



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI GELİŞİM EVRELERİNDEKİ YAĞ HÜCRELERİNDE NİBAN
GENİNİN ANTIAPOPTOTİK VE LİPOGENİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP ÇEVİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN

İSTANBUL, 2016



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**INVESTIGATION OF ANTIAPOPTOTIC AND LIPOGENIC EFFECTS OF
NIBAN GENE ON DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES OF ADIPOCYTES**

MEHTAP CEVİK

MASTER THESIS

Department of Biology

ADVISOR

Prof. Dr. Belgin SUSLEYİCİ DUMAN

ISTANBUL, 2016

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Mehtap ÇEVİK'in "Farklı Gelişim Evrelerindeki Yağ Hücrelerinde Niban Geninin Antiapoptotik ve Lipogenik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması, 22 Nisan 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN (Danışman)

Marmara Üniversitesi

(İMZA)

Prof. Dr. İlhan ONARAN (Üye)

İstanbul Üniversitesi

(İMZA)

Doç. Dr. Filiz VARDAR (Üye)

Marmara Üniversitesi

(İMZA)

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.05.2016 tarih ve 2016/12.02 sayılı kararı ile Mehtap ÇEVİK'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAHSI

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, maddi ve manevi olarak karşıma çıkan sorunlarımda çözümcü yaklaşımları ve mücadeleci tavrı ile bana örnek olan, yaptığım ve yapmakta olduğum tüm bilimsel çalışmalarda bana çok sayıda fırsatlar sunan, bilim insanı olma yolunda bana her daim sabırla destek olan kıymetli Hocam Sayın Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince sahip olduğru bilgi, tecrübe ve dostluğunu benden esirgemeyen, sabır ve anlayışla her daim bana destek olan Dr. Meliha KOLDEMİR GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Son olarakta, yaşamımın her anında, maddi ve manevi fedakarlıklarda bulunup beni yetiştiren, beni güçlü kılan başta Annem ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2016

Mehtap ÇEVİK

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER	viii
KISALTMALAR	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.1. Metabolik Sendrom	1
1.1.2. Obezite	1
1.1.3. Beyaz Adipoz Doku ve Adipogenez	2
1.1.4. Endoplazmik Retikulum Stresi	5
1.1.5. Niban Geni	6
1.1.6. Niban ve Apoptoz İlişkisi	7
1.1.6.1. MDM2-Niban	7
1.1.6.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Niban Geni İlişkisi	8
1.1.7. Kanser ve Niban İlişkisi	9
1.1.8. Gerçek Zamanlı Hücre Monitorizasyon Sistemi: iCELLigence	10
2. MATERYAL ve YÖNTEM	12
2.1. Materyal	12
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	13
2.2. Yöntem	14
2.2.1. Hücre kültürü	14
2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	15
2.2.3. 3T3-L1 Fibroblast Hücrelerinin Adiposit Hücrelerine Dönüştürülmesi	16
2.2.4. 3T3-L1 Fibroblastlarının Adiposit Hücrelerine	

Dönüşümünün Saptanması	18
2.2.5. iCELLigence Gerçek Zamanlı Monitorizasyon Sistemi Kullanılarak Hücre Sayısının Optimizasyonu	18
2.2.6. iCELLigence Sisteminde 3T3-L1 Adiposit Hücrelerine Linoleik Asit ve Stearik Asit Uygulamaları	22
2.2.7. iCELLigence Sisteminde Adiposit Hücrelerine Hidrojen Peroksit ve Etanol Uygulamaları	22
2.2.8. iCELLigence Sisteminde IC50 Değerlerinin Belirlenmesi	23
2.2.9. 3T3-L1 Adiposit Hücrelerine Linoleik Asit, Stearik Asit, Hidrojen Peroksit ve Etanol Uygulaması	23
2.2.10. Adipogenik Süreçte Niban Gen Anlatımındaki Değişimlerin Belirlenmesi	23
2.2.11. Total RNA İzolasyonu	24
2.2.12. Total RNA'dan cDNA Sentezi	25
2.2.13. Kantitatif Polimeraz Zincir (qPCR) Analizi	25
2.2.14. İstatistiksel Analizler	26
3. BULGULAR veTARTIŞMA	27
3.1. Hidrojen Peroksitin 3T3-L1 Adipositlerin Çoğalması Üzerine Etkileri	27
3.2. Linoleik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri	29
3.3. Stearik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri	30
3.4. Etanol'ün 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri	31
3.5. Farklı Dozlara H ₂ O ₂ , Linoleik Asit, Etanol ve Stearik Asit Uygulaması Yapılan 3T3-L1 Adipositlerinde Niban Gen Anlatımı	33
3.6. Tartışma	35
4. SONUÇLAR	43
KAYNAKLAR	45
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

FARKLI GELİŞİM EVRELERİNDEKİ YAĞ HÜCRELERİNDE NİBAN GENİNİN ANTIAPOPTOTİK VE LİPOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gerçek zamanlı hücre monitorizasyon sistemi kullanılarak olgun adipositlerin birtakım stres koşullarını tetiklediği bilinen linoleik asit (LA), stearik asit (SA), etanol ve hidrojen peroksitin farklı dozlarına cevap olarak proliferasyonları incelenmiştir. Bu proliferasyon eğrilerinden faydalanılarak IC50 değerleri tespit edilmiştir. 50, 100, 250, 300, 400, 600, 800 ve 1000 µM hidrojen peroksitin (H₂O₂) olgun adipositler üzerine olan etkisi 130 saat boyunca gözlemlendi. 1 mM ve 800 µM hidrojen peroksitin 3T3-L1 adipositleri üzerine letal etkili olduğu saptandı.

600, 400 ve 200 µM linoleik asit uygulamasının adiposit proliferasyonuna olan etkisi yaklaşık 120 saat boyunca incelendi ve kontrol grubuna göre 600 µM linoleik asitin adipositler üzerine letal etkili; diğer dozların ise antiproliferatif etkili olduğu saptandı. 250, 150, 100 ve 50 mM etanolün olgun adipositlerin proliferasyonu üzerine olan etkileri yaklaşık 190 saat boyunca incelendi. Uygulanan tüm dozların kontrole göre antiproliferatif etkili olduğu tespit edildi. Bu çalışmalar sonrası proliferasyon verilerine dayanarak her bir ajan için belirli saatlerdeki IC50 değerleri tespit edildi. Bu değerler belirli süreler boyunca hücrelere uygulandıktan sonra hücrelerden Total RNA izolasyonu yapılarak Niban genine ait gerçek zamanlı qPCR (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışması yapıldı.

4 saat 300, 5 saat 600 ve 800, 24 saat 600 ve 800 µM hidrojen peroksit uygulaması; 4 saat 50 mM stearik asit ve 24 saat 90 mM etanol uygulamalar sonucu Niban gen anlatımı kontrole göre azaltmış bulunmuştur. 24 saat 480 µM linoleik asit uygulaması ise Niban gen anlatımını kontrole göre arttırmıştır. Ayrıca adipositlerdeki apoptozun inhibisyonun obezite ile ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanımının yeni bir terapötik strateji olabileceği hipotezinden yola çıkarak Niban geninin adipogenik ve lipogenik süreçteki rolünün ortaya konulması amacıyla henüz yeni farklılaşmış ancak yağ birikimi çok az olan pre-adipositler ile uzun süre kültüre edilmiş ve aşırı yağ birikimi gözlemlenen olgun adipositlerde Niban gen anlatımı karşılaştırmalı olarak

alışılmıştır. Sonuç olarak olgun adipositlerdeki Niban gen anlatımı kontrole göre çok yüksek; pre-adipositlerdeki ise kontrole göre düşük bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Niban Geni, 3T3-L1 Adiposit, Obezite, iCELLigence, Gerçek Zamanlı PZR

Nisan 2016

Mehtap ÇEVİK



ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIAPOPTOTIC AND LIPOGENIC EFFECTS OF NIBAN GENE ON DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES OF ADIPOCYTES

By using real-time monitoring system, as a response to different doses of some stress triggering substances such as linoleic acid (LA), stearic acid (SA), ethanol and hydrogen peroxide, the proliferations of mature adipocytes were examined. IC₅₀ values were determined by utilizing the proliferation curves. 50, 100, 250, 300, 400, 600, 800 and 1000 μ M of hydrogen peroxide concentrations were observed on mature adipocytes for 130 hours. 1 mM ve 800 μ M hydrogen peroxide was found to have lethal effect on 3T3-L1 adipocytes.

600, 400 and 200 μ M linoleic acid application was examined for about 120 hours and 600 μ M linoleic acid was found to have lethal effect compared to controls; whereas other doses were found to have antiproliferative effect. 250, 150, 100 and 50 mM ethanol effects were examined for about 180 hours for the proliferation of mature adipocytes. All doses administered were found have antiproliferative effect compared to controls. These IC₅₀ values of each agent for certain times after operation data based on their proliferation were observed. After applying these doses over the cells for certain periods total RNA was isolated from cells, and qPCR was for NIBAN gene was performed.

The NIBAN gene expression levels were found to be decreased compared to controls in 4 hours, 300, 600 and 800 for 5 h, 24 h 600 and 800 mm the hydrogen peroxide treatment; 4 hours 24 hours 90 mm 50 mm stearic acid and ethanol administered cells. The 24-hour 480 μ M linoleic acid administration was found to increase Niban gene expression compared to control. Also starting from the hypothesis that a new therapeutic strategy for use in the treatment of diseases associated with obesity, inhibition of apoptosis in adipocytes Niban to reveal the role adipogenic and the lipogenic process of gene order has not differentiated new but fat accumulation with little pre-adipocytes has been a long time culture and excessive fat accumulation observed narrative Niban genes in mature adipocytes were studied comparatively. As a

result, Niban gene expression was found to be higher in mature adipocytes, and lower in preadipocytes compared to control.

Anahtar Kelimeler: Niban Geni, 3T3-L1 Adiposit, Obezite, iCELLigence, Gerçek Zamanlı PZR

Key Words: Niban Gene, 3T3-L1 Adipocyte, Obesity, iCELLigence, Real Time PCR

April 2016

Mehtap CEVIK



SEMBOLLER

%	: Yüzde
°C	:Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µM	: MikroMolar
µl	: Mikrolitre
β	: Beta
α	:Alfa
cm²	: Santimetrekare
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
mM	: Mili Molar
mmol	: Mili Mol
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
rpm	: Dakikada dönme hızı
R_n	: Kuyucuklarda hücre varlığındaki hücre-elektrot empedansı
R_b	:Kuyucuklarda hücre olmadığında medyuma ait arka plan empedansı
S	: Sedimentasyon Katsayısı

KISALTMALAR

3T3-L1	: Mus musculus embriyolarından elde edilen fibroblast hücre soyu
ADP	: Adenozin diFosfat
AKT	: Protein Kinaz B
ATTC	: American Type Culture Collection
ATF-6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
ATF-4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
Bcl-2	: β -cell lymphoma 2
BiP	: İmmunoglobulin Bağlayıcı Protein
C9T11 KLA	: Konjuge Lineloik Asitin Cis-9, Trans-11 İzomeri
CAL-27	: İnsan Skuamöz Hücreleri
Cq	: Kantitatif Döngüsü
CHAC 1	: ChaC glutasyon-spezifik gama-glutamilsiklotransferaz 1
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
eIF2α	: Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü alfa
ER	: Endoplazmik Retikulum
FAM129A	: 129A Gen Ailesi
FBS	: Fetal Bovin Serum
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
HMC-1	: İnsan Mast Hücre Soyu
HT1080	: Sarkoma Hücre Hattı
HuMC	: İnsan Periferik Kan Türevli Mast Hücreleri
IC50	: The half maximal inhibitory concentration
IRE-1	: İnositol-Gerektiren Enzim 1
KLA	: Konjuge Lineloik Asit
LA	: Lineloik Asit
L929	: Murin Fibroblast Hücreleri
LK9d(L)	: Renal Karsinom Hücre Hattı

LNCaP	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
mRNA	: mesajcı RNA
MDM2	: Murine Double Munit 2
MDM4	: Murine Double Munit 4
MDMX	: Murine Double Munit X
MSC	: Mezenkimal Stromal Hücreler
mBMMC	: Fare Kemik İliği Türevli Mast Hücreleri
NPM	: Nükleofosmin
Ob/ob	: Obez Fare
PBS	: Phosphate-buffered saline
PC3	: Prostat Kanseri Hücre Hattı
PERK	: Çift Zincirli RNA Bağımlı Protein Kinaz Benzeri-ER Kinaz
SA	: Stearik Asit
qPZR	: quantatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
siRNA	: Small İnterfering Ribonükleik Asit
T10c12	: Konjuge Lineloik Asitin Trans10,Cis-12 İzomeri
T2D	: Tip 2 Diyabet
TNF	: Tümör nekroz faktör
TSC2	: Tuberoskleroz 2 Geni
UPR	:Katlanmamış Protein Cevabı
UV	: Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFALAR

- Şekil 1.1** AKT bağımlı Niban fosforilasyonu tarafından düzenlenen antiapoptotik yolak. **8**
- Şekil 1.2** iCELLigence gerçek zamanlı hücre monitorizasyon sisteminin çalışma prensibi. **11**
- Şekil 2.1** Hücre kültürü ile ilgili tüm deneylerin yapıldığı kabinin çalışma öncesi sterilizasyonu. **14**
- Şekil 2.2** Hücrelerin flasklara ekilmesi. **15**
- Şekil 2.3** Besiyerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler. A) High Glucose DMEM, B) New Born Calf Serum, C) Amfoterisin B Solüsyonu, D) Penisillin-Streptomisin Solüsyonu. **15**
- Şekil 2.4** Hücrelerin zeminden kaldırılması ve hücrelerarası bağlantıların koparılması için kullanılan malzemeler. A) Tripsin-EDTA B) PBS. **16**
- Şekil 2.5** 3T3-L1 adiposit gelişimlerinin inverted mikroskopda incelenmesi. **17**
- Şekil 2.6** 3T3-L1 fibroblastlarının pre-adipositlere dönüşümü. A) Dönüşüm öncesi fibroblastlar (10X), B-C) Dönüşüm sırasında fibroblast-preadiposit hücreleri (10X), D) Olgun adipositler (40X). **17**
- Şekil 2.7** A) Oil-Red O ile boyanan adipositler, B) Oil Red O boyası. **18**
- Şekil 2.8** A) iCELLigence sisteminin kurulması ve optimizasyonu. B-C) Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra E-platelerin CO2 kabin içinde yerleştirilmiş cihaza yüklenmesi. **20**
- Şekil 2.9** A-B) iCELLigence sisteminde 120 saatlik kültür sonrası hücre dilüsyonlarına ait proliferasyon eğrileri. **21**
- Şekil 2.10** iCELLigence sisteminde 120 saatlik kültür sonrası kontrole göre en iyi proliferere olan hücre dilüsyonu. **22**
- Şekil 2.11** Yağ birikimi gözlemlenen olgun adipositler (40X). **24**

Şekil 2.12 qPZR deneyleri sonucu NİBAN ve GAPDH genlerine ait Ct ve katlanma indüksiyon değerleri.	26
Şekil 3.1 Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 250, 1000 μM H_2O_2 uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.	27
Şekil 3.2 Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 300, 400, 600, 800 μM H_2O_2 uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.	28
Şekil 3.3 24 saat H_2O_2 uygulaması için IC50 değeri.	28
Şekil 3.4 Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 200, 400, 600 μM linoleik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.	29
Şekil 3.5 24 saat linoleik asit uygulaması için IC50 değeri.	30
Şekil 3.6 Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 500, 750, 1000, 1500 μM stearik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.	31
Şekil 3.7 Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 150, 250 mM etanol uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.	32
Şekil 3.8 24 saat etanol uygulaması için IC50 değeri.	32
Şekil 3.9 Farklı dozlarda H_2O_2 , etanol, linoleik asit ve stearik asit uygulamaları sonucu Niban gen anlatımında kontrole göre meydana gelen değişimler.	34

TABLO LİSTESİ**SAYFALAR**

Tablo 3.1 qPZR analizi ile elde edilen Niban ve GAPDH genlerine ait Ct değerleri. 33



1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Metabolik Sendrom

İnsan hayatını olumsuz yönde etkileyip mortaliteye sebep olan temel unsurlardan olan obezite; insülin direnci, tip 2 diyabet (T2D), dislipidemi, hipertansiyon ve kardiovasküler hastalık gibi bir dizi metabolik hastalığın da dahil olduğu patolojilerle birlikte metabolik sendrom olarak tanımlanmaktadır [1-3]. Metabolik sendrom, obezitenin yaygınlık oranındaki artış ile beraber seyrederek ve dünyanın bir çok bölgesinde obezitenin görülme sıklığındaki artış, metabolik sendrom komponentlerinden özellikle insülin direnci ve tip 2 diyabetin ortaya çıkmasına katkıda bulunur [2,3]. Metabolik sendrom komponentlerinin moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılmış değildir [3]. Son yıllarda metabolik sendrom sıklığındaki artışın daha çok obezite ve tip 2 diyabete bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir [4].

1.1.2. Obezite

Obezite, adipoz dokuda aşırı yağ birikimi ile karakterize edilen ve lipid metabolizması hastalıkları, hipertansiyon, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalıklarının yanı sıra insülin direnci, tip 2 diyabet, kalp damar hastalıkları ve kanser gibi metabolizma ile ilişkili hastalıklara yol açan kronik ve inflamasyonla beraber seyreden bir hastalıktır [5-7]. Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, obezitenin hücrelerdeki stres sinyalleri ve inflamasyon yollarıyla ilişkili olduğunu gösterse de [8-11], bu stresin kaynağı tam olarak aydınlatılamamıştır. Obezitenin mekanik stres, aşırı lipid birikimi, hücreler arası enerji değişimindeki bozukluklar ve besine erişebilirlik ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [3]. Obez bireylerin adipoz dokularında oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve hipoksi gibi stres koşulları mevcuttur [3,12,13]. Ob/ob diyabetli farelerin adipoz doku ve karaciğerlerinde, fosforile edilmiş Çift Zincirli RNA Bağımlı Protein Kinaz Benzeri-ER Kinaz (PERK),

immunoglobulin bağlayıcı protein (BiP) ve fosforile edilmiş ökaryotik translasyon başlatma faktörü (eIF2 α) gibi ER stres belirteçlerinin moleküler seviyede mekanizmalarını açığa çıkarmak için yapılan çalışmalarda obezite ile artan serbest yağ asitlerinin özellikle adiposit ve diğer hücrelerde ER stresini uyarıcı potansiyeli olduğu rapor edilmiştir [3,14,15].

Obezite sıklığının tüm dünyada artmasına rağmen, obezite ve obezite ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılan mevcut terapötik seçenekler sınırlı ve etkisiz kalmaktadır [6]. Bu nedenle obezite gelişimindeki moleküler mekanizmaları anlamak obezite tedavisinde başarı elde etmek için kritik öneme sahiptir. Obezitede adipositlerde gözlenen apoptozun, insanlarda adipoz doku, insülin direnci ve hepatik steatozda makrofaj infiltrasyonunun başlamasına katkıda bulunduğunun ortaya konması, adipositlerde apoptozun baskılanmasının metabolik komplikasyonlara bağlı olarak obezitenin tedavisinde yeni bir yöntem olabileceği savını ortaya çıkarmaktadır [16].

Obez insan ve farelerde yapılan deneyler sonucu elde edilen verilerde, bireylerin yağ dokusunda adiposit ölümlerinin tespit edildiği rapor edilse de [16], henüz tip 2 diyabet, insülin direnci, inflamasyon aracılı obezite gibi metabolik hastalıklarda apoptozun hangi şartlara cevap olarak oluştuğu bilinmemektedir. Alkhouri N. ve ark.'larının [16] insan ve farelere ait adipoz dokuda yaptıkları çalışma sonucunda, adiposit apoptozunun obez farelerde ve insanlarda arttığı verilerine ulaşılmıştır.

