir.

cDNA'ları oluşturulan her bir örnek için Tablo 8'deki gibi pipetlemeler 96 kuyucuklu LightCycler pleyte yapıldı. 5 s'lik spindown işlemi gerçekleştirildikten sonra LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazında Tablo 9 'deki program eşliğinde Real Time PCR yapıldı.

Ekspresyon değişimleri hesaplanırken "relative quantitation" göreceli miktar belirleme yöntemi kullanıldı ve farklılaşmamış fibroblastlardaki ekspresyon değerleri 1 olarak kabul edilerek, farklılaşmış hücrelerde izoenzimlerin ekspresyonlarındaki değişim kat olarak ifade edildi.

**Tablo 8.** Örneklerin Real Time PCR için hazırlanması

<b>Eklenecek Reaktifler</b>	<b>1 örnek için hacim</b>	<b>50 örnek için hacim</b>
SYBR GreenER qPCR SuperMix	10 µL	500 µL
10 µM forward primer (500 nM final)	1 µL	50 µL
10 µM reverse primer (500 nM final)	1 µL	50 µL
Nükleaz free su	3 µL	150 µL
cDNA(her örnek için)	5 µL	

- Tablo 9’da verilen miktarlar kullanılarak beta aktin ve CA izoenzimleri için ayrı ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı.
- Roche LightCycler 480 II marka qPCR cihazının özel pleytine her bir örnek için beta aktin ve CA izoenzimleri karışımı 15 µL duplike olarak pipetlendi.
- Her örneğe ait cDNA örneklerinden 5 µL beta aktin ve CA izoenzimleri kuyucuklarına ilave edilerek toplam hacim 20 µL’ye tamamlandı ve pleytin üzeri özel cover ile iyice kaplandı.
- Pleyt kısa süreli santrifüjlendikten sonra Roche LightCycler 480 II marka qPCR cihazına yerleştirildi.
- Tablo 9’da verilen, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda qPCR programı cihaza programlandı ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

**Tablo 9.** Real Time PCR protokolü

<b>Program</b>	<b>Döngü</b>	<b>Analiz Modu</b>
Ön inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	50	Kantifikasyon
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrileri
Soğutma	1	-

<b>Hedef Sıcaklık (°C)</b>	<b>Elde Etme Modu</b>	<b>Süre(hh:mm:ss)</b>	<b>Sıcaklık Artış Hızı (°C/s)</b>
Ön inkübasyon			
95	-	00:05:00	4.4
Amplifikasyon			
95	-	00:00:10	4.4
Primer Tm	-	00:00:10	2.2
dakikada 5 °C			
72	Tek	00:00:10	4.4
Erime Eğrisi			
95	-	00:00:05	2.0
65	-	00:01:00	2.0
97	Devamlı (5–10 acquisitions per °C)		
Soğuma			
40	-	00:00:10	2.0

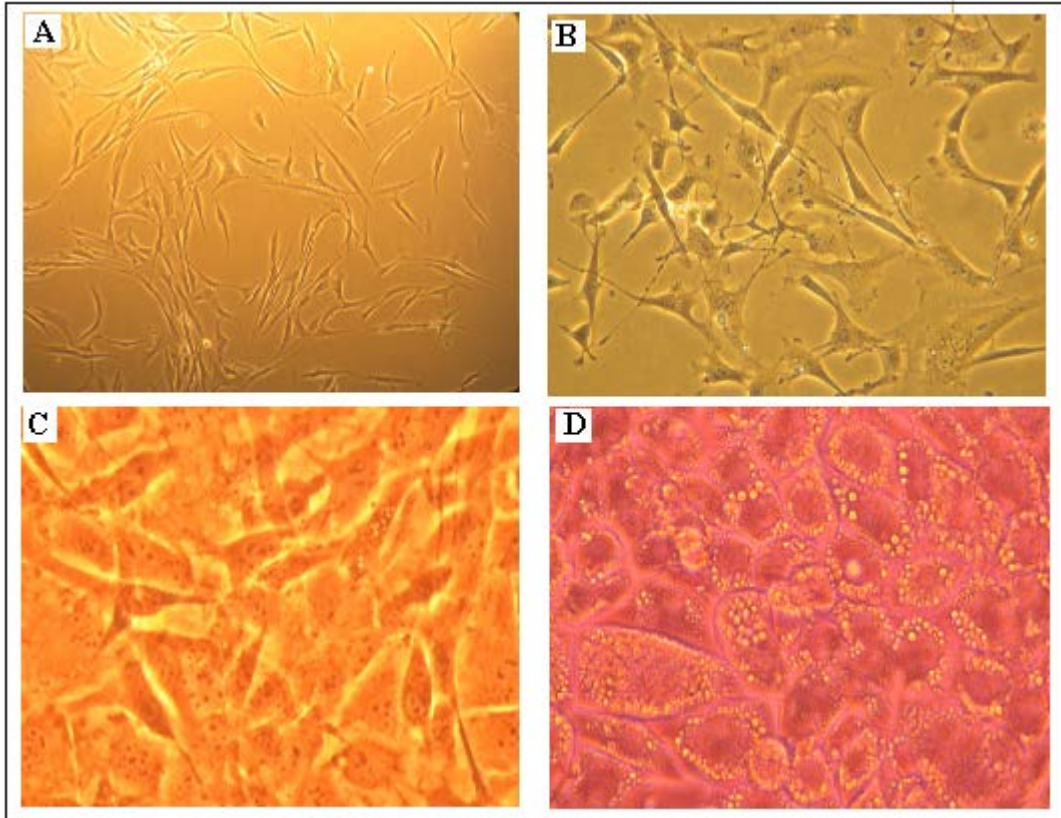
### 5.7. İstatistiksel Yöntemler

Tüm veriler ortalama  $\pm$  SD şeklinde verildi. Gruplar arasındaki farklar eşleştirilmiş örnekler t testi ve ANOVA kullanılarak belirlendi.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücresine Farklılaşması

3T3-L1 hücrelerinin yağ hücresine dönüşümünün incelenmesi için yapılan deneylerde farklılaşmanın literatürle ve bölümümüzde önceden yapılan çalışmalarla uyumlu olarak % 80 civarında gerçekleştiği gözlemlendi. Resim 1’de yeni ekilmiş ve hücre kültürü flask yüzeyine tutunmuş hücreler (A), çoğalmaya başlamış ve karakteristik fibroblast görünümü kazanan hücreler (B), konflue olmaya başlamış ve farklılaşma kokteylinin etkisiyle farklılaşmaya adapte olmuş hücreler (C), farklılaşmış, lipid damlacıkları oluşturmuş adipositlerin mikroskop altındaki görüntüleri verilmiştir.



**Resim 1.** A. Yeni ekilmiş ve flask yüzeyine tutunmuş fibroblastlar, B. Çoğalan fibroblastlar, C. Konflue olmaya başlamış hücreler, D.Farklılaşmış ve lipid toplamış adipositler. (10X, Nikon Eclipse TS100)

## 6.2. Topiramatin 3T3- L1 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

Hücre kültürü, farklılaşma ve gen ekspresyonu deneylerinde kullanılacak uygun topiramatin konsantrasyonlarını ve topiramatin 3T3-L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini belirlemek için MTT testi yapıldı. MTT testi sonucunda farklı topiramatin konsantrasyonlarına karşılık gelen canlılık sonuçları % olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 1, 5, 10, 50, 100 µM konsantrasyonlarda topiramatin kullanılmasına karar verildi (Tablo 10).

**Tablo 10.** Topiramatin 3T3-L1 hücreleri üzerine toksik etkisi ( % canlılık testi)

n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
TPM(µM)	0	1	5	10	25	50	100	250	500	750	1000
Canlılık (%)	100	92	92	108	98	101	93	75	75	61	46

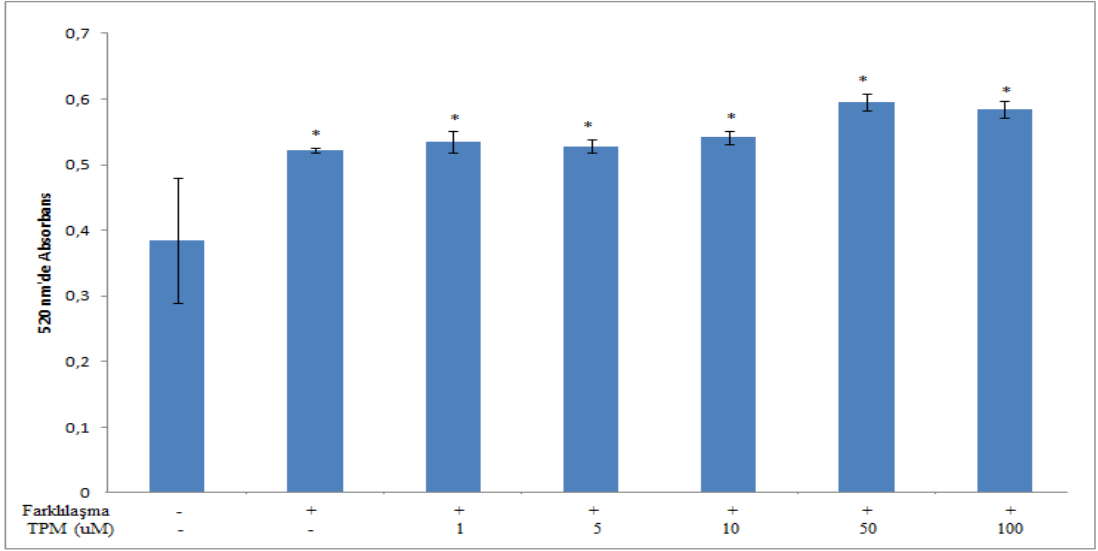
## 6.3. Topiramatin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşmasına Etkisi

Topiramatin 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşmasına olan etkisinin incelenmesi için farklılaştırma işlemi sonunda altı kuyucuklu pleytlerde bulunan farklılaşmamış ve farklılaşmış ve/veya topiramatin uygulanmış tüm hücreler Oil Red O boyası ile boyandı ve 520 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri (ort ± SD) şeklinde Tablo 11’de ve bar grafiği halinde Şekil 10’da verildi.

