



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**NARENCİYE ALKALOİDİ OLAN LİMONİN VE NOMİLİNİN
PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON VE
DİFERANSİYASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ABDULLAH BARANSEL YALÇIN

**KÖK HÜCRE VE REJENERATİF TIP
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
HAZİRAN- 2022**

T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**NARENCİYE ALKALOİDİ OLAN LİMONİN VE NOMİLİNİN
PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON VE
DİFERANSİYASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ABDULLAH BARANSEL YALÇIN

ORCID ID: 0000-0002-7386-3777

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi AHMET SENCER YURTSEVER

**KÖK HÜCRE VE REJENERATİF TIP
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
HAZİRAN- 2022**

ETİK BEYAN

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

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

ETHICAL DECLARATION

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

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

...../...../ 2020

İmza / Signature

Abdullah Baransel YALÇIN

ÖZET

NARENCİYE ALKALOİDİ OLAN LİMONİN VE NOMİLİN'İN PREADİPOZİTLERDE (3T3-L1) PROLİFERASYON VE DİFERANSİYASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmanın amacı narenciye meyvelerinde bulunan limonin ve nomilin alkaloidlerinin adiposit farklılaşması için yaygın olarak kullanılan preadiposit 3T3-L1 hücre hattı üzerinde proliferasyon ve diferansiyasyona etkisinin belirlenmesidir. Limonin ve nomilin 3T3-L1 preadipositlerinde proliferasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla diferansiyasyon protokolünün 0-4'üncü günleri boyunca 5, 10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarda limonin ve nomilin uygulaması yapıldı (n=4). Alkaloidlerin proliferasyon üzerine etkisi MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) analizi ile ölçüldü. Limonin ve nomilin 3T3-L1 preadipositlerinde diferansiyasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla diferansiyasyon protokolünün 0-8'inci günleri boyunca 5, 10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarda limonin ve nomilin uygulaması yapıldı (n=4). Alkaloidlerin diferansiyasyon üzerine etkisi ise Oil Red O boyama yöntemi ile ölçüldü. İlaveten nomilin ve limoninin hücre viabilitesi üzerine etkisi de değerlendirildi. Hücre viabilitesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği deney serilerinde limonin ve nomilin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat süresince hücre kültür ortamına uygulandı (n=4) ve sonuçlar MTT analizi yapılarak değerlendirildi. Test edilen tüm konsantrasyonlarda limonin ve nomilin 3T3-L1 preadipositlerinin canlılığı üzerine bir etki oluşturmadı. Diferansiyasyon protokolünün 0-4'üncü günlerinde 5 mcg/ml ve 25 mcg/ml konsantrasyonda uygulanan limonin, 3T3-L1 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı olarak artırırken 10 mcg/ml konsantrasyonda bir etki yapmadı. Nomilin uygulanan dozlarda 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadı. Nomilin, uygulanan tüm konsantrasyonlarda 3T3-L1 hücrelerinin terminal diferansiyasyonunu doza bağımlı şekilde anlamlı olarak süprese etti. Limoninin diferansiyasyon üzerine herhangi bir etkisi olmadı. Sonuç olarak, bir narenciye alkaloidi olan nomilin 3T3-L1 hücrelerinde preadiposit farklılaşmasını süprese edebileceği görülmektedir. Bu nedenle, potansiyel olarak bu alkaloidin anti-obezite etkisi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Obezite, 3T3-L1, Nomilin, Limonin, Narenciye alkaloidleri, diferansiyasyon, proliferasyon.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Sencer YURTSEVER, Mersin Üniversitesi, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

EFFECTS OF THE LIMONIN AND NOMILIN, CITRUS ALKALOIDS, ON PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION ON PREADIPOCYTES (3T3-L1)

The aim of this study was to determine the effects of limonin and nomilin alkaloids in citrus fruits on proliferation and differentiation on the preadipocyte 3T3-L1 cell line, which is widely used for adipocyte differentiation. In order to evaluate the effects of limonin and nomilin on proliferation in 3T3-L1 preadipocytes, limonin and nomilin were administered at 5, 10 and 25 mcg/ml concentrations during the 0-4 days of the differentiation protocol (n=4). The effect of alkaloids on proliferation was measured by MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) analysis. In order to evaluate the effects of both alkaloids on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes, limonin and nomilin were applied at concentrations of 5, 10 and 25 mcg/ml during the 0-8th days of the differentiation protocol (n=4). The effect of alkaloids on differentiation was measured by Oil Red O staining method. In addition, the effects of nomilin and limonin on cell viability were also evaluated. In the experimental series in which the effects of limonin and nomilin on cell viability were evaluated, limonin and nomilin were applied at concentrations of 5, 10 and 25 mcg/ml to the cell culture medium for 48 and 96 hours, and the results were evaluated by MTT analysis (n=4). Limonin and nomilin at all concentrations tested had no effect on the viability of 3T3-L1 preadipocytes. Limonin applied at 5 mcg/ml and 25 mcg/ml concentrations on days 0-4 of the differentiation protocol significantly increased the proliferation of 3T3-L1 cells, but did not have an effect at 10 mcg/ml concentration. Nomilin had no significant effect on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes at administered doses. Nomilin significantly suppressed the terminal differentiation of 3T3-L1 cells at all applied concentrations in a dose-dependent manner. Limonin had no effect on differentiation. In conclusion, it seems that nomilin, a citrus alkaloid, can suppress preadipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Therefore, potentially this alkaloid may have an anti-obesity effect.

Keywords: Obesity, 3T3-L1, Nomilin, Limonin, Citrus.

Advisor: Dr. Ahmet Sencer YURTSEVER, Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde bana yol gösteren, bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve anlayışla beni destekleyen danışman hocam Sn. Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Sencer YURTSEVER'e;

Tez konusunun belirlenmesinde, bulguların yorumlanmasında değerli katkıları ve kazandırdığı bilimsel bakış açısı için Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a

Tezimde kullandığım 3T3-L1 hücrelerini bizimle paylaşarak büyük bir yardımda bulunan değerli bilim insanı Sn.Prof. Dr. Reşat ÜNAL'a

Yüksek lisans eğitimime başlamam için beni cesaretlendiren ve desteğini her zaman hissettiğim Sn. Prof. Dr. Selma ÜNAL'a

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da yanımda olan ve koşulsuz desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Nuray SOBACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2021-1-TP2-4239 proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	2
2.1. Obezite, Tanımı, Nedenleri, Komorbiditeler	2
2.2. Yağ Dokusu	4
2.3. Yağ Dokusu Tipleri	4
2.3.1. Beyaz Yağ Doku	4
2.3.2. Kahverengi Yağ Doku	5
2.3.3. Bej Yağ Doku	6
2.4. Lipogenez ve Lipoliz	7
2.5. Yağ Dokunun Endokrin Fonksiyonu	8
2.6. Preadiposit Hücre Hatları	9
2.7. Adipogenez	9
2.7.1. Büyümenin Durması	9
2.7.2. Mitotik Klonal Ekspansiyon	10
2.7.3. Terminal Farklılaşma	12
2.8. Narenciye Limonoidleri	13
2.8.1. Narenciye Limonoidlerinin Yapısal Özellikleri	13
2.8.2 Limonin ve Nomilin	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17

	Sayfa
3.1. Hücre Kültürü	17
3.2. Hücrelerin Pasajlanması	17
3.3. Hücre Sayımı	18
3.4. Limonin ve Nomilin Çözeltilerinin Hazırlanması	18
3.5. Viabilite Deneyi	18
3.6. Proliferasyon Deneyi	19
3.7. Diferansiyasyon Deneyi	19
3.8. MTT Analizi	20
3.9. MTT ve Çözücü Solüsyonların Hazırlanışı	20
3.10. MTT Analizinin Yapılması	20
3.11. 3T3-L1 Hücre Hattı Diferansiyasyon Protokolü	20
3.12. Oil Red O çalışma solüsyonunun Hazırlanması	21
3.13. Oil Red O Boyama ile Diferansiyasyon Analizi	21
3.14. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. Viabilite Bulguları	23
4.1.1. Limonin Uygulamasının Viabilite Üzerine Etkisi	23
4.1.1.1. 48 Saat	23
4.1.1.2. 96 Saat	23
4.1.2. Nomilin Uygulamasının Viabilite Üzerine Etkisi	24
4.1.2.1 48 Saat	24
4.1.2.2. 96 Saat	25
4.2. Proliferasyon Bulguları	26
4.2.1. Limonin Uygulamasının Proliferasyon Üzerine Etkileri	26
4.2.2. Nomilin Uygulamasının Proliferasyon Üzerine Etkileri	27
4.3. Diferansiyasyon Bulguları	28
4.3.1. Limonin Uygulamasının Diferansiyasyon Üzerine Etkileri	28
4.3.2. Nomilin Uygulamasının Diferansiyasyon Üzerine Etkileri	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	31
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Başlıca obezite gelişim nedenleri	3
Şekil 2.2. Beyaz, kahverengi ve bej yağ dokusunun lokalizasyonu	6
Şekil 2.3. Adipogenez evreleri	13
Şekil 2.4. Temel limonoid yapısı	14
Şekil 2.5. Limonin' in kimyasal yapısı	15
Şekil 2.6. Nomilin' in kimyasal yapısı	15
Şekil 4.1. Limonin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-2'nci gün)	23
Şekil 4.2. Limonin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-4'üncü gün)	24
Şekil 4.3. Nomilin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-2'nci gün)	25
Şekil 4.4. Nomilin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-4'üncü gün)	26
Şekil 4.5. Limonin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi (0-4'üncü gün)	27
Şekil 4.6. Nomilin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi (0-4'üncü gün)	28
Şekil 4.7. Limonin uygulamasının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi (0-8'inci gün)	29
Şekil 4.8. Nomilin uygulamasının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi (0-8'inci gün)	30

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
ACC	Asetil KoA karboksilaz
AMPK	AMP-activated protein kinase
aP2	Adiposit yağ asidine bağlanan protein-2
ATF	Activating transcription factor
ATGL	Adipoz trigliserid lipaz
BSA	Sığır serum albümini
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
C/EBP α	CCAAT-enhancer-binding protein alfa
C/EBP δ	CCAAT-enhancer-binding protein delta
C/EBP β	CCAAT-enhancer-binding protein beta
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDK2	Cyclin-dependent kinase2
CDK4	Cyclin-dependent kinase4
CDK6	Cyclin-dependent kinase6
CHOP	C/EBP homolog protein
CREB	cAMP response element-binding protein
CRP	C-reaktif protein
CS	Calf serum
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle medyumu
DMSO	Dimetil sülfoksit
EBF	Early B cell factor
GLUT4	Glucose transporter type 4
GPCR	G-protein coupled receptor 5
IBMX	İzobutilmetilksantin
IL	İnterlökin
KLF	Kruppel-like factor
LPL	Lipoprotein lipaz
mcg	Mikrogram
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MKE	Mitotik klonal ekspansiyon

Kısaltma/Simgesi	Tanım
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
PBS	Phosphate buffered saline
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pref-1	Preadiposit faktör-1
Rb	Retinoblastoma
RBP4	Retinol binding protein4
SREBP-1a	Sterol regulatory-element binding protein-1a
SREBP-1c	Sterol regulatory-element binding protein-1c
SREBP-2	Sterol regulatory-element binding protein-2
TGF β	Transforming growth factor beta
TGR5	Takeda G-protein coupled receptor 5
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
UCP	Uncoupling protein
UCP1	Uncoupling protein1

1. GİRİŞ

Obezite, karmaşık ve çok faktörlü olmakla birlikte önüne geçilebilir bir hastalıktır. Günümüzde dünya popülasyonunun üçte biri hafif şişman sınıfına girmektedir. Tahminler, obez hasta sayısındaki artışın devam etmesiyle, 2030 yılına kadar yetişkin nüfusun yaklaşık %38'i hafif şişman, %20'sinin ise obez olacağı yönündedir [1]. Obezite ve hafif şişman tanımlanmasında kullanılan en önemli ölçüt vücut kitle indeksidir. Bilimsel çalışmalar obezite gelişimine sebep olan birden fazla faktör olduğunu göstermiştir. Bu faktörler, beslenme, uyku, fiziksel aktivite, hijyen, mental sağlık/duygu durum ve medya kullanımındadır [2]. Obezite tedavisi için çeşitli ilaçlar veya ilaç kombinasyonları klinik olarak kullanılmaktadır, fakat henüz obezite için etkili bir tedavi bulunmamıştır. Obezite besinlerle alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması durumunda, fazla enerjinin adipoz dokuda lipid olarak birikmesi ve bunun sonucunda adipoz dokunun büyümesiyle gelişir. Adipoz dokunun büyümesinde iki etkin mekanizma vardır. Bunlardan ilki hücre sayısındaki artış olan hiperplazi, ikincisi ise hücre boyutundaki artış olan hipertrofidir [3].