1.1.3. Beyaz Adipoz Doku ve Adipogenez

Beyaz adipoz doku enerji tüketimi ve yağ asitlerinin salınımı sırasında trigliseritlerin depolanmasında ve enerji metabolizmasını kontrol ederek metabolik olaylarda aktif rol alır. Adipositler genel olarak endokrin, parakrin ve otokrin sinyaller ile diğer yağ hücrelerinin ve bazı hücrelerin metabolizmalarını düzenlerler [17]. Adipoz dokunun metabolizma üzerine 3 temel etkisi bilinmektedir. Şöyle ki, adipoz doku lipid metabolizmasında yağ asidi salınımında ve trigliserit depolanmasında görev yaparak rol alır; karaciğer ve diğer dokularda glikoz metabolizmasında trigliseritleri katabolize

ederek gliserol ve yağ asidi salınımına yol açar ve son olarak spesifik biyolojik fonksiyonları bulunan hormon, adipokinler ve diğer bazı proteinlerin sentezlenmesinden sorumludurlar [18]. Adipositlerden salınan bu moleküller metabolizmanın, enerji ve yağ depolanmasının düzenlenmesinde rol alırlar. Tüm bu etkilerinden dolayı adipoz doku adipositlerin büyümesi ve enerji hemostazı gibi fizyolojik süreçlerin gelişiminde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca adipoz doku ve adipositler, anjiyogenez, adipogenez, ekstrasellüler matriks çözünmesi ve yeniden şekillenme gibi metabolik süreçlerde aktif olarak rol alırlar [19]. Bireylerin vücut ağırlığında bir artış meydana geldiğinde adiposit çapında büyüme gözlenir, mevcut kontrol mekanizmaları bozulur, adipoz dokuda makrofaj birikimi başlar ve inflamasyon ortaya çıkar. Adipositlerdeki serbest yağ asidi depolanmasında ve oksidasyonunda görev alan düzenleyici moleküller ve çevresel faktörler yağ metabolizması hemostazında rol alır. Yapılan bir çalışmada obezitenin oksidatif stresi indüklediği ve yağ birikimi ile artan oksidatif stresinde adipokinlerin degradasyonuna ve metabolik sendromun gelişmesine kısmen aracılık ettiği rapor edilmiştir [13].

Enerji alımının enerji harcanımını geçtiği durumlarda fazla enerji trigliseritler şeklinde adipositlerde depolanır. Adiposit farklılaşması ve lipogenezini düzenleyen moleküler mekanizmalar yağ hücrelerinde enerji dengesinin kontrolünde anahtar rol oynar [20]. Adipositlerdeki lipid depolama kapasitesi adipoz dokunun büyümesi ile dengelenmiştir. Bu sebeple adipoz dokuda hiperplazi ve hipertrofi görülebilir [21]. Adipoz dokunun artmasında hiperplazinin rolü büyüktür. Aşırı miktarda artan adipoz doku kütlesi adiposit boyutu, sayısı ya da her ikisi sonucuda ortaya çıkabilir. Adipositler yapılarında depolanmış olan trigliserit miktarına bağlı olarak çok çeşitli büyüklüklerde olabilirler. Hafif şişmanlık durumlarında (hipertrofik obezite) fazla yağ birikimine bağlı olarak adipositlerin boyutlarında artış gözlemlenir. Ancak çocukluk çağı ve diğer obezite tiplerinde ise adipositlerin sayısında da artış gözlemlenir (hiperplastik obezite). Hipertrofik adipositler çevrelerinde bulunan pre-adipositlerin dönüşümünü uyararak lipid depolama kapasitesinin yükselmesine yol açan yağ asidi salınımına sebep olurlar [22]. Obez bireylerin adipositlerinde büyüme ile birlikte adipoz dokularında sistemik metabolizmayı etkileyen moleküler ve hücrel değişimler bulunur. Obezitede artış ile birlikte adipositlerden bazı proinflamator

moleküllerin sentezlendiği ve obezite ile ilişkili hastalıkların gelişimine aracılık ettiği bilinmektedir [23]. Adipogenez birçok molekülün etkileşimi ile gerçekleşen bir farklılaşma sürecidir [24]. Adipogenezde adipositler öncül hücrelerden farklılaşma ile oluşurlar [25]. Fonksiyonel anlamda hücre farklılaşması fenotip üzerine etkili gen anlatım patern değişimleri olarak tanımlanabilir. Hücrelerin şekli ve adipogenez ile ortaya çıkan lipid birikimi gibi morfolojik değişimler hücre farklılaşmasını uyaran genlerin aktiviteleri sonucu oluşur. Dolayısıyla farklılaşma süreçleri transkripsiyon faktörlerinin anlatımında ve aktivitelerindeki değişimler ile ortaya çıkar [26]. Tüm organizmalarda pre-adipositlerin farklılaşma yetenekleri mevcut olup vücudun enerji durumuna ve yağ depolama ihtiyacına bağlı olarak değişim gösterir. Literatürde adiposit gelişimini incelemek amacıyla yapılmış olan çalışmalarda kullanılan 2 farklı hücre hattından biri miyosit, kondrosit ve fibroblast kaynaklı pluripotent fibroblastlar, diğeri ise sadece olgun adipositlerin oluşumuna izin veren unipotent 3T3-L1 hücre hatlarıdır [27,28]. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasının baskılanmasında, farklılaşma süreçlerinin başlatılmasında ve dönüşüm süreçlerinde birçok protein rol alır [29,30]. 3T3-L1 hücrelerinin maksimum farklılaşması için büyüme ortamında insulin, deksametazon ve izometil-bütül ksantinden oluşan bir karışım gereklidir. Bu moleküllerle 5-7 günlük muameleden sonra adipositler yuvarlak bir form kazanırlar ve lipoliz ve lipogenezde rol alan enzimleri yapılarında bulundurmaya başlarlar [31].

Lipogenez karbonhidratlardan ve diğer dietle alınan enerji kaynaklarından esrterleşmiş yağ asitlerinin trigliserit olarak sentezi olarak tanımlanır. Sıçanlarda lipogenez karaciğerde ve beyaz adipoz dokuda meydana gelir [32]. Lipid sentezi tokluk evresinde ve karbonhidrat tüketiminden sonra artış gösterir ve açlık koşullarında inhibe edilir [33]. Adipoz dokudaki lipid birikimi dolaşımdaki yağ asidi alımına bağlı olarak değişiklik gösterir [34]. Yağ asitleri şilomikronlardaki trigliseritlerin lipoprotein lipaz aracılı enzimatik yıkımı sonucu ortaya çıkarlar. Yağ asitleri adipositlere alındıktan sonra tekrar trigliseritler halinde depo edilirler [35].

1.1.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

Hücrel strese bağlı olarak endoplazmik retikulum (ER) fonksiyonlarının çeşitli koşullar altında bozulması sonucu protein katlanmalarında sorunlar ortaya çıkarak, katlanmış ya da yanlış katlanmış proteinler ER lümeninde birikebilir. ER dengesinin bozulmasıyla sonuçlanan bu süreç, ER stresi olarak adlandırılır [36,37]. Kalsiyum dengesi, glikozilasyon inhibitörleri ve hücre içindeki doğru katlanmamış proteinlerin birikimi ER stresine neden olabilir [38]. ER stresi, ER'nin protein katlanma kapasitesini azaltarak hatalı proteinlerin birikimine yol açar [39]. ER stresini tetikleyen durumlar arasında glikoz veya besin yetersizliği, viral enfeksiyonlar, yağlar, salgı proteinlerinin miktarında artış ve yanlış katlanmış proteinlerin varlığı gibi koşullar mevcut olup bu koşullardan bazıları obezitenin oluşmasından sorumlu tutulmaktadır [40-42].

Hücrelerde toksik etkiye sebep olan ER stresine cevap olarak memeli hücreleri katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan çoklu adaptif yollar geliştirmişlerdir [43]. Glikoz ve enerji yoksunluğu, artan protein sentezi ve protein glikozilasyonun inhibisyonu, ER kalsiyum düzeyinde dengesizlik, mutasyon ve yanlış katlanmış proteinlerin varlığı gibi hücrel stresler UPR aktivasyonuna neden olabilirler [44]. Hücrel sinyaller aracılığıyla işlev gören katlanmamış protein cevabı çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz benzeri-ER kinaz (PERK), İnositol-Gerektiren Enzim 1(IRE-1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF-6) olmak üzere 3 farklı mekanizma ile gerçekleşebilir. UPR aracılı ER işlevlerinin düzenlenmesi, katlanmamış proteinlerin azaltılması yoluyla sağlanır. ER stresine bağlı olarak protein sentezini baskılama, ökaryotik translasyon başlatma faktörünün (eIF2 α) fosforilasyonunun artışı ile sağlanmaktadır. Fosforilasyon aracılı gerçekleştirilen bu modifikasyon, aktif 43S translasyon başlama kompleksinin oluşumunu engeller [44-46].

İmmunoglobulin Bağlayıcı Protein (BiP) aracılığıyla gerçekleştirilen hatalı ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ER kapasitesini aşması nedeniyle UPR sensörlerine bağlanacak olan BiP miktarı azalacaktır. UPR sensörlerine daha az BiP bağlanması PERK ve IRE-1'in oligomerleşip otofosforilasyona uğrayarak aşağı yönde sinyallerin uyarılmasına sebep olur. ATF-6, Golgi'den salındıktan sonra belirli

işlemler sonucu aktif transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. PERK'in aktivasyonu eIF2 α 'nın fosforilasyonunun inhibisyonu ile protein translasyonunu seçici olarak zayıflatır. Bu fosforilasyon aynı zamanda apoptotik süreçlerde de yer alan birçok genin anlatımında görev alan ATF-4'ün translasyonunun artması ile sonuçlanır. De novo protein sentezinin seçici inhibisyonuna ek olarak UPR yolağı aynı zamanda katlanmamış protein yükünü azaltmak için şaperonların transkripsiyonunu da uyarır. Aktive edilmiş ATF-6 nukleusa hareket eder ve şaperonların gen anlatımlarını artırarak, ER stresi sürecinde rol alan birçok molekülün uyarılmasına neden olur. UPR aynı zamanda siklin D protein sentezini baskılayarak PERK/eIF2 α vasıtasıyla hücre döngüsünü G1 fazında bloke eder [47,48].

ER stresi sırasında UPR yolağında yer alan birbiri ile bağlantılı yollar ve birçok diğer farklı süreç hücrenin kurtarılıp hayatta kalabilmesi amacıyla devreye girer. ER stresi ortadan kaldırılamadığında ise, UPR'da rol alan bazı moleküller apoptotik süreçleri uyararak hücre ölümüne yol açar [49].

1.1.5. Niban Geni

FAM129A gen ailesinin bir üyesi olan ve 14 eksondan oluşan Niban geni insan ve farelerde 1., sıçanlarda ise 13. kromozomda yer alır [50]. Niban geninin varlığı TSC2 mutasyonlu sıçan renal karsinomunda tanımlanmıştır [51]. Fare, sıçan ve insanlar arasında Niban homologlarındaki amino terminal uç bölgesindeki amino asit dizi korunumunun yüksek seviyede olması, bu bölgenin fonksiyonel önemi olduğunu işaret etmektedir. Niban gen dizisinin genetik veri tabanları ile karşılaştırılması sonucunda ısı şoku protein ailesinin üyelerinde bulunan bir DNAj motifinin ortak olduğu anlaşılmıştır [53]. Niban geninin fonksiyonu bilinmemesine rağmen, DNAj motifine sahip oluşu, çeşitli stres koşulları altında anlatımları artabilen ısı şoku protein ailesi ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır [52]. Çeşitli stres koşulları altında Niban proteininin sitoplazmadan nukleusa hareket ettiği immunhistokimyasal analizlerle tespit edilmiştir [52]. LK9d(L) renal tümör hücrelerinde yapılan çalışmada normal hücre kültürü koşullarında 130 kDa Niban proteini sentezi saptanırken, kültür ortamı stres şartlarına maruz bırakıldığında 130 kDa yanı sıra ayrıca 70kDa'luk Niban proteininde

sentezlendiği gösterilmiştir [52]. Niban'ın karsinogenezde hücreyi ölüme karşı koruyor olabileceği de belirtilmiştir [52]. Niban'ın insan hastalıkları ve neoplastik koşullarda, çeşitli organlardaki anlatım paterni ve fonksiyonel önemi tamamen karakterize edilememiştir.

Niban gen anlatımının sağlıklı insana ait kalp, iskelet kası, pankreas, akyuvar ve prostat bezi dokularında güçlü, kolon ve dalakta ise orta seviyede olduğu rapor edilmiştir. Böbrek, karaciğer, akciğer, timüs, testis, ovaryum, ince bağırsak, beyin ve plasentada ise Niban gen anlatımının olmadığı bilinmektedir [53]. Niban ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 α (eIF2 α), p70 ribozomal S6 kinaz 1 alt birimi ve ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein 1'in fosforilasyonunu modüle ederek protein sentezini düzenlemektedir [53]. Ancak Niban'ın hücre fonksiyonlarına etki mekanizması ve hücrenin yaşam döngü sürecindeki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır.

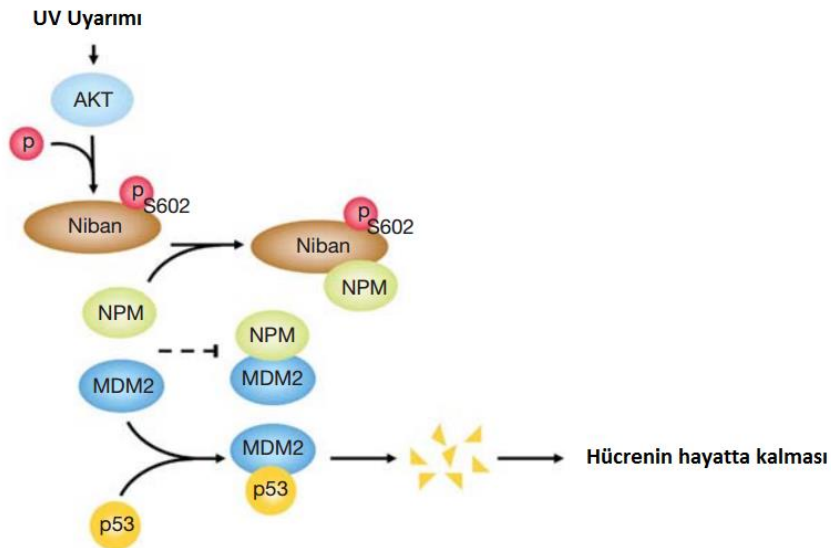
Ye F. ve ark. [54] yaptığı çalışmada 3T3-L1 fibroblastların yağ damlacıkları içeren adipositlere farklılaşması sonrasındaki proteomik değişimleri analiz etmişlerdir. Fibroblastlardan farklı olarak farklılaşmış adipositlerde Niban proteininde içinde bulunduğu, anlatımı yapılan birçok protein saptamışlardır.

1.1.6. Niban ve Apoptoz İlişkisi

1.1.6.1. MDM2-Niban

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve DNA hasarı, oksidatif stres, metabolik stres, düzensiz onkogen aktivasyonu gibi çoklu stres sinyallerine cevaben apoptozun uyarılmasında p53 proteinin önemli rol oynadığı bilinmektedir [55-57]. Stres altında olmayan sağlıklı hücrelerde *murine double minute 2* (MDM2) aracılı p53 yıkımı ve transkripsiyonel gen anlatımındaki kısıtlama ile p53 aktivitesi düşük seviyelerde tutulur [58]. MDM2, p53 aktivitesini hem ubikuitin bağımlı p53 yıkımı hem de p53'ün gen anlatımını baskılayarak düzenler [59,60]. p53'ün kararlılığı ve transkripsiyonel aktivitesi MDM2 aracılığıyla farklı mekanizmalar yoluyla kontrol edilir. MDM2-p53 etkileşimi; ADP-ribozilasyon faktörü, p53 stabilizasyonu ve aktivasyonu yoluyla

gerçekleşir [61]. MDM2'nin bir diğer düzenleyici faktörü de MDM4 olarak da bilinen MDMX'dir. MDM2 ve MDMX birbirleriyle karboksil uçlarındaki halka bölgeleri aracılığıyla etkileşirler ve MDMX, MDM2'nin E3-ligaz aktivitesini p53 yıkımı için uyarır [60]. Nukleolus ve sitoplazma arasında sürekli olarak yer değiştirerek görev yapan bir nukleolar fosfoprotein olan nukleofosmin (NPM), MDM2'ye bağlanarak, MDM2-p53 etkileşimini engeller ve p53 proteinini stabilize ederek transkripsiyonel aktivitesini artırır [62,63]. Bununla birlikte NPM'nin etki mekanizması sırasında hangi moleküller tarafından kontrol edildiği bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilerde Niban'ın ultraviyole radyasyon ile protein kinaz B (AKT) aracılı fosforilasyonu sonucu, Niban ve NPM arasındaki bağlanmayı uyardığı ve NPM'nin p53-MDM2 kompleksi üzerindeki etkisini inhibe ederek p53'ün stabilizasyonunu bozup apoptozu engellediği tespit edilmiştir (**Şekil 1.1**) [64].



Şekil 1.1: AKT bağımlı Niban fosforilasyonu tarafından düzenlenen antiapoptotik yolak [64].

1.1.1.6.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Niban Geni İlişkisi

Obezitenin ER stresini uyardığı ve ER stresinde özellikle obezite, tip 2 diyabet ve insülin direnci arasında anahtar rol oynadığı bilinse de [65] adipöz dokuda obezite

aracılı ER stresine cevap olarak Niban gen anlatımının ne şekilde değiştiği yönünde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

ER stresine cevap olarak Niban mRNA ve protein anlatım seviyelerinin arttığı yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir [53,54]. Sun G.D. ve ark. [54] ER stresörü olan tunikamisinin (TM) Niban mRNA ve protein seviyelerini arttırdığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar Niban'ın in vivo fonksiyonlarını ortaya koyabilmek amacıyla Niban γ γ fareler oluşturmuşlar ve Niban geninin fibroblastik proliferasyon üzerinde etkili olmadığını kanıtlamışlardır. Ayrıca ER stresi esnasında eIF2 α fosforilasyonunun Niban γ γ hücrelerde artığını göstermişlerdir. Böylece Niban'ın eIF2 α 'nın fosforilasyonunu baskılayarak protein translasyon mekanizmalarını etkilediği ortaya konmuştur. Aynı araştırmacılar HeLa hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında Niban gen anlatımının baskılanması sonucu apoptozun uyarıldığını ortaya koymuşlardır. Tüm bu veriler Niban'ın ER stres cevabında etkin rol oynadığını ve translasyonu düzenleyip hücre ölüm sinyalleşmesini organize ederek antiapoptotik bir rol üstlendiğini göstermektedir [53]. Aynı şekilde tip 2 diyabetli bireylerin pankreas hücreleriyle yapılan çalışmada çeşitli ajanlarla ER stresi uyarıldığında, hücrelerde Niban gen anlatım seviyesinin arttığı ve Niban proteininin β hücrelerini apoptoza karşı koruyucu rol üstlendiği ortaya konmuştur [66]. Tip 2 diyabette de β hücre ölümünün öncelikli sebebi ER stresi kaynaklı apoptoz olduğundan [67], Niban'ın hipometilasyonu, protein sentezinin azaltılması ile ER homeostazının yeniden kurulmasında rol oynayabilir [66-68]. Obezite ve obezite ilişkili hastalıklardaki adipogenik süreçte Niban'ın hangi yolak üzerinden etki ettiğine dair bilgi mevcut değildir. Obezitenin ER stresini uyardığı ve ER stresinin de özellikle obezite, tip 2 diyabet ve insülin direnci arasında anahtar rol oynadığı bilirse de [65] adipoz dokuda obezitenin uyardığı ER stresine cevap olarak Niban gen anlatımının ne yönde değiştiğine dair bir çalışmaya rastlanmadı.

1.1.7. Kanser ve Niban İlişkisi

Metabolik bir hastalık olan kanserin diğer metabolizma hastalıkları ile ortak bazı genetik temellerinin olduğu bilinmektedir. [69-73]. Epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen mevcut kanıtlara ek olarak deneysel, translasyonel ve klinik çalışma

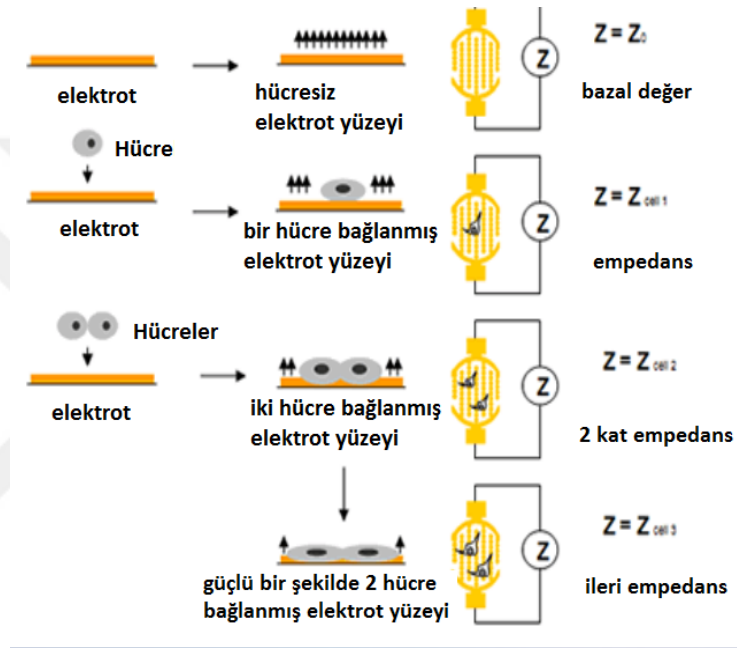
verileri, metabolik sendromun bazı kanser tiplerinin gelişiminde ve progresyonunda önemli etiyolojik rol alabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir [69]. Metabolik sendromun birçok komponentlerinden özellikle obezite ve diyabet, bazı kanser tiplerinin gelişiminde rol almaktadır [71-73]. Bir meta analiz çalışma sonuçlarına göre, metabolik sendromun yetişkinlerde, bazı kanser türlerindeki artışla ilişkili olduğu ifade edilmektedir [49]. Metabolik sendromun bazı kanser tiplerinin gelişiminde yüksek risk faktörü olarak ele algılandığı çalışmalar da bulunmaktadır [73]. Ayrıca Calle E.E. ve ark.'larının yaptığı çalışma beden kütle indeksinin artışı, birçok kanser tipinin ölüm oranının artışı ile alakalı olduğunu ortaya koymuştur [74]. Ayrıca kilo alımı ve kaybının da kanser oluşumunda önemli bir risk faktörü olabileceği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [75,76]. Eldeki bu verilere rağmen metabolik sendrom ve kanser arasındaki ilişkinin ayrıntılı mekanizması halen tam olarak netleşmemiştir.