**Tablo 11.** 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasına topiramatin farklı konsantrasyonlardaki etkisi

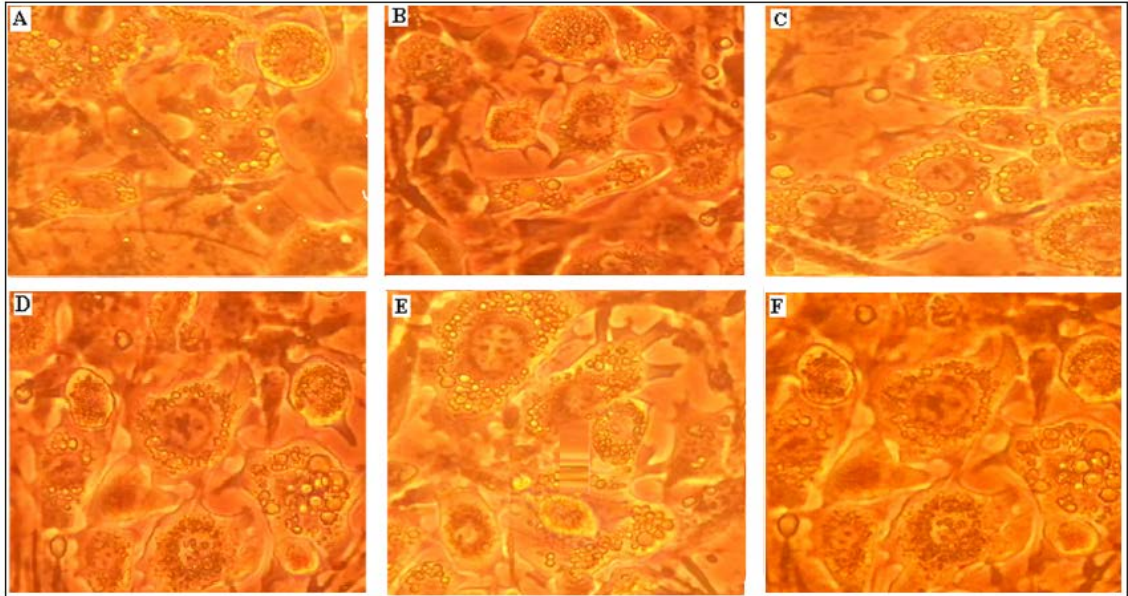
n	3	3	3	3	3	3	3
Farklılaşma	-	+	+	+	+	+	+
TPM (µM)	-	-	1	5	10	50	100
Abs 520nm	0.39±0.01	0.52±0.01*	0.54±0.02*	0.53±0.01*	0.54±0.01*	0.6±0.01*	0.59±0.01*

\*(P<0.01), Farklılaşmayan hücreler ile kıyaslandığında.



**Şekil 10.** 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasına topiramatin farklı konsantrasyonlardaki etkisi. (\* (P<0.01), Farklılaşmayan hücreler ile kıyaslandığında)

Yağ hücresine farklılaşmamış hücreler ile farklılaşmış ve topiramatin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş olgun adipositler Oil Red O boyası ile boyandıktan sonra, elde edilen ortalama absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (P<0.01). Sonuçlara ait bar grafiği Şekil 9'da, hücrelerin mikroskop görüntüleri ise Resim 2'de verilmiştir.



**Resim 2.** 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasına topiramatin farklı konsantrasyonlardaki etkisi mikroskop görüntüleri. **A:** 0 µM, **B:** 1 µM, **C:** 5 µM, **D:** 10 µM, **E:** 50 µM, **F:** 100 µM (10X, Nikon Eclipse TS100)



#### 6.4. GW 9662'nin 3T3- L1 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

Farklılaşma deneylerinde, negatif kontrol olarak bir PPAR  $\gamma$  antagonisti ve dolayısıyla farklılaşma inhibitörü olan GW9662 maddesi kullanıldı. Çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi ve maddenin 3T3-L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, MTT testi gerçekleştirildi. Test sonucunda, çalışma konsantrasyonu 1  $\mu$ M olarak belirlendi (Tablo 12).

**Tablo 12.** GW9662'nin 3T3-L1 hücreleri üzerine toksik etkisi ( % canlılık testi)

n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
GW9662( $\mu$ M)	0	0.1	0.5	1	5	10	25	50	100
Canlılık (%)	100	91	112	101	112.2	95	78	44	13

#### 6.5. GW 9662'nin 3T3- L1 Hücrelerinin Farklılaşması Üzerine Etkisi

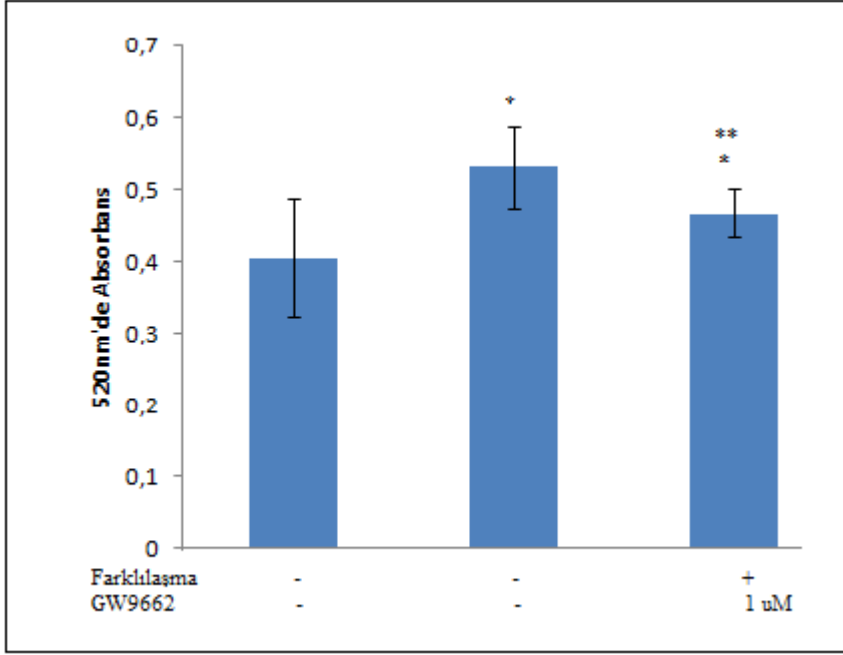
GW9662' nin farklılaşma üzerine inhibitör etkisinin belirlenmesi için, MTT testi ile belirlenen 1  $\mu$ M 'lık konsantrasyon topiramamat ile muamele edilmiş ve edilmemiş farklılaşan hücrelere uygulandı. Deney sonunda tüm hücreler Oil Red O boyası ile boyanarak 520 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi.

Absorbans ölçümlerine ait sonuçlar ortalama  $\pm$  SD şeklinde Tablo 13'te verildi. GW9662' nin farklılaşma üzerine inhibitör etkisini gösteren bar grafiği Şekil 11' da görülmektedir. Ayrıca inhibitör deneyine ait hücrelerin mikroskop görüntüleri Resim 3'te görülmektedir.

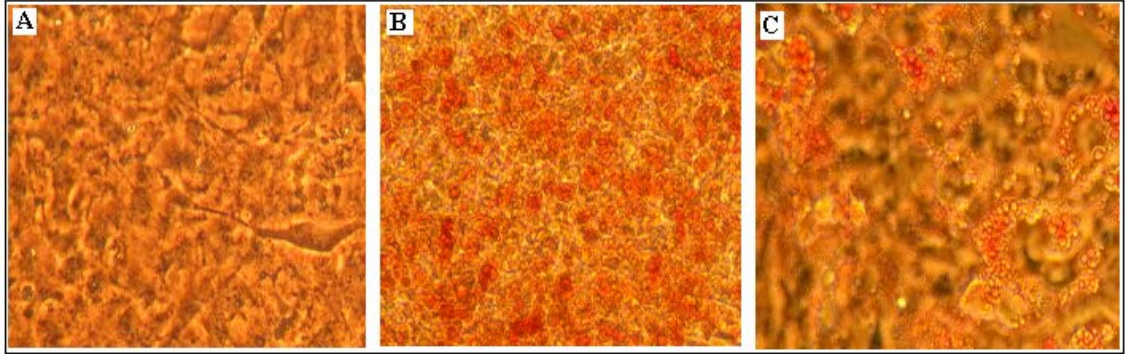
**Tablo 13.** GW9662'nin 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasına etkisi

n	3	3	3
Farklılaşma	-	+	+
GW9662(1 $\mu$ M)	-	-	+
Absorbans (Ort $\pm$ SD)	0.405 $\pm$ 0.08	0.531 $\pm$ 0.06*	0.467 $\pm$ 0.03***

(\* $P < 0,01$ ) Farklılaşmayan hücreler ile kıyaslandığında. \*\*  $P < 0,01$ , Farklılaşan ve GW9662 uygulanmayan hücreler le kıyaslandığında)



**Şekil 11.** GW9662'nin 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasına etkisi. (\*  $P < 0.01$ , Farklılaşmayan hücrelerle kıyaslandığında, \*\*  $P < 0.01$ , Farklılaşan ve GW9662 uygulanmayan hücreler ile kıyaslandığında)

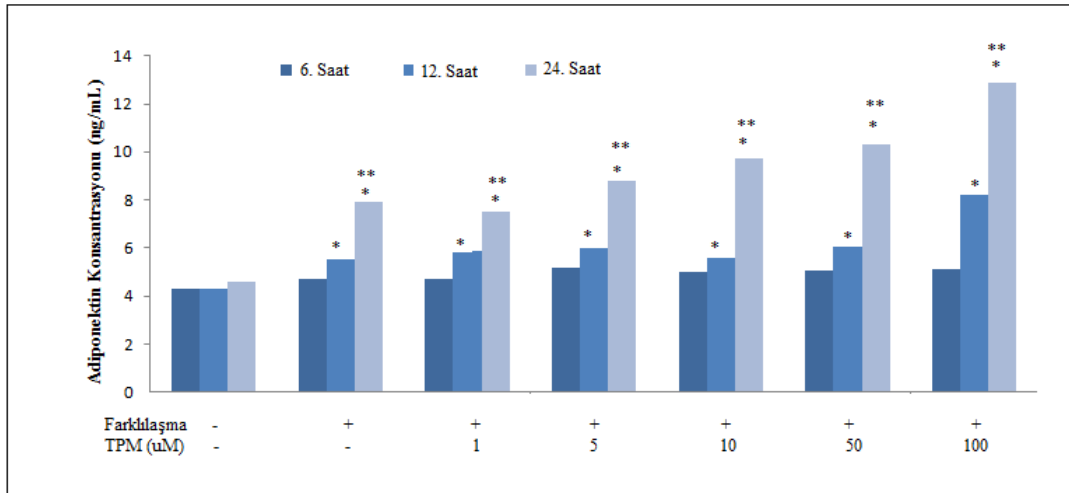


**Resim 3.** GW9662'nin 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasına etkisi mikroskop görüntüleri. **A.** Farklılaşmamış hücreler **B.** Farklılaşmış hücreler **C.** Farklılaşmış ve 1  $\mu\text{M}$  GW9662 ile muamele edilmiş hücreler. (10X, Nikon Eclipse TS100)

Negatif kontrol olarak kullanılan GW9662'nin farklılaşmaya olan inhibitör etkisi istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0.01$ ) ve literatürle uyumlu bulundu.