Limonoidler, Rutaceae ve Meliaceae bitki familyalarının bitki türlerinde doğal olarak bulunur. Limonoidler, turuncgillerde asetat-mevalonat yolundan biyosentezlenen yüksek oranda oksijenlenmiş modifiye triterpenlerdir. Yapılan çalışmalarda limonoidlerin meme kanseri inhibisyonundaki etkisi [4], antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri [5] ve kolesterol metabolizmasındaki olumlu etkileri [6] gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmada bir TGR5 (Takeda G protein-coupled receptor 5) agonisti limonoid olan nomilinin farelerde anti-obezite ve anti-hiperglisemik etki gösterdiği bulunmuştur [7]. Ancak nomilinin 3T3-L1 hücrelerinde proliferasyon ve diferansiyasyon üzerine etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Buna ek olarak limoninin de farelerde diyetle indüklenen obeziteyi önleyici etki gösterdiği bulunmuş ve siklodekstrin ile muamele edilmiş limoninin 3T3-L1 hücrelerinde diferansiyasyon üzerine süprese edici etkisi olduğu gösterilmiş, fakat söz konusu çalışmada limoninin proliferasyon üzerine etkisi değerlendirilmemiştir [8]. Buna ek olarak modifiye edilmemiş limoninin 3T3-L1 hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Sonuç olarak, başlıca narenciye alkaloidleri olan nomilin ve limoninin preadiposit canlılık, proliferasyon ve diferansiyasyon üzerine etkileri tam olarak ortaya konulmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen narenciye ürünlerinin tohum ve kabuklarında yüksek miktarda bulunan limonin ve nomilin'in 3T3-L1 hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

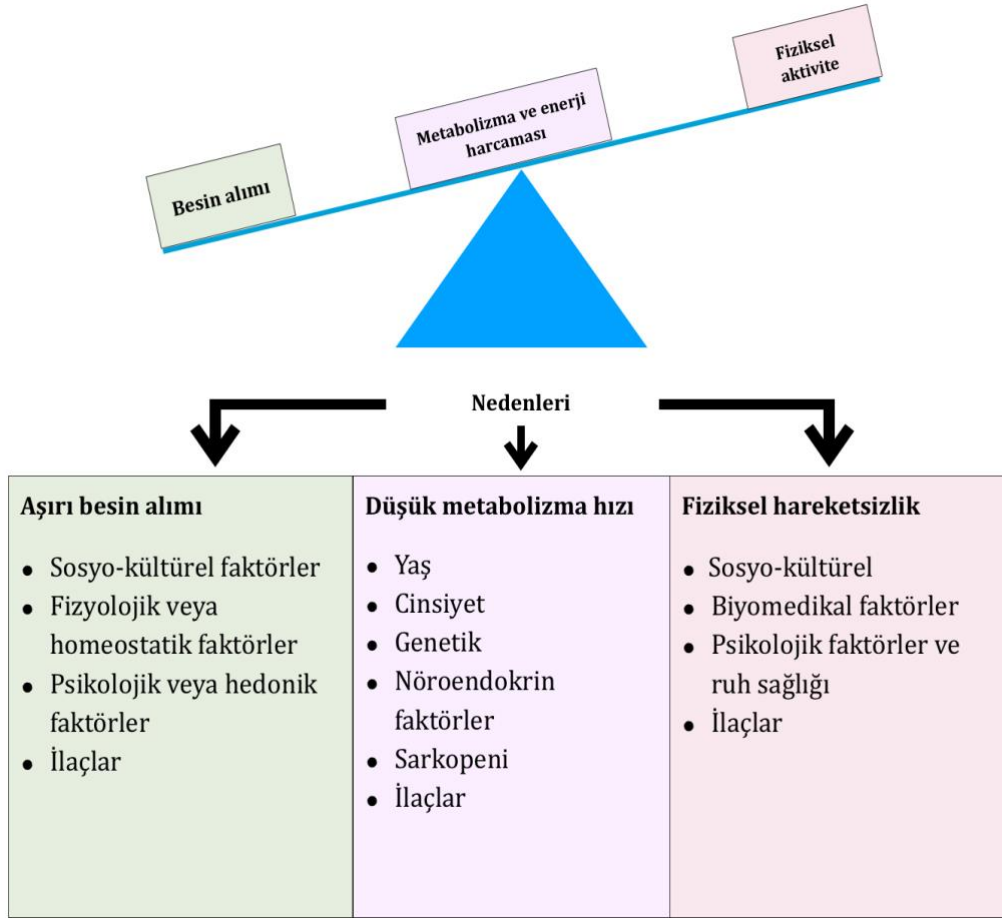
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Obezite Tanımı, Nedenleri ve Komorbiditeler

Obezite, gıdalar vasıtasıyla alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olması sonucu gelişen ve vücut yağ kitlesinin, yağsız vücut kitlesine oranla artması ile gelişen bir hastalıktır [9]. Kilogram cinsinden ağırlığın, metrekare cinsinden yüksekliğe bölünmesiyle bulunan vücut kitle indeksi (VKİ), obeziteyi tanımlamak için kullanılır. VKİ değeri 25,0 ile 29,9 kg/m² arasında olan yetişkinler aşırı kilolu olarak tanımlanırken, 30 kg/m² ve üstü VKİ değeri olan yetişkinler obez olarak sınıflandırılmaktadır [10]. VKİ'de 25 kg/m²'nin üzerindeki her 5 birimlik artış, genel ölüm oranını %29, kardiyovasküler nedenli ölüm oranını %41 ve diyabete bağlı ölüm oranını %210 arttırmaktadır [11]. 1970'lerden bu yana, küresel obezite prevalansı yetişkinlerde neredeyse üç katına çıkmış, çocuklarda ve ergenlerde daha da çarpıcı bir şekilde artmıştır [12]. Bu artışlar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde görülmüştür. Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde aşırı kilo ve obezite prevalansı her yaşta, gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksektir. Gelişmiş ülkelerde, obezite kadınlara göre erkeklerde daha sık görülmekteyken gelişmekte olan ülkelere ise tam tersi bir cinsiyete göre dağılım görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde obezite oranları 20 yaş altı erkeklerde %12,4, 20 yaş ve üzeri erkeklerde %31,7, 20 yaşından küçük kızlarda %13,4 ve 20 yaş ve üzeri kadınlarda %33,9'dur. Prevalans oranlarının 1992 ve 2002 yılları arasında artmış olduğu, ancak o zamandan beri sabit ilerlediği görülmektedir [13].

Obezite vücudun hemen hemen tüm fizyolojik fonksiyonlarını olumsuz etkilemekte ve halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Diabetes mellitus [14], kardiyovasküler hastalıklar [15], çeşitli kanser türleri [16] artrit [17], gut [18], uyku apnesi [19] ve ruh sağlığında bozulma [20] gibi birden fazla hastalık durumu geliştirme riskini artırır. Bunların hepsinin iş verimliliği, yaşam kalitesi ve sağlık hizmetleri maliyetleri üzerinde olumsuz etkileri vardır.

Obezitenin kesin nedeni bilinmemekte olup, gelişim nedenleri kültürel yapı, genetik ve sosyoekonomik durum gibi faktörleri içeren biyolojik, psikososyal ve davranışsal faktörler arasındaki ilişki gibi etmenler aracılığı ile açıklanmaya çalışılmaktadır. [21]. Obezitenin gelişimine besin alım miktarı, fiziksel aktivite, cinsiyet, mikrobiyota, uyku, ilaç kullanımı vb. daha birçok faktörün etki ettiği bildirilmektedir [22]. Bununla birlikte, günümüzde bir pandemi niteliğini taşıyan obeziteye neden olan faktörlerin henüz açıklığa kavuşturulamadığı değerlendirilebilir.



Şekil 2.1. Başlıca obezite nedenleri [22]

Adipositler, obezitenin ve buna bağlı metabolik sendromların ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Tüketilen ve harcanan kaloriler arasındaki kronik enerji dengesizliği nedeniyle fazla enerji trigliserid şeklinde adipositlerde depolanır [23]. Adipositler, enerji depoları olmanın yanı sıra, adipokin adı verilen çok çeşitli proteinler üreten ve salgılayan aktif endokrin hücreler olarak tanımlanır. Adipokinler, enerji homeostazı, inflamasyon ve insülin sinyalizasyonu ile ilgili çoklu hücresel düzenlemelerde yer alır ve bu da bireyin sağlık durumunu yansıtır [24]. Obezitede adiposit doku kütleindeki artış, yağ doku içerisindeki olgun adipositlerin çok miktarda yağ birikimi yolu ile hipertrofisine ve/veya öncü hücrelerden (preadipositler) yeni adipositlerin oluşumu yolu ile (adipogenez) yağ dokunun hiperplazisinebağlı olarak gerçekleşir [25]. Adiposit hipertrofisi, önceden var olan yağ hücrelerinde lipid birikiminin bir sonucu olarak olgun adipositlerin boyutunda bir artıştır. Buna karşılık, adiposit hiperplazisi, esas olarak çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkan adiposit sayısını belirlemede kilit bir süreçtir. Bu anahtar yolda, preadipositler olgun adipositler haline gelir ve bu da yağ dokusunun kütleini artırır [26]. Yetişkinlerde kilo kaybından sonra bile hücre sayısı sabit kalır ve bu nedenle kilo kaybı esas olarak adiposit hacmindeki azalmanın bir sonucudur [27]. Bu nedenle, adipositlerin

hem boyutunu hem de sayısını düzenleyen stratejiler, obezite tedavisinde olası bir terapötik yaklaşım olarak düşünülebilir.

2.2. Yağ Dokusu

Yağ dokusu, sağlıklı bireylerde vücut kütlelerinin %20-28'ini oluşturmaktadır. Obez bireylerde ise bu oran, vücut kütlelerinin %80'ine kadar ulaşabilmektedir. Yağ dokusunun vücuttaki dağılımı ve lokalizasyonu işlevini belirlemektedir. Vücutta depolanan yağın büyük kısmını deri altı yağ dokusu oluşturmaktadır [28]. Deri altı yağ doku vücudun ısı yalıtımını sağlamanın yanı sıra travmalara karşı darbe emici olarak da işlev görmektedir. Bunun yanı sıra, deri altı yağ dokuda bulunan adipositlerin hücre bütünlüğünün bozulduğu durumlarda yara iyileşmesinde ve onarımda aktif görev aldıkları da gösterilmiştir [29]. Visceral yağ dokusu başta böbrekler (perirenal yağ dokusu), bağırsak (mezenterik ve omental yağ dokusu), gonadlar (epididimal ve parametrial adipoz doku), vaskülatür (perivasküler veya periadventisiyal adipoz doku) ve kalp (epikardiyal ve perikardiyal yağ dokusu) olmak üzere vücuttaki organları çevreler [30]. Yağ doku, organlara veya sistemlere kohezyon sağlamakla görevli bağ doku grubuna aittir. Yağ dokusu, adipositlerin yanı sıra bağ dokusu matriksi, sinir dokusu, stromavasküler hücreler ve bağışıklık hücreleri içerir [31]. Yapılara destek verme fonksiyonunun yanı sıra, yağ dokusu enerji dengesini düzenlemektedir. Son zamanlarda, yağ dokusunun bir enerji deposu veya pasif bir metabolizma organı olmakla kalmadığı, aynı zamanda enerji durumunu etkilediği ve buna katkıda bulunduğu gösterilmiştir [22]. Günümüzde yağ doku adipokin olarak adlandırılan çok sayıda hormonun sentezlenip salıverildiği bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir [32]. Yağ dokusu bunun yanı sıra, cinsel dimorfizm, bağışıklık, üreme, adipogenez, anjiyogenez, hücre dışı matriks yeniden yapılandırılması, steroid metabolizması, hemostaz ve vücut ısısının sürdürülmesi gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine de katkıda bulunmaktadır [33, 34].

2.3. Yağ Dokusu Tipleri

İşlevine, rengine ve yapısına göre beyaz yağ doku, kahverengi yağ doku ve bej yağ doku olmak üzere üç tip yağ dokusu vardır.

2.3.1. Beyaz Yağ Doku

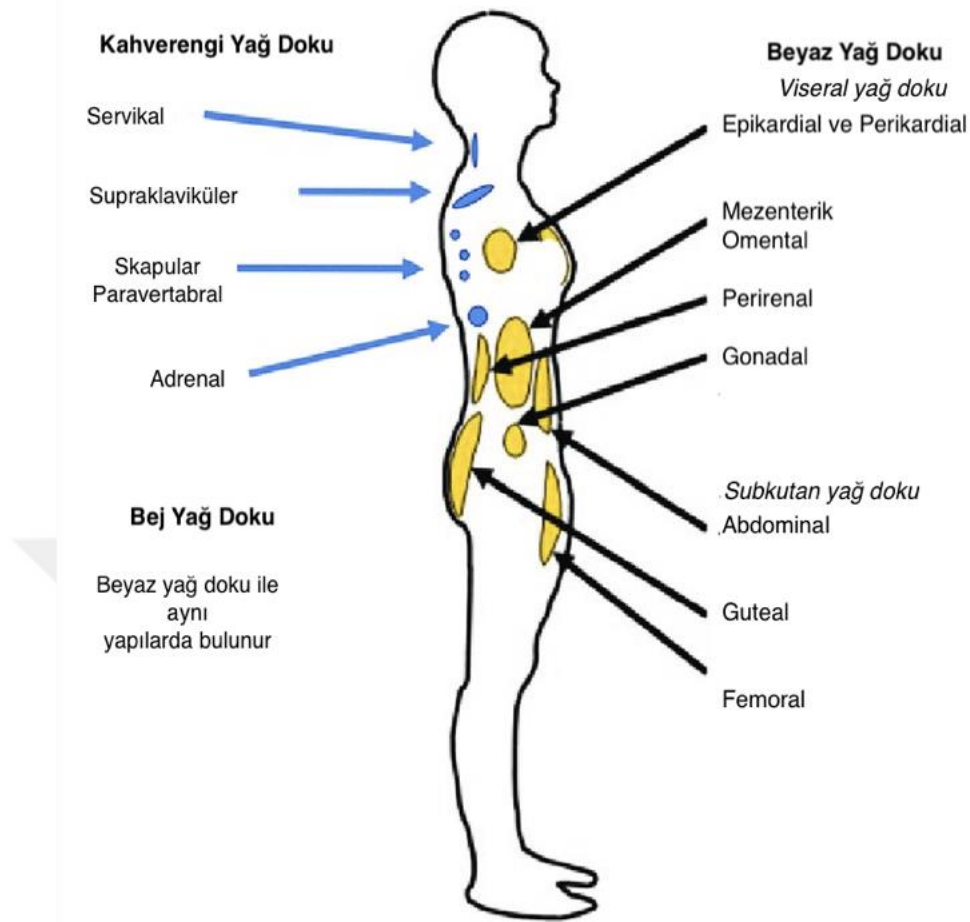
Beyaz yağ dokusu, kahverengi dokuya göre daha az vaskülarizasyon ve innervasyona sahip, sarı veya beyaz renkli bir doku olmasıyla karakterizedir. Beyaz yağ dokusu yağ hücrelerinin boyutu 20 ila 200 µm arasındadır ve tek bir lipid vakuölü içerirler. Söz konusu vakuolde, enerji ihtiyacı olduğunda kullanılmak üzere lipitler depolanır. Beyaz adipositlerde

bulunan lipid vakuollerinin lipid içeriğinin %90 ila 99'unu triasilgliseroller oluşturmaktadır [35]. Lipid vakuolde biriken triasilgliseroller, sağlıklı bir yetişkinin enerji gereksinimlerini en az iki ay boyunca karşılamaya yetecek kadar enerji içerir. Beyaz yağ doku, çok sayıda adipokin üretir. Adipokinler, metabolizmayı düzenleyen hormonlar veya haberciler gibi davranan peptidlerdir. Yağ dokusu tarafından ifade edilen genlerin %40'ının işlevleri yeni keşfedilmiştir ve bunların %20 veya 30'unun salgı proteinlerine karşılık geldiği tahmin edilmektedir [35]. Adipoz dokunun proinflamatuvar sitokinler, bağışıklık, fibrinolitik sistem, renin-anjiyotensin sistemi, lipid metabolizması, transport ve steroid metabolizması enzimleri gibi sistemlerle ilişkili yüksek çok yönlü proteinler salgıladığı artık bilinmektedir [36]. Bu nedenle yağ dokusu bir endokrin organ olarak kabul edilir [37].