Obezite ve obezite ilişkili hastalıklarda rol aldığı ortaya konulan Niban'ın kanser gelişiminde de rol aldığına dair sınırlı sayıda veri mevcuttur. Literatür verileri, Niban geninin çeşitli doku ve organlarda erken ve geç evrelerdeki kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiğini rapor etmişlerdir [50,52,76,78]. *Eker sıçanları* üzerinde yapılan bir çalışmada renal karsinomlarında, erken preneoplastik lezyonlarda Niban geninin anlatım yaptığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Niban gen anlatımı insan böbrek hücrelerinin de dahil olduğu diğer renal karsinomlarında da tespit edilmiştir. Niban gen anlatımının normal insan ve fare böbreklerinde olmayıp, renal karsinomlu hücrelerde bulunması insan ve farelerde renal karsinogenez için yeni bir tümör markeri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir [50].

1.1.8. Gerçek Zamanlı Hücre Monitorizasyon Sistemi: iCELLigence

iCELLigence, hücre kültürü ortamında hücrelerin sayıları, morfolojileri ve canlılıkları ile ilişkili olan elektriksel empedansı gerçek zamanlı ölçerek hücresel olayların incelenmesine olanak tanıyan ve oldukça yüksek duyarlılığa sahip bir monitorizasyon sistemidir [79,80]. Bu sistem hücre çoğalmasını, morfoloji değişikliklerini, hücrelerin hareketlerini ve hücrelerin zemine bağlanma kalitelerini herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymaksızın gerçek zamanlı olarak noninvaziv

elektriksel empedansı ölçerek analiz eder (**Şekil 1.2**) [81]. Sistem rastgele hücre indeks birimleri olan $(R_n - R_b)/4.6$ 'nın empedansını ifade eder. R_n kuyucukların hücre varlığındaki hücre-elektrot empedansdır. R_b ise kuyucuklarda hücre olmadığında medyuma ait arka plan empedansdır [79]. Sistem 8 kuyucuklu 2 adet elektronik plaka (E-Plate) yüklenebilen cihaz ve bunun bağlı olduğu ve analizlerin yapıldığı bilgisayar sisteminden oluşur. Cihaz standart CO₂ etüv içerisine yerleştirilir ve buradan kablosuz olarak Kontrol Ünitesi 'ne (etüvün dışında yer alan bir iPad) veri aktarımı gerçekleştirir.



Şekil 1.2: iCELLigence gerçek zamanlı hücre monitorizasyon sisteminin çalışma prensibi.

Bu çalışmamızda hücrelerde birtakım stres koşullarını tetklediği bilinen linoloik asit, stearik asit, etanol ve hidrojen peroksitin, obezitenin modellendiği adipositlerin gelişimlerine olan etkileri gerçek zamanlı olarak incelenmiştir. Daha sonra adiposit apoptozunun önlenmesinin obezite tedavisinde yeni bir terapi olabileceği düşüncesinden yola çıkarak, bu ajanların belirli doz ve sürelerde adipositlere uygulanması sonrası stres koşullarına cevap olarak antiapoptotik rol etkisi olan Niban gen anlatım paternindeki değişimler tespit edilmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. FastStart Essential DNA Probes Master (Roche)
2. High Pure RNA Tissue Kit(ROCHE)
3. Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche)
4. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROCHE)
5. RealTime ready Catalog Assays (ROCHE)
6. RealTime ready Designer Assays, 300 reactions (ROCHE)
7. Dulbecco's MEM
8. Phosphate Buffer Saline (PBS) (THERMO)
9. Amfoterisin b çözeltisi (THERMO)
10. Penicillin Streptomisin Çözeltisi (THERMO)
11. Fetal Bovin Serum (FBS) (THERMO)
12. 3-İzobutil-1- Metil Ksantin (SİGMA)
13. İnsulin (Sigma)
14. Lineloik Asit (Sigma)
15. Stearik Asit
16. Etanol
17. Hidrojen Peroksit (% 35 MERCK)
18. Oil Red O (Sigma Aldrich)
19. Formalin (Sigma)
20. Deksametazon

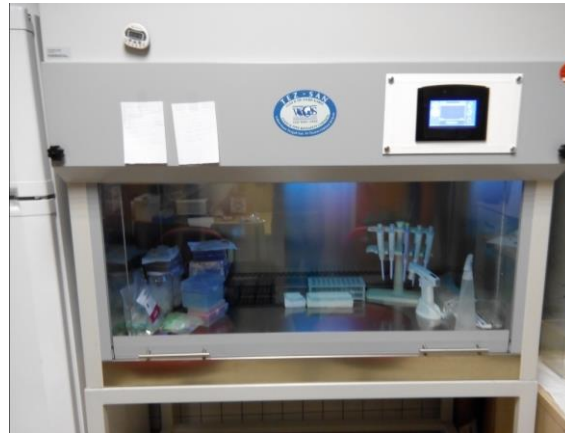
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

1. LightCycler R Nano (ROCHE)
2. iCELLigence Real Time Cell Monitoring System (ACEA, Bioscience)
3. Spektrofotometre (Beckman Coulter)
4. CO₂ Etüv (Thermo Scientific)
5. -80 Derin Dondurucu (Thermo Scientific Forma 700 Series)
6. -20 Derin Dondurucu (Vestel No Frost)
7. +4 Buzdolabı (Vestel)
8. Otoklav (ALP)
9. Elektronik Pipet Seti (Thermo)
10. Vorteks (Biosan V-1 Plus)
11. Mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
12. Soğutmalı Santrifüj (Sigma 3-18K)
13. UV Kabin (Tez-San Biosafety Cabinet Class II)
14. Su banyosu (Stuart)
15. Etüv (Elektromag)
16. Hassas Terazi (Radwag)
17. Distile Su Cihazı (Elga)
18. İnverted Faz Konstrat Mikroskop
19. Floresan Mikroskop (Euromax/IR Serisi)
20. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Stuart)

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre kültürü

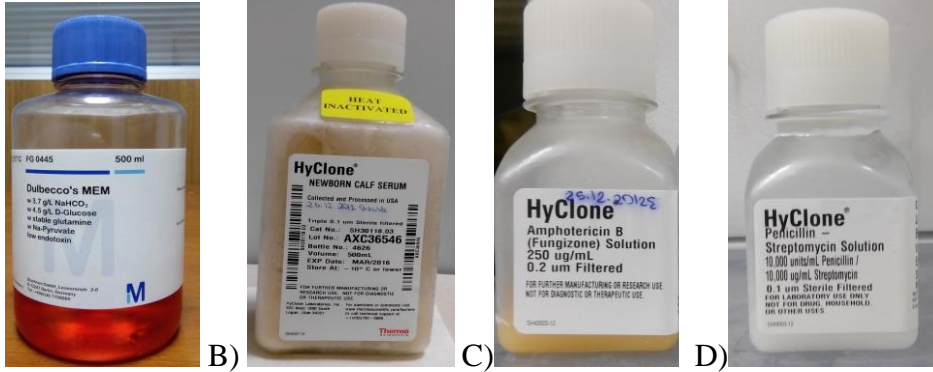
Çalışmada kullanılan 3T3L-1 fibroblast hücre soyu *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, USA) ticari olarak temin edilmiştir. Çalışmalar başlayıncaya kadar ve gerektiğinde fibroblastlar ve adipositler $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmişlerdir. Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin beslenme ortamı olarak DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) medyumunu, %10 Fetal Bovin Serum (FBS), Penisilin (100 unit/ml)-Streptomisin (100 $\mu\text{g/ml}$) Solüsyonu ve Amfoterisin B solüsyonu kullanıldı (**Şekil 2.3**). Hücrelerin gelişmesi ve büyümesi için 25 cm^2 'lik flasklar içine komplet medyumdan 10 ml döküldü. Daha sonra dondurulmuş haldeki hücreler kademeli olarak çözündürüldü. Hızlı bir şekilde hücreler flasklara paylaştırıldı (**Şekil 2.2**). Hücrelerin flasklara ekilmelerinin ardından inverted mikroskop altında gözlem yapılarak hücrelerin varlıkları teyit edildi. Mikroskobik gözlemin ardından flasklar %5'lik karbondioksit etüvde $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin zemine yapışıp yapışmadığını gözlemek amacıyla ekimden 24 saat sonra hücreler tekrar inverted mikroskop altında incelendi. Tüm bu çalışmalar steril şartlarda ultraviyole (UV) kabin içerisinde gerçekleştirildi (**Şekil 2.1**).



Şekil 2.1: Hücre kültürü ile ilgili tüm deneylerin yapıldığı kabinin çalışma öncesi sterilizasyonu.



Şekil 2.2: Hücrelerin flasklara ekilmesi.

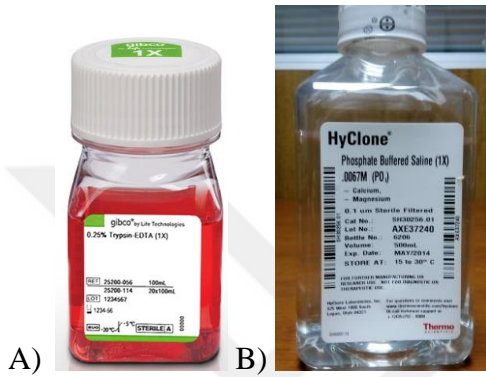


A) High Glucose DMEM, B) New Born Calf Serum, C) Amfoterisin B Solüsyonu, D) Penisillin-Streptomisin Solüsyonu.

2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Çalışmalar süresince rutin olarak flasklar içindeki besi yerleri 2-3 gün arayla değiştirildi ve flask yüzeyinin %90' lık bölümü hücreler ile kaplanınca, hücreler klasik

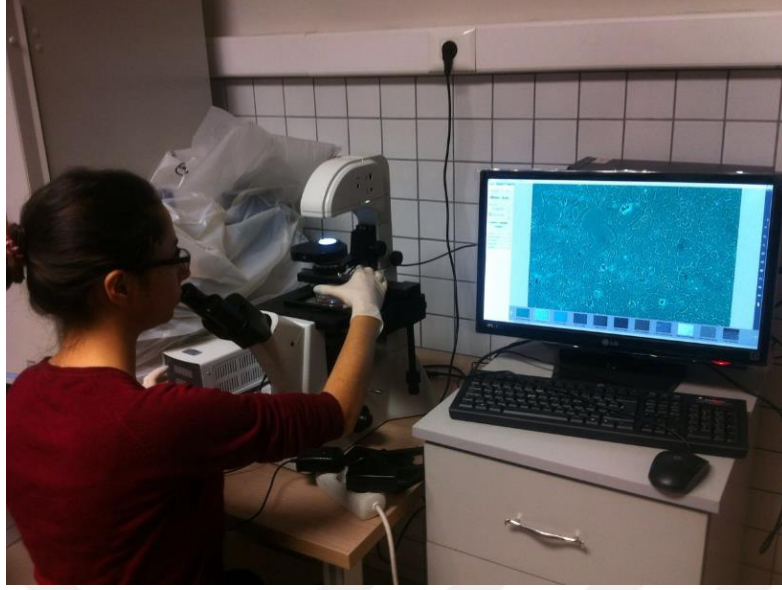
tripsinojen yöntemi ile pasajlandı. Hücreler önce ardışık olarak 2 ml ve 1 ml PBS ile yıkandı. Daha sonra 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu uygulaması yapılarak hücreler kaldırıldı (**Şekil 2.4**). 2-3 dakikalık uygulama sonrası tripsin, serum içeren besiyeri eklenmesiyle inaktif hale getirildi. Daha sonra 20 ml'lik falkon tüplere alınan hücreler 7 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Tripsin yöntemi ile hücrelerin kaldırılmasına dair yukarıda anlatılan işlemler, rutin pasajlamada, iCELLigence deneyleri ve RNA izolasyonları öncesinde yapıldı.



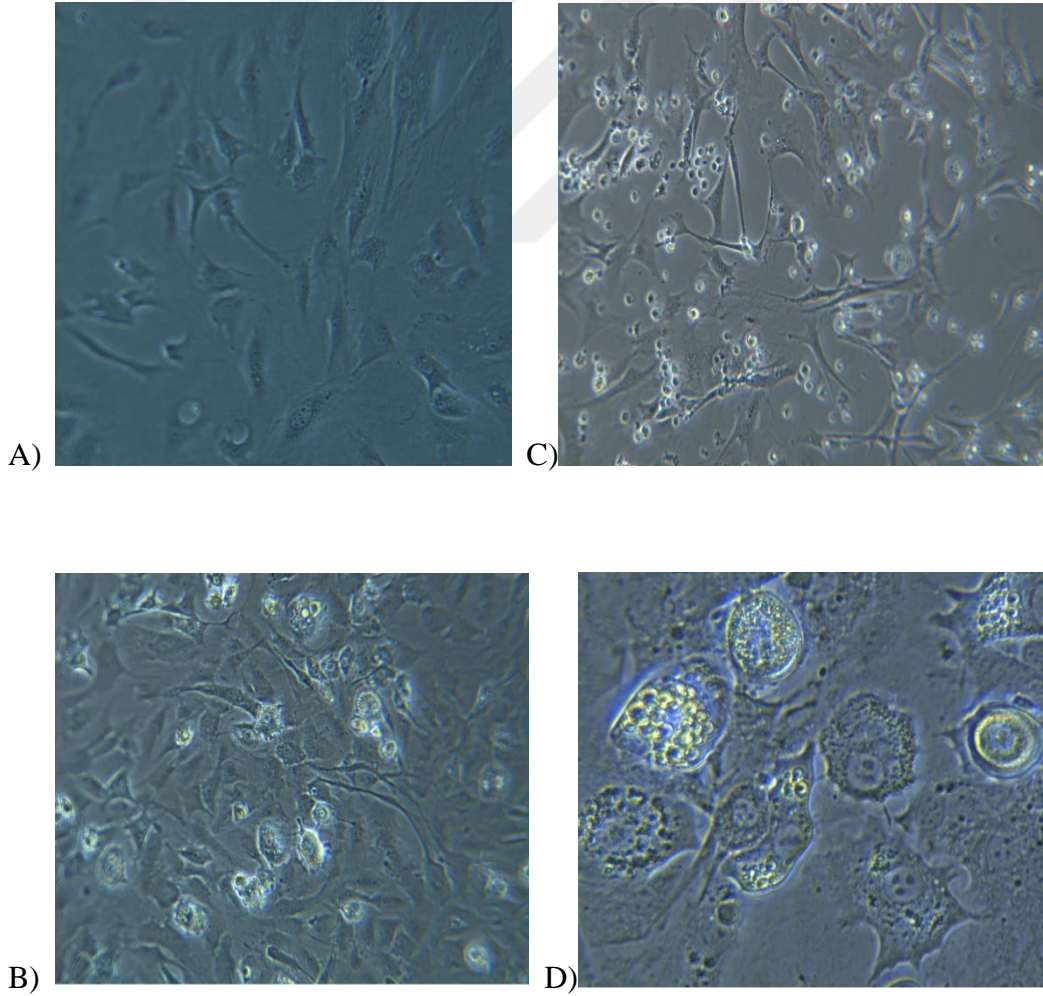
Şekil 2.4: Hücrelerin zeminden kaldırılması ve hücrelerarası bağlantıların koparılması için kullanılan malzemeler. A) Tripsin-EDTA B) PBS.

2.2.3. 3T3-L1 Fibroblast Hücrelerinin Adiposit Hücrelerine Dönüştürülmesi

3T3-L1 fibroblast hücrelerinin adiposit hücrelerine dönüştürülmesi Miard S. ve ark.'larının [82] protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. 3T3-L1 fibroblast hücreleri DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) medyumuna, %10 *Fetal Bovin Serum* (FBS) içinde %5'lik karbondioksit etüvde 37 °C'de 4 gün inkübasyonu sonrası flaskların %75'i hücreler tarafından kaplanınca hücrelere dönüşüm besiyeri verildi. Dönüşüm besiyerinin hazırlanmasında DMEM-FBS içine 10 µg/ml insülin, 1 µM dekzametazon, 0.5 mM 3-izobütül-1-metil ksantin eklenmiş besiyeri kullanıldı. Ardından bu besiyeri ile birlikte hücreler %5'lik karbondioksit etüvde 37 °C' de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 2'şer gün aralıklarla DMEM-FBS +10µ/ml insülin içeren besi yeri ile hücrelerin 3 kez besiyeri yenilemesi yapıldı. Hücrelerin gelişimleri belirli periyotlarda inverted mikroskop altında incelendi (**Şekil 2.5-2.6**).



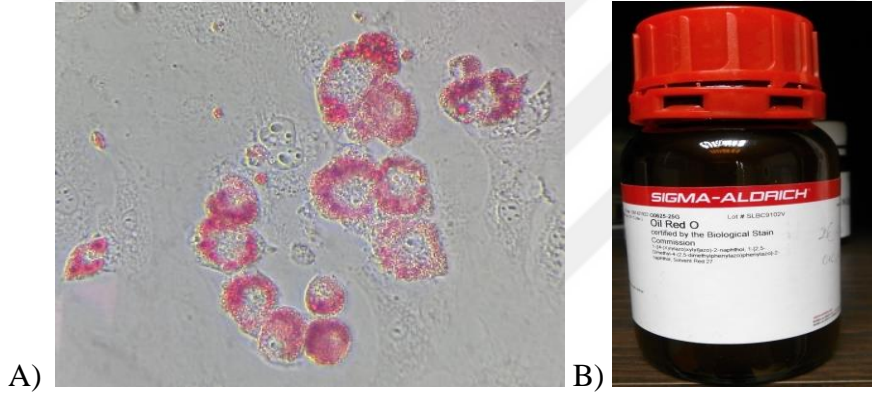
Şekil 2.5: 3T3-L1 adiposit gelişimlerinin inverted mikroskopda incelenmesi.



Şekil 2.6: 3T3-L1 fibroblastlarının pre-adipositlere dönüşümü. A) Dönüşüm öncesi fibroblastlar (10X), B-C) Dönüşüm sırasında fibroblast-preadiposit hücreleri (10X), D) Olgun adipositler (40X).

2.2.4. 3T3-L1 Fibroblastlarının Adiposit Hücrelerine Dönüşümünün Saptanması

Temel olarak adipositlerdeki hücre içi lipid damlacıklarının birikimi ile fibroblastların adiposit hücrelerine dönüşümü saptandı. Bu dönüşüm sırasında belirli aralıklarla mikroskop ile gözlem yapılarak incelenerek hücrelerin gelişim aşamaları kaydedilmiştir. 3T3-L1 fibroblast hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine dönüşümü Oil Red O boyama yöntemi ile tespit edildi. Hücreler ilk olarak %10'luk formalin solüsyonunda bir saat bekletildi. Daha sonra 5 dakika oda sıcaklığında % 60'luk oil red o çözeltisinde inkübasyona bırakıldı. İverted mikroskopta yağ damlacıkları kırmızı renkte izlendi (Şekil 2.7).