## 6.6. Farklılaşan Hücrelerde Adiponektin Düzeyleri

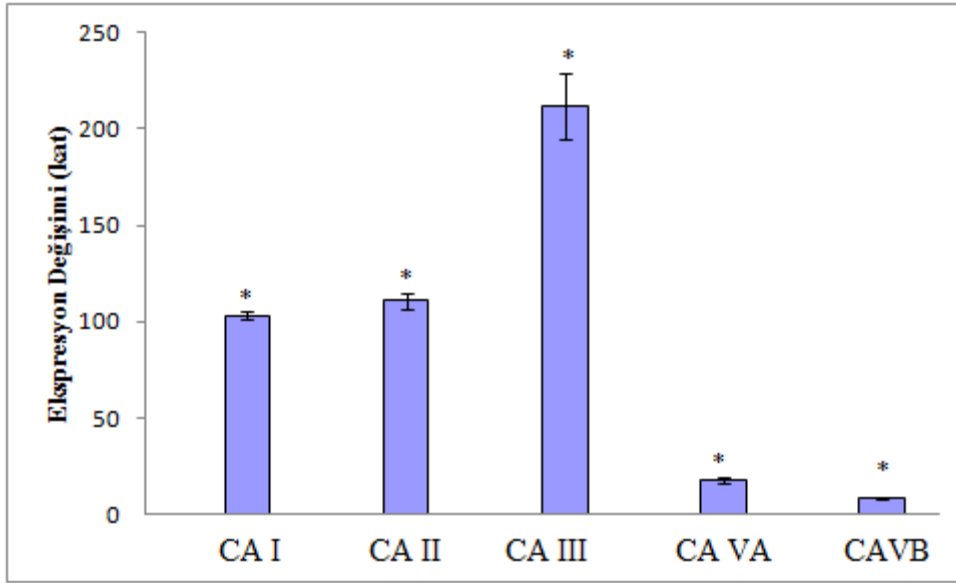
Farklı konsantrasyonlardaki topiramate uygulamasının farklılaşmaya olan etkisinin belirlenmesini desteklemek amacıyla adipositlerden bolca salgılanan bir adipokin olan adiponektin düzeyleri hücre kültür sıvılarında ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sonuçlar standart grafiği ile oluşturulan denklem yardımı ile hesaplandı ve ng/mL olarak ifade edildi. Adiponektin düzeyleri farklılaşmış hücrelerde farklılaşmayanlara göre 12 ve 24. saatlerde anlamlı artış göstermiştir ( $P<0.01$ ), ayrıca 24. saatte tüm konsantrasyonlarda 6 ve 12. Saate göre anlamlı artış gözlenmiştir ( $P<0.001$ ).



**Şekil 12.** Farklılaştırılmış hücrelerde adiponektin düzeylerinin saat ve topiramate konsantrasyonu ile değişimi. ( \* ( $P<0.01$ ) Farklılaşmayan hücrelerle kıyaslandığında \*\*( $P<0.001$ ), 6 ve 12. Saatler ile kıyaslandığında)

## 6.7. Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (CA I, CA II, CA III, CA VA, CA VB) Gen Ekspresyonu Değişimi

Farklılaşma işleminin uygulanması ile CA izoenzimlerinin ekspresyonunda meydana gelen değişimin gözlenmesi için farklılaşmayan fibroblastlar ile farklılaşma kokteyli uygulanmış ve başka herhangi bir işlem uygulanmamış hücrelerde karbonik anhidraz ekspresyonları incelendi. Ekspresyon değişimleri hesaplanırken “relative quantitation” göreceli miktar belirleme yöntemi kullanıldı ve farklılaşmamış fibroblastlardaki ekspresyon değerleri 1 olarak kabul edilerek, farklılaşmış hücrelerde izoenzimlerin ekspresyonlarındaki değişim kat olarak ifade edildi.



**Şekil 13.** Farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde karbonik anhidraz izoenzimleri gen ekspresyonu değişimi (\*P<0.001, Farklılaşmamış hücreler ile kıyaslandığında).

Farklılaşmamış hücreler ile kıyaslandığında, farklılaşmış hücrelerde karbonik anhidraz I, II, III, VA ve VB ekspresyonları sırasıyla 103, 111, 212, 17.3, 8.4 kat arttığı bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (P<0.001). sonuçlara ait bar grafiği Şekil13’de verilmiştir.

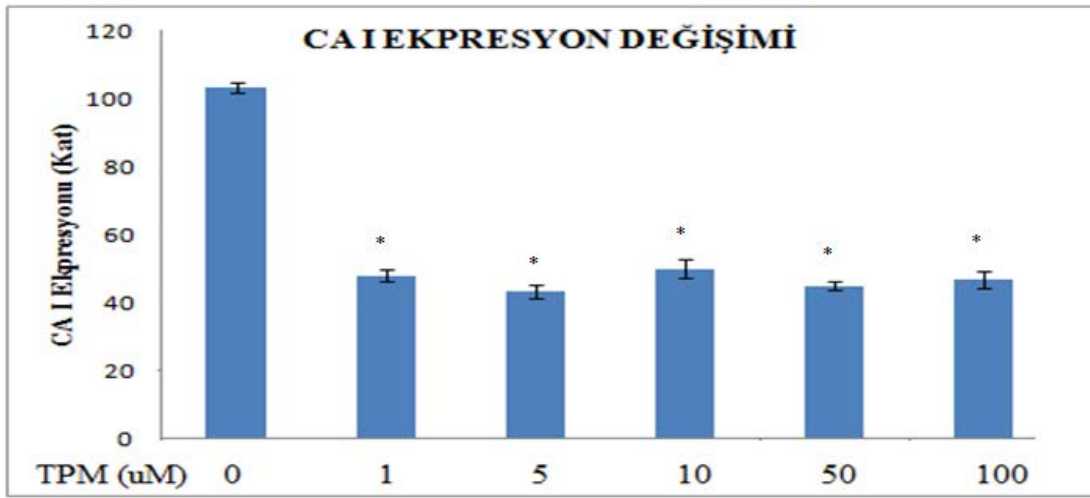
### **6.8. Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA I Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi**

Farklılaştırılmış hücrelerde, farklı konsantrasyonlardaki topiramatin CA I ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için, farklılaştırılmamış hücrelerdeki ekspresyon değeri 1 kabul edilerek, her bir konsantrasyondaki ekspresyon değerleri, kat olarak ifade edildi. Sonuçlar Tablo 14’te ve Şekil 14’te bar grafiği olarak verildi. CA I ekspresyonu topiramatin ile muamele edilen örneklerde uygulanmayanlara göre anlamlı şekilde düştüğü gözlenmiştir (P=0.0001). Topiramatin farklı konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ise CA I ekspresyonu açısından bir fark bulunamamıştır (P=1).

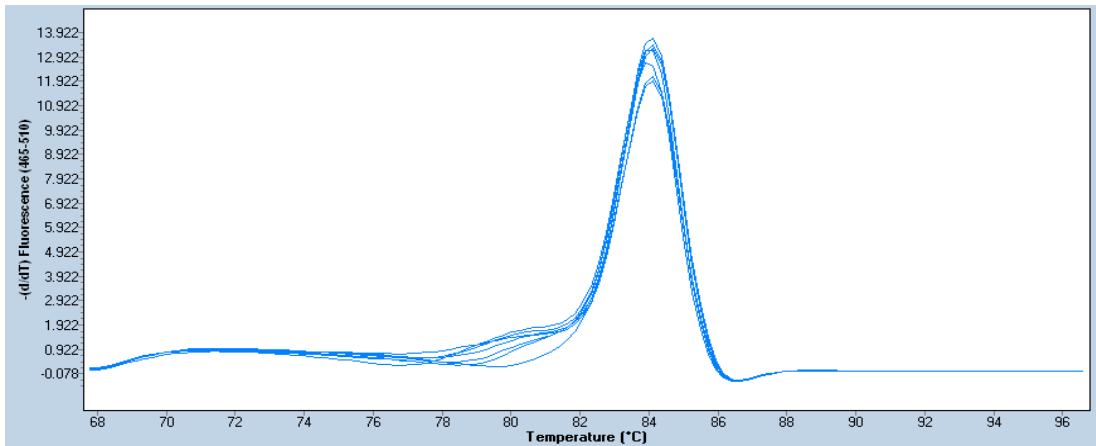
**Tablo 14.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CA I gen ekspresyonu üzerine etkisi

n	2	2	2	2	2	2
Farklılaşma	+	+	+	+	+	+
TPM( $\mu$ M)	-	1	5	10	50	100
Ekspresyon	103.5 $\pm$ 1.5	47.9 $\pm$ 1.8*	43.4 $\pm$ 2*	50 $\pm$ 2,8*	45 $\pm$ 1.4*	46.7 $\pm$ 2.43*
Değişimi						

(\* (P=0.0001), TPM uygulanmayan hücreler ile kıyaslandığında).



**Şekil 14.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde, topiramatin CA I gen ekspresyonu üzerine etkisi (\* (P=0.0001), TPM uygulanmayan hücrelere göre).