2.3.2. Kahverengi Yağ Doku

Daha yüksek vaskülarize ve yüksek mitokondri içeriği sebebiyle yoğun sitokrom içeriği, dokunun kahverengileşmesini sağlamaktadır. Kahverengi yağ dokusunu oluşturan yağ hücreleri multilokülerdir ve birkaç lipid vakuole sahiptir. Bu hücreler poligonol bir şekle sahiptir ve 15 ile 50 µm boyutlarındadır [38]. Kahverengi yağ dokusu, iskelet kası ile ortak bir progenitör hücre olan Myf5 pozitif hücrelere sahiptir [39]. Beyaz yağ dokusunun aksine, kahverengi doku enerji depolama işlevine sahip değildir, ancak termojenez yoluyla enerjiyi dağıtır. Vücut ısısını düzenleyebilmek için kahverengi yağ doku yüzeysel ve derin bölgelerde lokalize edilir. Yüzeysel bölgelerde interskapular, servikal ve aksiller bölgelerde bulunurken, derin bölgelerde perirenal, periaortik, kasık ve perikardiyal kahverengi yağ dokuları bulunur [40]. Kahverengi yağ dokusunun varlığı özellikle neonatal dönemde belirgindir. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, insanlarda kahverengi yağ dokusunun metabolik olarak aktif birkaç doku yapısı ile temsil edildiğini göstermiştir [41, 42]. Soğuğa maruziyet ve aşırı yeme bu yapıların aktivitesini ve boyutunu artırırken yaş onları azaltır [43]. Öte yandan kemirgenlerde kahverengi yağ dokusu yaşam boyunca korunur ve termojenez yoluyla enerji harcamasını sağlar [44].

Kahverengi yağ dokusunda β-adrenerjik reseptör aktivasyonu, oksidatif fosforilasyon proton akışını kullanan ve dolayısıyla ATP yerine ısı üreten uncoupling proteinlerin (UCP) uyarılmasını stimüle eder. Isı kahverengi yağ dokusunun mitokondrilerinde UCP'ler tarafından üretilir ve bunun sonucunda enerji harcaması artar. Yiyecek bulunmadığında, hipotalamustan gelen açlık sinyalleri, kahverengi yağ dokusunda termojenezi azaltmak ve enerji tüketimini azaltmak için sempatik sistem aktivasyonunu bloke eden gabaminerjik nöronları aktive eder [45].



Şekil 2.2. Beyaz, kahverengi ve bej yağ dokusunun lokalizasyonu [46].

2.3.3. Bej Yağ Doku

Son zamanlarda, bej renkli ve UCP1 ekspresyonu için pozitif olan kahverengi adipositlere benzer yağ hücrelerinin, egzersiz, soğuğa maruz kalma veya bazı hormonlar gibi belirli uyaranlara yanıt olarak ortaya çıkma olasılığının yüksek olduğu gösterilmiştir [47]. Bu adipositler beyaz yağda dokuda birikebilirler ve bej veya brite adipositler olarak adlandırılırlar. Bej adipositler, morfolojileri (birkaç lipid vakuölü içerirler) gibi kahverengi olanlara benzer özelliklere sahip olsalar da, farklı anatomik lokalizasyonlara sahiptirler. Bej adipositler, beyaz adipoz dokunun deri altı bölgelerinde bulunurken, kahverengi adipositler esas olarak daha yüzeysel bölgelerde bulunur.

Kahverengi ve bej adipositlerin farklı embriyonik öncüllerden geliştiği gösterilmiştir [48]. Kahverengi adipositler Myf5-pozitif hücrelerden köken alırken bej yağ hücreleri Myf5-negatif soydan gelmektedir, ancak tam kökenleri hala tartışılmaktadır ve iki olasılık öne sürülmüştür. Birincisi, beyaz adiposit progenitörlerden türetildiklerini ve soğuğa maruz kalma gibi çevresel uyaranlara yanıt olarak bej adipositler olduklarını ileri sürmektedir. İkincisi, olgun

beyaz adipositlerin bej olabilmek için uygun uyaranlarla temas kurarak farklılaştırılabileceğini önermektedir [49]. Her iki önerinin de doğru olması çevreye, genetik arka plana ve bej hücre içeren yağ doku lokalizasyona bağlı olarak olası gibi görünmektedir [50].

Bazal koşullar altında bej adipositlerde, beyaz adipositlerde ifade edilen moleküler belirteçlere benzer belirteçler ifade edilir, ancak transdiferansiyasyondan sonra, daha yüksek enerji tüketimini ve oksijen tüketimini yansıtan termojenik bir ifade kalıbı kazanarak kahverengi adipositlerinkine benzer bir ekspresyon paterni kazanırlar [51].

2.4. Lipogenez ve Lipoliz

Yağ birikimi, yağ sentezi (lipogenez) ve yağ yıkımı (lipoliz/yağ asidi oksidasyonu) arasındaki denge ile belirlenir. Lipogenez, tercihen yağ dokusunda oluşan bir süreçtir, ancak karaciğerde de meydana gelir ve enerji rezervi olarak kullanılan yağ asitlerinin sentezidir. Bu süreç diyetdeki değişikliklere duyarlıdır [48]. Lipogenez yüksek karbonhidratlı diyetle uyarılır ve yemek sonrası plazma trigliserid seviyelerinin yükselmesine neden olurken, çoklu doymamış yağ asitleri ve açlık tarafından inhibe edilir. Oruç, plazma glikozunda bir düşüş ve plazma yağ asitlerinde bir artışa yol açabilir. Bu etkilere kısmen, lipogenezi inhibe eden (leptin) veya uyarıcı (anjyotensin, asilasyon uyarıcı protein) hormonlar aracılık eder. Glikozun kendisi, lipogenez için bir substrattır, insülin salınımını uyararak ve pankreastan glukagon salınımını inhibe ederek lipogenezi uyarır [52].

Lipoliz, yağ dokusunda meydana gelir ve yağın, diğer bir deyişle enerji üretimi için enerji rezervlerinden (trigliseridler), triasilgliserol moleküllerinin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolize edilmesidir. Metabolik stres zamanlarında, adipositin triasilgliserol damlası, diğer dokular tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere serbest yağ asitlerini sağlamak için degrade olur. Çok sayıda uyarıcı, adipositlerde lipolitik yanıtı ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, nihayetinde aynı enzim çifti, hormona duyarlı lipaz ve monoasilgliserol lipaz, triasilgliserol ester bağlarının hidrolizini katalize etmekten sorumludur. Triasilgliserolün tam hidrolizi, serbest yağ asitlerini ve bir gliserol parçasını serbest bırakmak için 3 ester bağının kırılmasını içerir. Aynı enzim, hormona duyarlı lipaz, triasilgliserolün 1 inci ve 3'üncü pozisyonlarında esterlerin hidrolizini kolaylaştırmaktan sorumludur. İkinci bir enzim olan 2-monoasilgliserol lipaz, üçüncü bir serbest yağ asidi ve gliserol verecek şekilde kalan esterin hidrolizini katalize eder. Hormona duyarlı lipaz, insülin tarafından inhibe edilir [53]. Gliserol, akuaporin tipi bir taşıma molekülü aracılığıyla adipositlerden dışarı atılır ve oksidasyon veya glukoneojenezde kullanılmak üzere karaciğere geri gönderilmelidir. Bununla birlikte, maksimum lipolitik koşullar altında, yağ asitlerinin esaslı geri dönüşümü, gliserol molekülü başına ortalama olarak yaklaşık iki yağ asidi molekülü salınacak şekilde cereyan etmektedir. Adipositin dışında, yağ asitleri hemen albümine bağlanır ve kan dolaşımında oksidasyon için karaciğere, kaslara ve diğer dokulara taşınır [54].

β -Oksidasyon, lipoliz sonucu oluşan serbest yağ asitlerinin vücut tarafından enerji kaynağı olarak kullanıldığı katabolik bir süreçtir. Yağ asidi molekülleri, asetil koenzim A moleküllerine dönüştürülür [55].

2.5. Yağ Dokunun Endokrin Fonksiyonu

Obezitenin tip 2 diyabet, dislipidemi, yağlı karaciğer hastalığı, kronik inflamasyon, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık için bir risk olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir [56-58]. Obezitenin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi, bu bozuklukların önlenmesi ve tedavisi için yeni stratejiler geliştirmek adına gereklidir. Son yıllarda obezite araştırmalarındaki gelişmeler, adipoz dokunun adipokinler olarak adlandırılan 600'den fazla biyoaktif faktör salgılayan aktif bir endokrin organ olduğunun anlaşılmasına yol açmıştır [59]. Adipokinler iştah ve tokluk kontrolü, yağ dağılımı, insülin duyarlılığı ve insülin salgılanması, enerji harcaması, inflamasyon, kan basıncı, hemostaz ve endotel fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli roller oynarlar [32,60-65]. Otokrin, parakrin ve endokrin sinyallerle adipokinler, adipogenezin modülasyonuna, adipoz dokuda immün hücre infiltrasyonuna, adiposit metabolizmasına ve işlevine katkıda bulunur [61]. Ayrıca adipokinlerin beyin, karaciğer, kas, damar sistemi, kalp ve pankreas β -hücreleri gibi hedef organlar üzerinde önemli sistemik etkileri vardır [61]. Adipokin sekresyon paterni, yağ dokusu fonksiyonunu yansıtmaktadır ve obezitenin metabolik ve kardiyovasküler komorbiditelerinin gelişme riskinin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir [60].

1987'de yağ dokusu, seks steroid metabolizması [62] ve kemirgenlerde obezite ile negatif ilişkili bir endokrin faktör olan adipsin üretimi için ana bölge olarak tanımlanmıştır [63]. Bir adipokin olarak leptinin keşfi [32], yağ dokusu kaynaklı yeni sinyal molekülleri için araştırma alanı açmıştır.

Adipoz dokudan salgılanan adipokinler arasında, interlekinler (IL)-1, -6, -8, -10, TNF α (Tümör nekroz faktörü alfa), TGF β (Transforming growth factor β -Dönüştürücü büyüme faktörü β), interferon- γ , CRP (C-reaktif protein), plazminojen aktivatör inhibitörü-1 ve chemerin dahil olmak üzere inflamatuvar yanıtta rol oynayan moleküller de vardır.

RBP4 (Retinol binding protein4 - Retinol bağlayıcı protein 4), chemerin, vaspin, fetuin-A, omentin ve yağ asidi bağlayıcı protein 4 dahil olmak üzere birçok adipokin, insülin direnci ve yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Adiponektin ise insülin duyarlılığı ile pozitif korelasyon göstermektedir [60]. Ayrıca, adipokinler, obezite ve hipertansiyon (örn., anjiyotensinojen), endotelial fonksiyon (örn., omentin, apelin), hemostaz (örn., fibrinojen), yağ dokusunda immün hücre infiltrasyonu (örn., MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1 - Monosit kemotaktik protein-1), progranülin ve makrofaj inflamatuvar protein1 α) arasındaki bağlantıyı temsil edebilmektedirler [59].

2.6. Preadiposit Hücre Hatları

3T3-L1 ve 3T3-F422A hücre hatları 17-19 günlük Swiss 3T3 fare embriyolarının disagrege edilmesi ve izole edilmesi ile elde edilen embriyonik fibroblastlardır [66]. Klonal hücre hatları, hücre popülasyonu açısından homojendir ve hücre tiplerinin hepsi aynı farklılaşma aşamasındadır. Bu, tedavilere homojen bir yanıt sağlar. Ek olarak, bu hücreler süresiz olarak pasajlanabilir, bu da çalışma için tutarlı bir preadiposit kaynağı sağlar. Bu nedenle klonal hücre modelleri deneysel çalışmalar için hayvan modellerini tamamlayıcı bir araçtır. Proliferasyon sırasında, tüm preadiposit hücre modelleri fibroblastlara benzer bir morfoloji gösterir. Farklılaşmanın uyarılması, küresel hale gelen ve lipid damlacıkları ile dolu olan preadipositlerin fenotipik değişikliklerini tetikler ve *in vivo* olarak farklılaşan adipositlerin morfolojik ve biyokimyasal özelliğini gösterir.

3T3-L1 fibroblastlarının adiposit hücrelere farklılaşması, adiposit biyolojisi çalışmalarında kullanılan en yaygın *in vitro* modellerden biridir. Bu model, adipogenez, lipid metabolizması ve hormonların etkilerine ilişkin anlayın geliştirilmesinde kritik bir yere sahiptir.

2.7. Adipogenez

Adipogenezin moleküler ve hücresel süreçleri, 3T3-L1 preadiposit fibroblast klonal hücre dizisi kullanılarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. 3T3-L1 preadiposit hücre hattında farklılaşma aşamaları iyi karakterize edildiğinden, obezite araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [67]. 3T3-L1 preadipositlerinde adipogenez, büyüme durması, mitotik klonal ekspansiyon (MKE) ve terminal farklılaşma olmak üzere üç ana aşamayı içerir [68].

3T3-L1 post-konfluent preadipositlerin farklılaşması deksametazon (DEX), izobütilmetilksantin (IBMX) ve insülin kullanılarak hormonal stimülasyon ile indüklenir. MKE olarak adlandırılan bu erken farklılaşma aşamasında, hücreler geri dönüşümsüz olarak farklılaşma sürecine girerler [69]. Adipojenik kokteylin neden olduğu farklılaşma, hücre sayısını iki katına çıkaran klonal genişlemeyi uyarır [70] ve preadipositler, farklılaşmanın ilk iki günü boyunca bir veya iki replikasyon geçirir. Olgunlaşan preadipositler, obezitenin önlenmesi ve/veya tedavisinde doğal ürünler için önemli bir hedef olabilmektedir.

2.7.1. Büyümenin Durması

Erken adipogenez için bir ön koşul olarak hücre döngüsü ve düzenlenmesi, MKE'nin tamamlanmasında çok önemli bir rol oynar. Farklılaşmadan iki gün önce 3T3-L1 preadipositleri konfluent olduğunda komşu hücrelerle fiziksel temas hücre büyümesini inhibe eder (-2 nci gün). Konfluensi sonrası preadipositler, yüksek seviyelerde siklin bağımlı kinaz inhibitör

proteinleri (CIP) olan p27^{CIP} ve p27^{KIP1} ve hiperfosforile tümör baskılayıcı retinablastoma (Rb) proteinleri seviyelerinde artışla hücre döngüsü G1 fazında durdurulur [71].