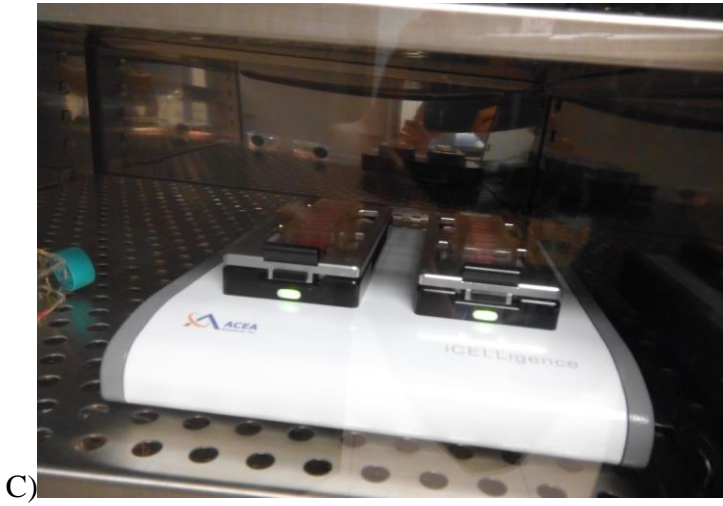
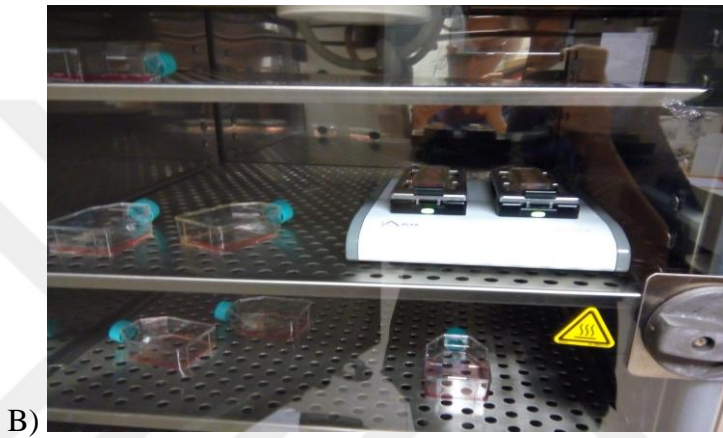


Şekil 2.7: A) Oil-Red O ile boyanan adipositler, B) Oil Red O boyası.

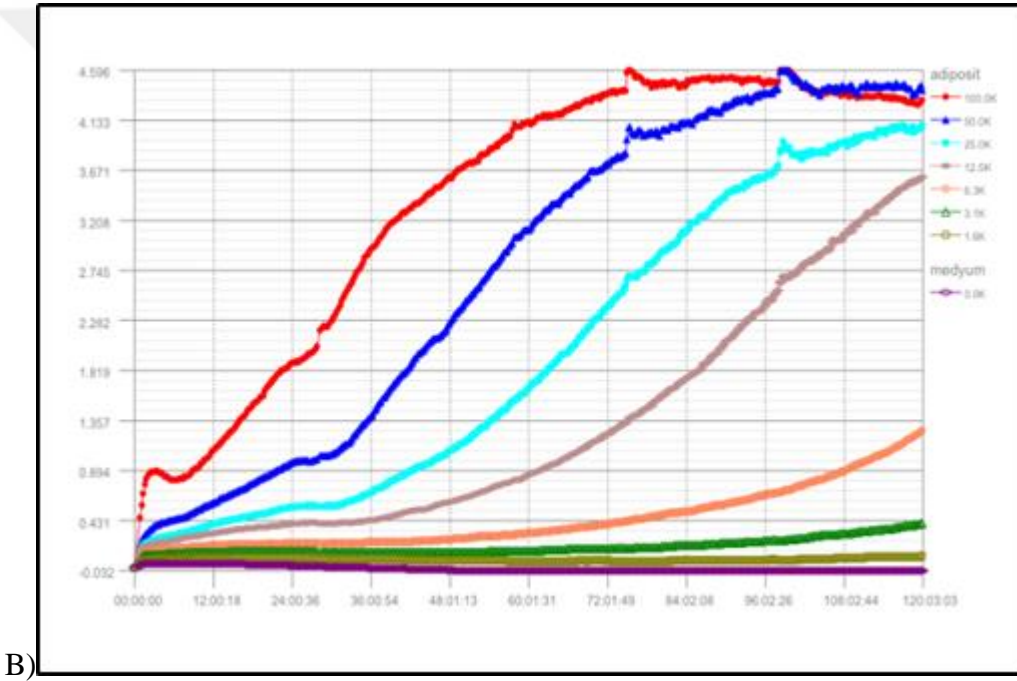
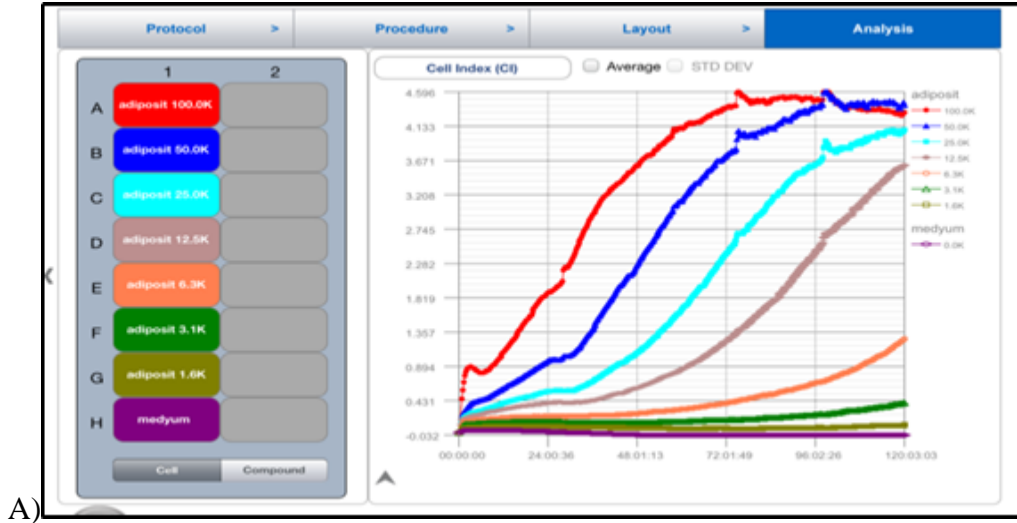
2.2.5. iCELLigence Gerçek Zamanlı Monitorizasyon Sistemi Kullanılarak Hücre Sayısının Optimizasyonu

Çalışma sonucunda daha doğru bir sonuç elde edilmesi için deneyler sırasında gerekli olan 3T3-L1 adiposit hücre sayısı iCELLigence sistemi kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 2.8). 37 °C'de %5'lik karbondioksit etüvde inkübasyona bırakılmış olan hücreler ilk önce PBS ile yıkandıktan sonra tripsin kullanılarak zeminden kaldırıldı. Daha sonra üzerine 1 ml serum içeren besiyeri eklenerek tripsinin inhibisyonu sağlandı. Santrifüj ile tripsin içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve 1 ml taze besiyeri bu hücrelerin üzerine eklendi. 1 ml besiyeri içindeki yer alan hücre sayısı hemositometre kullanılarak hesaplandı. Bu arada iCELLigence sistemine ait elektronik

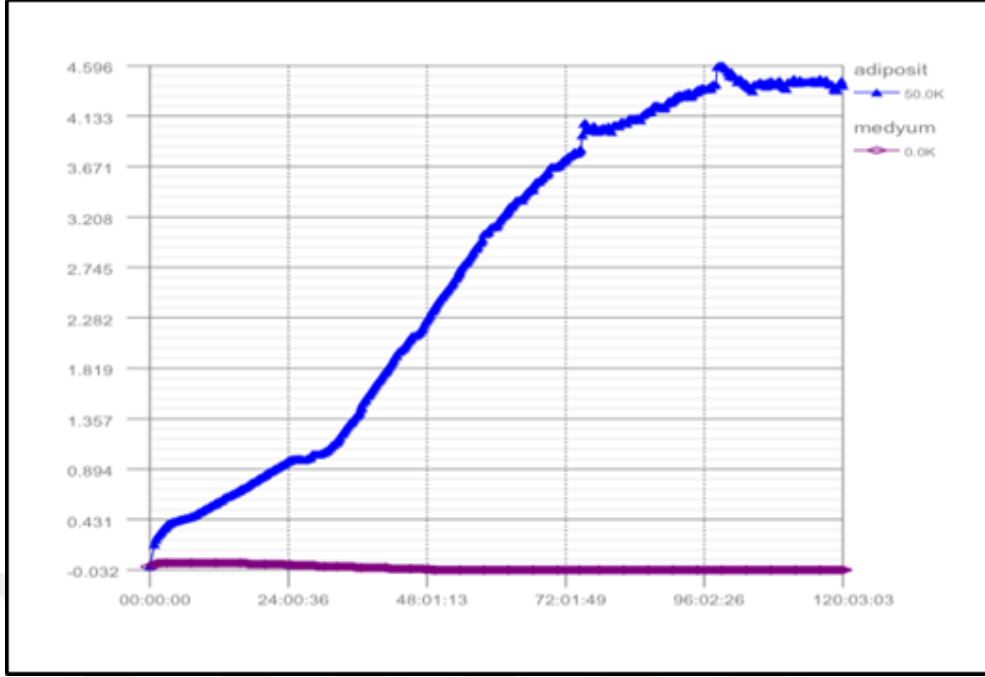
plakaların her bir kuyusuna 150 µL besiyeri eklendi. Deneye başlamadan önce arka plan ölçümü için besiyeri içeren elektronik plakalar iCELLigence sistemine yerleştirildi ve ölçüm yapıldı. Sayımı yapılan hücreler elektronik plakaya ait kuyucuklarda yaklaşık olarak sırasıyla 100000, 50000, 25000, 12500, 6300, 3100 ve 1600 hücre/ml olacak şekilde besi yeri ile süspansiyonu yapıldı. Daha sonra her bir kuyucukta toplamda 300 µl besi yeri olacak şekilde besiyeri eklendi. Elektronik plakalar sisteme yüklendikten sonra deneye başlamadan önce 30 dakika beklenerek hücrelerin zemine çökmesi sağlandı. Daha sonra sistem çalıştırılarak 15'er dakikalık periyotlar ile 120 saat boyunca hücrelerin proliferasyonu ölçüldü. 120 saatlik çalışma sonrasında proliferasyon eğrilerinden yararlanarak deneyler için en uygun hücre sayısı 50000 hücre/kuyucuk olarak belirlendi (**Şekil 2.9-2.10**). Bu deney analizlerinde hesaplanan *half maximum inhibitory concentrations* (IC50) değerleri “Sigmoidal dose-response (Variable slope)” formülü ile hesaplandı.



Şekil 2.8: A) iCELLigence sisteminin kurulması ve optimizasyonu. B-C) Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra elektronik plakaların CO₂ kabin içinde yerleştirilmiş cihaza yüklenmesi.



Şekil 2.9: A-B) iCELLigence sisteminde 120 saatlik kültür sonrası hücre dilüsyonlarına ait proliferasyon eğrileri.



Şekil 2.10: iCELLigence sisteminde 120 saatlik kültür sonrası kontrole göre en iyi proliferen olan hücre dilüsyonu.

2.2.6. iCELLigence Sisteminde 3T3-L1 Adiposit Hücrelerine Linoleik Asit ve Stearik Asit Uygulamaları

3T3-L1 adipositlerine yağ asitlerinin uygulanması Chavez J.A. ve ark.'larının [83] verilerine göre yapıldı. Kültür ortamına serum içermeyen besiyeri ilave edildi. Linoleik ve stearik asit alkol ve besi yeri içinde çözündürüldü. Adiposit hücrelerinin elektronik plakalara ekiminden yaklaşık 24 saat sonra 3T3-L1 adipositlerine 200 μ M, 400 μ M ve 600 μ M linoleik asit; 500 μ M, 750 μ M, 1000 μ M ve 1500 μ M stearik asit yaklaşık 120 saat boyunca uygulandı ve 15'er dakikalık periyotlar ile ölçümler alındı. Kontrol hücrelerine sadece kültür medyumunu eklendi.

2.2.7. iCELLigence Sisteminde Adiposit Hücrelerine Hidrojen Peroksit ve Etanol Uygulamaları

Adiposit hücrelerinin elektronik plakalara ekiminden yaklaşık 24 saat sonra hücrelere 50, 100, 250, 300, 400, 600, 800, 1000 μ M hidrojen peroksit ve 50, 100, 150,

250 mM etanol uygulaması yapıldı. Kontrol hücrelerine sadece kültür medyumu eklendi. Sırasıyla yaklaşık 120 ve 190 saat boyunca ve 15'er dakikalık periyotlar ile ölçümler alındı.

2.2.8. iCELLingence Sisteminde IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

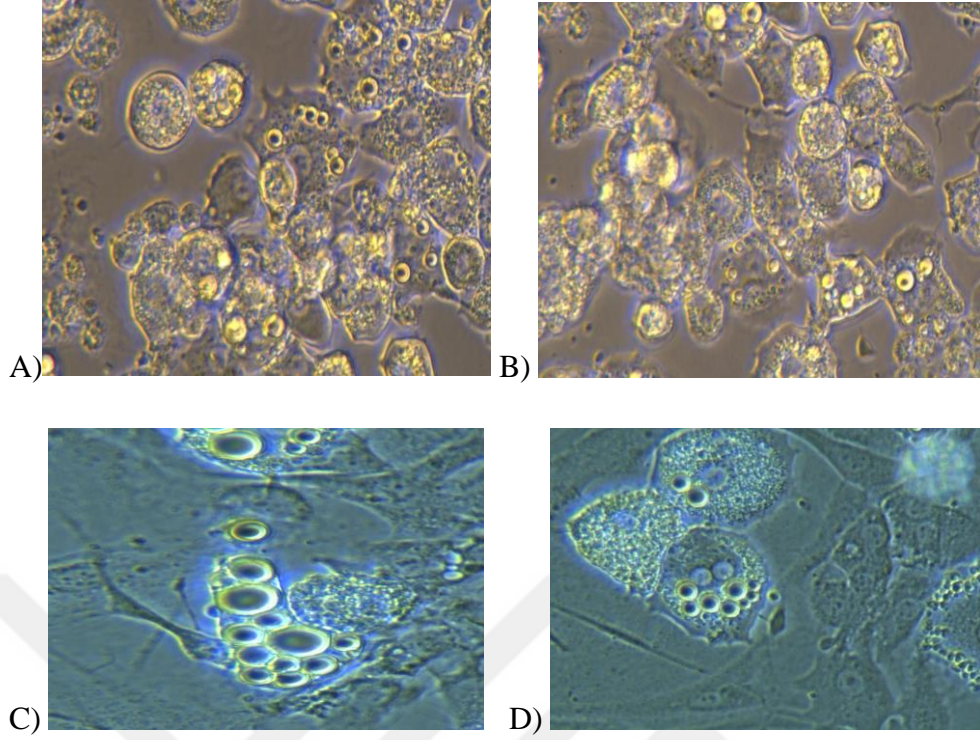
Linoleik asit, stearik asit, hidrojen peroksit ve etanol uygulaması yapılmış adiposit hücrelerinin 120 saatlik proliferasyon eğrileri incelendi. Daha sonra her biri için, Sigmoidal dose-response (Variable slope) formülü kullanılarak *half maximum inhibitory concentrations* (IC50) değerleri hesaplandı.

2.2.9. 3T3-L1 Adiposit Hücrelerine Linoleik Asit, Stearik Asit, Hidrojen Peroksit ve Etanol Uygulaması

IC50 değerleri hesaplandıktan sonra hücreler belirli doz ve süre boyunca linoleik asit, stearik asit, hidrojen peroksit ve etanol ile muamele edildiler. Buna göre 4 saat 300, 400 ve 600 μM H_2O_2 , 5 saat 600 ve 800 μM H_2O_2 , 24 saat 600 ve 800 μM H_2O_2 ; 24 saat 480 μM linoleik asit, 24 saat 50 μM stearik asit ve 24 saat 90 mM etanol uygulaması yapıldı.

2.2.10. Adipogenik Süreçte Niban Gen Anlatımındaki Değişimlerin Belirlenmesi

Adipositlerdeki adipogenik süreçte Niban gen anlatım paterninin yağlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan stres süreçlerine cevabının belirlenmesi için henüz yeni farklılaşmış pre-adipositler ile yaklaşık 21 gün kültürde yetiştirilmiş ve yağ birikimi mikroskop altında rahatça gözlemlenebilen olgun adipositlerden (**Şekil 2.11**) total RNA izolasyonları yapılmıştır.



Şekil 2.11: Yağ birikimi gözlemlenen olgun adipositler (40X).

2.2.11. Total RNA İzolasyonu

Total RNA hücrelerden *High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Germany)* protokolüne uygun izole edildi.

1. Hücreler PBS ile süspanse edildi.
2. Üzerine 200 µl lizis-bağlayıcı tampon (*Lysis/-Binding Buffer*) eklendi.
3. İyice karıştırıldı.
4. Filtreli tüp, toplatıcı tüpün üzerine konuldu.
5. Eppendorf tüpteki sıvı, filtreli tüpe aktarıldı.
6. 8000 x g' de 15 saniye santrüfuj edildi.
7. Toplayıcı tüp sıvı ile birlikte atıldı. Filtreli tüp temiz bir toplayıcı tüpün içine konularak üzerine 90 µl *DNase incubation buffer* ve 10 µl *DNase I* eklendi.
8. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. Üzerine 500 µl yıkama tamponu I (*Wash Buffer I*) eklendi ve 8000 x g' de 15 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı. Filtreli tüp toplayıcı tüp ile birleştirildi.
10. Filtreli tüpün içine 500 µl yıkama tamponu II (*Wash Buffer II*) eklendi ve 8000 x g' de 15 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı. Filtreli tüp toplayıcı tüp ile birleştirildi.
11. Filtreli tüpün içine 300 µl yıkama tamponu II (*Wash Buffer II*) eklendi ve 13000 x g' de 2 dakika santrifüj edildi. Toplayıcı tüp sıvı ile birlikte atıldı.
12. RNA içeren filtreli tüp, 1.5 ml'lik eppendorf tüpün içine konuldu. Önceden ısıtılmış 100 µl süzme tamponu (*Elution Buffer*) filtreli tüpe eklendi ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. İzole edilen total RNA'lar kullanılabildiği kadar -80°C de saklandı.

2.2.12. Total RNA'dan cDNA Sentezi

Total RNA'dan *cDNA transcriptor HiFi cDNA synthesis kit (Roche)* kullanılarak sentezlendi.

1. 1µg total RNA, 2µl random hexamer primer ve 9µl *PCR grade water* ile karıştırıldı.
2. Toplam hacim 13 µl olan karışım 65°C 'de 10 dakika inkübe edildi.
3. Üzerine 4 µl *transcriptor reverse transcriptase reaction buffer*, 0.5 µl *protector RNase inhibitor*, 2µl deoksinükleotid karışımı ve 0.5 µl *transcriptor reverse transcriptase* eklenerek toplam hacmi 20 µl olan yeni bir karışım elde edildi.
4. Yeni karışım 25°C 'de 10 dakika, 50°C 'de 60 dakika ve 85°C 'de 5 dakika inkübe edildi.
5. Sentezlenen cDNA'lar -20°C 'de analiz yapılabildiği kadar saklandı.

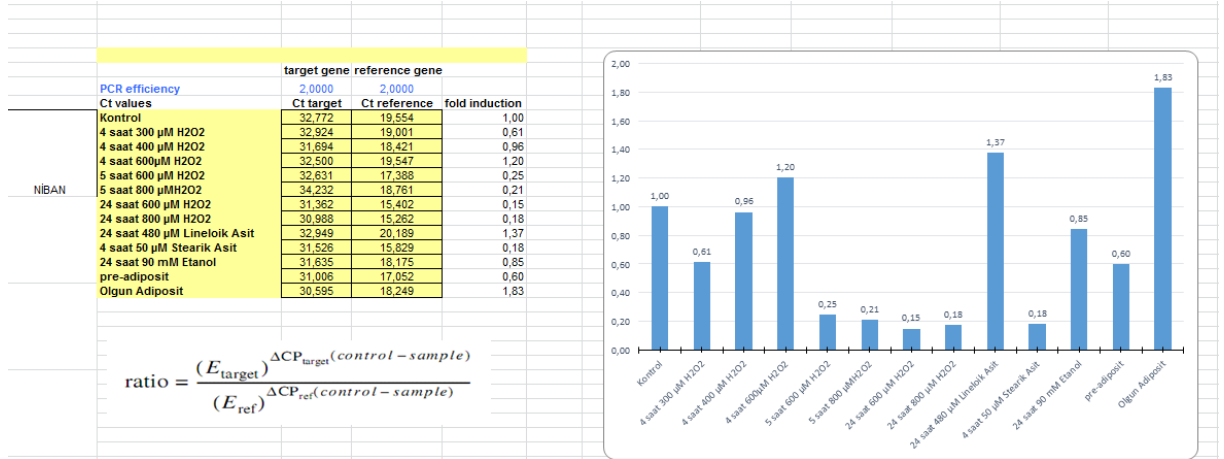
2.2.13. Kantitatif Polimeraz Zincir (qPZR) Analizi

Niban gen anlatımları kantitatif olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile (qPZR) LightCycler nano (Roche Diagnostik, Almanya) cihazında belirlendi. Niban mRNA'sı, GAPDH mRNA düzeylerine göre normalize edildi. Niban genlerine ait anlatım oranları referans gen olarak kullanılan GAPDH ile oranlanarak

hesaplandı. Spesifik gen ürünlerinin varlığı relative quantification analizi ile doğrulandı. Cq değer 40'ın üzerinde olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi.