**Resim 4.** Karbonik Anhidraz I için elde edilen erime noktası eğrileri.

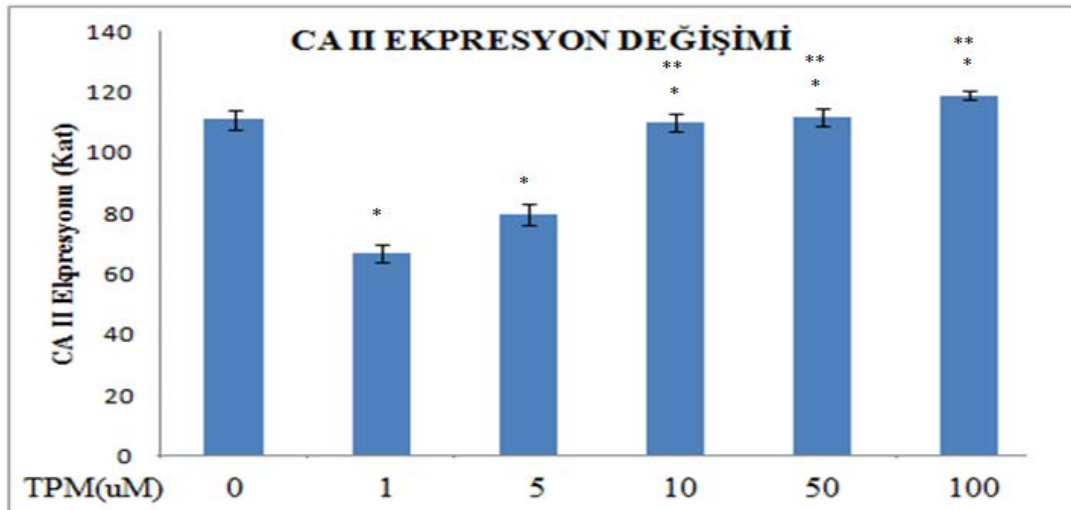
## 6.9. Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA II Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Farklılaştırılmış hücrelerde farklı konsantrasyonlardaki topiramatin CA II ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için her bir konsantrasyondaki ekspresyon değerleri farklılaştırılmamış hücrelerdeki ekspresyon değeri 1 kabul edilerek, kat olarak ifade edildi. Sonuçlar Tablo 15’te ve Şekil 15’te bar grafiği olarak verildi. CA II ekspresyonu 1 ve 5  $\mu\text{M}$  TPM ile beraber anlamlı şekilde düşmüş ( $P=0.0001$ ), 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  TPM uygulanan örneklerde ise, 1 ve 5  $\mu\text{M}$  TPM verilen örneklere göre artmış bulunmuştur ( $P=0.0001$ ).

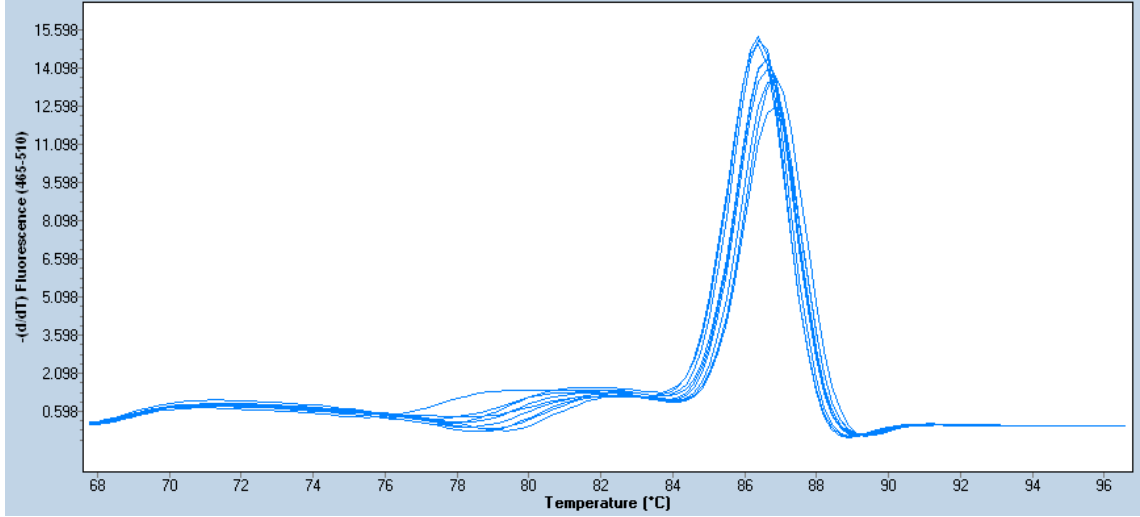
**Tablo 15.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CA II gen ekspresyonu üzerine etkisi

n	2	2	2	2	2	2
Farklılaşma	+	+	+	+	+	+
TPM( $\mu\text{M}$ )	-	1	5	10	50	100
Ekspresyon	111 $\pm$ 3	67 $\pm$ 2.82*	80 $\pm$ 3.53*	110 $\pm$ 2.92*	112 $\pm$ 2.78*	119 $\pm$ 1.92*
Değişimi						

(\* $P=0.0001$ ) TPM uygulanmayan hücrelere göre, (\*\* $P=0.0001$ ) 1, 5  $\mu\text{M}$  TPM uygulanan hücrelere göre)



**Şekil 15.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CA II gen ekspresyonu üzerine etkisi (\* $P=0.0001$ ) TPM uygulanmayan hücrelere göre, (\*\* $P=0.0001$ ) 1, 5  $\mu\text{M}$  TPM uygulanan hücrelere göre)



**Resim 5.** Karbonik Anhidraz II için elde edilen erime noktası eğrileri.

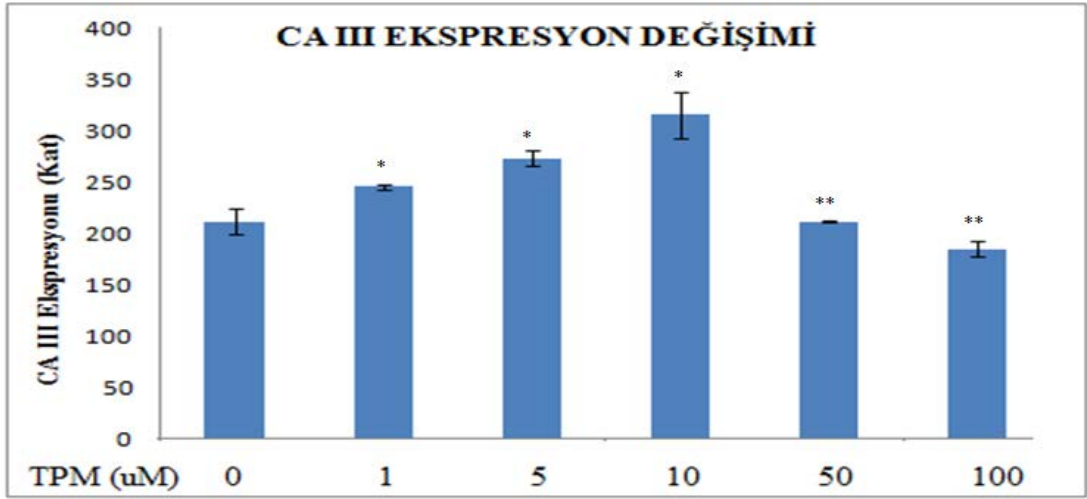
### 6.10. Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA III Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Farklılaştırılmış hücrelerde farklı konsantrasyonlardaki topiramatin CA III ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için her bir konsantrasyondaki ekspresyon değerleri farklılaştırılmamış hücrelerdeki ekspresyon değeri 1 kabul edilerek, kat olarak ifade edildi. Sonuçlar Tablo 16'da ve Şekil 15'te bar grafiği olarak verildi. 1, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  TPM ile muamele edilen hücrelerde ekspresyonun, uygulanmayan hücelere göre artış gösterdiği 50 ve 100  $\mu\text{M}$  uygulanan hücrelerde ise CA III ekspresyonunun düştüğü gözlenmiştir.

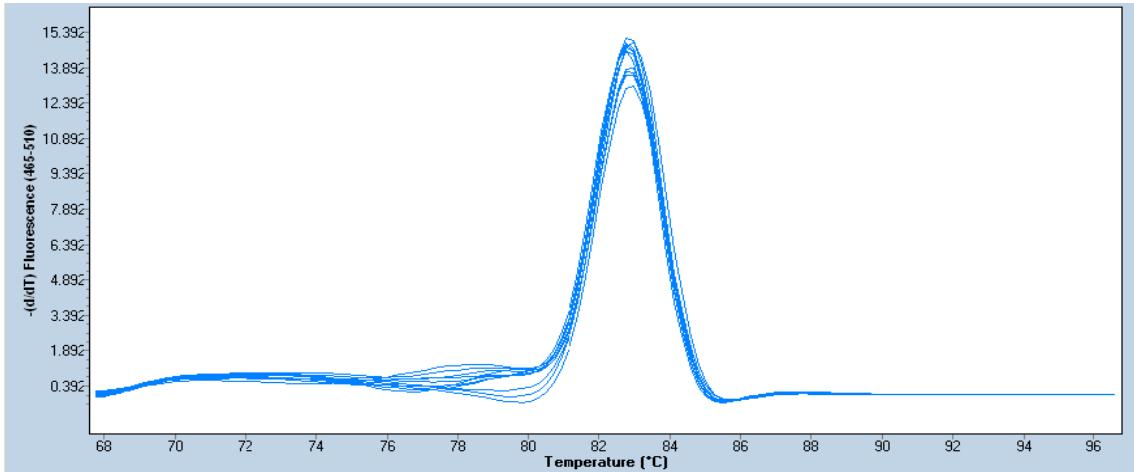
**Tablo 16.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CAIII gen ekspresyonu üzerine etkisi

n	2	2	2	2	2	2
<b>Farklılaşma</b>	+	+	+	+	+	+
<b>TPM(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	-	1	5	10	50	100
<b>Ekspresyon</b>	212 $\pm$ 12	245 $\pm$ 2.82*	273 $\pm$ 7.7*	315 $\pm$ 21.9*	220 $\pm$ 0.2**	185 $\pm$ 7.7**
<b>Değişimi</b>						

(\*P =0.009, TPM uygulanmayan hücelere göre, \*\* P=0.009 1 ve 5  $\mu\text{M}$  uygulanan hücelere göre.)



**Şekil 16.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CA III gen ekspresyonu üzerine etkisi (\*P =0.009, TPM uygulanmayan hücelere göre, \*\* P=0.009 1 ve 5 µM uygulanan hücelere göre.)