Farklılaşmanın erken evresinde, hücre döngüsünde durdurulan hücreler, MKE ile birlikte tekrar hücre döngüsüne girerler ve bir veya iki tur hücre döngüsü geçirirler [72]. Siklin D'nin CDK4 (Cyclin-dependent kinase-4 - siklin bağımlı kinaz-4) ve CDK6 (Cyclin-dependent kinase-6 - siklin bağımlı kinaz-6), Siklin E'nin CDK2 (Cyclin-dependent kinase-2 - siklin bağımlı kinaz-2) ile birleşmesi ve aktivasyonu gerçekleşir ve CDK (Cyclin-dependent kinase - siklin bağımlı kinaz) inhibitörünün degradasyonu meydana gelir. Siklin D-CDK4/CDK6 kompleksi, hücre döngüsünün erken G1 fazının düzenleyicisidir, siklin E-CDK2 kompleksi ise G1 ve S fazı geçişi için kritik öneme sahiptir ve bunların tümü büyümesi durmuş olan hücrelerin hücre döngüsüne yeniden girmeleri için döngünün G1/S fazına ilerlemesini sağlar [73]. CDK'nın sikline bağlanması, kinaz aktivitesi ve E2F transkripsiyon faktörü ailesinin bir düzenleyicisi olan Rb proteininin fosforilasyonu için gereklidir. Rb proteininin fosforilasyon durumu, farklılaşmanın erken evresinde hücre döngüsü ilerlemesini aktive eden hiperfosforile formdan, terminal farklılaşma sırasında hücre döngüsünü baskılayan hipofosforile forma değişir [74]. S fazının girişi, adipojenik kokteyl ile muameleden yaklaşık 14 saat sonra gerçekleşir ve en yüksek DNA sentezi ise hormonal uyarımdan yaklaşık 18 saat sonra gözlenir [75].

2.7.2. Mitotik Klonal Ekspansiyon

Mitotik klonal ekspansiyonla birlikte bir dizi transkripsiyon faktörünün ardışık olarak aktive olduğu oldukça karmaşık ve çok iyi düzenlenmiş bir kaskad başlar. Farklılaşmamış durumda preadipositler yüksek seviyelerde Pref-1 (Preadiposit faktör-1), CHOP (C/EBP homolog protein), KLF (Kruppel-like factor), GATA transkripsiyon faktörü ve Wnt proteinleri içerirken, adipogenez sürecine girdiklerinde bu seviyeler hızla düşer [76]. Bu proteinlerden herhangi birinin seviyesinin azalmaması, adipogenez sürecini durdurur ve hücreleri preadiposit aşamada tutar. C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olan CHOP, C/EBP β ile heterodimer oluşturur ve bu bağlanma, C/EBP β 'nin inaktive durumda kalmasını sağlayarak adipogenezin inhibisyonuna yol açar [77]. Adipogenez üzerine baskılayıcı etki gösteren diğer transkripsiyon faktörleri olan GATA2 ve GATA3 ekspresyonu ve Wnt10b'nin ektopik ekspresyonu adipogenezini inhibe eder [78,79].

Hormonal stimülasyon adipojenik transkripsiyon kaskadının aktivasyonuna yol açar. Büyümesi durmuş hücreler, fetal sığır serumu (FBS) içeren ortamda DEX, IBMX ve insülinde oluşan standart bir adipojenik kokteyl ile stimüle edilebilir. Sentetik bir glukokortikoid olan DEX, glukokortikoid reseptör yolunu uyarır ve C/EBP β ekspresyonunu artırır [80]. Ayrıca DEX, Pref-1 degradasyonunu da sağlamaktadır [81]. Fosfodiesteraz inhibitörü olan IBMX, cAMP'ye bağlı protein kinaz yolunu aktive eder ve C/EBP δ ekspresyonunu indükler [82]. İnsülin ise IGF-

1 reseptörü aracılığıyla etki eder [83]. Farklılaşmanın erken evrelerinde FBS nin CHOP10 seviyesini azalttığı ve adipojenik gen ekspresyonunu aktive etmek için C/EBP β salınmasını uyardığı bilinmektedir [84]. C/EBP transkripsiyon faktörleri ailesinin bu üyeleri ve ayrıca PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), adipogenezde anahtar roller oynar. C/EBP β ve C/EBP δ adipogenezin erken evresinde eksprese edilir ve PPAR γ ve C/EBP α ekspresyonunu indükler [87]. Transkripsiyon faktörleri PPAR γ ve C/EBP α , lipid metabolizması ile ilgili genlerin ekspresyonunu aktive eder. PPAR γ ve C/EBP α , adipogenezin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak adipogenez için gerekli olduğu gösterilmiştir [85]. PPAR γ ve C/EBP α terminal farklılaşmanın kontrolü ve farklılaşmış durumun korunması için birbirleri ile uyum içinde hareket ederler [86]. 3T3-L1 preadipositlerinde, PPAR γ ve C/EBP transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu hormonal stimülasyondan sonraki 4 saat içinde meydana gelir ve C/EBP β 'nin susturulmasının bu adipojenik gen lokuslarında kromatin açılmasını bozduğu gösterilmiştir [88].

EBF (Early B cell factor) ailesi transkripsiyon faktörlerinin de adipogenezin erken safhasında görev aldığı düşünülmektedir. EBF1/2 nin susturulması 3T3-L1 preadipositlerinde adipogenezini süprese etmektedir [89]. EBF2 nin kahverengi adiposit özelliklerinin korunmasına katkı sağladığı yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir [90,91]. EBF2 termojenik gen ekspresyonunu aktive etmekle görevli bir gen olan Dpf3'ün ekspresyonunu düzenlemektedir [91]. Ebf2-null fare embriyolarında, embriyonik 18. günde kontrol gruba kıyasla kahverengi yağ doku kütlelerinde azalma gözlemlenmiştir [90]. Bu nedenle, EBF2'nin hem genel adipojenik gen ekspresyonunu hem de kahverengi adiposit spesifik gen ekspresyonunu aktive etmek için diğer adipojenik transkripsiyon faktörleri ile koordine bir şekilde etki gösteriyor olabileceği düşünülmektedir [90].

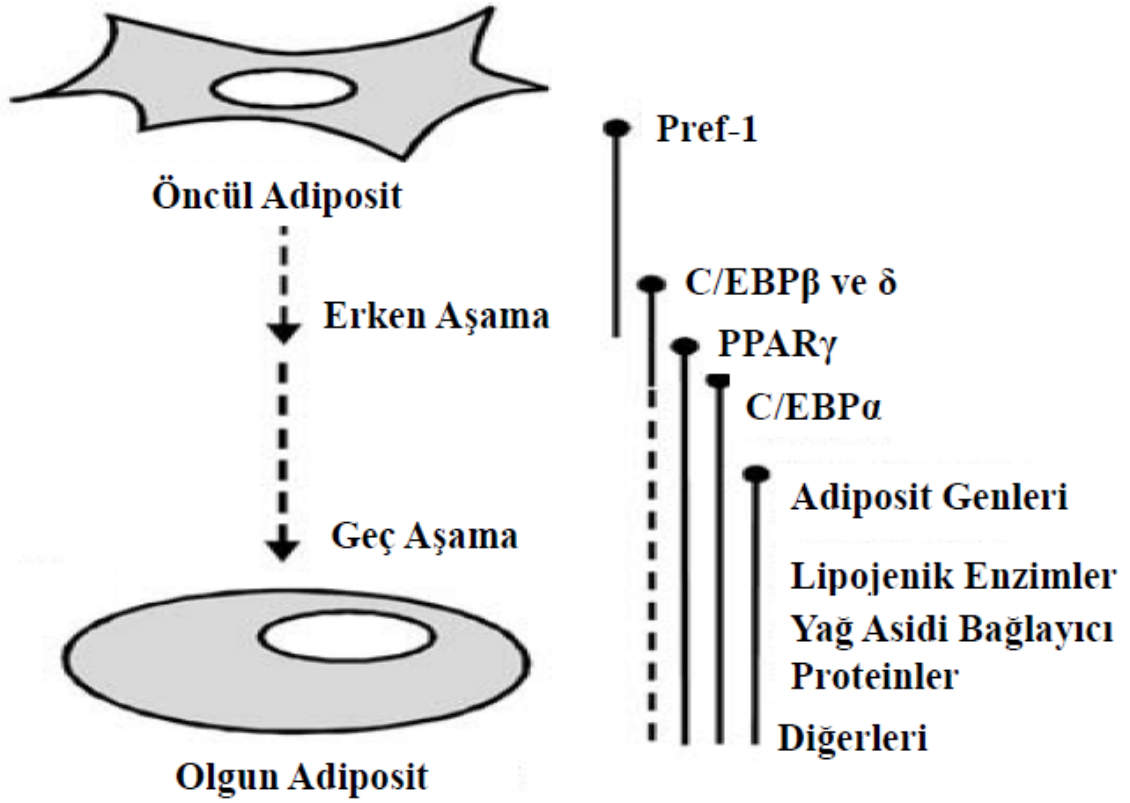
ATF4 (Activating transcription factor4), CREB/ATF (cAMP response element-binding protein/Activating transcription factor) ailesi üyesi bir transkripsiyon faktörüdür. 3T3-L1 preadipositlerinde yapılan bir çalışmada ATF4'ün susturulmasının adipogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir ve adipogenez esnasında ATF4'ün C/EBP β 'nin promotör aktivitesini arttırarak görev yaptığı ve böylece C/EBP β 'nin transaktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. [92]. KLF4 ve KLF15 adipogenezini indüklerken KLF3 ve KLF7 adipogenezini inhibe etmektedir [93]. KLF4, adipogenezde erken evrede eksprese edilir ve C/EBP β ekspresyonunu indükler, KLF4'ün yıkılmasının adipogenezini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [94]. KLF5 de adipogenezde erken evrede eksprese edilir ve KLF5^{+/-} farelerde beyaz yağ doku kitlesinde belirgin bir azalma gözlenmektedir [95]. KLF15'in 3T3-L1 adipositlerinde diferansiyasyon sürecinin 3. günü civarı eksprese edilmeye başladığı ve terminal diferansiyasyon evresinde KLF15 ekspresyonunda yaklaşık 80 kat artış görüldüğü bulunmuştur [96]. Bunun yanı sıra insan preadiposit hücre kültürü modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada adipogenez sürecinin

1 inci günü eksprese edilmeye başladığı ve diferansiyasyon süreci boyunca eksprese edildiği gösterilmiştir [97]. Hem KLF2 hem de KLF3'ün aşırı ekspresyonu adipogenezini inhibe etmektedir. KLF2 nin doğrudan PPAR γ promotör aktivitesini inhibe ettiği, KLF3'ün ise C/EBP α promotör aktivitesini azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [98,99].

Adipogenezde rol oynayan diğer transkripsiyon faktörlerinden CREB ve STAT5a'nın, genetik olarak susturulması 3T3-L1 preadipositlerinde adipogenezini inhibe etmiştir [100,101]. SREBP-1a (Sterol regulatory-element binding protein-1a), SREBP-1c (Sterol regulatory-element binding protein-1c) ve SREBP-2 (Sterol regulatory-element binding protein-2) ise yağ asidi ve kolesterol sentezini düzenleyen temel transkripsiyon faktörleridir [102]. Hücre kültür ortamında, SREBP-1c'nin, PPAR γ aktivasyonuna aracılık eden lipid ligandları sağlayarak adipogenezini desteklediği gösterilmiştir [103].

2.7.3. Terminal Farklılaşma

Preadiposit diferansiyasyonunun MKE aşamasının bitimi ile birlikte hücreler sürecin sonunda olgun yağ hücrelerinin morfolojisine sahip olacakları terminal diferansiyasyon aşamasına girerler. Bu aşamada hücreler hücre döngüsünden çıkar ve hücre içinde yüksek miktarda lipid sentezi başlar. Bu sürecin sonunda ortasında tek bir büyük lipid damlacığı bulunan, sitoplazması ve nukleusu kenara itilmiş, tipik taşlı yüzük görüntüsüne sahip olgun adipositler halini alırlar. Hücrelerde, yağ asidi sentaz, aP2 (adiposit protein 2) gibi lipojenik enzim ekspresyon ve aktivitesinin artışının yanı sıra LPL (Lipoprotein lipaz) ve ATGL (adipoz trigliserid lipaz) gibi lipolitik enzimlerin de ekspresyon ve aktivitesinin artışı nedeni ile lipid metabolizması artmıştır [104]. Buna ek olarak, leptin, adiponektin ve resistin gibi adipokinler olgun adipositler tarafından yüksek oranda eksprese edilir ve salgılanır [105]. Adipogenez sırasında, C/EBP aktivitesi sadece lipojenik SREBP1c indüksiyonunu değil, aynı zamanda inflamatuvar adipokin TNF- α 'yı da düzenler [106]. Ayrıca, C/EBP α ve PPAR γ , pozitif geri besleme döngüleriyle birbirlerini çapraz düzenler ve aP2, LPL ve SREBP-1 gibi hedef genleri transaktive eder [107].



Şekil 2.3. Adipogenez evreleri [108]

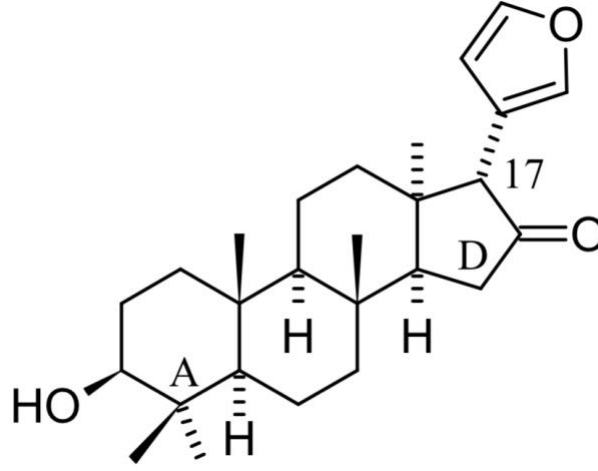
2.8. Narenciye Limonoidleri

Narenciye limonoidleri, çoğunlukla limon, misket limonu, portakal, pomelo, greyfurt, bergamot ve mandalina gibi narenciye meyvelerinin tohumlarında [109], meyvelerinde [110] ve kabuklarında [111] bulunan kalabalık bir polisiklik sekonder metabolit ailesidir [112]. Yapılarında nispeten yüksek sayıda oksijen atomu [113] içerdiğinden yüksek oranda oksijenli triterpenoidler olarak kabul edilir. Narenciye limonoidleri hem serbest aglikonlar hem de β -D-glikozitler olarak bulunur. Aglikonlar çoğunlukla tohumlarda bulunurken β -D-glikozitler meyve olgunlaşması sırasında oluşur. β -D-glikozitlerin oluşumu, turunçgillerde acı limonoid aglikonların konsantrasyonunu azaltan ve böylece narenciye meyve sularına ve diğer ürünlere hoş bir tat veren spesifik bir limonoid glikoziltransferaz tarafından katalize edilir [114].