2.2.14. İstatistiksel Analizler

qPCR deneylerinden elde edilen sonuçlar Pfaffl analizi [84] ile değerlendirilmiştir (Şekil 2.12).

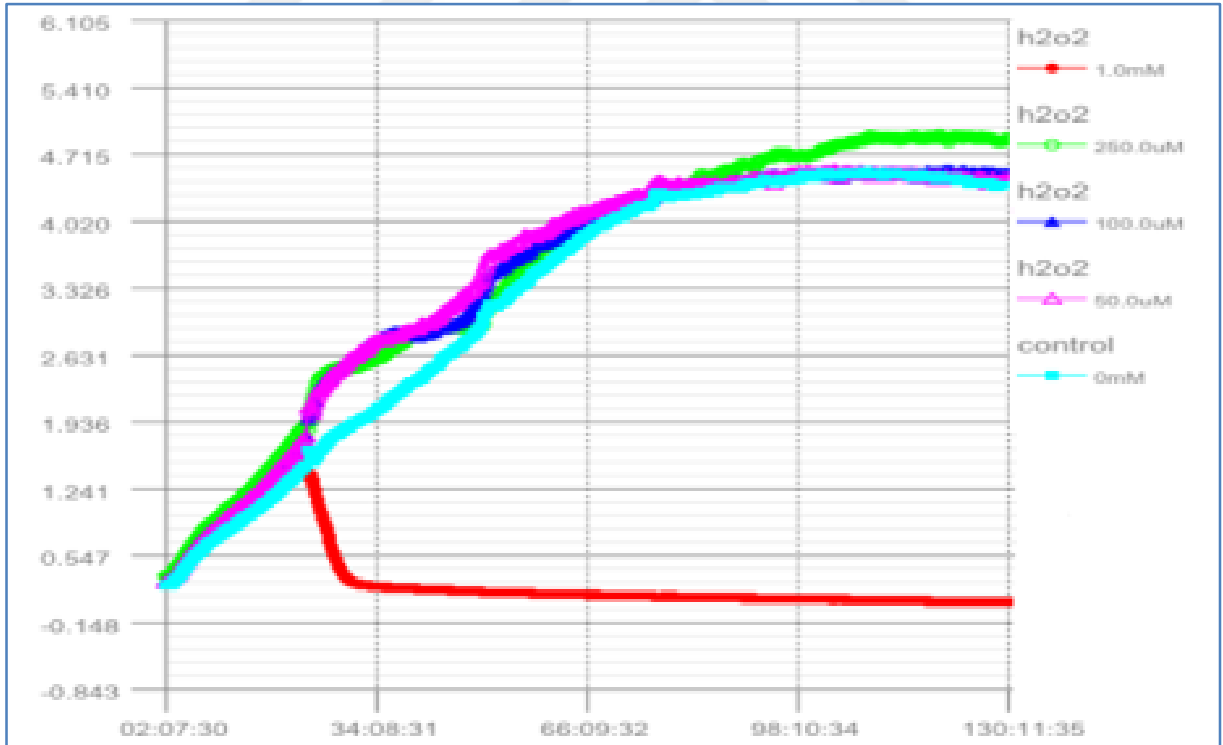


Şekil 2.12: qPCR deneyleri sonucu NİBAN ve GAPDH genlerine ait Ct ve katlanma induksiyon değerleri.

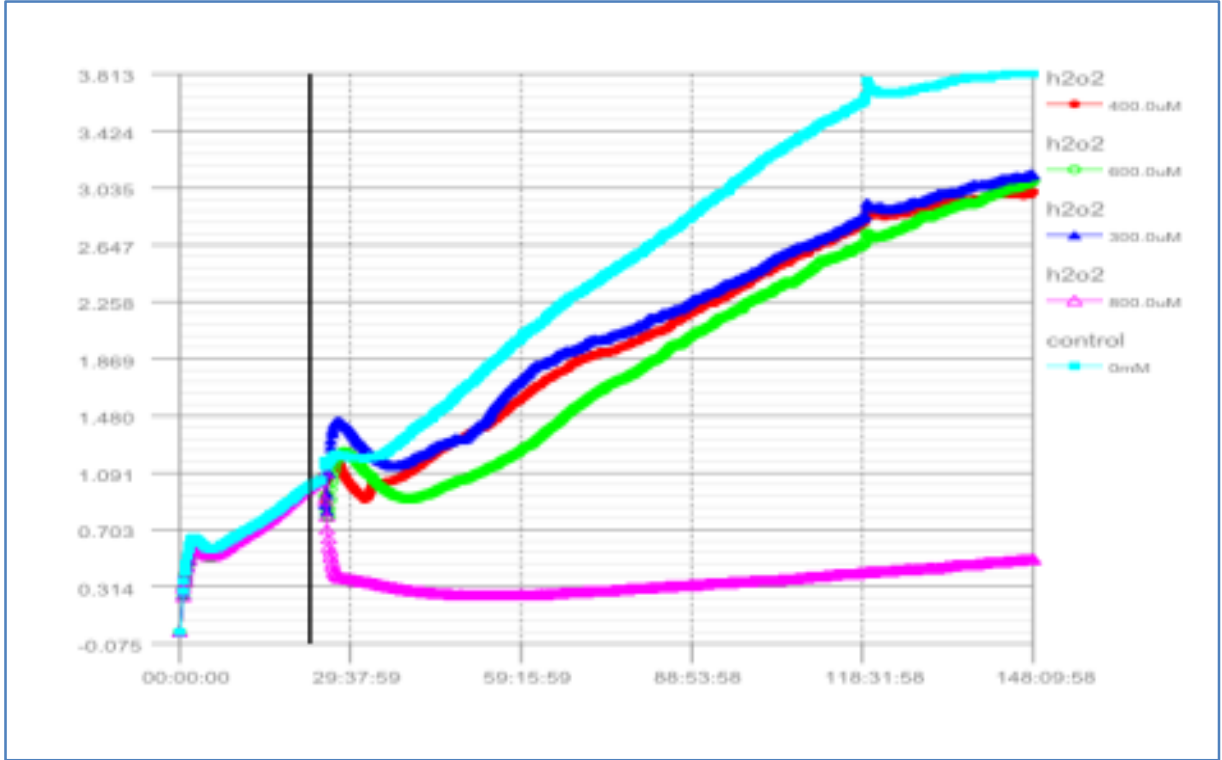
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Hidrojen Peroksitin 3T3-L1 Adipositlerin Çoğalması Üzerine Etkileri

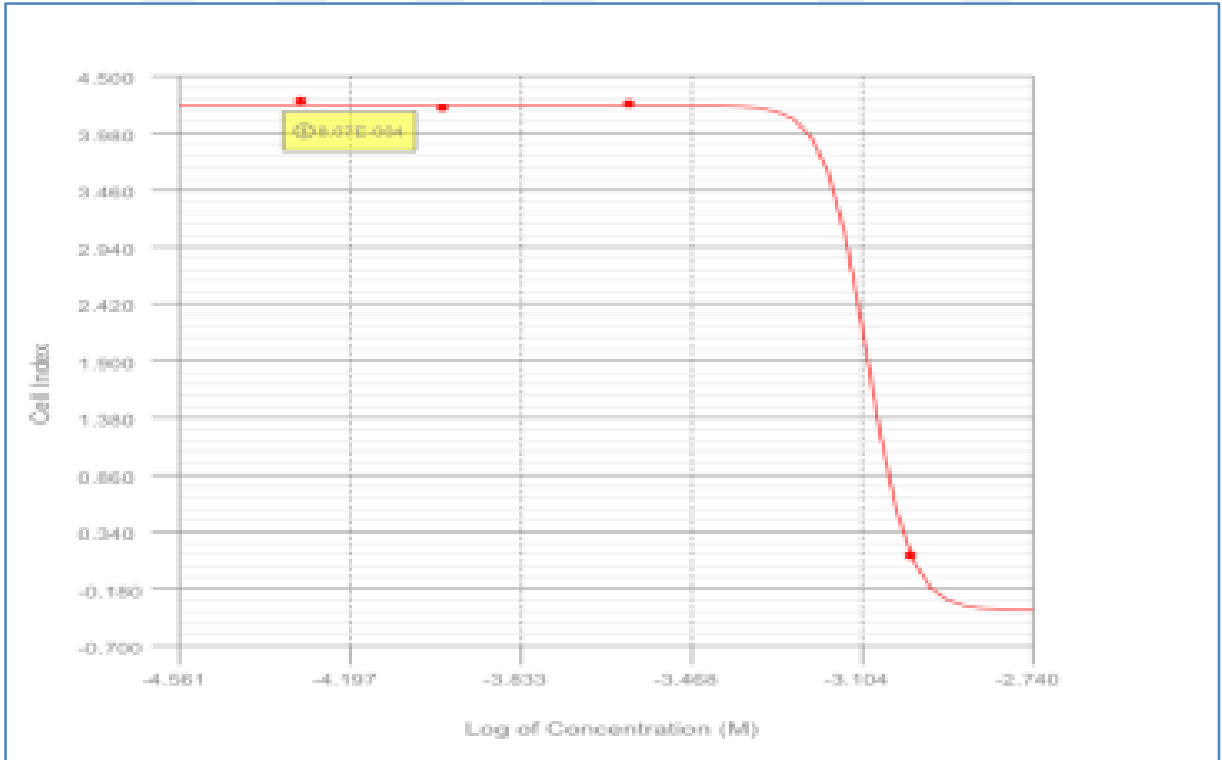
3T3-L1 adipositlerine hidrojen peroksit uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yerinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 50, 100, 250, 1000 μM H_2O_2 eklendi ve yaklaşık 130 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.1). 1mM H_2O_2 'in adipositler üzerinde letal etkisi olduğu tespit edildi. 50, 100, 250, μM H_2O_2 dozlarının adipositlerde antiproliferatif etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1). Sınır sitotoksite değerlerini tespit etmek amacıyla 300, 400, 600, 800 μM konsantrasyonlarda H_2O_2 hücrelere verildi (Şekil 3.2). Yaklaşık 145 saat boyunca 600 μM H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde hücre çoğalmasının inhibe edildiği saptandı (Şekil 3.2). Hidrojen peroksit için IC50 değeri Şekil 3.3'teki konsantrasyonlar temel alınarak hesaplandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.1: Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 250, 1000 μM H_2O_2 uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.



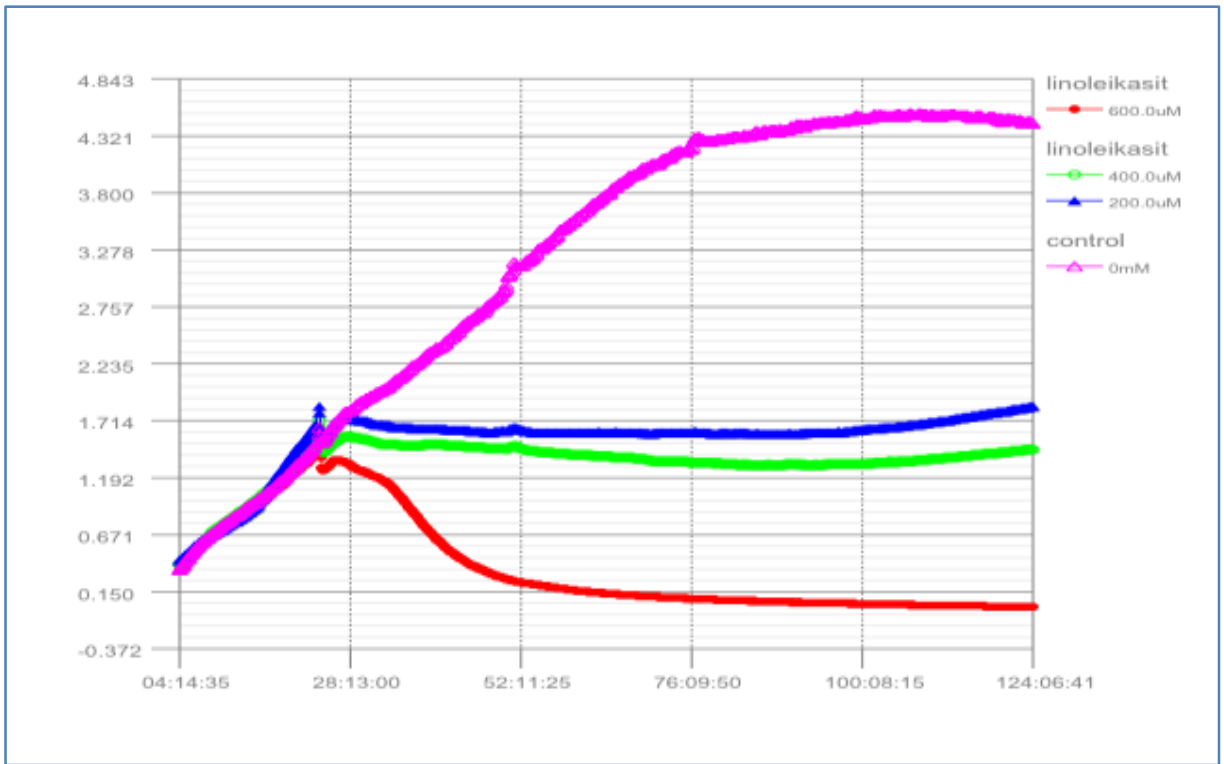
Şekil 3.2: Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 300, 400, 600, 800 μM H_2O_2 uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.



Şekil 3.3: 24 saat H_2O_2 uygulaması için IC_{50} değeri.

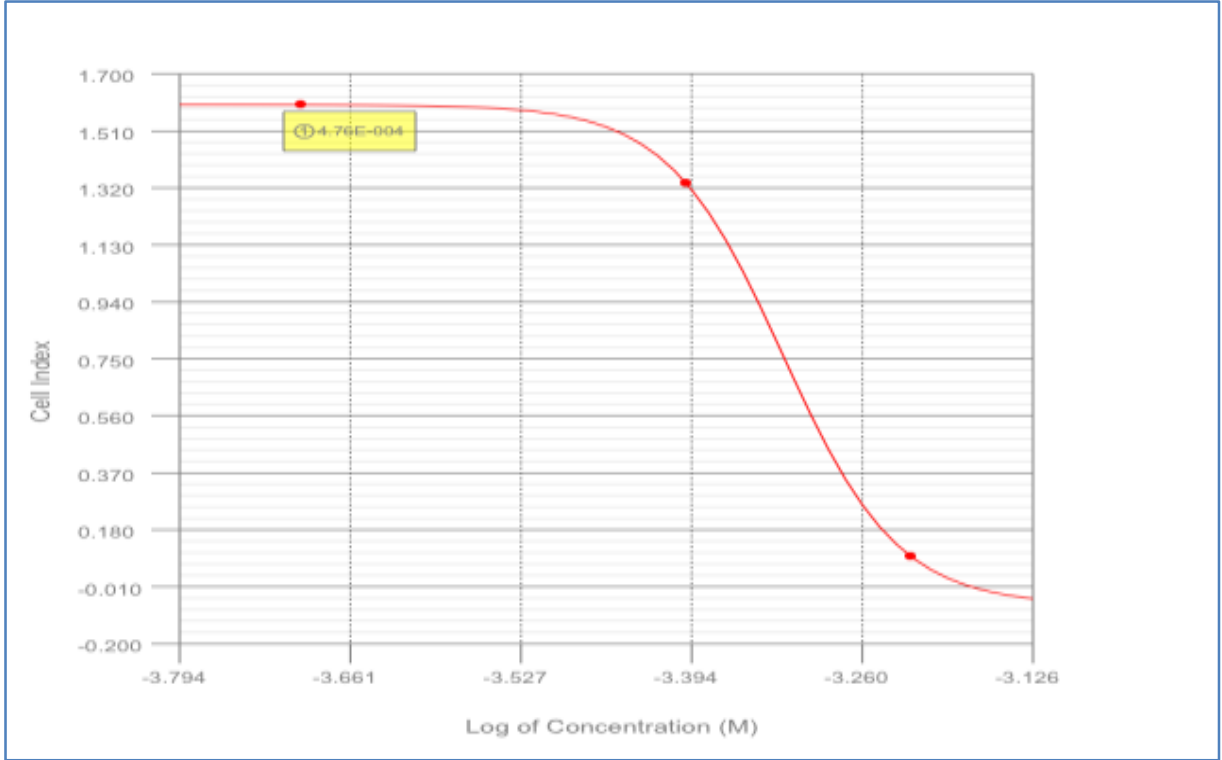
3.2. Linoleik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

3T3-L1 adipositlerine linoleik asit uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 200, 400, 600 μ M linoleik asit eklendi ve 124 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.4). 600 μ M linoleik asidin adipositler üzerinde öldürücü etkisi olduğu tespit edildi. 200 ve 400 μ M linoleik asidin 3T3-L1 adipositler üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu tespit edildi (Şekil 3.4). 24 saat linoleik asit uygulaması sonucunda IC50 değeri 480 μ M olarak tespit edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 200, 400, 600 μ M linoleik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.

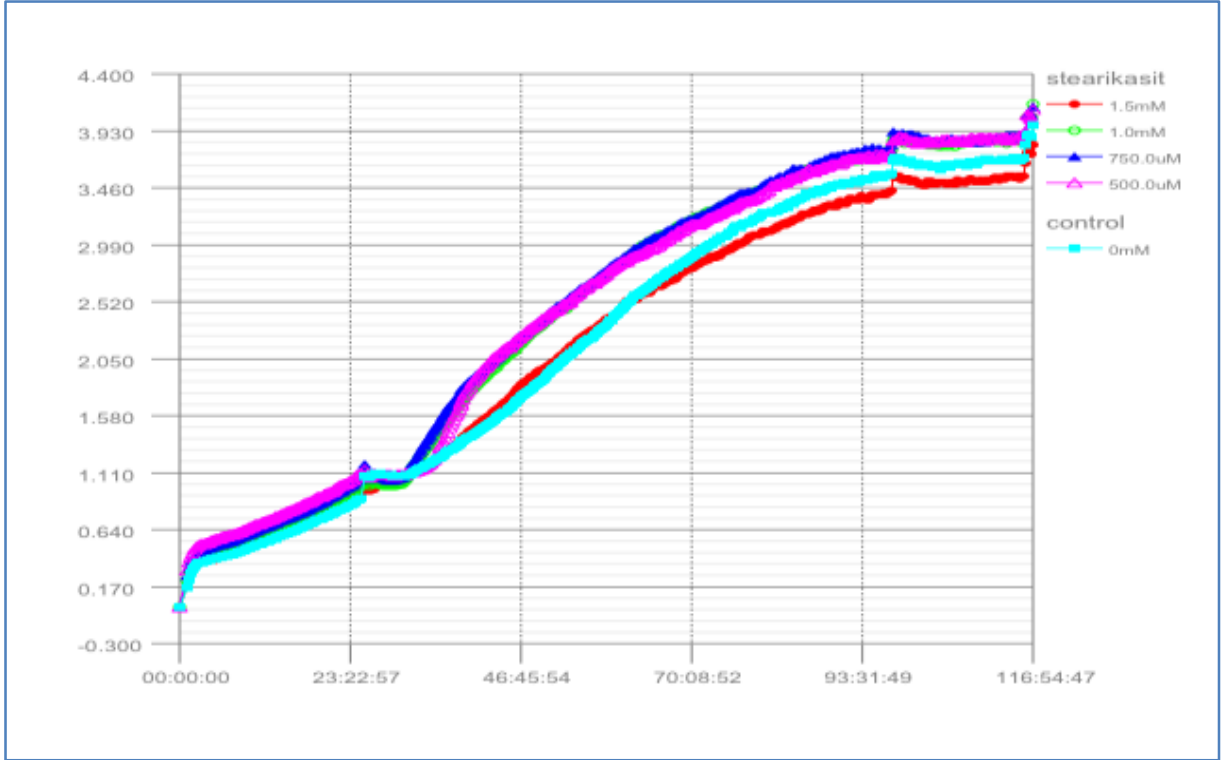
Linoleik asit uygulaması sonucu izlenen bu grafikler proliferasyonla ilgili olabileceği gibi hücredeki yağ miktarının azalmasından dolayı hücre boyutlarında oluşan küçülmeden de kaynaklanıyor olabilir düşüncesindeyiz.



Şekil 3.5: 24 saat lineloik asit uygulaması için IC50 değeri.