**Resim 6.** Karbonik Anhidraz III için elde edilen erime noktası eğrileri.

### 6.11. Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA VA Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Farklılaştırılmış hücrelerde farklı konsantrasyonlardaki topiramatin CA VA ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için her bir konsantrasyondaki ekspresyon değerleri farklılaştırılmamış hücrelerdeki ekspresyon değeri 1 kabul edilerek, kat olarak ifade edildi. Sonuçlar Tablo 17’de ve Şekil 17’de bar grafiği olarak verildi. CA

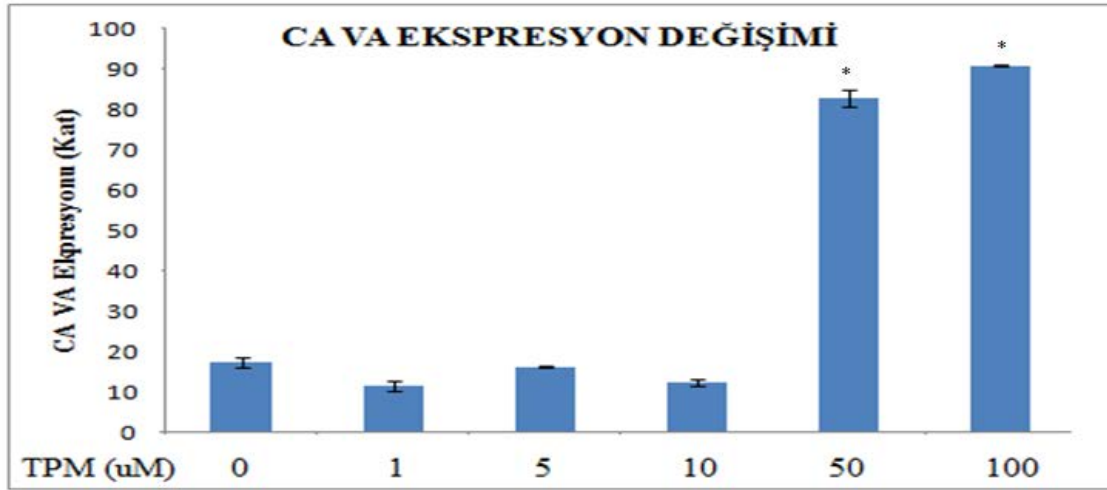


VA ekspresyonu 1, 5, 10  $\mu$ M TPM uygulanan hücrelerde uygulanmayan hücelere göre anlamlı bir değişim göstermezken 50 ve 100  $\mu$ M için ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı artmış bulunmuştur (P=0.0001).

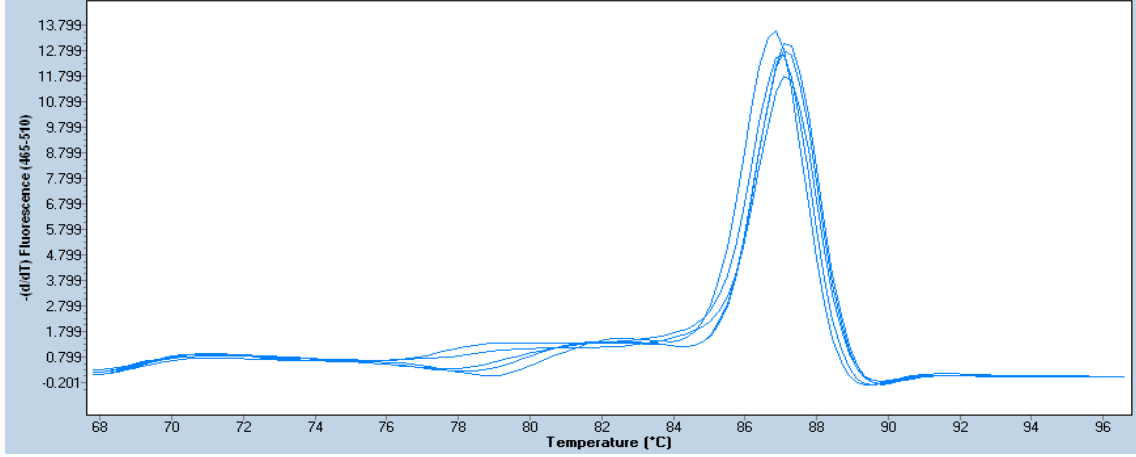
**Tablo 17.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CAVA gen ekspresyonu üzerine etkisi

n	2	2	2	2	2	2
Farklılaşma	+	+	+	+	+	+
TPM( $\mu$ M)	-	1	5	10	50	100
Ekspresyon	17.3 $\pm$ 1.1	11.4 $\pm$ 1.4	16.15 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 0.8	83 $\pm$ 2.2*	91 $\pm$ 0.1*
Değişimi						

(\*P=0.0001 TPM uygulanmayan hücelere göre)



**Şekil 17.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CA VA gen ekspresyonu üzerine etkisi (\*P=0.0001 TPM uygulanmayan hücelere göre).



**Resim 7.** Karbonik Anhidraz VA için elde edilen erime noktası eğrileri.

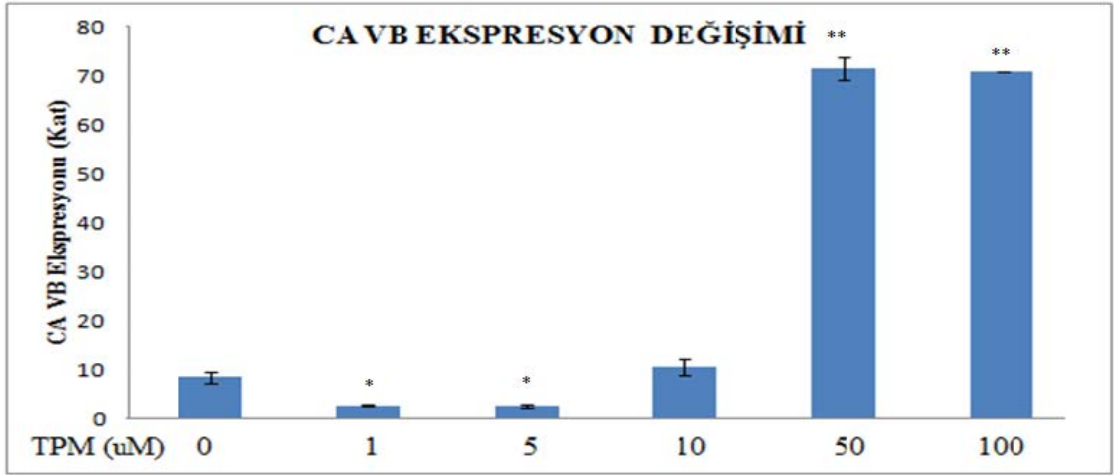
### 6.12. Olgun Adipositlere Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Topiramatin CA VB Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Farklılaştırılmış hücrelerde farklı konsantrasyonlardaki topiramatin CA VB ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için her bir konsantrasyondaki ekspresyon değerleri farklılaştırılmamış hücrelerdeki ekspresyon değeri 1 kabul edilerek, kat olarak ifade edildi. Sonuçlar Tablo 18’de ve Şekil 18’de bar grafiği olarak verildi. CA VB ekspresyonu 1 ve 5  $\mu\text{M}$  TPM için anlamlı düşüş göstermiş ( $P < 0.05$ ), 10  $\mu\text{M}$  için değişim anlamlı bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ). 50 ve 100  $\mu\text{M}$  TPM uygulanan hücrelerde anlamlı artış gözlenmiştir ( $P = 0.0001$ ).

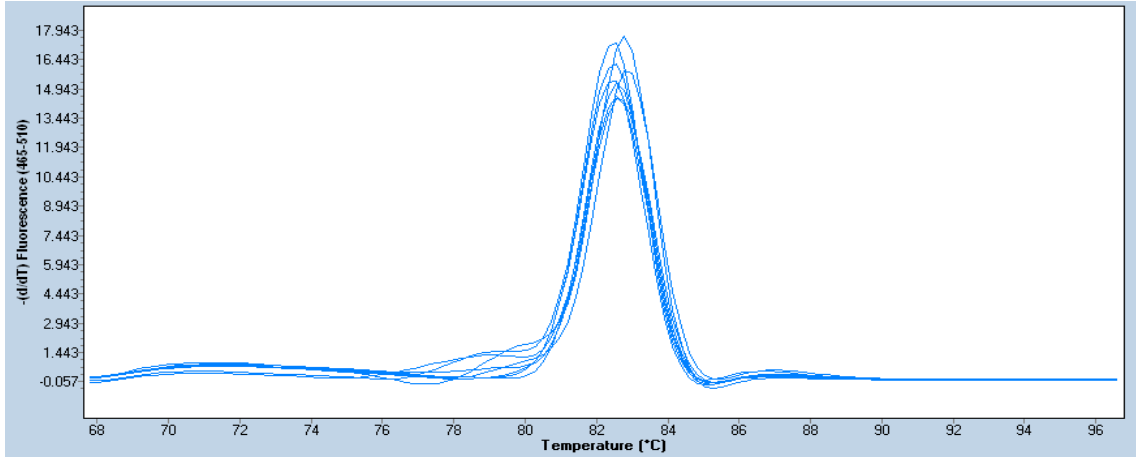
**Tablo 18.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CAVB gen ekspresyonu üzerine etkisi

n	2	2	2	2	2	2
<b>Farklılaşma</b>	+	+	+	+	+	+
<b>TPM(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	-	1	5	10	50	100
<b>Ekspresyon</b>	8.4	2.7 $\pm$ 0.1*	2,65 $\pm$ 0.35*	10.4 $\pm$ 1.69	71.7 $\pm$ 2.3**	71 $\pm$ 0.14**
<b>Değişimi</b>						

(\* $P < 0.005$ , TPM uygulanmayan hücrelere göre, \*\* $P = 0.0001$ , TPM uygulanmayan hücrelere göre)



**Şekil 18.** Olgun adipositlere farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin CA VB gen ekspresyonu üzerine etkisi (\* $P < 0.005$ , TPM uygulanmayan hücelere göre, \*\* $P = 0.0001$ , TPM uygulanmayan hücelere göre)



**Resim 8.** Karbonik Anhidraz VB için elde edilen erime noktası eğrileri.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite gelişmiş ülkelerde en çok görülen metabolik hastalık olup Tip II diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser türleri için risk faktörü oluşturmaktadır. Hastalığın yaygınlaşması konu üzerindeki çalışmaları hızlandırmış ve önemini artırmıştır. Diyet ve yaşam tarzı değişikliklerinin, teorik olarak tedavide çözüm gibi gözükse de, başarılı olmaması farmakolojik yaklaşımları gerekli kılmaktadır. Ancak, hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç sayıca oldukça az olmakla beraber, etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış ve bu ilaçlar ciddi yan etkilere sahiptirler (37). Çevresel ve genetik faktörlerin rol oynadığı kompleks bir hastalık olan obezite, hücre biyolojisi yönünden, adipoz dokudaki adipositlerin sayı ve hacimce artması ile tanımlanmaktadır. Hastalıkla ilgili yapılan birçok çalışma adipositlerin çoğalma ve farklılaşmasını etkileyen faktörleri hedef almaktadır (48).

Adipositler kas ve kemik hücrelerine benzer şekilde, mezoderm orijinli mezenşimal kök hücrelerden (MSCs) köken alırlar. İki aşamada incelenen adipogenezin ilk adımı bu hücrelerden preadipositlerin oluşumu iken, ikinci adımı preadipositlerden olgun yağ hücrelerinin oluşumu olarak tanımlanabilir (18).