2.8.1 Narenciye Limonoidlerinin Yapısal Özellikleri

Limonoidler, prototipik 4,4,8-trimetil-17-furanilsteroid iskeletinden [115] türetilen, stereokimyasal olarak homojen bileşiklerdir. Doğal olarak oluşan narenciye limonoidleri,

C-17'de D halkasına bağlı bir furan halkasının yanı sıra C-3, C-4, C-7, C-16 ve C-17'de oksijene sahip fonksiyonel gruplar içerir [116].

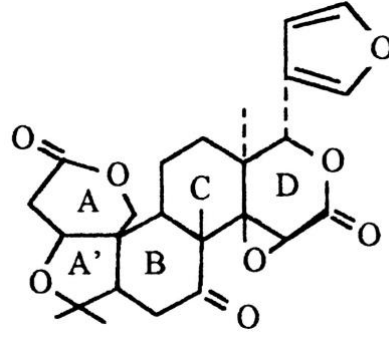


Şekil 2.4. Temel limonoid yapısı (Beema and Corey's 'protolimonoid') [120]

Narenciye limonoidleri terpen ailesi sınıfında yer almaktadır. Terpenler ($C_{10}H_{16}$), izopren (C_5H_8) birimlerinin baş-kuyruk polimerizasyonundan türetilen doğal ürünlerdir [117]. İki yaygın izopren yapı taşı olan izopentenil pirofosfat (IPP) ve dimetilalil pirofosfat (DMAPP), skualen gibi triterpen öncülerini oluşturmak için enzimatik olarak polimerize olur. Bu nedenle, biyosentetik olarak narenciye limonoidinin temel hidrokarbonu olan triterpen skualeni oluşturmak için altı izopren birimine ihtiyaç vardır. Tüm limonoidlerde bir izobütil terminal parçası eksik olduğundan, genellikle tetranortriterpenoidler olarak adlandırılırlar, burada 'tetranor-' ön eki dört karbon atomunun kaybını göstermektedir [118]. Temel limonoid yapısı, steroid benzeri bir şekilde yoğunlaştırılmış ve A ila D olarak adlandırılan dört halkadan oluşur [119]. C-17 konumunda bir furan halkası eklenirken beş metil C-4'te, iki β - ve bir α -hidrojen sırasıyla C-8, C-10 ve C-13'te konumlanmıştır.

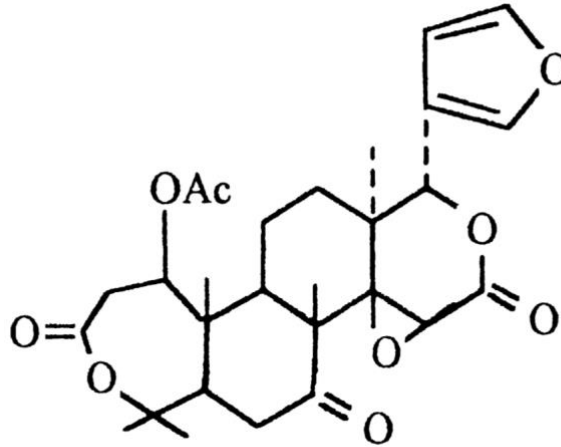
2.8.2 Limonin ve Nomilin

Limonin, tetrasiklik triterpenoiddir ve narenciye türü bitkilerde yaygın olarak bulunan ve yüksek düzeyde biyolojik aktiviteye sahip bir sekonder metabolittir. Moleküler formülü $C_{26}H_{30}O_8$ 'dir ve moleküler ağırlığı 470,25'tir. Limonin genellikle Rutaceae ve Meliaceae bitkilerinden türetilir [121]. Narenciye meyveleri limonin bakımından zengindir ve genellikle limonin, narenciye tohumlarında yüksek konsantrasyonda bulunur [122]. Limonin ve nomilinin Tohumların yanı sıra çeşitli citrus türlerinin tohum ve meyvelerinde bulunduğu gösterilmiştir. Narenciye meyvelerindeki limonin ve nomilin miktarı meyvenin olgunlaşma düzeyine göre değişiklik göstermektedir [123].



Şekil 2.5. Limonin in kimyasal yapısı [120]

Nomilin yapısı A halkası hariç, C-3 ve C-4 arasında oksijen atomu bulunan yedi üyeli bir lakton olan limonin yapısı ile benzerlik gösterir. Moleküler formülü $C_{28}H_{34}O_9$ 'dur ve molekül ağırlığı 514,6'dır. Nomilin, limoninden sonra narenciye türlerinde en çok bulunan limonoiddir [124].



Şekil 2.6. Nomilin in kimyasal yapısı [120]

Son yıllarda limonin ve nomilinin biyolojik aktivitelerini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. İnsan kolon adenokarsinomu (SW480) hücrelerinde limoninin antiproliferatif etkisi mitokondriyal membran potansiyeli analizi ile gösterilmiştir [125]. Ayrıca laktat dehidrojenaz (LDH) hücre canlılığı analizi kullanarak limoninin insan hepatoma HepG2 hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi değerlendirilmiştir. HepG2 hücrelerinde limonin tarafından apoptozun indüklendiği bulunmuş, western blot analizi sonucunda limonin uygulamasının Bax ve siklin D1'in ekspresyonunun azalmasına, apoptozta kilit oyuncular olan kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ekspresyonlarında ise artışa yol açtığı gösterilmiştir. Limonin'in ayrıca bu çalışmada LRP5, LRP6 ve DKK wnt sinyal yolağı proteinlerinin ifadesini downregüle ettiği bulunmuştur [126].

Yapılmış olan bir *in-vivo* çalışmada ise limonoidlerin farelerde faz II detoksifiye edici enzim aktivitesini nasıl etkileyeceği değerlendirilmiş ve midede 1-kloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) karşı %58 GST indüksiyonu gözlemlenmiştir [127].

Vasküler düz kas hücrelerinde deasetil nomilin, obakunon, metil nomilinat, defuran nomilin, defuran limonin, limonin ve nomilini içeren limonoidlerin p38 MAP kinaz aktivitesi modülasyonu ile inflamatuvar yolaklar üzerine etkisi araştırılmıştır. Nomilin, p38 MAP kinaz aktivitesini en belirgin olarak inhibe etmiş, inhibitör etkinliği en yüksek ikinci limonoidin ise limonin olduğu bulunmuştur. Nomilin düz kas hücrelerinde TNF- α ile indüklenen p38 MAP kinaz aktivitesini tamamen ortadan kaldırmıştır [128]. Yapılan bir *in-vivo* çalışmada ise sıçan modellerinde limoninin hepatik hasar (yüksek karaciğer enzim aktiviteleri ve total bilirubin), hepatik inflamasyon (TNF-a, nötrofillerin infiltrasyonu), oksidatif stres ve TLR-4 ekspresyonunun zayıflamasını desteklediği gösterilmiştir [129].

Nomilinin, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde kontrole göre anlamlı bir ağırlık azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. Nomilin bunun yanı sıra kan glikoz ve insülin düzeylerini azaltmış ve glikoz toleransını düzeltmiştir. Çalışmada nomilinin önemli metabolik etkileri bulunan TGR5'i doz bağımlı yolla ve anlamlı ölçüde aktive ettiği bulunmuştur. [7]. Buna karşın aynı çalışmada limoninin TGR5 üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır. TGR5, GPCR (G-protein-coupled receptor) ailesi üyesi membran reseptörüdür. TGR5, safra asidi ile aktive olur ve aktivasyonu hücre içi cAMP üretimini artırır [130]. İnsanlarda kahverengi yağ dokunun yanı sıra subkütan yağ dokuda da TGR5 geninin eksprese edildiği gösterilmiştir [131]. TGR5'in lipid metabolizmasını düzenleyici etkisinin yanı sıra yağ doku üzerine önemli etkileri olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır: Uzun süre soğuğa maruz bırakılan farelerde TGR5 agonisti INT-777 uygulanmasının kontrole göre beyaz yağ dokunun bejleşmesini anlamlı olarak artırdığı gösterilmiş, bunu destekleyecek şekilde TGR5 knockout farelerde soğuğa maruziyet sonrası beyaz yağ doku morfolojisinde değişiklik gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra TGR5^{-/-} fareler ılımlı ortam ısısında bulduklarında vücut ağırlığında artış eğilimi bulunduğu ve bu fareler soğuğa maruz bırakıldıklarında daha az kilo kaybettikleri gösterilmiştir. Fare primer adiposit kültürlerinde TGR5'in ERK aktivasyonu aracılığı ile mitokondriyal solunumu indüklediği bulunmuştur. Bütün bu etkilerine ek olarak TGR5 aktivasyonunun primer adipositlerde lipolizi belirgin ölçüde artırdığı gösterilmiştir [132].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

3T3-L1 hücre hattı, murin Swiss 3T3 hücrelerinden geliştirilmiş preadiposit hücre hattıdır. Son yıllarda yapılan adipogenez ve obezite ilişkili çalışmalarda 3T3-L1 hücre hattı kullanımı yaygınlaşmıştır.

Bu hücre hattının ana avantajlarından biri, olgun adipositler gibi yeni izole edilmiş hücrelere göre kültürlenmesinin daha kolay ve kullanımının daha az maliyetli olmasıdır. Ayrıca, artan sayıda pasajı tolere edebilirler ve hücre popülasyonu açısından homojendirler. Böylece, deney koşullarındaki uygulamaları ve değişiklikleri takiben homojen bir yanıt sağlar. Bu nedenle, 3T3-L1 hücreleri, adipogenez üzerindeki bileşiklerin veya besinlerin etkilerini değerlendirmek, adipogenezin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak, çeşitli bileşiklerin ve besinlerin obezite tedavisinde potansiyel uygulamalarını değerlendirmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [133]. Bu çalışmada da 3T3-L1 hücre hattı kullanıldı.

1 ml lik cryo tüp içerisinde -80°C derece donmuş olarak bulunan 3T3-L1 hücreleri dolaptan çıkarılarak 37°C sıcak su banyosunda ortalama 1 dakikada çözdürüldü. Çözdürülen hücreler 15 ml lik falkon tüpe aktarıldı ve 15 ml hacim daha önce 37°C ye getirilmiş komplete medyum (%10 buzağı serumu, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin bulunan Dulbecco nun modifiye Eagle medyum (DMEM)) ile tamamlandı. Hacmi 15 ml'ye tamamlanan, içinde hücrelerin bulunduğu tüp 37°C sıcaklığa ayarlanmış santrifüjde 1800 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüpün süpernatant kısmı atıldı, pelletin üzeri komplete medyum ile 4 ml ye tamamlanarak pipetaj yapıldı. Pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışmış olan hücreler 25 ml hacimdeki flasklara ekildi. Ekilen hücrelerin üzeri komplete medyum ile 5 ml ye tamamlandı. Çözdürülmesi sağlanan 3T3-L1 hücre hattı, %5 CO_2 konsantrasyona ve 37°C ortam sıcaklığına sahip inkübatörde, pH değeri 7,0-7,4 olan, içeriğinde %10 buzağı serumu, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin bulunan Dulbecco nun modifiye Eagle medyum (DMEM) içeren ortamda çoğaltıldı ve pasajlandı. Flask içindeki medyum gün aşırı değiştirildi.

3.2. Hücrelerin Pasajlanması

Flask içerisinde hücrelerin yoğunluğu %70-80'e ulaştığında hücrelerin büyüme durması evresine geçmemesi için pasajlama yapıldı. Flask içindeki medyum uzaklaştırıldı ve serum kalıntılarının tripsini inhibe etmemesi için PBS tamponu ile yıkama yapıldı. Flask içine 2 ml kadar tripsin eklendi. Hafif çalkalamalarla tripsinin flask yüzeyine yayılması sağlandı ve 37°C

inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. 5 dakikanın sonunda inverted mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrılmaları değerlendirildi ve hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılması sağlandıktan sonra pipetaj yapılarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp içindeki hücrelerin hacmi PBS tamponu ile 15 ml'ye tamamlandı. 37°C sıcaklıkta 1800 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden alınan tüpdeki süpernatant atıldı ve pelletin üzeri komplete medyum ile tamamlanarak 1:3 oranında pasaj yapıldı. Pasajlama sonrası flasklardaki hücrelerin medyumları iki günde bir değiştirildi. Konfluensi %70-80 olduğunda tripsinizasyon işlemi tekrarlanarak pasajlandı.

3.3. Hücre Sayımı

Deney serilerinde kullanılacak pleytlerdeki kuyucuklara eşit hücre ekilebilmesi için ekim öncesi hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı, tripan boyama tekniği kullanarak hücre sayımı yapan Cedex XS hücre sayım cihazı ile yapıldı. Flasklardaki hücrelerin kaldırılması için tripsin kullanıldı, ardından hücreler 15 ml lik falkon tüpe toplandı ve üzerlerine 15 ml lik hacmi tamamlamak için üzerine PBS eklendi. Ardından 1800 rpm e ayarlanan santrifüj cihazında hücreler 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı ve pelletin üzeri komplete medyum ile tamamlandı. Pipetaj yapılarak hücrelerin homojenizasyonu sağlandı. Ardından hücre süspansiyonundan 10 µl ve tripan blue solüsyonundan 10 µl tripan blue alındı ve karıştırıldı. Daha sonra bu karışımdan 10 µl alınarak Cedex XS hücre sayım cihazında kullanılan Cedex XS slaytlarındaki yuvaya bırakıldı. Slayt Cedex XS cihazındaki yuvasına yerleştirilerek otomatik sayım yapıldı.

3.4. Limonin ve Nomilin Çözeltilerinin Hazırlanması

Sigma-Aldrich marka limonin ve nomilin ticari olarak satın alındı, DMSO içinde çözdürülerek stok hazırlandı. Stok +4°C de muhafaza edildi. Deney serilerinde kullanılacak miktarlar stok çözeltiden medyum ile seyreltilerek kullanıldı.

3.5. Viabilite Deneyi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi amacı ile 48 saat ve 96 saatlik viabilite deney serileri planlandı ve canlılık analizi MTT ile yapıldı. Sayımın ardından 24 lük pleytlerde her kuyucuğa 20.000 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin kuyucuk tabanına tutunmaları için 24 saat beklenildi. 24 saatin ardından limonin ve nomilin uygulaması gerçekleştirildi. Kontrol gruplarında çözeltilerle aynı hacimde, son konsantrasyon 0,002 mcg/ml olarak DMSO uygulandı. Deney serileri aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- Kontrol grubu (n=4)

- 5 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 10 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 25 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 5 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)
- 10 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)
- 25 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)

48 saatlik ve 96 saatlik iki grup şekilde planlanan deneyde, her grubun kendisi için planlanan sürenin sonunda deney durduruldu ve MTT analizi yapıldı.