3.3. Stearik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

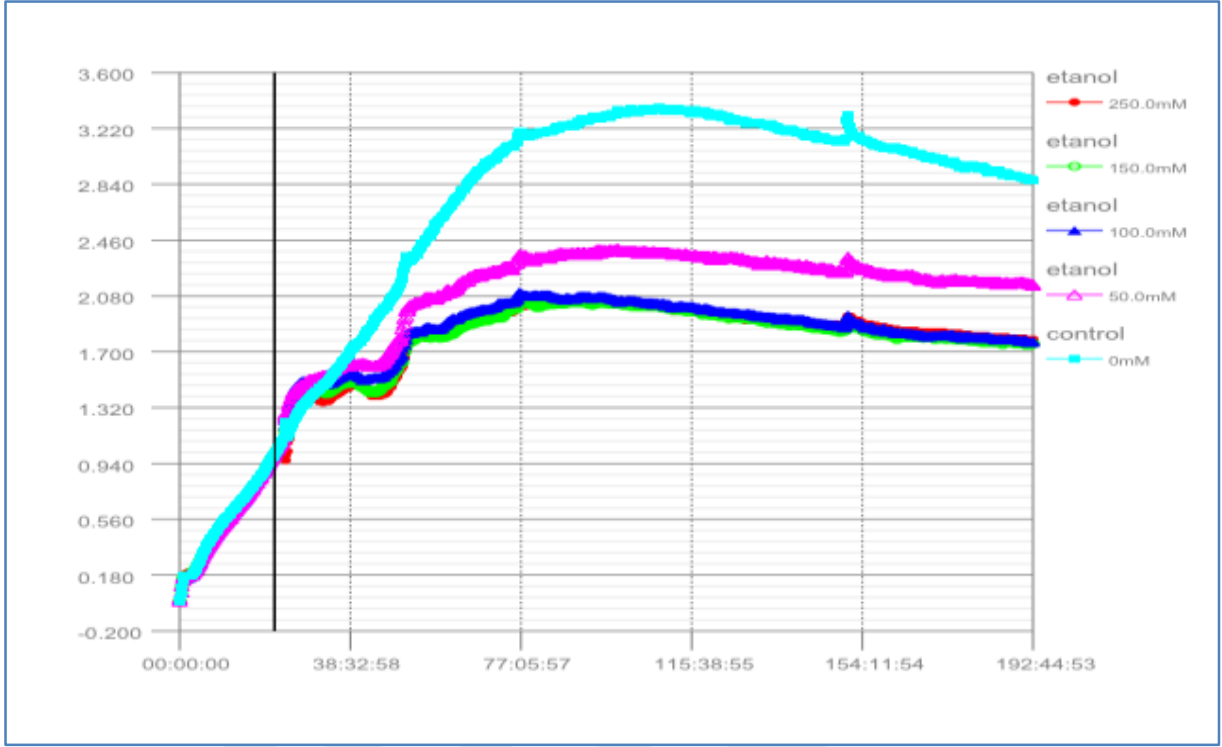
3T3-L1 adipositlerine stearik asit uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 500, 750, 1000, 1500 μM stearik asit eklendi ve 116 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.6). Çalışmada uygulanan bu dozlarda stearik asitin hücrelerin çoğalması üzerine etkisi tespit edilmedi.



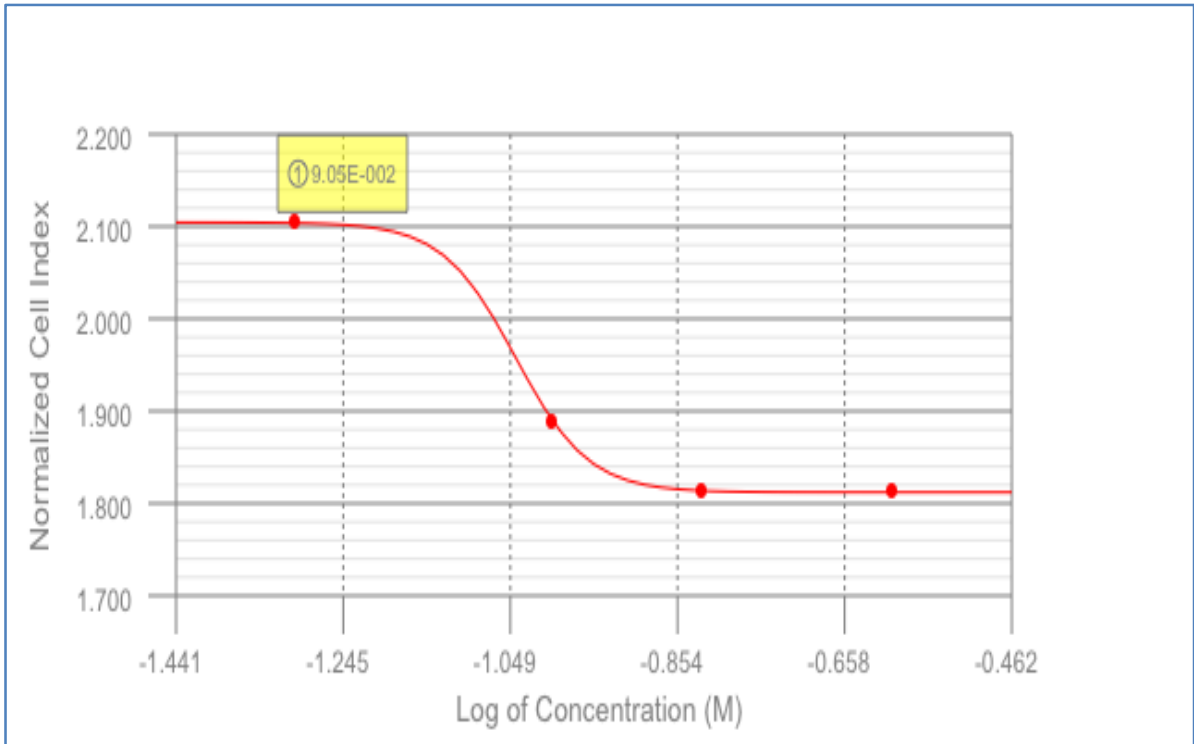
Şekil 3.6: Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 500, 750, 1000, 1500 μ M stearik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.

3.4. Etanol'ün 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

3T3-L1 adipositlerine etanol uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 250, 150, 100, 50 mM etanol eklendi ve 192 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.7). Çalışmada uygulanan normalize edilmiş şekli ile dozların kontrol grubuna göre proliferasyonu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.7). 24 saat etanol uygulaması sonucunda IC50 değeri 90 mM olarak tespit edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.7: Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 150, 250 mM etanol uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.

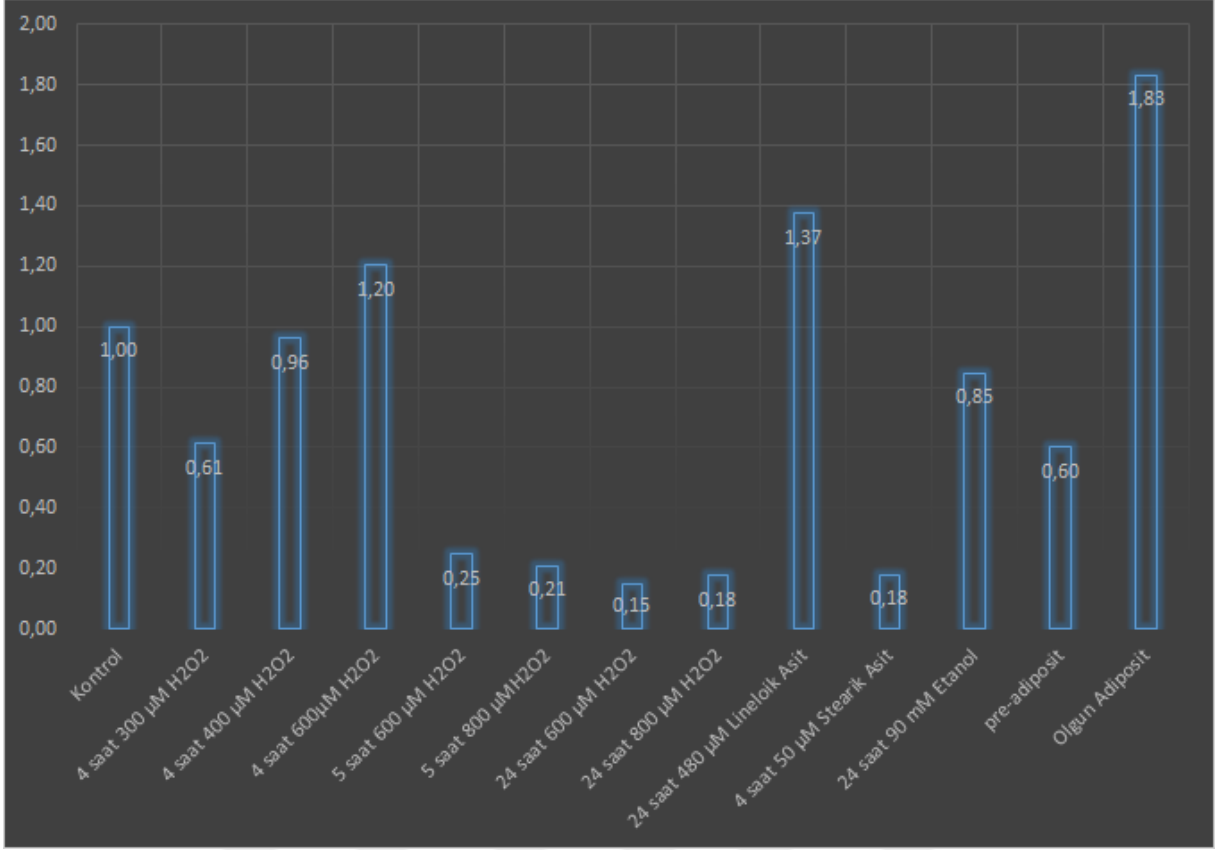


Şekil 3.8: 24 saat etanol uygulaması için IC50 değeri.

3.5. Farklı Dozlarda H₂O₂, Linoleik Asit, Etanol ve Stearik Asit Uygulaması Yapılan 3T3-L1 Adipositlerinde Niban Gen Anlatımı

Deney Grupları	Niban Genine ait Ct değerleri	Referans Gene ait (GAPDH) Ct değerleri
Kontrol	32,772	19,554
4 saat 300 µM H ₂ O ₂	32,924	19,001
4 saat 400 µM H ₂ O ₂	31,694	18,421
4 saat 600µM H ₂ O ₂	32,500	19,547
5 saat 600 µM H ₂ O ₂	32,631	17,388
5 saat 800 µM H ₂ O ₂	34,232	18,761
24 saat 600 µM H ₂ O ₂	31,362	15,402
24 saat 800 µM H ₂ O ₂	30,988	15,262
24 saat 480 µM Linoleik Asit	32,949	20,189
4 saat 50 µM Stearik Asit	31,526	15,829
24 saat 90 mM Etanol	31,635	18,175
pre-adiposit	31,006	17,052
Olgun Adiposit	30,595	18,249

Tablo 3.1: qPZR analizi ile elde edilen Niban ve GAPDH genlerine ait Ct değerleri.



Şekil 3.9: Farklı dozlarda H₂O₂, etanol, lineloik asit ve stearik asit uygulamaları sonucu Niban gen anlatımında herhangi madde uygulaması yapılmamış kontrole göre meydana gelen değişimler.

Niban gen anlatım seviyelerinin adipogenez sürecindeki değişimlerini tespit etmek için pre-adipositlerde ve yağ damlacıkları oldukça büyük bir şekilde gözlemlenebilen olgun adipositlerde Niban gen anlatımı değişimi beklenen yönde olmuştur. Her ikiside kontrole kıyaslandıklarında olgun adipositlerdeki Niban gen anlatım seviyesinde anlamlı (fold induction: 1,83) bir artış gözlenmiştir (**Şekil 3.9**).

4 saat 300 µM H₂O₂, 5 saat 600 µM H₂O₂, 5 saat 800 µM H₂O₂, 24 saat 600 µM H₂O₂, 24 saat 800 µM H₂O₂, 4 saat 50 µM stearik asit, uygulamaları sonucu Niban gen anlatımı seviyelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmektedir. 4 saat 400 µM H₂O₂ uygulaması sonucunda ise kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

24 saat 90 mM etanol uygulaması sonucu ise Niban gen anlatım seviyelerinde belirgin bir değişim kaydedilmedi.

4 saat 600 μ M H₂O₂ (fold induction:1,20)ve 24 saat 480 μ M lineloik asit (fold induction:1,37) uygulaması sonrası Niban gen anlatım seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir.

3.6. Tartışma

Ye F. ve ark. [54] yaptıkları proteom analizinde pre-adipositlerden farklı olarak, farklılaşmış ve yağ damlacıkları gözlemlenen adiposit hücrelerinde Niban proteinin anlatım yaptığını saptamışlardır. Adipogenez sürecinde yağlanmayla birlikte Niban geninin anlatımındaki artış bizim çalışmamızda da tespit edilmiştir. 21 gün boyunca kültüre edilmiş farklılaşmış adipositlerde büyük yağ damlacıkları gözlemlendikten sonra hücrelerin total RNA'ları izole edildi ve qPZR analizi sonucu Niban gen anlatımının yaklaşık 2 kat arttığı gözlemlendi. Farklılaşma sürecini ve dolayısıyla yağ birikimini yeterince sağlamamış olan pre-adipostlerde ise Niban gen anlatımı kontrole kıyasla daha düşük bulunmuştur.

Esensiyel yağ asitlerinden biri olan lineloik asit [85] ile yapılan çalışmalar daha çok konjuge lineloik asitin (KLA) adipositlerdeki proliferatif ve apoptoz üzerindeki etkileri üzerine olmuştur. Konjuge lineloik asit, çalışmada kullandığımız linoleik asitin (cis-9,cis-12 oktadekadienoik asit) pozisyonel ve geometrik izomerleri için verilen genel addir. Beyaz adipoz doku, KLA izomerlerin depolanmasında tercih edilen bir depo organ olduğundan çalışmalarda kullanılması tercih edilmektedir [86]. Yapılan birçok çalışmada KLA'nın vücut kütle oranını (*BMR*) ya da termogenezi azaltması yoluyla enerji harcanımını artırarak yağlanmayı azalttığını rapor etmektedir [87-90]. Literatürde yer alan in vivo ve in vitro çalışmaların sonuçlarına göre konjuge linoleik asitlerin, enerji metabolizması, adipogenez, inflamasyon, lipid metabolizması ve apoptoz gibi farklı mekanizmaların düzenlenmesi aracılığıyla yağlanmanın azalmasına sebep oldukları rapor edilmiştir [91].

Hayvan, [92] insan [93] ve in vitro [94] çalışmalarından elde edilen verilerde KLA'nın vücuda olan etkilerinin izomer spesifik olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde West D.B ve ark. farelerde KLA'nın enerji alımı üzerinde etkili olabileceğini [95], ancak insanla yaptıkları çalışmalarında belirgin etki saptamadıklarını rapor etmişlerdir [96,97]. Park Y. ve ark.'ları linoleik asidin C9T11 KLA izomerinin farelerin

gelişimi sırasında kilo alımını artırdığını ancak vücuttaki yağ miktarı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. [92]. Ancak söz konusu linoleik asit izomeri T10c12 olduğunda büyüme üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı ve vücut yağ kütlesini azalttığı rapor edilmiştir [92]. Benzer olarak linoleik asidin 10,12 KLA izomeri uygulamasının lipogenezi ve adipogenezi azalttığına dair bir çok çalışma mevcuttur [98-103]. Churruca I. ve ark. [104] farklı KLA izomerlerinin kanser, yağlanma, ateroskleroz, insülin direnci ve immün sistem üzerine olan etkilerinin birbirinden farklı olduğunu saptamışlardır. Riserus U. ve ark. [105] yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri bulgulara göre diyetle alınan KLA'nın vücut yağlanmasını azalttığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 4 hafta boyunca KLA uygulamasına maruz bırakılan metabolik sendromlu obez erkeklerde abdominal yağlanmada azalma olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalar KLA kullanımı ile yağ kütlesindeki hızlı azalmanın, beklenmedik bir şekilde lipodistrofi ile ilişkili olan insülin direnci ve hepatomegaliye sebep olduğunu göstermektedir [106,107]. Aynı zamanda Delany J.P. ve ark.'nın farelerle yaptıkları bir çalışmada KLA'nın vücut yağlanmasını azalttığını ancak hiperinsülinemi ve karaciğerde genişlemeye sebep olduğunu belirtmişlerdir [108]. Kasaoka N.T. ve ark. yaptığı çalışmada düşük yağlı bir diyetle KLA alımının lipodistrofiyi uyardığını rapor etmişlerdir [109]. Aynı araştırmacılar KLA kaynaklı adiposit apoptozunun TNF'nin belirgin artışı aracılığıyla gerçekleştiğini ve beyaz ile kahverengi adipoz dokularda azalma, karaciğerde yağ birikimi ve insülin direnci gibi etkilerin lipodistrofinin fenotipik karakteristikleri olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir [109]. Yapılan çalışmalar adipoz dokuda apoptozu uyaran TNF'in vücut yağlanmasını azaltarak hepatomegaliye ve insülin direncine yol açabileceği görüşünü desteklemektedir [110,111]. Sonuç olarak bu araştırmacılar çalışmalarında elde ettikleri verilerde KLA uygulamasının yağ kütlesini apoptoz yoluyla azalttığını saptamışlardır [109]. Shen W. ve ark. [112] çalışmalarında KLA'nın 10,12 ve 9,11 izomerlerinin yüksek seviyelerinin büyümekte olan farelerde adipoziteyi güçlü bir şekilde azalttığını ve bu azalmanın besin azlığından kaynaklanmadığını rapor etmişlerdir [112]. Ancak aynı araştırmacılar linoleik asidin 10,12 KLA izomerinin yüksek dozlarının steatoza sebep olduğunu, KLA alımının serumdaki insülin seviyelerini azalttığını ya da insülin direncine yol açtığını rapor etmişlerdir [112]. Ayrıca insülin direnci de dahil

olmak üzere metabolik hastalıklara karşı koruyan M2 makrofajları belirteçlerinin yüksek doz KLA uygulamasına cevap olarak gen anlatım seviyelerini de yüksek bulmuşlardır [112].

Akter S.H. ve ark. süt ineklerinde yaptıkları çalışmalarında KLA uygulaması sonucu adipoz dokudaki adiposit çapındaki küçülmenin KLA'nın lipolitik, antilipogenik ya da her iki etkiye işaret edebileceğini rapor etmişlerdir [114]. El Roz ve ark. t9,t11 KLA'nın MCF-7 (göğüs kanseri hücre hattı) hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini, hücre göçünü baskıladığını ve apoptozu uyardığını rapor etmişlerdir [115]. Parra P. ve ark. [113] farelerle yaptıkları çalışma sonucunda KLA izomerlerinin (cis-9, trans-11 ve trans-10, cis-12, yarı yarıya karışım halinde verilmiş) yağlanmayı azalttığını rapor etmişlerdir [113].

Yaptığımız çalışmada olgun adipositlere 480 µM LA uygulaması yapılmış ve sonrasında antiapoptotik etkili olduğu bilinen Niban geninin anlatımının kontrole kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Literatürdeki bilgilerin ışığında LA uygulamasının yağlanmayı azaltmasının yanı sıra bazı stres süreçlerini tetikleyip apoptotik süreçleri uyararak Niban gen anlatımının artmasına sebep olmuş olabilir düşüncesindeyiz.

Hidrojen peroksit sulu ve lipid ortamların varlığında çözünürlüğü ve yarı-ömrünün uzun olması gibi eşsiz biyokimyasal özellikleri nedeniyle eksojen oksidatif stres modeli tasarlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [116,117]. Ayrıca hidrojen peroksitinde üyesi olduğu reaktif oksijen türlerinin (ROT) apoptozu uyardığı bilinmektedir [118]. Bu çalışmada da oksidatif strese cevap olarak olgun 3T3-L1 hücrelerinde apoptotik yollarda rol alan Niban geninin anlatımını belirlemek amacıyla farklı doz ve sürelerde hidrojen peroksit uygulandı.