Karbonik anhidrazlar hemen hemen tüm organizmalarda bulunan ve asit-baz dengesinde görev alan enzimlerdir. Karbondioksit ve bikarbonat transportu, kemik resorpsiyonu, vücut sıvılarının üretimi glukoneogenez, üregenez ve lipogenez gibi fizyolojik süreçlere, tümör oluşumuna katkıları bilinen enzimin, son yıllarda, tümör belirteci olarak ilaç tasarımı amacıyla hedef görüldüğü bildirilmiştir (39).

İlk olarak 1979 yılında Bruce E. Maryanoff ve Joseph F. Gardoki tarafından tanımlanan topiramet, bir fruktoz türevi olup, voltaj kapılı sodyum kanallarını bloklamak, “kainate” tipi glutamat reseptörlerini inhibe etmek, C-tip voltaj sensitif kalsiyum akımlarını düşürmek, GABA aracılıklı klorür kanallarının açılımını ve potasyum kondüktansını artırmak ve karbonik anhidraz enzimini inhibe etmek gibi etkilere sahiptir. Bu etkiler sinirsel uyarıların inhibisyonunu artırıcı veya azaltıcı yöndedir. Topiramet epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır ve kullanan bireylerin %6-16’sında kilo kaybı gözleendiği bildirilmiştir. İlacın farmakolojik etkileri ve mekanizmaları bilinse de, yan etki olarak görülen bu durumun altında yatan sebep ve mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. İlacın biyokimyasal/farmakolojik

özelliklerinden dolayı enerji metabolizması üzerindeki etkileri tartışmalı kalmaktadır (49, 50).

Obezite, adipoz doku, adiposit farklılaşması araştırmaları için *in vivo* modeller olarak bazı primer yağ hücresi kültür modelleri ve yağ hücrelerine farklılaşabilen çeşitli hücre serileri mevcuttur. Farklılaşmanın *in vivo* modellerle çalışılması oldukça zordur çünkü adipoz dokuda birçok hücre çeşidi bulunmaktadır. Bunun için tek tip hücre içeren seriler farklılaşma sürecinin moleküler mekanizmasının ve olgun yağ hücrelerinin karakteristiklerin belirlenmesinde daha kullanışlı modellerdir (51).

Bu tez çalışmasında bu modellerden en yaygın olarak kullanılan ve özellikleri en iyi ortaya konulmuş 3T3-L1 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler ATCC firmasından temin edilmiş ve firmanın tavsiyeleri doğrultusunda 25 cm<sup>2</sup> 'lik flaska 70x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kültürlenecek hücrelerin doğru sayılması ve uygun sayıda ekilmesine özen gösterilmelidir, çünkü fazla sayıda ekilen hücreler erken konflue olacak ve çoğalma özelliklerini kaybederek sonraki pasajlamalarda tutunmaları zorlaşacaktır. Çalışmanın bütün aşamalarında aynı markadan temin edilmiş, aynı seri numaralı hücreler ve bu hücrelerin aynı sayıdaki pasajları kullanılarak standardizasyon sağlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında dikkat edilecek diğer hususlar ise, kullanılan sarf malzemelerin de aynı marka ve lot numaralı olmasıdır. Kullanılan suyun steril, deiyonize ve öz direnci düşük olmalıdır. Kullanılan malzemelerin, laminar flow ve laboratuvarın genel sterilizasyonu en iyi şekilde sağlanmalıdır. 3T3-L1 hücreleri oldukça hassas hücreler olduğu için, besi yeri değiştirilirken dikkatli olunmalı ve hücrelerin zeminden kopmamasına özen gösterilmelidir. Bu hücreler yağ hücresine farklılaşma özelliğine sahip hücrelerdir, ancak laboratuvar koşullarında süreci hızlandırmak için hücreler IBMX, DEX ve insülin ile muamele edilmiştir. Ayrıca laboratuvarımızda daha önceden yapılmış bir tez çalışması örnek alınarak farklılaşma kokteyline, farklılaşma süresini kısalttığı bildirilen biotin eklenmiştir (22). Farklılaştırılmış hücrelerin Oil Red ile boyanması aşamasında, boyanın sadece pleyt yüzeyine temasından emin olunmalı, pleyt yan duvarlarına temasından kaçınılmalıdır.

Farklılaşmaya etkisi belirlenecek olan topiramatin ve farklılaşma deneylerinde negatif kontrol olarak kullanılan GW9662 maddesi için uygun dozların belirlenmesi

amacıyla MTT testi yapılmıştır. Test sonucunda farklı topiramet ve GW9662 konsantrasyonlarına karşılık canlılık yüzdeleri Tablo 10 ve 12’de verildi. Elde edilen sonuçlara göre topiramet için 1, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ , GW9662 için 1  $\mu\text{M}$  uygun konsantrasyonlar olarak bulundu ve tüm deneylerde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.

İnsulin bağlama metodu, gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesi ölçümüne dayalı metodlar gibi farklılaşmanın tayin edilebileceği yöntemlerin de bulunmasına rağmen, bu çalışmada, literatürde de en çok tercih edilen Oil Red O boyama tekniği tercih edilmiştir. Güvenilir, uygulanması kolay, ekonomik olan yöntemde ölçümler spektrofotometrik olarak yapılmakta ve ayrıca, mikroskop altında, boyanan yağ damlacıkları kolaylıkla görülebilmektedir (52). Farklı konsantrasyonlardaki topirametin 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşma etkisinin değerlendirilmesi amacıyla deneyler sonunda farklılaştırma uygulanmış ve uygulanmamış hücreler Oil Red O boyası ile boyanmış ve 520 nm’ de absorbansları ölçülmüştür. Boyama sonucunda absorbans değerleri ve elde edilen mikroskop görüntüleri ile farklılaşmanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Elde edilen absorbans sonuçları, ortalama  $\pm$  SD şeklinde Tablo 11’de ve bar grafiği halinde Şekil 10’da ifade edildi. Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile farklılaşmış olgun yağ hücreleri boyama sonrası absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $P < 0.0001$ ). Farklı konsantrasyonlarda topiramet uygulanan hücreler ile farklılaşmamış hücreler karşılaştırıldığında, topirametin farklılaşmayı anlamlı şekilde artırdığı gözlenmiştir ( $P < 0.0001$ ). Farklılaştırma uygulanmış ancak topiramet ile muamele edilmemiş hücreler ile, topirametin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücreler karşılaştırıldığında ise, 1 ve 5 $\mu\text{M}$  topiramet için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değilken ( $P = 0.244$ ,  $P = 0.354$ ); 10, 50 ve 100 $\mu\text{M}$  topirametin farklılaşmayı anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur ( $P < 0.035$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). Bu bulgular topirametin kilo düşürücü etkisi ile paralellik göstermemektedir. Topirametin farklılaşan hücrelere farklılaşma kokteyli ile eşzamanlı verilmesi sebeplerden biri olabilir. Topirametin kilo kaybı etkisi obez kişilerde, zayıf kişilerden daha fazla olduğu bilinmektedir (50). Farklılaşmanın indüksiyonundan sonra verilmesiyle hücrelerin yağ damlacığı toplamaya başlamasını yavaşlatması daha destekleyici bulgu olabilirdi. Topirametin adipogenezini artırmış olmasının hücreleri aktive etmiş olabileceğini akla getirmektedir. MTT testi sonucunda da, geniş konsantrasyon aralığında yüksek canlılık yüzdeleri bu sonucu

desteklemektedir. Topiramate antiepileptik bir ilaç olduğu için, ilaçla ilgili in vitro çalışmalar daha çok nöronlarda yapılmıştır ve araştırmalarda topiramatin nöroprotektif etkileri ortaya konulmuştur (53,54). Ayrıca kondrositlerde yapılan bir çalışmada proliferatif etkisinin olduğu gösterilmiştir (55). In vivo çalışma olarak, yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik hasardan sonra uygulanmasıyla hasarı azaltıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (56). Benzer şekilde yeni doğan domuzlarda yapılan çalışmada topiramatin nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (57). Ayrıca fare hipokampusunda “kainate” indüklü hücre ölümünde kaspaz-3 aktivitesini inhibe ederek antiapoptotik özelliği öne sürülmüştür (58). Nöronlarda nöroprotektif, kondrositlerde proliferatif ve in vivo antiapoptotik etkiler göstermesi preadipositlerde de farklılaşmayı ve lipid birikimini uyarıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca topiramate ilaç olarak alındığında daha sistemik ve kompleks etkiler gösterebilmektedir. Ancak in vitroda tek tip hücreler kullanılmış ve hücrelerin adipoz dokuda bulunan diğer hücrelerle, diğer dokudaki hücrelerle olan etkileşimi ve de ilacın diğer dokulardaki etkisi bertaraf edilmiş olduğundan sonuçların bu şekilde elde edilmiş olabileceği kanısına varılmıştır.

Farklılaşmaya olan etkinin belirlenmesini desteklemek amacıyla, hücre kültür sıvılarında adiponektin düzeyleri ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Adiponektin adipoz dokudan salınan, glukoz metabolizması ve yağ asidi oksidasyonu gibi metabolik yollarda düzenleyici rollere sahip protein yapısında bir adipokindir (59). Diğer hormonlara kıyasla dolaşımdaki miktarı oldukça fazla olan adiponektin düzeylerinin yetişkinlerde vücut yağ yüzdesi ile ters ilişkili olduğu bildirilmiştir (60). Ayrıca, kilo kaybı durumunun plazma düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı bilinmektedir (61). 6, 12 ve 24. saatlerde alınan örneklerdeki adiponektin düzeyleri incelendiğinde, adiponektin düzeyleri farklılaşmış hücrelerde farklılaşmayanlara göre 12 ve 24. saatlerde anlamlı artış göstermiştir ( $P<0.01$ ), ayrıca 24. saatte tüm konsantrasyonlarda 6 ve 12. saate göre anlamlı artış gözlenmiştir ( $P<0.001$ ). Bu bulgular topiramatin farklılaşmaya etkisi bulguları ile uyumluluk göstermektedir. Farklılaşıp adiposit karakteri kazanan hücreler, biyolojik özellikleri gereği, adipokin salgılamaya devam edecektir.