3.6. Proliferasyon Deneyi

Proliferasyonun değerlendirildiği deney serilende limonin ve nomilin tek başlarına diferansiyasyon sürecinin 0-4'üncü günü boyunca uygulandı. 4'üncü günde MTT proliferasyon analizi yapıldı. Kontrol gruplarında çözeltilerle aynı hacimde, son konsantrasyon 0,002 mcg/ml olarak DMSO uygulandı. Deney serileri aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- Kontrol grubu (n=4)
- 5 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 10 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 25 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 5 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)
- 10 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)
- 25 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)

3.7. Diferansiyasyon Deneyi

Diferansiyasyonun değerlendirildiği deney serilende limonin ve nomilin tek başlarına diferansiyasyon sürecinin 0-8 inci günü boyunca uygulandı. 8 inci günde Oil Red O boyaması yapıldı. Kontrol gruplarında çözeltilerle aynı hacimde, son konsantrasyon 0,002 mcg/ml olarak DMSO uygulandı. Deney serileri aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- Kontrol grubu (n=4)
- 5 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 10 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 25 mcg/ml limonin uygulanan grup (n=4)
- 5 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)
- 10 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)
- 25 mcg/ml nomilin uygulanan grup (n=4)

3.8. MTT Analizi

MTT analizi, MTT nin ((3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolyum bromid) redüksiyonuna bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntem kullanılacak olan herhangi bir terapötik ajanın hücreye olası sitotoksik veya proliferatif etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. MTT mitokondriyal redüktazlar tarafından metabolize edilir ve bunun sonunda ortaya formazan tuzu çıkar. Formazan tuzu çözülürken ELISA reader ile 570 nm dalga boyunda okuma yapılarak değerlendirilmektedir.

3.9. MTT ve Çözücü Solüsyonların Hazırlanışı

MTT, deneyden bir gün önce 5 mg/ml olarak hesaplandı ve pH 7,4 olan PBS içinde çözüldü. Çözelti 0,2 µm lik filtreden geçirildi. MTT çözeltisinin bulunduğu tüpün ışıktan korunmasına dikkat edildi. Saklanması için +4°C sıcaklıkta buzdolabına kaldırıldı. Formazan kristallerini çözmek için kullanılacak izopropil alkole 0,04 M HCl eklenerek asidifiye edildi. Deney günü hazırlanmış olan MTT çözeltisi final konsantrasyon 0,5 mg/ml olacak şekilde kullanıldı.

3.10. MTT Analizinin Yapılması

24 kuyucuklu pleytler inkübatörden çıkarıldı ve kuyucuklardaki tüm medyum boşaltıldı. Ardından, kuyucuklarda kalmış olabilecek medyumda bulunan fenol red in deney sonuçlarında hataya yol açmaması için kuyucuklar 37°C sıcaklıkta renksiz RPMI 1640 ile yıkandı. MTT çözeltisi filtre edildi ve %10 unu MTT nin oluşturduğu, final konsantrasyon 0,5 mg/ml olan medyum kuyucuklara eklendi. Pleytler tekrar 37°C de 3 saat inkübe edildi. 3 saatlik inkübasyonun akabinde pleytler inkübatörden çıkarıldı ve kuyucuklarda bulunan medyum boşaltıldı. Oluşan formazan kristalleri üzerine asidifiye izopropil alkol eklenerek 10 dakika boyunca çalkalama işlemi yapıldı ve böylece formazan tuzlarının iyice çözülmesi sağlandı. Çalkalama işleminin bitiminde pipetaj yapılarak her kuyucuktan 200 µl alınarak 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine aktarıldı ve ELISA okuyucusunda 570 nm absorbansta okuma yapıldı. Negatif kontrol için hücresiz pleytlere aynı işlem yapıldı ve aynı absorbansta ölçüldü.

3.11. 3T3-L1 Hücre Hattı Diferansiyasyon Protokolü

Hücre sayımının ardından 24 kuyucuklu pleytlerin her kuyucuğuna 20.000 hücre ekildi. Kuyucuktaki hücrelerin ekimi ve çoğalması aşamalarında komplete medyum (%10 buzağı

serumu, %1 glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ile hazırlanmış DMEM) kullanıldı. Her kuyucuktaki medyum iki günde bir değiştirildi. Bu süre boyunca hücrelerin kuyucuklarda ulaştıkları yoğunluk inverted mikroskopta aracılığıyla izlendi. Hücrelerin tam konfluent oldukları gün -2 nci gün kabul edilerek buzağı serumu içeren komplete medyumda 2 gün daha kalmalarına izin verildi. Konfluensi sonrası 2 nci gün diferansiyasyon sürecinin 0. günü olarak kabul edildi. Protokolün 0. gününde adiposit diferansiyasyonunun indüklenmesi için hücrelere 0,25 µM deksametazon, 1µM insülin ve 0,5 mM izobutilmetilksantin (IBMX) içeren %10 FBS olacak şekilde hazırlanmış DMEM (fetal sığır serumu/Dulbecco nun modifiye Eagle medyum) uygulandı, iki gün inkübe edildi (0-2 nci gün). 2 gün sonra kuyucuklarda bulunan hücrelere 1µM insülin içeren %10 u FBS olan DMEM uygulandı, iki gün inkübe edildi (2-4'üncü gün). Protokolünün 4'üncü günü kuyucuklardaki medyum %10 FBS içeren komplete medyum ile değiştirildi. İki günde bir medyum değişimi yapıldı ve inkübasyon 8 inci güne kadar ilerletildi (4-8 inci gün). Diferansiyasyon protokolünün 8 inci gününde deney sonlandırıldı, kuyucuklardaki hücrelere Oil Red O boyama yapılarak adiposit diferansiyasyonu gözlemlendi ve değerlendirildi.

3.12. Oil Red O Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Toz şeklindeki Oil red O boyası 0,35 g tartılarak 100 ml izopropanol içerisinde aktarıldı, iyice çözünmesi sağlandı. Solüsyon haline gelen boya 1 gece +4°C sıcaklıkta ışıktan korunarak saklandı. Ertesi gün 0,22 µm membran filtre kullanılarak solüsyon filtrelendi ve stok solüsyonu +4°C de ışıktan korunarak bekletildi. Boyama işlemi yapılacağı zaman 6 birim Oil Red O stok solüsyon 4 birim dH₂O ile seyreltildi. 20 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak bekletildikten sonra 0,22 µm membran filtresi kullanılarak tekrar filtrelendi ve kullanıldı.

3.13. Oil Red O Boyama ile Diferansiyasyon Analizi

Adiposit diferansiyasyon protokolü 8 gün süresince uygulandı ve 8 inci günde deney sonlandırıldı. Hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki medyum mikropipet ile boşaltıldı. Kuyucuklara %10 luk formalin eklenerek 5 dakika beklenildi. 5 dakika beklenildikten sonra kuyucuklardaki formalin taze formalin ile değiştirildi. Hücreler formalin içerisinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardaki formalin tamamen boşaltıldı. Kuyucuklara %60 lık izopropanol ile yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra kuyucukların kuruması için bir süre beklenildi. Kuyucukların kurduğundan emin olunduktan sonra hazırlanmış ve seyreltilmiş olan Oil Red O solüsyonundan 200 µl kuyucuklara konuldu. Hücreler 10 dakika Oil red O solüsyonu içinde inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde Oil Red O çalışma solüsyonu kuyucuklardan

uzaklaştırıldı, akabinde kuyucuklar 4 kez ddH₂O ile yıkandı. Bu aşamada kuyucuklar inverted mikroskop ile görüntüledi. Ardından kuyucuklar tekrar kurutuldu. Kuyucuklardaki yağ hücreleri boyamış olan Oil Red O çalışma solüsyonunu çözmesi için kuyucuklara %100 izopropanol eklendi. Pleytler 10 dakika çalkalayıcıda oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak çalkalandı. Ardından pipetaj yapılarak her kuyucuktan 200 µl çözelti alındı ve 96 lık ELISA pleytlerine transfer edildi. Pleytler ELISA cihazında 490 nm absorbansta ölçüldü.

3.14 İstatistiksel Analiz

Kolorimetrik olarak değerlendirilen diferansiyasyon ve proliferasyon verileri ortalama standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü ANOVA'yı takiben Dunnet *post-hoc* testi kullanıldı ve $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.



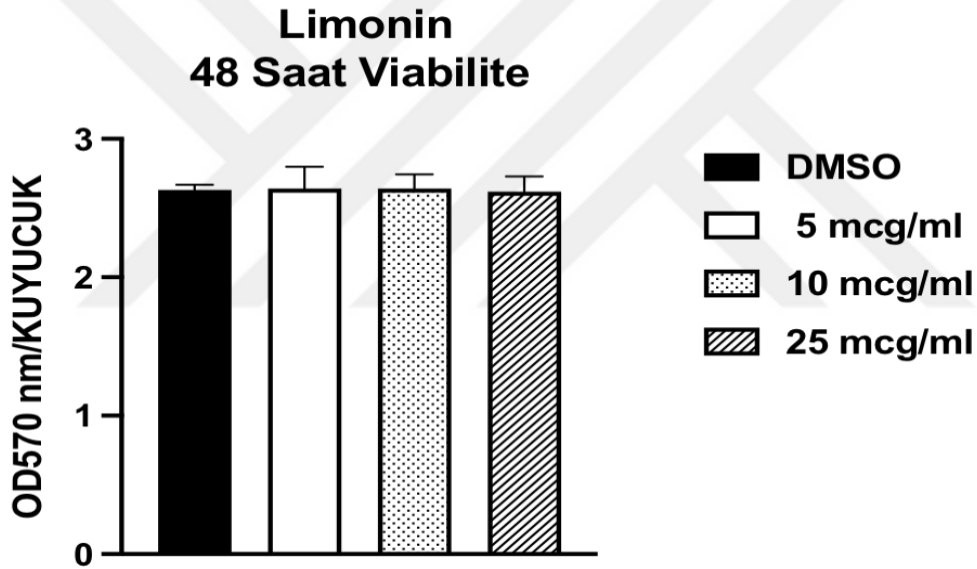
4. BULGULAR

4.1. Viabilite Bulguları

4.1.1 Limonin Uygulamasının Viabilite Üzerine Etkisi

4.1.1.1. 48 Saat

Hücre kültür ortamında limonin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi için 3T3-L1 hücre kültür ortamına limonin (5, 10 ve 25 mcg/ml) uygulaması yapıldı. 48 saat sonunda MTT viabilite analizi yapılarak viabilite değerlendirildi. Limonin, 48 saatin sonunda uygulanan konsantrasyonlarda viabilite üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Limonin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-2 nci gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, deney protokolünde her kuyucuğa 0-2 gün limonin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Preadiposit viabilitesi üzerine limonin uygulamasının etkisi MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

4.1.1.2. 96 Saat

Hücre kültür ortamında limonin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile 3T3-L1 hücre kültür ortamına limonin (5,10 ve 25 mcg/ml) uygulaması yapıldı. 96 saat sonunda MTT viabilite analizi yapılarak viabilite değerlendirildi.

Limonin, 96 saat sonunda uygulanan konsantrasyonlarda viabilite üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.2.).

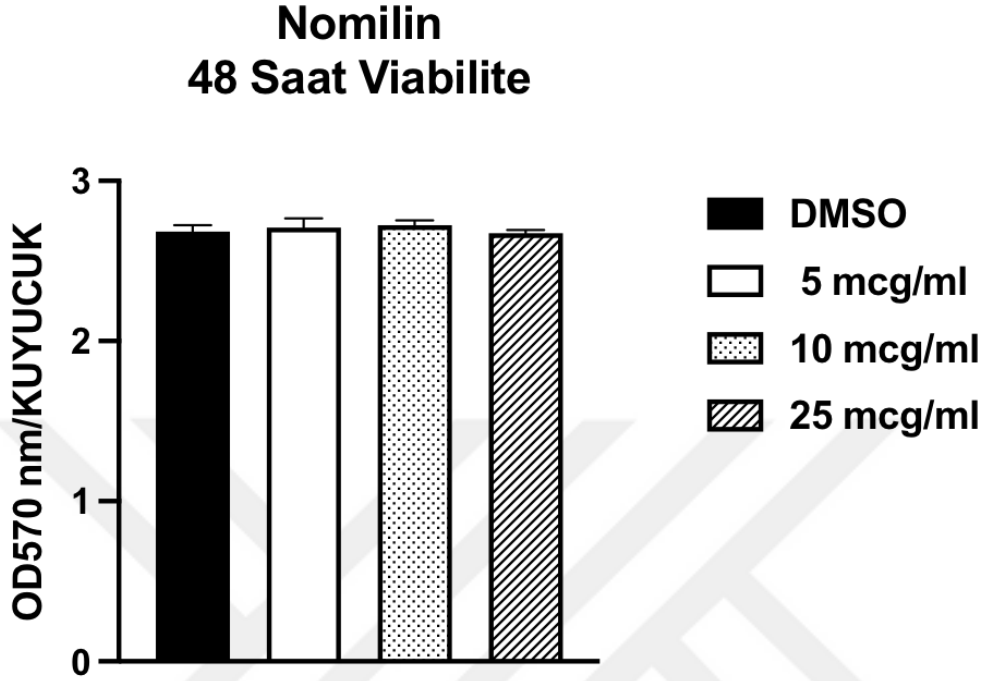


Şekil 4.2. Limonin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-4 gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, deney protokolünde her kuyucuğa 0-4 gün limonin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Preadiposit viabilitesi üzerine limonin uygulamasının etkisi MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4.1.2. Nomilin Uygulamasının Viabilite Üzerine Etkisi

4.1.2.1. 48 Saat

Hücre kültür ortamında nomilin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi için 3T3-L1 hücre kültür ortamına nomilin (5,10 ve 25 mcg/ml) uygulaması yapıldı. 48 saat sonunda MTT viabilite analizi yapılarak viabilite değerlendirildi. Nomilin, 48 saatin sonunda uygulanan konsantrasyonlarda viabilite üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.3.).