Literatürde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilerde H₂O₂'nin uygulama dozuna bağlı olarak nekrotik ve apoptotik ölüm süreçlerine neden olduğu bilinmektedir [119,120]. Gardner A. ve ark. L929 fibroblastları ve CAL-27 insan skuamöz hücreleri ile yaptıkları çalışmalarında geniş konsantrasyon aralıklarında hidrojen peroksit uygulamasının sitotoksosite üzerine etkilerini araştırmışlardır [121]. Bu araştırmacılar H₂O₂'nin 10 mM'ın üzerindeki yüksek konsantrasyonlarda nekroz yoluya hücre

ölümüne, 10 ve 5 mM hidrojen peroksit uygulamalarının endonükleozomal DNA parçalanmaları ile eş zamanlı olarak sitotoksisite ve apoptoza sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Hidrojen peroksitin 24 ve 48 saat 0,5 ve 0,1 mM'lık uygulamalarının sitotoksik etki ettiğini ancak apoptoz ya da nekroza sebep olmadığını rapor etmişlerdir. 0,1 mM altında olan konsantrasyonlarda ise 48 saatlik uygulama sonrası herhangi bir etki kaydetmemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışma sonucu elde ettikleri verilere dayanarak, hidrojen peroksit kaynaklı sitotoksik etkilerin konsantrasyona bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini rapor etmişlerdir [122]. Bizde çalışmamızda 3T3-L1 adipositlerinde 50, 100 ve 250 μM H_2O_2 'in geniş zaman aralığında hücre proliferasyonuna herhangi bir etkisi olmadığını; 300, 400 ve 600 μM H_2O_2 uygulamasında dozlarla paralel olarak antiproliferatif, 800 ve 1000 μM H_2O_2 uygulamasında ise letal etkisi olduğunu saptadık.

Wei H. ve ark. [123] yaptıkları, mezenkimal kök hücrelerine (MSC) 6-24 saat sürelerle hidrojen peroksitin farklı konsantrasyonlarının (0,06, 0,09, 0,12 mM) uygulandığı çalışmanın sonucunda H_2O_2 'nin apoptoz üzerine olan uyarıcı etkisinin, uygulanan doz ve zamana bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmadan elde edilen verilerde H_2O_2 'nin MSC'lerde hücre ölümünü hem mitokondriyal hem de ER stresi aracılı olarak uyardığı rapor edilmiştir. Annexin V-FITC/PI boyaması sonucu elde ettikleri verilerde 24 saat 0.06 mM H_2O_2 uygulaması sonucu hücrelerde apoptoz gözlemlediklerini; ($3.73 \pm \% 1.5$), 24 saat 0.09 mM ve 0.12 mM H_2O_2 uygulaması sonucu ise apoptotik hücre sayısının arttığını ($13.55 \pm \% 4.56$, $21.85 \pm \% 5.92$) rapor etmişlerdir. Araştırmacılar H_2O_2 'nin ER stresine de sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada düşük dozlarda uygulanan H_2O_2 'nin bile mezenşimal kök hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi olduğu belirtilmiştir. 0.12 mM H_2O_2 'in 6, 12 ve 24 saatlik sürelerde mezenkimal kök hücreler üzerine olan etkilerini incelemişler ve apoptotik hücre sayısının, etki süresiyle doğru orantılı olarak (sırasıyla $5.3 \pm \% 3.06$, $16.08 \pm \% 5.23$ ve $21.79 \pm \% 6.58$) arttığını gözlemlemişlerdir [123].

Bilgimiz dahilinde literatürde adipositlere H_2O_2 uygulaması ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple bu çalışmadan elde edilen veriler hidrojen peroksitin adiposit proliferasyonu ve Niban'ın rol aldığı ER stres aracılı apoptotik yolaktaki rolü hakkında bilgi veren ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır.

Yoon S. ve ark. HT1080 hücre soyu üzerinde yaptıkları çalışmada 500 μM H_2O_2 uygulamasının apoptotik süreci ve AKT-bağımlı antiapoptotik yolağı uyardığını saptamışlardır [124]. Niban'ın AKT-bağılı apoptotik yolakta rol aldığı bilindiğinden ve çalışmamızda 4 saat 600 μM H_2O_2 uygulaması Niban gen anlatımını arttırmış olduğundan [64] sonuçlarımız literatür bilgisini desteklemektedir.

Schaffler A. ve ark. [125] yaptıkları çalışmada 3T3-L1 adipositlerine 24 saat 10 μM 'lık stearik asit uygulaması adipositlerden adiponektin salımını yaklaşık 2 kat arttırken, 24 saat 100 μM stearik asit uygulamasında bu artışın yaklaşık 3 kat olduğu saptanmıştır. Adiponektinin vücut yağ oranı ile negatif korelasyon içinde olduğu, yağların oksidasyonuna sebep olduğu, apoptotik süreçlerde önemli rol alan TNF'yi baskılayıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir [126]. Furukawa S. ve ark. [13] hücre kültürü çalışmalarında oksidatif stres gibi stres koşullarının adiponektin salımını baskıladığını rapor etmişlerdir. Dolayısıyla yağlanma sonucu ortaya çıkabilen stres koşulları ile adiponektin salımını arasında negatif bir korelasyon olduğu açıktır.

iCELLigence deneylerinden elde ettiğimiz verilerde yaklaşık 120 saat boyunca 1,5 mM, 1mM, 750 μM ve 500 μM stearik asit uygulaması sonucu hücrelerin proliferasyon eğrilerinde kontrol grubuna göre bir farklılık saptanmamıştır. Ancak qPZR sonuçlarında 4 saat 50 μM stearik asit uygulaması sonrası Niban gen anlatım seviyeleri oldukça düşük bulunmuştur.

Etanol mitojenik büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunun baskılanması, glutatyon azalması, DNA hasarı ve endoplazmik retikulum stresini yoluyla apoptozu uyarır [127-131]. Kronik alkol alımı sitokinler, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi hücrelerde çeşitli stres koşullarını tetiklediği bilinen inflamatuvar moleküllerin artışı ile karakterizedir [132]. Etanol uygulaması reaktif oksijen türlerinin üretimini ve apoptozu uyardığına dair birçok çalışma bulunmaktadır [133-135].

Chen X. ve ark.'nın [132] sıçanlarda diyetle kronik olarak etanol alımının adiponektin gen anlatımları ve salınımları üzerine olan etkileri araştırdıkları çalışmalarında, 4 hafta boyunca kronik etanol alımının subkütanoz adipoz dokuda adiponektin mRNA sentezinde azalmaya sebep olduğunu ancak adiponektin protein seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Aynı zamanda izole edilmiş retroperitoneal ve

subkütanoz adipositlerde adiponektin salınımında da azalma kaydetmişlerdir. Sonuç olarak kronik etanol alımı sonucu subkütanoz ve retroperitoneal adipositlerden adiponektin salınımı bozulduğunu ve bu bozulma sonucu adiponektin konsantrasyonlarında azalmaya sebep olabileceğini vurgulamışlardır [132].

Etanol uygulaması sonucu hücre ölümlerinin uyarıldığına dair farklı hücrelerle yapılmış çalışmalar mevcuttur. Plante ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarında PC3 ve LNCaP hücrelerine 48 saat boyunca %4'lük etanol uygulaması sonucunda etanolün apoptotik yolda yol alan p21'in ekspresyonunu artırdığını ve hücrelerin hayatta kalmasında rol alan faktörler olan fosforillenmiş Akt ve Bcl-2'nin ekspresyonlarının ise azaldığını rapor etmişlerdir [136]. Idrus N.M. ve ark gelişmekte olan serebellumda etanolün purkinje hücreleri üzerine olan etkilerini araştırıldıkları çalışmalarında apoptozun uyarıldığını rapor etmişlerdir [137]. Higuchi H. ve ark. sıçan hepatositleriyle yaptıkları kültür çalışmalarında besiyerine ekledikleri 4 saat 50 mmol/L uygulamasının birçok hepatosit hücresinde DNA fragmentasyonuna sebep olduğunu rapor etmişlerdir [138]. Aynı araştırmacılar farklı bir çalışmalarında ise 100 mmol/L etanol uygulaması sonrası daha fazla apoptotik hücre tespit etmişlerdir [139]. Neuman M.G. ve ark. İn vitroda insan hepatositlerinde farklı dozlardaki (40, 60, 80/24 saat mmol/L) etanolün apoptoz süreçlerindeki etkisi araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda etanol aracılı apoptozun uygulanan doza ve süreye bağlı olarak değiştiğini rapor etmişlerdir [140]. Etanol içeren diyet ile beslenen sıçanlarda ve farelerde apoptoza uğrayan hücrelerin sayısında, dağılımında ve değişimlerinde artış olduğu rapor edilmiştir [141,142]. Bu araştırmacılar daha önceki çalışmalarında 80 mmol/L etanol uygulaması sonucu transmisyon elektron mikroskopisi ile mitokondri, endoplazmik retikulum, lipid veziküllerinde ve lipid damlacıklarının içeriğinde değişiklikler kaydetmişlerdir [143,144]. Normal görünümlü nukleuslara sahip hücrelerin mitokondrilerinde pleomorfizm, endoplazmik retikulumda dilatasyon ve vezikülleşme olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine birçok hücrede ise *bleb* yapılarının oldukça belirgin olduğunu rapor etmişlerdir. DNA yapısında meydana gelen fragmentasyonların oranının ise uygulanan doza ve süreye göre farklı olduğunu rapor etmişlerdir. Hücrelerde kontrol gruplarına göre apoptoz oranını 60 mmol/L etanol uygulaması sonucu $15 \pm \% 2$ (p, 0.05); 80 mmol/L etanol uygulaması sonrası $26 \pm \% 1$ (p, 0.001); 24 saatlik ardışık iki 80 mmol/L etanol uygulaması sonucu $55 \pm \% 3$ (p, 0.0001) olarak kaydetmişlerdir [140].

Sonuç olarak 24 saat 80 mmol/L'lık yüksek doz etanol uygulaması, DNA fragmentasyonu ölçümlerine dayanarak apoptozu artırdığını rapor etmişlerdir [140]. Nurmi K. ve ark. [145] etanol ve etanolün ilk metaboliti olan asetaldehit'in mast hücrelerinin yaşam, çoğalma ve apoptoz süreçlerindeki etkilerini insan mast hücre soyu (HMC-1), fare kemik iliği türevli mast hücreleri (mBMMC) ve insan periferal kan türevli mast hücreleri (HuMC) kullanarak incelemişlerdir. Aynı araştırmacılar hücelere 43, 86, 344, 860, 1720 ve 3440 mM etanol uygulaması yapmış ve hücrelerin canlılıklarını 4 gün boyunca gözlemlemişlerdir. 4 gün sonunda HMC-1 ve mBMMC hücrelerin canlılıklarında artan dozla ilişkili olarak düşüş rapor etmişlerdir (e HMC-1 ($p < 0.05$), mBMMC ($p = 0.057$)). Özellikle binde 5'lik 86 mM etanol uygulamasının hücre canlılığı üzerine oldukça fazla etkisi olduğunu kaydetmişlerdir. 1720 and 3440 mM'lık uygulamalarda ise sadece birkaç hücrenin canlı kaldığını belirtmişlerdir. Mast hücrelerinin etanol uygulamasına bağlı olarak proliferasyonları ise aynı çalışma grubu tarafından [3H] timidin alımına bağlı olarak ölçülmüş ve artan etanol dozuyla paralel olarak [3H] timidin alımlarında belirgin düşüş saptamışlardır (HMC-1 cells ($p < 0.0001$)) [145]. Vaculova ve ark. çalışmalarında etanolün ER stresine yol açtığı bilinen tunikamisin ve tapsigardin aracılı nöron hücre ölümünü tetiklediğini rapor etmişlerdir [146].

Volkmar M. ve ark. [66] 5 tip 2 diyabetli ve 11 diyabetik olmayan kadından aldıkları pankreas dokularından izole ettikleri β hücrelerinde DNA metilasyon profilini ortaya çıkarmışlardır. Deneyleri sonucunda elde ettikleri verilerde, ER stres sürecinde rol alan 2 genin (NIBAN ve CHAC1) T2D'li β hücrelerde hipometile olduğunu saptamışlardır. Bu genlerin ER stresindeki işlevlerini ortaya koyabilmek üzere yaptıkları daha ileri seviye çalışmalarında ise β hücrelerine ER stresörü oldukları bilinen palmitat, oleat, tapsigardin ve tunikamisin uygulamışlar ve Niban ve CHAC 1 gen anlatımları bu stresörlerin ER stres potansiyellerinin oranlarıyla paralel olarak artmış bulmuşlardır. Niban'ın siRNA ile knockdown edilmesi sonrası β hücrelerinde apoptoz oranının normale göre arttığı; CHAC1'in knockdown edilmesi ile de β hücrelerini apoptozdan korunduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışma grubu, CHAC1'in ER hemostazının yeniden kurulması aşamasında başarısız olduğunda apoptozu uyardığı savını ortaya atmışlardır. Araştırmacılar insan β hücrelerine yaptıkları çalışmalarında CHAC1 ve Niban'ın ER stres aracılı apoptotik yolda birbirlerine zıt etkili olarak çalıştıklarını

rapor etmişlerdir [66]. Niban'ın β hücrelerini apoptoza karşı korurken, CHAC1 aktivasyonu ile β hücrelerinin geri kazanım süreçlerinde başarısızlığa neden olduğu ve ER stresi aracılı apoptozu uyarıcı etkilerinin bulunduğu sonuçlarını elde edilmiştir [66-68].

Çalışmamızda iCELLigence deneylerinden elde edilen verilerde farklı dozlarda etanol ile muamele edilmiş adipositlerde kontrol grubuna göre proliferasyonun inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte qPZR sonuçlarımızda ise Niban gen anlatımında kayda değer bir değişim gözlemlenmemiştir. Adipositler ve diğer birçok hücrede stres koşullarının üstesinden gelinmediği durumlarda hücrelerin apoptoza yönlendirildikleri bilinmektedir. Ayrıca Volkmar M. ve ark.'nın [66] yaptığı çalışmaya göre Niban'ın CHAC1 adlı gen ile antogonistik çalıştığı bilindiğinden, etanol uygulanmış adipositlerde stres koşulları ilerlemiş olabileceğinden dolayı Niban gen anlatımı baskılanmaya başlanarak apoptotik mekanizmalar devreye girmiş olabilir.

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada linoleik asit (LA), stearik asit (SA), etanol ve hidrojen peroksit gibi bazı stres koşullarını tetiklediği bilinen 4 farklı ajanın olgun 3T3-L1 adipositlerinin proliferasyonlarına olan etkileri gerçek zamanlı hücre monitorizasyon sistemi kullanılarak incelenmiştir. 50, 100, 250, 300, 400, 600, 800 ve 1000 μM hidrojen peroksitin olgun adipositler üzerine olan etkisi geniş zaman aralığı boyunca gözlemlendi. 1 mM ve 800 μM hidrojen peroksitin 3T3-L1 adipositleri üzerine letal etkili olduğu; 300, 400 ve 600 μM 'ın dozlarla orantılı olarak antiproliferatif etki ettiğini ve 50, 100 ve 250 μM uygulamanın hücre çoğalmasında belirgin bir etkisi olmadığını gözlemledik. Bu sonuçlar farklı hücrelerle yapılan hücre kültürü çalışmalarından [119-123] elde edilen verilerle genel anlamda paralellik göstermektedir. 600, 400 ve 200 μM linoleik asit uygulamasının adiposit proliferasyonuna olan etkisi gerçek zamanlı olarak yaklaşık 120 saat boyunca incelendi ve 600 μM linoleik asitin adipositler üzerine letal etkili; 400 ve 200 μM linoleik asitin ise dozla orantılı olarak antiproliferatif etkili olduğu saptandı. Bu verilerden elde edilen IC50 değeri olan 480 μM linoleik asit uygulamasına cevap olarak ise antiapoptotik etkili Niban gen anlatımını normale göre yüksek bulundu.

Linoleik asitin hücreye olan etkisinin izomerine bağlı olarak değişim gösterdiği bilinmektedir [92-94]. Çalışmada kullandığımız LA izomeri ile apoptoz ve lipogenez ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bazı KLA izomerlerinin hücrelerde yağlanmayı azalttığı ancak bununla birlikte birtakım süreçlerde sorunlara yol açtığı bilindiğinden, çalışmamızda Niban gen anlatımının artmış bulunması 3T3-L1 adipositlerinde de birtakım stres koşullarının oluşumuna yol açtığı söylenebilir. iCELLigence sistemi zemine yapışan hücrelerin sayı ve hacmine bağlı olarak proliferasyon eğrisi verdiğinden linoleik asit uygulaması sonrası yağlanmanın azalmasına bağlı olarak hücrelerin hacminde de bir azalmaya sebep olacağından elde edilen bu grafikler hem hücre proliferasyonunun düşmesi hem de yağlanmanın azalması olarak yorumlanabilir.

Etanol ile yapılmış birçok çalışmada hücrelerde apoptoza yol açtığı rapor edilmiştir [136-146]. Çalışmamızda 250, 150, 100 ve 50 mM etanolün olgun adipositlerin proliferasyonu üzerine olan etkileri yaklaşık 190 saat boyunca incelendi.

Uygulanan tüm dozların kontrole göre antiproliferatif etkili olduğu tespit edildi. qPZR analizi sonuçlarında ise 90 mM etanol uygulamasında kontrole göre çok az bir azalma saptadık. Volkmar M. ve ark.'nın [66] yaptığı çalışmaya göre Niban'ın apoptoz sürecinde başka moleküllerle antogonistik çalışabileceği göz önüne alındığında, iCELLigence deneylerinden ve qPZR analizlerinden elde ettiğimiz bu sonuçlara göre etanol uygulanmış adipositlerde stres koşulları ilerlemiş olabileceğinden Niban gen anlatımı baskılanmaya başlanarak apoptotik mekanizmalar devreye girmiş olabilir.

Niban geninin adipogenik ve lipogenik süreçteki rolünün ortaya konulması amacıyla henüz yeni farklılaşmış ancak yağ birikimi çok az olan pre-adipositler ile uzun süre kültüre edilmiş ve aşırı yağ birikimi gözlemlenen yaşlı adipositlerde Niban gen anlatımı karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu deneyin sonunda yaşlı adipositlerdeki Niban gen anlatımı kontrole göre çok yüksek; pre-adipositlerdeki ise kontrole göre düşük bulunmuştur.

Niban geninin lipogenik ve adipogenik süreçte anlatım paternindeki değişimlerin saptanması için pre-adipositler ile aşırı yağ birikimi gerçekleşmiş yaşlı adipositlerden elde edilen total RNA'lerden karşılaştırmalı qPZR analizi yapılmıştır. Deney sonucu elde edilen verilerde Niban gen anlatımı kontrole göre pre-adipositlerde düşük; yaşlı adipositlerde yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlarımız 3T3-L1 pre-adiposit ve olgun adipositlerinde karşılaştırmalı proteom analizi yapan Ye ve ark.'nın [54] sonuçlarını desteklemektedir.

Özetle yaptığımız bu çalışmada, linoleik asit uygulamasının 3T3-L1 adipositlerinin yaşamsal aktiviteleri üzerine durdurucu etkiye sahip olduğu, hidrojen peroksit ve etanolün 3T3-L1 adipositlerinin yaşam ve proliferasyonlarına olan etkilerinin doza ve süreye bağlı olarak gerçekleştiği, stearik asit uygulamasının 3T3-L1 adipositlerinin yaşamsal aktiviteleri üzerine herhangi etkisinin olmadığını ve adipogenezle birlikte ortaya çıkan yağ birikiminin Niban gen ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

1. Moloney, F., Yeow, T.P., Mullen, A., Nolan, J.J., Roche, H.M. (2004) Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 887- 95.
2. Eckel, R.H., Grundy, SM., Zimmet, P.Z. (2005) The metabolic syndrome. *Lancet*, 365, 1415–28
3. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity insulin action and type2 diabetes. *Science*, 306, 457–461
4. Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J. 2001, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414, 782–87.
5. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1796–1808.
6. Cao, Y. (2010) Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 107–115.
7. Eckel, R.H. (2003) Obesity: mechanisms and clinical management. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins.
8. Hotamisligil GS. in *Diabetes Mellitus*, D. LeRoith, S. I. Taylor, J. M. Olefsky, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003), 953–962.
9. Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., Hotamisligil, G.S. (1997) Protection from obesityinduced insulin resistance in mice lacking TNF-a function. *Nature*, 389(6651), 610-4.
10. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G.S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420 (6913), 333-6.

11. Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., Shoelson, S.E. (2001) Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikk β . *Science*, 293(5535), 1673-7.
12. Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., Shimomura, I. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56, 901–911.
13. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1752–1761.
14. Cnop, M., Foufelle, F., Velloso, L.A. (2012) Endoplasmic reticulum stress obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, 18, 59–68.
15. Jiao, P., Ma, J., Feng, B., Zhang, H., Diehl, J.A., Chin, Y.E., Yan, W., Xu, H. (2011) FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKK β pathways. *Obesity (Silver Spring)*, 19, 483–491.
16. Alkhoury, N., Gornicka, A., Berk, M.P., Thapaliya, S., Dixon, L.J., Kashyap, S., Schauer, P.R., Feldstein, A.E. (2010) Adipocyte Apoptosis, a Link between Obesity, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3428-3438.
17. Kim, S., Moustaid-Moussa, N. (2000) Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *Journal of Nutrition*, 130, 3110S-3115S.
18. Morrison, R.F., Farmer, S.R. (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *Journal of Nutrition*, 130, 3116S-3121S.
19. Bays, H.E., González-Campoy, J.M., Bray, G.A., Kitabchi, A.E., Bergman, D.A., Schorr, A.B., Rodbard, H.W., Henry, R.R. (2008) Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6, 343-368.
20. Spiegelman, B.M., Flier, J.S. (1996). Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell*, 87, 377–389.