Hücre kültürü lizatlarından total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu ürünler ters transkriptaz yöntemi ile cDNA örneklerine dönüştürülmüştür. Gen ekspresyonu analizi için Real Time PCR işlemi Roche LightCycler 480 II cihazı ve SYBR Green floresans

sinyali ölçüm metodu kullanılmıştır. Topiramamat ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerde her örneğe ait karbonik anhidraz I, II, III, VA ve VB izoenzimlerinin gen ekspresyonları aynı örneğin  $\beta$ -aktin ekspresyonuna oranlanarak hesaplanmıştır. Farklılaşmamış hücreler ile farklılaşmış, ancak, topiramamat ile muamele edilmemiş hücreler karbonik anhidraz ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlara ait bar grafiği Şekil 12’de verilmiştir. Buna göre farklılaşma ile birlikte CA I, II, III, VA ve VB izoenzimlerinin ekspresyonlarında artış gözlenmekle beraber ( $P=0.0001$ ), en yüksek artış CA III izoenziminde izlenmiştir. CA III kas dokusunda ve adipoz dokuda ekspresyonu yüksek olan bir izoenzim olup, aktivitesi CA II’nin % 3’ü kadardır. Bu durum izoenzimin katalitik görevinden ziyade hücresel fonksiyonlarına dikkat çekmektedir. Adipogenez ile CA III ekspresyonunun indüklendiği bilinmektedir. Obez hallerde, yağ asidi biyosentezi artışına rağmen miktarının azalması substrat metabolizmasında rol alabileceğini düşündürmektedir. CA III’ün PPAR $\gamma$ 2 gen ekspresyonu düzeyinde adipogenez düzenlediği bilinmektedir. CA III’ün PPAR $\gamma$ 2 ekspresyonu üzerindeki negatif etkisi, CA III knock-out farelerde adipogenezin arttığı ve bunun PPAR $\gamma$ 2 ekspresyonundaki 1000 katlık artışa bağlandığı çalışma ile gösterilmiştir. CA III ekspresyonu adipogenez ile artmakta, ancak, terminal farklılaşma için gerekli olmayıp farklılaşmanın erken döneminde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (39).

CA II ekspresyonundaki artış, hücrelerin adipogenez için uyarılmış olmasına ve devamında adiposit fenotipi oluşturmak için, yüksek glukoz içerikli besi yeri ve insülinin suprafizyolojik konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu hücreler yağ damlacığı oluşturmak üzere lipogenez artıracaklarından, bu süreçte ihtiyaçları olan bikarbonat anyonunun tek kaynağı karbonik anhidraz enziminin olması ile açıklanabilir. CA II, aktivitesi yüksek bir izoenzim olup, hücre membranlarındaki taşıyıcılarla metabolonlar oluşturmaktadır (39). Hücreler aktif bir süreçte olduğundan bu tür metabolik olayların da devamı için ilgili proteinlerin ekspresyonlarının artması kaçınılmaz olmuştur.

CA I’in yağ doku ve diğer dokudaki fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber, adipogenez ile artan ekspresyonunun hücresel olaylarda fonksiyonlarının olabileceğini göstermektedir. CA VA ve VB mitokondriyal izoformlar oldukları için, ekspresyonlarının diğer izozimlere göre daha az artış göstermesinin normal olduğu ve



bu izoenzimlerin de mitokondrideki sentez yollarına bikarbonat kaynağı sağlamak üzere ekspresyonlarının arttığı sonucuna varılmıştır.

Farklılaşmış hücrelerde topiramatin karbonik anhidraz ekspresyonları üzerine etkisi incelendiğinde ise, farklılaşmayla beraber artmış bulunan CA I ekspresyonunun topiramat ile muamele edilen örneklerde uygulanmayanlara göre anlamlı şekilde düştüğü gözlenmiştir (P=0.0001). 1, 5, 10, 50 ve 100 µM TPM uygulanan hücrelerde CA I ekspresyonu anlamlı bir değişim göstermemiştir (P=1).

CA II ekspresyonu 1 ve 5 µM TPM ile beraber anlamlı şekilde düşmüş (P=0.0001), 10, 50 ve 100 µM TPM uygulanan örneklerde ise, 1 ve 5 µM TPM muamele edilen örneklere göre artmış bulunmuştur (P=0.0001) .

CA III ekspresyonuna etkiye bakıldığında, 1, 5 ve 10 µM TPM ile muamele edilen hücrelerde ekspresyon, uygulanmayan hücrelere göre artış göstermiştir. 50 ve 100 µM uygulanan hücrelerde ise CA III ekspresyonunun düştüğü gözlenmiştir (P=0.009).

CA VA ekspresyonu, 1, 5, 10 µM TPM uygulanan hücrelerde uygulanmayan hücrelere göre anlamlı bir değişim göstermezken 50 ve 100 µM için ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı artmış bulunmuştur (P=0.0001).

CA VB ekspresyon düzeyleri, 1 ve 5 µM TPM için anlamlı düşüş göstermiş (P<0.05), 10 µM için değişim anlamlı bulunmamıştır (P>0.05). 50 ve 100 µM TPM uygulanan hücrelerde ise CA VA' ya benzer şekilde anlamlı artış gözlenmiştir (P=0.0001).

Adipositler, fazla enerjinin triaçilgliseroller halinde depolanması ve ihtiyaç halinde bu moleküllerin hidrolizi için özelleşmiş olup, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde de önemli rolleri vardır. Obezitenin çağın sağlık sorunu haline gelmesi ve hayat kalitesini düşüren birçok hastalığa da sebep olması, bunun tedavisi için farklı alternatiflerin oluşturulmasını teşvik etmektedir (11). Başlangıçta bir yan etki olarak görülen ve mekanizması tam olarak açıklanamayan kilo düşürücü etkisi ile anti epileptik olarak kullanılan topiramat 2012 yılında FDA tarafından obezite tedavisi için onaylanmıştır. İlacın enerji metabolizması üzerine etkileri araştırılmış, ancak, net bir sonuca varılamamıştır. Obez Zucker ratlarda yapılan bir çalışmada anorektik

etkilerinin olduğu, Wistar ratlarda yapılan başka bir araştırmada termogenezi uyardığı gösterilmiş, ama mekanizma ortaya koyulamamıştır. Sprague-Dawley ratlarında yapılan çalışmada da plazma leptin düzeyleri üzerinde düşürücü etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Picard ve arkadaşları dolaşımdaki glukoz ve insülin seviyelerini düşürdüğünü göstererek enerji metabolizması üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (62,63). Topiramatin adipoz doku üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin karbonik anhidraz inhibisyonu ile ilişkisini inceleyen çalışmalar literatürde sınırlı olmakla beraber, CA gen ekspresyonu ile ilişkisi araştırılmamıştır. CA inhibisyonu Supuran ve ekibi tarafından oldukça fazla araştırılmış olup inhibisyonun mekanizması ve inhibitör dizaynları ile ilgili birçok çalışmaları bildirilmiştir (37).

CA II'nin osteoklastlarda farklılaşma ile ilişkili olduğu ve ekspresyonunun 1,25 (OH<sub>2</sub>) Vit D<sub>3</sub> ile indüklendiği gösterilmiştir (64). Eritroid hücrelerde tiroid hormonu ile indüklendiği, monosit ve makrofajlarda all trans retinoik asit ile ekspresyonunun artması, farklı hücre çeşitlerinde, farklı hormonal duyarlılığının olduğunu göstermektedir (65). Bu çalışmada 1 ve 5 µM ile düşen CA II ekspresyonu 10, 50 ve 100 µM ile tekrar bazal seviyelere yükselmektedir. Topiramatin adipogenezi uyarmasıyla beraber CA II ekspresyonu da indüklenmiş olabileceği veya inhibisyonla birlikte hücre bir telafi mekanizması oluşturmuş olabileceği düşünölmüştür. Adipogenez ile indüklenen CA III ekspresyonu, obez durumlarda yağ asidi biyosentezi artışına rağmen azaldığı bilinmektedir (39). Topiramatin ile indüklenen adipogenez, önce CA III ekspresyonunu artırmıştır. 50 ve 100 µM TPM uygulanan hücrelerde, hücrelerin lipid içeriğine paralel olarak CA III ekspresyonu daha düşük bulunmuş olması literatürle uyum göstermiştir. CA VA ve VB ekspresyonlarındaki değişim de CA II' ye benzer mekanizmayla açıklanabilir. Ancak ekspresyonun bazal seviyelere göre çok artış göstermesi olaya katkıda bulunan farklı faktörleri düşündürmektedir.

Sonuç olarak, farklılaştırma uygulanan 3T3-L1 hücrelerinde topiramatin adipogenezi uyardığı, CA I, II, III, VA ve VB ekspresyonlarının farklılaşmanın indüklenmesiyle arttığı bulunmuş ve topiramatin uygulanan hücrelerde, izoenzimlerin ekspresyon değişimlerinin farklılık gösterdiği bulunmuştur. Topiramatin yağ dokusu üzerindeki etkilerinin, adipositler üzerinden ziyade, başka faktörler aracılığıyla olabileceği kanısına varıldı. CA III ekspresyonundaki değişim literatür ile uyumlu

bulunurken, CA II, VA ve VB ekspresyonlardaki değişim hücrelerde bir telafi mekanizması olarak değerlendirildi.

## 8. KAYNAKLAR

1. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-56.
2. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? *Dig Dis Sci* 54(9):1847-56
3. Khan Md Y, Gubta P, Bihari B, Misra A, Pathak A, Verma VK (2012). A Review on Obesity and its Management. *Intl J of Sci & Eng Res* (3) :11.
4. Bays HE (2004). Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res* 12(8): 1197-211.
5. J. Novakofski (2004). Adipogenesis: Usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Anim Sci* 82: 905-915.
6. Supuran CT (2012). Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin Emerg Drugs* 17(1):11-5.
7. Supuran CT (2003). Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity. *Expert Opin Ther Patents* 13(10):1545-50.
8. Shin JH, Gadde KM (2013). Clinical utility of phentermine/topiramate (Qsymia™) combination for the treatment of obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* (8) 6: 131-9.
9. Mohammadi A, Leibfritz D (2009). Inhibitory effect of carbonic anhydrase inhibitors on the de novo lipogenesis. A study with <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 17.
10. Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39: 715-28.
11. Trayhurn P, Beattie JH (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 60: 329-39
12. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
13. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM (1987). *Science* 237: 402-405.
14. Hauner H (2005). Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 64: 163-169.

15. Scherer PE (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55: 1537-45.
16. Kiess W, Petzold S, Topfer M, Garten A, Blüher S, Kapellen T, Körner A, Kratzsch J (2008). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 22: 135-153.
17. Gregoire FM (2001) Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell. *Experimental Biology and Medicine* 226: 997-1002.
18. Billon N, Monteiro MC, Dani C (2008). Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question *Biol. Cell* 100: 563–575.
19. Ergün A (2005). Yağ Dokusu ve Yağ Hücreleri Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 25: 412-20.
20. Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ (2010). Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Experimental Biology and Medicine* 235: 1185-93.
21. Ntambi JM, Kim YC (2000). Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J. Nutr.* 130: 3122S-3126S.
22. Mentşe A (2011) Homosisteinin Yağ Dokusunda Okside LDL (oxLDL) Reseptör Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
23. Li H, Xiao L, wang C, Gao JL, Zhai YG (2010). Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 11: 784-791.
24. Pektaş M (2011) Preadipositlerde (3T3-L1) Estrojen ve Progesteronun Adipositokin Salınması ve Diferansiyasyon Üzerine Etkisi: Rhp/Rhp Kinaz Yoluğunun Olası Katkısı. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin.
25. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* 78: 3.
26. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 6: 483-95.
27. MacDougald OA, Lane M (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64: 345-73.