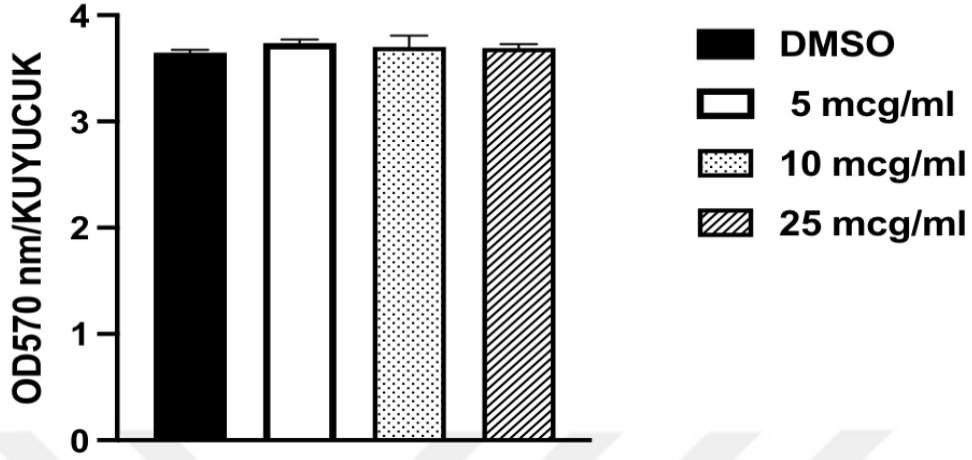


Şekil 4.3. Nomilin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-2 nci gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, deney protokolünde her kuyucuğa 0-2 gün nomilin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Preadiposit viabilitesi üzerine limonin uygulamasının etkisi MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4.1.2.2. 96 Saat

Hücre kültür ortamında nomilin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi için 3T3-L1 hücre kültür ortamına nomilin (5,10 ve 25 mcg/ml) uygulaması yapıldı. 96 saat sonunda MTT viabilite analizi yapılarak viabilite değerlendirildi. Nomilin, 96 saat sonunda uygulanan konsantrasyonlarda viabilite üzerine anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.4.).

Nomilin 96 Saat Viabilite

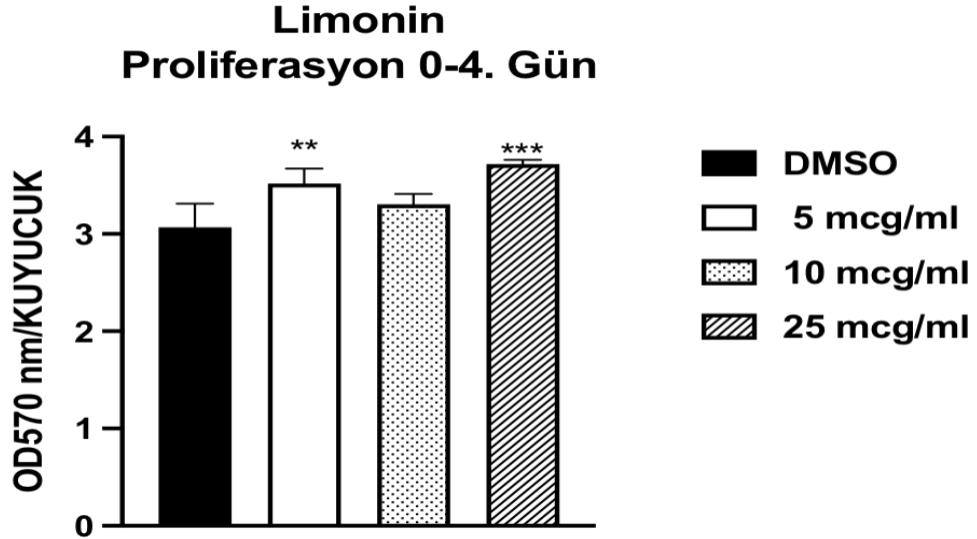


ŞEKİL 4.4. Nomilin uygulamasının preadiposit viabilitesi üzerine etkisi (0-4'üncü gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, deney protokolünde her kuyucuğa 0-4 gün nomilin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Preadiposit viabilitesi üzerine limonin uygulamasının etkisi MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4.2. Proliferasyon Bulguları

4.2.1. Limonin Uygulamasının Proliferasyon Üzerine Etkisi

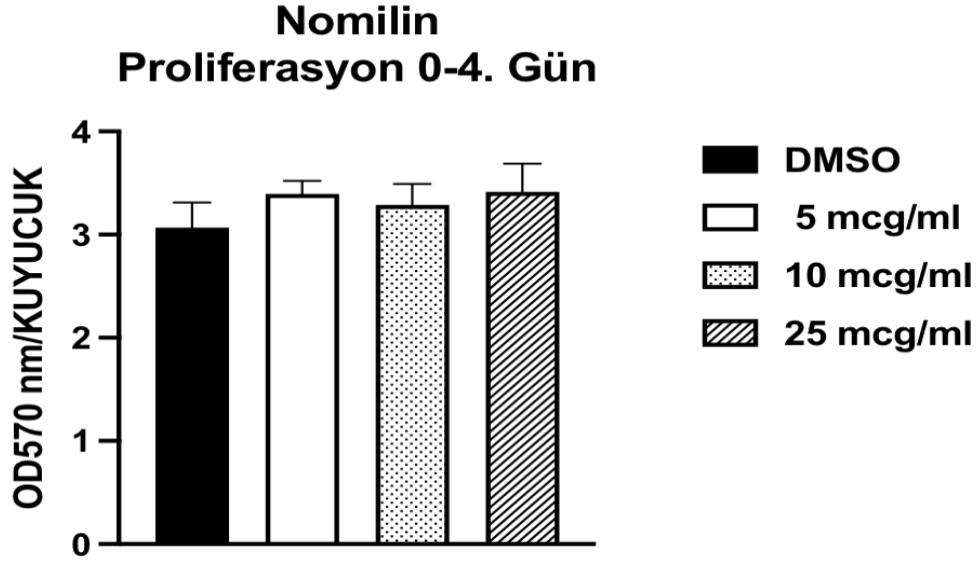
Hücre kültür ortamına limonin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etki gösterip göstermeyeceğini test etmek amacıyla 3T3-L1 hücre kültür ortamına diferansiyasyon sürecinin 0-4'üncü günü limonin (5, 10 ve 25 mcg/ml) uygulaması yapıldı. Protokolün 4'üncü günü sonunda deney sonlandırılarak MTT proliferasyon analizi yapıldı. 5 mcg/ml ve 25 mcg/ml konsantrasyonda uygulanan limonin proliferasyonu artırırken, 10 mcg/ml konsantrasyonda anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Limonin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi (0-4'üncü gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, diferansiyasyon sürecinde her kuyucuğa 0-4 gün limonin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Adiposit proliferasyon üzerine limonin uygulamasının etkisi MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. $P<0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi. **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ (kontrolle karşı anlamlılık).

4.2.2. Nomilin Uygulamasının Proliferasyon Üzerine Etkisi

Hücre kültür ortamına nomilin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etki gösterip göstermeyeceğini test etmek amacıyla 3T3-L1 hücre kültür ortamına diferansiyasyon sürecinin 0-4'üncü günü nomilin (5, 10 ve 25 mcg/ml) uygulaması yapıldı. Protokolün 4'üncü günü sonunda deney sonlandırılarak MTT proliferasyon analizi yapıldı. Nomilin, uygulanan konsantrasyonlarda proliferasyon üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 4.6.).

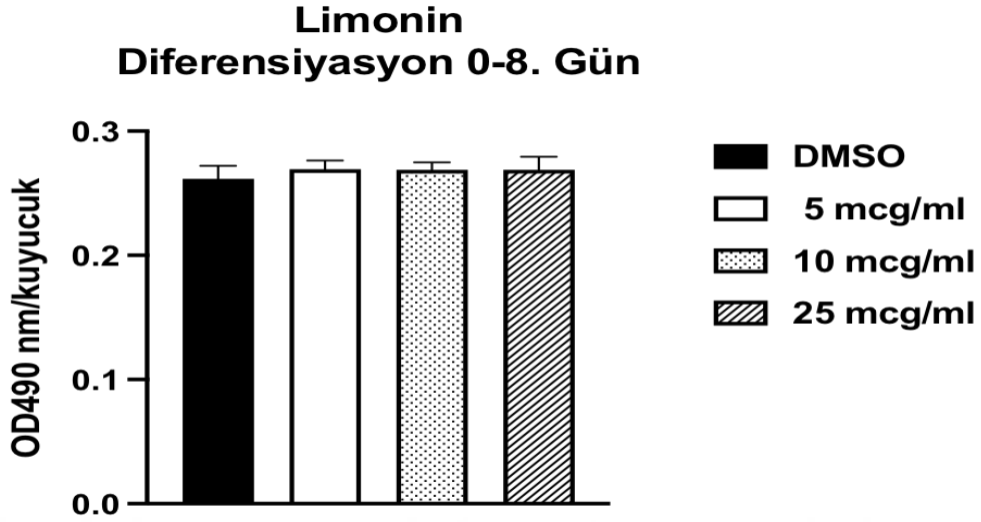


Şekil 4.6. Nomilin uygulamasının adiposit proliferasyonu üzerine etkisi (0-4'üncü gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, diferansiyasyon sürecinde her kuyucuğa 0-4 gün nomilin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Adiposit proliferasyon üzerine nomilin uygulamasının etkisi MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

4.3. Diferansiyasyon Bulguları

4.3.1. Limonin Uygulamasının Diferansiyasyon Üzerine Etkisi

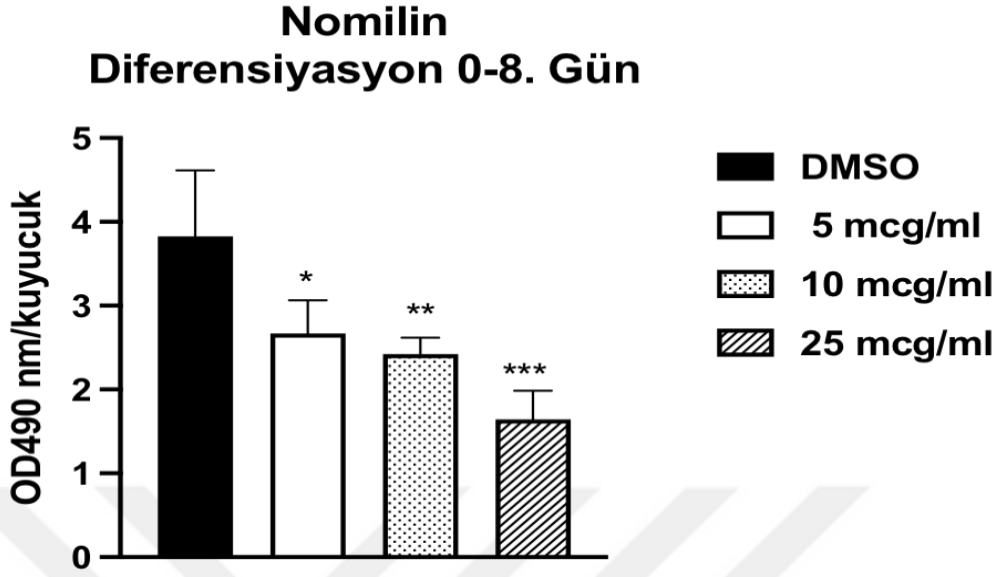
Hücre kültür ortamına diferansiyasyon protokolünün 0-8 inci günleri boyunca limonin (5,10 ve 25 mcg/ml) uygulanmasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi test edildi. Diferansiyasyon sürecinin 0-8 inci günleri arasında hücrelere limonin uygulanmasının ardından 8 inci günde deney sonlandırıldı ve Oil Red O boyaması yapılarak diferansiyasyon değerlendirildi. Limonin, uygulanan konsantrasyonlarda preadiposit diferansiyasyonu üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Limonin uygulamasının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi (0-8 inci gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, diferansiyasyon sürecinde her kuyucuğa 0-8 gün limonin 5,10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Adiposit diferansiyasyon üzerine limonin uygulamasının etkisi Oil Red O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

4.3.2. Nomilin Uygulamasının Diferansiyasyon Üzerine Etkisi

Hücre kültür ortamına diferansiyasyon protokolünün 0-8 inci günleri boyunca limonin (5,10 ve 25 mcg/ml) uygulanmasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi test edildi. Diferansiyasyon sürecinin 0-8 inci günleri arasında hücrelere limonin uygulanmasının ardından 8 inci günde deney sonlandırıldı ve Oil Red O boyaması yapıldı. Nomilin, uygulanan konsantrasyonlarda doza bağımlı olarak diferansiyasyonu baskıladı (Şekil 4.8.)



Şekil 4.8. Nomilin uygulamasının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi (0-8 inci gün). Preadiposit (3T3-L1) hücre kültüründe, diferansiyasyon sürecinde her kuyucuğa 0-8 gün nomilin 5, 10 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarında uygulandı (n=4). Adiposit diferansiyasyon üzerine nomilin uygulamasının etkisi Oil Red O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Veriler ortalama standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ (kontrolle karşı anlamlılık).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik ile beyaz yağ dokusunda aşırı lipid birikimi sonucu gelişen obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere çeşitli metabolik komplikasyonlarla ilişkili bir metabolik hastalıktır. Obezite gelişiminde adipositlerin lipid birikimi sonucu genişlemesi kadar yağ dokuda bulunan progenitor hücrelerin (preadipositler) olgun adipoz hücrelere diferansiyasyonunun da önemli olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda preadiposit diferansiyasyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir klon hücre hattı olan 3T3-L1 preadipositlerinde narenciye alkaloidleri olan limonin ve nomilinin diferansiyasyon ve proliferasyon üzerine etkileri araştırıldı.

Limonin ve nomilinin hücre viabilitesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği deney serilerinde hem limonin (5,10,25 mcg/ml, 48 ve 96 saat) hem de nomilinin (5,10,25 mcg/ml, 48 ve 96 saat) hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Halder ve arkadaşlarının çalışmasında siklodekstrin kaplı limonin 3T3-L1 preadipositlerinde 48 saat boyunca 25, 50, 100, 200, 300 mcg/ml konsantrasyonlarda uygulanmış ve viabilite üzerine anlamlı bir etki görülmemiştir [8]. Bu bulgular bizim çalışmamızda limoninin 3T3-L1 preadipositlerinde viabilite üzerinde etkisinin olmadığını gösteren verilerimizle uyumludur. Kimira ve arkadaşlarının çalışmasında nomilin RAW 264.7 hücrelerine 72 saat boyunca uygulanmış ve 50 µM ve daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermemiştir [134]. Nomilinin 3T3-L1 preadipositlerinde viabilite üzerine etkisini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Diferansiyasyon deneylerinde kullanılan klon preadiposit hücre hatları (3T3-L1, 3T3-F442A ve Ob17), konfluent olmalarının ardından büyümenin durması aşamasına ulaştıklarında, uygun hormonal indüksiyon ile yeniden hücre döngüsüne girerler ve mitotik klonal ekspansiyon (MKE) olarak bilinen en fazla iki tekrarlı postkonfluent mitoz bölünmeye uğrarlar. Bu, klon hücre hatları ile yapılan deneylerde hücrelerin terminal adiposit farklılaşması evresine girmesi için temel bir gerekliliktir. Bununla birlikte, insan kökenli preadipositler ile yapılan çalışmalarda terminal diferansiyasyon evresi öncesinde mitotik klonal ekspansiyon evresi gözlenmemektedir [135]. İnsan adiposit prekürsör hücrelerinin β-D-arabinofuranosilsitozin ile mitotik bölünmesinin inhibe edilmesinin terminal diferansiyasyonu etkilemediği gösterilmiştir. [136]. Bu sonuç, insan kökenli preadipositlerin *in vivo* olarak potansiyel kritik hücre bölünmelerinden geçmiş olabileceğini düşündürmüştür [137]. Yapılan bir başka çalışmada ise insan kökenli preadipositlerde siRNA aracılığı ile önemli bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan Cdk1 gibi hücre döngüsü genlerinin downregüle edilmesi ile mitoz bölünmenin azaltılması sonucunda terminal diferansiyasyonun artırmış fakat adipogenez sırasında hücre kültür ortamına fibroblast büyüme faktörü eklenmesi ile proliferasyonda artış görülürken terminal farklılaşmada azalma gözlemlenmiştir. [138]. Bu nedenle mitotik klonal ekspansiyon mürin

preadipositlerinde adipogenez için bir ön koşulken, insan adipositlerinde proliferasyonun rolü hala belirsizdir.