21. Lemonnier, D. (1972) Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *Journal of Clinical Investigation*, 51, 2907-2915.
22. Amri, E.Z., Ailhaud, G., Grimaldi, P.A. (1994) Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *The Journal of Lipid Research*, 35, 930-937.
23. Greenberg, A.S., Obin, M.S. (2006) Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 461S-465S.
24. Fu, M., Sun, T., Bookout, A.L., Downes M., Yu, R.T., Evans, R.M., Mangelsdorf D.J. (2005) A nuclear receptor atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Molecular Endocrinology*, 19, 2437-2450.
25. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., Sugiura, S. (2007) Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay Between Differentiating Adipocytes, Stromal Cells, and Blood Vessels. *Diabetes*, 56(6), 1517-26.
26. Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., Spiegelman, B.M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development* 14, 1293-1307.
27. Ailhaud, G., Grimaldi, P., Negrel, R. (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual Review of Nutrition*, 12, 207-233.
28. Burdi, A.R., Poissonnet, C.M., Garn, S.M., Lavelle, M., Sabet, M.D., Bridges, P. (1985) Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots. *International Journal of Obesity*, 9, 247-256.
29. Geloan, A., Roy, P.E., Bukowiecki L.J. (1989) Regression of white adipose tissue in diabetic rats. *American Journal of Physiology*, 257, 547-553.
30. Sul, H.S., Smas, C., Mei, B., Zhou, L. (2000) Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 24, 15-19.
31. Ntambi, J.M., Young-Cheul, K. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition*, 130, 3122-3126.

32. McDevitt, R.M., Bott, S.J., Harding, M., Coward, W.A., Bluck, L.J., Prentice A.M. (2001) De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 737-746.
33. Sebokova, E., Klimes, I. (1997) Molecular and cellular determinants of triglyceride availability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 827, 200-214.
34. Zechner, R., Strauss, J., Frank, S., Wagner, E., Hofmann, W., Kratky, D., Hiden M, Levak-Frank S. (2000) The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 24, 53-56.
35. Hirata, K., Dichek, H.L., Cioffi, J.A., Choi, S.Y., Leeper, N.J., Quintana, L., Kronmal, G.S., Cooper, A.D., Quertermous, T. (1999) Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14170-14175.
36. Marciniak, S.J., Ron, D. (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological Reviews*, 86, 1133–1149.
37. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7, 880-5.
38. Kaufman, R.J. (1999), *Genes & Development*, 13, 1211–1233.
39. Seydel, G.S., Aksoy, K. (2012) Endoplazmik Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 21(4), 221-235.
40. Y Ma, LM Hendershot. (2001) The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell*, 107, 827–830.
41. Randal J., Kaufman, D.S., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., Arnold, S.M. (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 411-421.
42. Kharroubi, I., Ladrière, L., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Cnop, M., Eizirik, D.L. (2004) Free Fatty Acids and Cytokines Induce Pancreatic β -Cell Apoptosis by Different Mechanisms: Role of Nuclear Factor- κ B and Endoplasmic Reticulum Stress. *Endocrinology*, 145(11), 5087–5096.

43. Kaufman R.J. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 1389–98.
44. Gregor, M.F, Hotamisligil, G.S. (2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of lipid research*, 48(9), 1905-1914.
45. Hussain, S.G, Ramaiah, K.V.A. (2007) Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis. *Current Science*, 93, 1684-96.
46. Brostrom, C.O., Brostrom, M.A. (1998) Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 58, 79–125.
47. Brewer, J.W., Hendershot, L.M, Sherr, C.J., Diehl, J.A. (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8505-8510.
48. Brewer, J.W., Diehl, J.A. (2000) PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12625-12630.
49. Tabas, I., Ron, D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184–190.
50. Adachi, H., Majima, S., Kon, S., Kobayashi, T., Kajino, K., Mitani, H., Hirayama, Y., Shiina, H., Igawa, M., Hino, O. (2004) Niban gene is commonly expressed in the renal tumors: a new candidate marker for renal carcinogenesis. *Oncogene*, 23(19), 3495-3500.
51. Majima, S., Kajino, K., Fukuda, T., Otsuka, F., Hino, O. (2000) A novel gene ‘Niban’ upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA amplified fragment length polymorphism approach. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91, 869–874.
52. Matsumoto, F., Fujii, H., Abe, M., Kajino, K., Kobayashi, T., Matsumoto, T., Ikeda, K., Hino, O. (2006) A novel tumor marker, Niban, is expressed in subsets of thyroid tumors and Hashimoto’s thyroiditis. *Human Pathology*, 37(12), 1592-1600.

53. Sun, G.D., Kobayashi, T., Abe, M., Tada, N., Adachi, H., Shiota, A., Totsuka, Y., Hino, O. (2007) The endoplasmic reticulum stress-inducible protein Niban regulates eIF2 α and S6K1/4E-BP1 phosphorylation *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360, 181–187
54. Ye, F., Zhang, H., Yang, Y.X., Hu, H.D. Sze, S.K., Meng, W., Qian, J., Ren, H., Yang, B.L., Luo, M.Y., Wu, X., Zhu, W., Cai, W.J., Tong, J.B. (2011) Comparative proteome analysis of 3T3-L1 adipocyte differentiation using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 3002–3014.
55. Vousden, K.H., Prives, C. (2009) Blinded by the Light: the Growing Complexity of p53. *Cell*, 137, 413–431.
56. Whibley, C., Pharoah, P.D, Hollstein, M. 2009, p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews Cancer*, 9, 95–107.
57. Levine, A.J, Tomasini, R., McKeon, F.D., Mak, T.W., Melino, G. (2011) The p53 family: guardians of maternal reproduction *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 259–265.
58. Junttila, M.R., Evan, G.I. (2009) p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer*, 9, 821–829.
59. Chene, P. (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3, 102–109.
60. Kruse, J.P., Gu, W. (2009) Modes of p53 regulation. *Cell*, 137, 609–622.
61. Iwakuma, T., Lozano, G. (2003) MDM2, an introduction. *Molecular Cancer Research*, 1, 993–1000.
62. Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B., Pelicci, P.G. (2002) Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biology*, 4, 529–533.
63. Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T.M., Ojala, P.M, Meek, D., Laiho, M. (2004) Nucleolar protein NPM interact with HDM2 and protect tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*, 5, 465–475.

64. Ji, H., Ding, Z., Hawke, D., Xing, D., Jiang, B.H., Mills, G.B., Lu, Z. (2012) AKT-dependent phosphorylation of Niban regulates nucleophosmin- and MDM2-mediated p53 stability and cell apoptosis. *EMBO reports*; 13, 554–560.
65. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790), 1137-1140.
66. Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D.A., Ndlovu, M.N., Defrance, M., Deplus, R., Calonne, E., Volkmar, U., Igoillo-Esteve, M., Naamane, N., Del Guerra, S., Masini, M., Bugliani, M., Marchetti, P., Cnop, M., Eizirik, D.L., Fuks, F. (2012) DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *The EMBO Journal*, 31, 1405–1426.
67. Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., Cnop, M. (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 29(1), 42-61.
68. Eizirik, D.L., Cnop, M. (2010) ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. *Science Signaling*, 3(110),7
69. Zhou, J.R., Blackburn, G.L., Walker, W.A. (2007) Symposium introduction: metabolic syndrome and the onset of cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 817–819.
70. Esposito, K., Chiodini, P., Colao, A., Lenzi, A., Giugliano, D. (2012) Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 35(11), 2402-2411.
71. Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., Zwahlen, M. (2008) Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*, 371, 569–578.
72. Nicolucci, A. (2010) Epidemiological aspects of neoplasms in diabetes. *Acta Diabetologica*, 47, 87–95.
73. Cowey, S., Hardy, R.W. (2006) The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer?. *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1505-1522.

74. Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*, 348, 1625–1638.
75. Friedenreich, C.M. (2001) Review of anthropometric factors and breast cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention*, 10, 15–32.
76. Morimoto, L.M., White, E., Chen, Z., Chlebowski, R.T., Hays, J., Kuller, L., Lopez, A.M., Manson, J., Margolis, K.L., Muti, P.C., Stefanick, M.L., McTiernan, A. (2002) Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control*, 13, 741–751.
77. Shin, I., Hiroaki, F., Toshiharu, M., Masaaki, A., Katsuhisa, I., Okio H. (2010) Frequent expression of Niban in head and neck squamous cell carcinoma and squamous dysplasia. *HeadNeck*, 32, 96–103.
78. Kannangai, R., Diehl, A.M., Sicklick, J., Rojkind, M., Thomas, D., Torbenson, M. (2005) Hepatic angiomyolipoma and hepatic stellate cells share a similar gene expression profile. *Human Pathology*, 36, 341–347.
79. Nicola, F., Federica, P., Chiara R., Giuseppe, M., and Alberto, C., (2015) Aliskiren inhibits prorenin-induced human aortic smooth muscle cell migration. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*, 16(2), 284–291.
80. Pan, T., Huang, B., Zhang, W., Gabos, S., Huang, D.Y., Devendran, V. (2013) Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration time-dependent cellular response curves. *Analytica Chimica Acta*, 764: 44-52.
81. <http://www.aceabio.com.cn/theory.aspx> (01.04.2016)
82. Miard, S., Dombrowski, L., Carter, S., Boivin, L., Picard, F. (2009) Aging alters PPARgamma in rodent and human adipose tissue by modulating the balance in steroid receptor coactivator-1. *Aging Cell*, 8(4), 449-59.
83. Chavez, J.A., Holland, W.L., Bar, J., Sandhoff, K., Summers, S.A. (2005) Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 20148–20153.
84. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45.
85. The Merck Index, 12th ed., Entry# 5529.

86. Andreoli, M.F, Illesca P.G., Gonzalez, M.A., Bernal, C.A. (2010) Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis and restores liver triacylglycerol secretion and the fatty acid profile during protein repletion in rats. *Lipids*. 45, 1035 – 1045.
87. West, D.B., Blohm, F., Truett, A., DeLany, J. (2000). Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *Journal of Nutrition*, 130, 2471 – 2477.
88. Terpstra, A.H., Beynen, A., Everts, H., Kocsis, S., Katan, M., Zock, P. (2002). The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *Journal of Nutrition*, 132, 940 – 945.
89. Terpstra, A.H., Javadi, M., Beynen, A., Kocsis, S., Lankhorst, A., Lemmens, A., Mohede, I. (2003) Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. *Journal of Nutrition*, 133, 3181 – 3186.
90. Ohnuki, K., Haramizu, S., Oki, K., Ishihara, K., Fushiki, T. (2001). A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids*. 36, 583 – 587.
91. Kennedy, A., Martinez, K., Schmidt, S., Mandrup, S., LaPoint, K., McIntosh, M. (2010) Antiobesity Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(3), 171–179.
92. Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W. (1999). Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34:235–41.
93. Malpuech-Brugère, C., Verboeket-van de Venne, W.P., Mensink, R.P., Arnal, M.A., Morio, B., Brandolini, M., Saebo, A., Lassel, T.S., Chardigny, J.M., Sébédio, J.L., Beaufrère, B. (2004) Effects of two conjugated linoleic Acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obesity Research*, 12(4), 591-8.
94. Brown, J.M., Halvorsen, Y.D., Lea-Currie, Y.R., Geigerman, C., McIntosh, M. (2001) Trans-10,cis-12, but not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid attenuates

- lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *Journal of Nutrition*, 131:2316–21.
95. West, D.B., Delany, J.P., Camet, P.M., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J (1998) Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *American Journal of Physiology*, 275(3), 667–72.
96. Zambell, K.L., Keim, N.L., Van Loan, M.D., Gale, B., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids*, 35, 777–82.
97. Medina, E.A., Horn, W.F., Keim, N.L., Havel, P.J., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J., Erickson, K.L. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids*, 35, 783–8.
98. House, R.L., Cassady, J.P., Eisen, E.J., Eling, T.E., Collins, J.B., Grissom, S.F., Odle, J. (2005) Functional genomic characterization of delipidation elicited by trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice. *Physiological Genomics*, 21, 351–61.
99. Kang, K., Liu, W., Albright, K.J., Park, Y., Pariza, M.W. (2003) Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303,795–9.
100. Brown J. M., Boysen, M.S., Jensen, S.S., Morrison, R.F., Storkson, J., Lea-Currie, R., Pariza, M., Mandrup, S., McIntosh, M.K. (2003) Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ by conjugated linoleic acid (CLA) in human preadipocytes. *The Journal of Lipid Research*, 44(7), 1287–300.
101. Brown J. M., Boysen, M.S., Chung, S., Fabiyi, O., Ron, F.M., Mandrup, S., McIntosh, M.K. (2004) Conjugated linoleic acid (CLA) induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 26735–47.
102. Granlund, L., Pedersen, J.I., Nebb, H.I. (2005) Impaired lipid accumulation by trans10,cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1687, 11–22.

103. LaRosa, P.C., Riethoven, J.M., Chen, H., Xia, Y., Zhou, Y., Chen, M., Miner, J., Fromm, M.E. (2007) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes. *Physiological Genomics*, 31, 544–553.
104. Churruga, I., Ferná'ndez-Quintela, A., Portillo, M.P. (2009) Conjugated linoleic acid isomers: Differences in metabolism and biological effects. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 105–111.
105. Riserus, U., Berglund, L., Vessby, B. (2001) Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 25 (8), 1129–1135.
106. Lawrence, R.D. (1946) Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances. *Lancet* 1:724–731.
107. Seip, M., Trygstad, O. (1996) Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatrica*. 413:2–28.
108. Delany, J.P., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.A., West, D.B. (1999) Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *American Journal of Physiology*, 276, 1172–1179.
109. Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S., Ezaki, O. (2000) Conjugated Linoleic Acid Supplementation Reduces Adipose Tissue by Apoptosis and Develops. *Diabetes*, 49, 1534–1542.
110. Prins, J.B., Niesler, C.U., Winterford, C.M., Bright, N.A., Siddle, K., O'Rahilly, S., Walker, N.I., Cameron, D.P. (1997) Tumor necrosis factor-induced apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46:1939–1944.
111. Semb, H., Peterson, J., Tavernier, J., Olivecrona, T. (1987) Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 8390–8394.
112. Shen, Wan., Chuang, C.C., Martinez, K, Reid, T., Brown, J. M., Xi, L., Hixson, L., Hopkins, R., Starnes, J., McIntosh, M. (2013) Conjugated linoleic acid reduces adiposity and increases markers of browning and inflammation in white adipose tissue of mice. *Journal of Lipid Research*, 54(4): 909–922.

113. Parra, P., Palou, A., Serra, F. (2010) Moderate doses of conjugated linoleic acid reduce fat gain, maintain insulin sensitivity without impairing inflammatory adipose tissue status in mice fed a high-fat diet. *Nutrition & Metabolism*, 7, 5.
114. Akter, S.H., Häussler, S., Dänicke, S., Müller, U., Soosten, D., Rehage, J., Sauerwein, H. (2011) Physiological and conjugated linoleic acid-induced changes of adipocyte size in different fat depots of dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2871–2882.
115. Roz, A.E. Barda, J.M. Huvelin, J.M. Nazih, H. (2013) The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the trans9,trans11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 88(4), 265–272.
116. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47–95.
117. Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A.M. (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 49–89.
118. Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), 415-8.
119. Lennon, S.V., Martin, S.J., Cotter, T.G. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, 24, 203–214.
120. Escargueil-Blanc, I., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. (1994) Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *The FASEB Journal*. 8, 1075–1080.
121. Gardner, A.M., Xu F.H., Fady, C., Jacoby, F.J., Duffey, D.C., Tu, Y., Lichtenstein, A. (1997) Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 73–83.

122. Agnes M. Gardner, Feng-hao Xu, Catherine Fady, Fred J. Jacoby, Dianne C. Duffey, Yiping Tu, Alan Lichtenstein. (1997) Free Radical Biology & Medicine, 22, 73–83.
123. Wei, H., Li, Z., Hu, S., Chen, X., Cong, X. (2010) Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(4), 967-78.
124. Yoon, S.O., Kim, M.M., Park, S.J., Kim, D., Chung, J., Chung, A.S. (2002) Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways. *FASEB Journals*, 16(1), 111-3.
125. Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich, J., Falk, W. (2009) Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-κB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*, 126(2), 233–245.
126. Goldstein, B.J., Scalia, R. (2004) Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2563-8.
127. Luo, J., Miller, M.W. (1996) Ethanol inhibits basic fibroblast growth factor-mediated proliferation of C6 astrocytoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 67, 1448–1456.
128. McVicker, B.L., Tuma, P.L., Kharbanda, K.K., Lee, S.M., Tuma, D.J. (2009) Relationship between oxidative stress and hepatic glutathione levels in ethanolmediated apoptosis of polarized hepatic cells. *World Journal of Gastroenterology*, 15,2609–2616.
129. Cherian, P.P., Schenker, S., Henderson, G.I. (2008) Ethanol-mediated DNA damage and PARP-1 apoptotic responses in cultured fetal cortical neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32, 1884–1892.
130. Hoek, J.B., Cahill, A., Pastorino, J.G. (2002) Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology*, 122, 2049–2063.

131. Chen, G., Ma, C., Bower, K.A., Shi, X., Ke, Z., Luo, J. (2008) Ethanol promotes endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death: involvement of oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 937–946.
132. Chen, Xi., Sebastian, B.M., Nagy, L.E. (2007) Chronic Ethanol Feeding to Rats Decreases Adiponectin Secretion by Subcutaneous Adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(2), E621–E628.
133. Flora, S.J., Gautam, P., Kushwaha, P. (2012) Lead and ethanol co-exposure lead to blood oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis in rats. *Alcohol*, 47,92–101.
134. Das, S.K., Vasudevan, D.M. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences*, 81, 177–187.
135. Olney, J.W., Ishimaru, M.J., Bittigau, P., Ikonomidou, C. (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis*, 5, 515–521.
136. Plante, M.K., Arscott, W.T., Folsom, J.B., Tighe, S.W., Dempsey, R.J., Wesley, U.V. (2013) Ethanol promotes cytotoxic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through induction of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Prostate Cancer and Prostatic Disease*, 16, 16–22.
137. Idrus, N.M., Napper, R.M. (2012) Acute and long-term purkinje cell loss following a single ethanol binge during the early third trimester equivalent in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 8, 1365–1373.
138. Higuchi, H., Kurose, I., Kato, S., Miura, S., Ishii, H. (1996) Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20, 340–6.
139. Kurose, I., Higuchi, H., Miura, S., Saito, H., Watanabe, N., Hokari, R., Hirokawa, M., Takaishi, M., Zeki, S., Nakamura, T., Ebinuma, H., Kato, S., Ishii, H. (1997) Oxidative stress mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology*, 25,368–79.
140. Manuela, G., Neuman, N.H., Shear, R.G., Cameron, G.K., Claudio, T. (1999) Ethanol-Induced Apoptosis In Vitro. *Clinical Biochemistry*, 32(7), 547–555.

141. Benedetti, A., Brunelli, E., Risicato, R., Cilluffo, T., Jezequel, A.M., Orlandi, F. (1998) Subcellular changes and apoptosis induced by ethanol in rat liver. *Journal of Hepatology*, 6, 137–43.
142. Goldin, R.D., Hunt, N.C., Clarck, J., Wickramasinghe, S.N. (1993) Apoptotic bodies in a murine model of alcoholic liver disease: Reversibility of ethanol-induced changes *The Journal of Pathology*, 171, 173–6.
143. Neuman, M.G., Koren, G., Tiribelli, C. In vitro, assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on Hep G2 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 931–42.
144. Cameron, R.G., Neuman, M.G., Shear, N.H., Katz, G., Bellentani, S., Tiribelli, C. (1998) Cellular response to ethanol in vitro in Hep G2 cells: A quantitative study. *Toxicology in Vitro*, 12, 111–22.
145. Nurmi, K., Methuen, T., Mäki, T., Lindstedt, K.A., Kovanen, P.T., Sandler, C., Eklund, K.K. (2009) Ethanol induces apoptosis in human mast cells. *Life Sciences*, 85, 678–684.
146. Vaculova, A., Hofmanova, J., Soucek, K., Andera, L., Kozubik, A. (2004) Ethanol acts as a potent agent sensitizing colon cancer cells to the TRAIL-induced apoptosis *FEBS Letters*, 577, 309–313.