28. MacDougald OA, Mandrup S (2002). Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 13: 5-11.
29. Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD (1997). Adipocyte Differentiation and Leptin Expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 : 231–59.
30. Farmer SR (2006). Transcriptional Control of Adipocyte Formation. *Cell Metab* 4: 263–273.
31. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPAR-diagram.png> (2014).
32. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000). Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Genes Dev.* 14: 1293-1307.
33. Thiry A, Supuran CT, Maseree B, Dogné JM (2007). Recent Developments of Carbonic Anhydrase Inhibitors as Potential Anticancer Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 11.
34. Simone GD, Scozzafav A, Supuran CT (2009). Which Carbonic Anhydrases are Targeted by the Antiepileptic Sulfonamides and Sulfamates? *Chem Biol Drug Des* 274: 317–32.
35. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases-an overview. *Curr Pharm Des* 14: 603–614.
36. Supuran CT (2011). Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Mol Divers* 15: 305–316.
37. Supuran CT, Winum JY (2009). *Drug Design of Zinc Enzymes*. John Wiley & Sons, New Jersey (241-251)
38. Akyüz A (2008). Romatoid Artritli Hastalarda Karbonik Anhidraz Otoantikorları ve Antioksidan Enzimler Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
39. Frost SC, McKenna R (2014). Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Link to Disease, and Industrial Applications. Springer Dordrecht Heidelberg New York London (9-31, 291-325).
40. Alver A (2003). Sıçan Yağ Hücrelerinde Leptin Hormonu İle Karbonik Anhidraz III İzoenzimi Arasındaki Etkileşmenin İn Vitro İncelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

41. Mitterberger MC, Kim G, Rostek U, Levine RL, Zwerschke W (2012) Carbonic anhydrase III regulates peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2. *Exp Cell Res* 318: 877-86.
42. De Simone G, Di Fiore A, Supuran CT (2008). Are Carbonic Anhydrase Inhibitors Suitable for Obtaining Antiobesity Drugs ? *Current Pharmaceutical Design* 14: 655-660.
43. Gordon A, Price LH (1999). Mood stabilization and weight loss with topiramate. *Am J Psychiatry* 156(6):968-9.
44. De Simone G, Supuran CT (2007). Antiobesity Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7(9):879-84.
45. Munari, C.C., Alves J., Bastos JK, Tavares DC, Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by vomet assay. *Journal of applied toxicology*;30 (1):22-8, 2010.
46. Li X, Ycaza J, Blumberg B (2011) The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 127: 9– 15.
47. Pan PW, Rodriguez A, Parkkila S (2007). A systematic quantification of carbonic anhydrase transcripts in the mouse digestive system. *BMC Mol Biol* 8: 22.
48. Drira R, Chen S, Sakamoto K (2011). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sci* 89: 708-16.
49. Moradi S, Kerman SR, Mollabashi M (2013). The effect of topiramate on weight loss in patients with type 2 diabetes. *J Res Med Sci.* 18: 297-302.
50. Verrotti A, Scaparrotta A, Agostinelli S, Di Pillo S, Chiarelli F, Grosso S (2011). Topiramate-induced weight loss: a review. *Epilepsy Res* 95: 189-99.
51. Ntambi JM, Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
52. Gamou S, Shimizu Y (1990). Adipocytes. *method Mol Biol.*, 5: 197-207.
53. Angehagen M, Ben-Menachem E, Rönnbäck L, Hansson E (2003). Topiramate protects against glutamate- and kainate-induced neurotoxicity in primary neuronal-astroglial cultures. *Epilepsy Res* 54: 63-71.

54. Gensel JC, Tovar CA, Bresnahan JC, Beattie MS (2012). Topiramate treatment is neuroprotective and reduces oligodendrocyte loss after cervical spinal cord injury. *PLoS One*. 7: e33519.
55. Lee HS, Wang SY, Salter DM, Wang CC, Chen SJ, Fan HC (2013). The impact of the use of antiepileptic drugs on the growth of children. *BMC Pediatr* 13: 211.
56. Ozyener F, Çetinkaya M, Alkan T, Gören B, Kafa IM, Kurt MA, Koksal N (2012). Neuroprotective effects of melatonin administered alone or in combination with topiramate in neonatal hypoxic-ischemic rat model. *Restor Neurol Neurosci* 30: 435-44.
57. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, Bauer R (2005). Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res* 1058: 129-36.
58. Park HJ, Kim HJ, Park HJ, Ra J, Zheng LT, Yim SV, Chung JH (2008). Protective effect of topiramate on kainic acid-induced cell death in mice hippocampus. *Epilepsia* 49: 163-7.
59. Coppola A, Marfella R, Coppola L, Tagliamonte E, Fontana D, Liguori E, Cirillo T, Cafiero M, Natale S, Astarita C (2009). Effect of weight loss on coronary circulation and adiponectin levels in obese women. *Int J Cardiol* 134: 414-6.
60. Ukkola O, Santaniemi M (2002). Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med (Berl)* 80: 696-702.
61. <http://en.wikipedia.org/wiki/Adiponectin> accessed on 13 Feb 2014.
62. Richard D, Ferland J, Lalonde J, Samson P, Deshaies Y (2000). Influence of topiramate in the regulation of energy balance. *Nutrition* 16: 961-6.
63. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Richard D (2000). Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res* 8: 656-63.
64. Lomri A, Baron R (1992).  $1,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates the transcription of carbonic anhydrase II mRNA in avian myelomonocytes. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 89: 4688-92.



- 65.** Que 'lo I, Jurdic P (2000). Differential Regulation of the Carbonic Anhydrase II Gene Expression by Hormonal Nuclear Receptors in Monocytic Cells: Identification of the Retinoic Acid Response Element. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271: 481– 491

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** Ayşegül SÜMER  
**Doğum Tarihi** 4 .11.1980  
**Telefon** 0 462 377 78 89  
**Medeni Hali** Evli  
**E-posta** uzunaysegul@yahoo.com  
**Adres** KTU SABE, Tıbbi Biyokimya AD,  
Trabzon

<b>Derece</b>	<b>Bölüm/Program</b>	<b>Üniversite</b>	<b>Yıl</b>
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2000-2004
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2005-2007
Doktora	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2007- 2014

<b>Görev, Unvan</b>	<b>Görev Yeri</b>	<b>Yıl</b>
Arş. Gör.	KTU ,SABE, Tıbbi Biyokimya AD	2005-2013

**Yabancı Dil:** İngilizce

**Uzmanlık Alanı:** Hücre kültürü, Karbonik Anhidraz, Oksidatif Stres.

## YAYINLAR

1. Mentese A, Fidan E, **Sumer AU**, Karahan SC, Sonmez M, Altay DU, Kavgaci H, Alver A. (2012) Is SCUBE 1 a new biomarker for gastric cancer? *Cancer Biomark.*;11(5):191-5
2. Kaynar K, Ersoz S, Aliyazicioglu R, **Uzun A**, Ulusoy S, Al S, Ozkan G, Cansız M. (2012) "Is there any way to protect from tacrolimus-induced renal and pancreas injury?" *Clin Transplant.*; 26(5):722-8,
3. Kaya S, Köksal I, Mentese A, Sönmez M, **Sümer A**, Yıldırım SS, Yılmaz G. (2013). "The significance of serum urokinase plasminogen activation receptor (suPAR) in the diagnosis and follow-up of febrile neutropenic patients with hematologic malignancies" *Int J Infect Dis.* . [Epub ahead of print]
4. Ozsu S, Abul Y, Mentese A, Bektas H, **Uzun A**, Ozlu T, Porcel JM. (2013) "Pentraxin-3: A novel biomarker for discriminating parapneumon from other exudative effusions." *Respirology.*(ISI) doi:10.1111/resp.12038, .
5. Mentese A, Yılmaz G, **Sümer A**, Arslan M, Karahan SC, Köksal I. (2013). "The diagnostic and prognostic significance of SCUBE1 levels in Crimean-Cong hemorrhagic fever." *Int J Infect Dis.* [Epub ahead of print]
6. Abul Y, Ozsu S, Mentese A, Durmus I, Bektas H, Pehlivanlar M, Turan OE, **Sumer A**, Orem A, Ozlu T. (2013) "Carbonic Anhydrase IX in the Prediction of Right Ventricular Dysfunction in Patients With Hemodynamically Stable Acute Pulmonary Embolism." *Clin Appl Thromb Hemost.* [Epub ahead of print]
7. Mentese A, Köksal I, **Sumer AU**, Arslan M, Karahan SC, Yılmaz G. . (2013) Diagnostic and prognostic value of Ischemia-modified albumin in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever." *J Med Virol.* ;85(4):684-8.
8. Turkmen S, Mentese S, Mentese A, **Sumer AU**, Saglam K, Yulug E, Turedi S, Gunduz A. (2013) "The value of signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein 1 and oxidative stress parameters in the diagnosis of acute mesenteric ischemia." *Acad Emerg Med.*;20(3):257-64

- 9.** Alver A, Imamođlu M, Mentese A, Sentürk A, Bülbül SS, Kahraman C, **Sümer A.** (2013) “Malondialdehyde and CA II autoantibody levels are elevated in children with undescended testes”, World J Urol. [Epub ahead of print]
- 10.** Kaya S, Köksal I, Mentese A, Sönmez M, **Sümer A,** Yıldırım SS, Yılmaz G. (2013)., “The significance of serum urokinase plasminogen activation receptor (suPAR) in the diagnosis and follow-up of febrile neutropenic patients with hematologic malignancies.” Int J Infect Dis. [Epub ahead of print]
- 11.** Turk A, Aykut M, Akyol N, Kola M, Mentese A, **Sumer A,** Alver A, Erdol H. (2013)., “Serum Anti-carbonic Anhydrase Antibodies and Oxidant-Antioxidant Balance in Patients with Acute Anterior Uveitis.” Ocul Immunol Inflamm. [Epub ahead of print]
- 12.** Durmus A, Mentese A, Yılmaz M, Sumer A, Akalin I, Topal C, Alver A., “Increased oxidative stress in patients with essential thrombocythemia.” Eur Rev Med Pharmacol Sci.;17(21):2860-6 (2013).