Çalışmamızda 3T3-L1 hücrelerinin proliferasyonu üzerine limonin ve nomilin alkaloidlerinin etkisinin değerlendirilmesi amacı ile alkaloidlerin her biri 3 farklı konsantrasyonda kontrol grubuna karşı test edildi. Nomilin uygulanan tüm konsantrasyonlarda 0-4'üncü gün zaman aralığında proliferasyon üzerine etkisiz bulundu. Limonin 5 mcg/ml ve 25 mcg/ml konsantrasyonda uygulandığında proliferasyonu artırdı. Bununla birlikte 10 mcg/ml'lik uygulama proliferasyonu bir miktar arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Limonin proliferasyonu artırıcı yönde etki oluşturuyor gibi görünmekle birlikte 10 mcg/ml konsantrasyonda bu yönde etki gözlenmemiş olması deneysel bir hata olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Preadiposit proliferasyonundaki artışın 5 ve 25 mcg/ml konsantrasyonlarda gerçekleşip 10 mcg/ml konsantrasyonda gerçekleşmemesi hücre ekimi sırasında pipetleme ile ilgili bir hata olması nedeni ile hücrelerin eşit dağılmamış olması olasılığını akla getirmektedir. Sonucun netleştirilmesi adına deney tekrarı gerekli görünmektedir fakat limonin miktarının kısıtlı olması nedeniyle deney serisinin tekrarı mümkün olmamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda limonin ve nomilinin kanser hücrelerinde anti-proliferatif etkisi gösterilmiştir. İnsan pankreatik adenokarsinom hücre hattı olan Panc-28 hücre hattına 2, 4 ve 6 gün boyunca 20, 40 ve 60 µM konsantrasyonlarda limonin ve nomilin uygulaması yapılmıştır. 6'ncı günün sonunda limonin uygulanan hücrelerde %71, nomilin uygulanan hücrelerde ise %81 proliferasyon inhibisyonu görülmüştür [139]. Limonin ve nomilinin 3T3-L1 preadipositlerinde proliferasyona olan etkisini gösteren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu açıdan bizim verilerimiz literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.

Diferansiyasyon üzerine limonin ve nomilin alkaloidlerinin etkisinin değerlendirilmesi amacı ile limonin (5,10,25 mcg/ml) ve nomilin (5,10,25 mcg/ml) kontrol grubuna karşı test edilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda limonin, 3T3-L1 hücre diferansiyasyonu üzerinde etkisiz bulunmuştur. Halder ve arkadaşları siklodekstrin ile modifiye edilmiş limoninin 30 mcg/ml de 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonunu süprese ettiğini göstermişlerdir [8]. Bizim çalışmamızda uygulanan dozlarda limoninin diferansiyasyon üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır. Limonin ve nomilin suda ve alkolde çözünmezken, DMSO limonin ve nomilin için iyi bir çözücüdür. Bunun DMSO sitotoksitesinden kaçınmak amacı ile daha düşük konsantrasyonları denemiş olmamızdan veya modifiye edilmemiş limonin kullanmış olmamızdan kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. Yakın zamanda siklodekstrinin lipid metabolizması üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra siklodekstrin uygulamasının kilo alımını baskıladığı da ortaya konulmuştur. Artiss ve arkadaşlarının erkek Wistar sıçanları üzerinde yaptığı bir çalışmada 6 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen

sıçanların diyetlerine, diyetteki yağın %10 u kadar α -siklodekstrin eklenmesi sıçanların kilo alımını sadece yüksek yağlı diyetle beslenen gruba göre önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, α -siklodekstrin ekli yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda plazma trigliserit seviyelerinde %30, toplam kolesterol seviyelerinde %9'luk bir azalma görülmüş, dışkıdaki yağ içeriği artmış ve serum leptin seviyeleri normale dönmüştür. 6 ncı haftanın sonunda sıçanlarda insülin duyarlılığı geliştiği görülmüştür [140]. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde siklodekstrinin adiposit diferansiyasyonu üzerine bir etki oluşturuyor olması olası görünmektedir. Bu nedenle Halder ve arkadaşlarının çalışmasında diferansiyasyonda gözlenen süpresyonun limonin dışında siklodekstrinden kaynaklanma ihtimali akla gelmektedir. Çalışmamızda kullanılan diğer narenciye alkaloidi olan nomilin 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonunu tüm konsantrasyonlarda ve doz bağımlı şekilde süprese etmiştir. Nomilinin preadiposit diferansiyasyonu üzerine süprese edici etkisinin gösterildiği ilk çalışma olması nedeni ile çalışmamız özgündür. Bununla birlikte, bu süprese edici etkinin hangi sinyal yolları aracılığı ile ortaya çıktığının belirlenebilmesi için ek deneylere gereksinim bulunmaktadır. Diğer taraftan nomilinin bu etkisinin *in vivo* deneylerle de ortaya konulması gerekmektedir. Örneğin obez farelerde ağırlık üzerine etkisi, insülin direnci ve bununla ilgili metabolik hastalık modellerinde de test edilmesi ilginç ve ümit vadeci gibi durmaktadır. Bütün bunların sonucunda, toksisite açısından da olumsuz bir durum olmazsa, nomilin potansiyel bir antiobezite ilaç haline gelebilir.

Adiposite özgü faktörler olan PPAR γ ve C/EBP- α , adiposit farklılaşmasında erken fazda yer almaktadırlar [141]. 3T3-L1 preadipositlerinin de içinde bulunduğu 8 tip mürin fibroblastik hücre hattında C/EBP- α 'nın ektopik ekspresyonu sağlandığında hücre kültür ortamında hormonal indüksiyon olmamasına rağmen hücrelerde lipid birikimi gözlemlenmiş ve C/EBP- α nın adipogenez kontrol mekanizmasının önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir [142]. Ayrıca antisense RNA kullanılarak C/EBP- α nın seçici olarak susturulması 3T3-L1 preadipositlerinin farklılaşması sırasında GLUT4 (Glucose transporter type 4), aP2 gibi olgun adipositlerde eksprese olan genlerin ekspresyonunu ve trigliserid brikimini baskılamıştır [143]. PPAR γ 'nın rolünün anlaşılması için yapılan bir başka çalışmada çinko parmak baskılayıcı proteinler ile PPAR γ 2'ye özgü promotor bölge hedeflenerek PPAR γ 2 ekspresyonunun baskılanması adipogenezin inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. Aynı hücrelerde PPAR γ 2 nin tekrar ekspresyonunun sağlanması adipogenez inhibisyonunu ortadan kaldırmıştır [144]. Hiperkolestrolemi üzerine etkisi olduğu bilinen berberinin 3T3-L1 preadipositlerin diferansiyasyonunu 3T3-L1 neredeyse tamamen bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca PPAR γ ve C/EBP- α mRNA seviyelerini yaklaşık %98 oranında inhibe etmiştir [145]. Yapılan çalışmalarda kafein, kurkumin delfinidin, genistein ve kakao gibi birçok fitokimyasalın terminal diferansiyasyonu baskımlarken PPAR γ ve C/EBP- α ekspresyon seviyelerini de düşürdüğü

gösterilmiştir [146,147,148,149,150]. Elde ettiğimiz sonuçlar, özellikle nomilin in 3T3-L1 preadipositlerinde PPAR γ ve C/EBP- α ekspresyon seviyelerini düşürebileceğini düşündürmüştür. Ancak, bunun açıklığa kavuşması için ek deneylere gereksinim vardır.

G protein-kenetli reseptör TGR5'in glikoz homeostazı ve obeziteye karşı koruyucu olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Watanabe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada C57Bl/6J farelerinde bir grup yüksek yağlı diyetle beslenmiş, diğer gruba ise yüksek yağlı diyetle ek olarak TGR5 agonisti olan kolik asit verilmiştir. Sadece yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde kontrole kıyasla kilo alımı artarken, yüksek yağlı diyetle kolik asit eklenen grupta kilo alımının daha sınırlı olduğu görülmüştür. 120 günün sonunda yüksek yağlı diyetle beslenen grubun diyetine de kolik asit eklenmiş ve 30 gün içinde vücut ağırlıklarının normale döndüğü, beyaz yağ doku kütlelerinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α), UCP1 gibi enerji harcanmasında görev alan genlerin ifadesinin kolik asit ile beslenen farelerde arttığı gösterilmiştir. [151]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diyabetik farelerin TGR5 agonisti olan INT-777 ile tedavisi renal mitokondriyal biyogenezini artırmış, oksidatif stresi azaltmış ve yağ asidi β -oksidasyonunu artırmıştır. INT-777 uygulamasının diyabetik farelerde AMPK'nın (AMP-activated protein kinase - AMP ile aktive olan protein kinaz) aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir [152]. Hem preadiposit diferansiyasyonunda hem de adipositlerde lipid metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi bir rolü olan AMPK aktivasyonu PPAR γ ve C/EBP- α gibi preadiposit diferansiyasyonunun erken transkripsiyon faktörlerini baskılayarak adipogenezini inhibe etmektedir [153]. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde glikoz toleransını düzelttiği ve kilo alımını azalttığı gösterilen nomilinin, bu etkisini TGR5 aktivasyonu yolu ile ortaya koyduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra kimyasal yapı olarak çok benzer olduğu diğer bir narenciye alkaloidi olan obakunon'un da TGR5 agonisti olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, halka yapısında nomilin ve obakunon'a göre belirgin fark bulunan limonin'in TGR5 aktivasyonuna yol açmadığı gösterilmiştir [7]. Preadipositlerde TGR5 aktivasyonunun etkilerini gösteren çalışma bulunmamakla birlikte yukarıda aktarılan bilgiler ışığında nomilinin 3T3-L1 preadipositlerinin adipogenezini üzerindeki süprese edici etkisinin TGR5 aktivasyonu aracılığıyla AMPK aktivitesinin indüklenmesi yolu ile gerçekleşebileceği öne sürülebilir. Ancak bu noktayı açıklığa kavuşturmak için ek deneylere gereksinim vardır ve TGR5'in beyaz adipositlerin fizyolojisindeki rolü belirsizliğini korumaktadır.

Çalışmamızdaki deneylerde madde ve malzeme sınırlamalarından dolayı n sayısı 4 olarak belirlenmiş, deney tekrarı yapılamamış ve konsantrasyon aralığı kısa tutulmuştur. Sınırlı madde kullanımından dolayı limonin ve nomilin, adipogenezin farklı aşamalarında ayrıca test edilememiştir. Bu yüzden nomilinin adipogenezini süprese edici etkisi terminal bir etki mi yoksa adipogenezin erken aşamalarında gerçekleşen bir etki mi net bir yorum yapılamamaktadır.

Limonin ve nomilinin proliferasyon ve diferansiyasyon üzerine etkilerine katılan sinyal yolları ve transkripsiyon faktörlerinin anlaşılmasına dair yapılması gereken deneyler ek madde ve malzeme ihtiyacını doğurmaktadır. Bu durum deney çeşitliliği ve kullanılan teknikleri sınırlandırmıştır.

Obezite prevelansı çağımızda gitgide artmaktadır ve hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkeler için ciddi bir sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir. İlişkili olduğu kronik hastalıklar nedeni ile yol açtığı morbidite ve mortalite oranlarındaki artış nedeni ile obezite ülkelerin sağlık sistemleri üzerine olumsuz etki göstermekte ve bunun yanı sıra ekonomik açıdan büyük bir yük oluşturmaktadır. Günümüzde çok sayıda merkezde obezitenin moleküler temellerinin anlaşılmasına ve obeziteye karşı etkili yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bununla birlikte, henüz etkili bir tedavi bulunabilmiş değildir. Ancak, oldukça dinamik ve enerji dengesinin hangi yönde ağır bastığına bağlı olarak kompozisyonu, hücre sayısı ve hücrelipid içeriği açısından çok büyük değişiklikler gösterebilen yağ dokunun hacimsel olarak artışının önlenmesi diferansiyasyonun süpresyonu aracılığı ile sağlanabilir. Adipositlerin lipid içeriğinin artışı kadar önemli bir mekanizma olan sayıca artışının baskılanabilmesi önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada narenciye limonoidi olan limonin ve nomilinin adipogenez üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla standart diferansiyasyon protokolü kullanılarak 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin adipositlere diferansiyasyonuna narenciye alkaloidleri olan limonin ve nomilinin etkileri değerlendirilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışma narenciye alkaloidi olan limonin ve nomilinin 3T3-L1 preadipositlerinde proliferasyon ve diferansiyasyon üzerine etkisinin anlaşılması için yapılması gereken çalışmaların ilk basamağını oluşturmaktadır. Limonin preadiposit proliferasyonunu artırıyor gibi görünmekle birlikte diferansiyasyon üzerine bir etki göstermemiştir. Bunun uygulanan konsantrasyon aralığının dar oluşundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırmaya muhtaç gibi görünmektedir. Çalışmamızda nomilinin preadiposit diferansiyasyonunu doz bağımlı olarak süprese ettiğini gösterdik. Bununla birlikte bu etkiye karışan sinyal yolları ve transkripsiyon faktörlerinin ortaya konulabilmesi için ek deneylere gereksinim bulunmaktadır. Sonuç olarak, limonin ve nomilinin 3T3-L1 preadipositlerinde proliferasyon ve diferansiyasyon üzerine etkisinin netleştirilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Hem nomilin hem de limonin ile ilgili olarak literatürde oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle daha geniş bir konsantrasyon aralığı kullanılarak limonin ve nomilinin hangi sinyal yolları üzerinden lipid metabolizması ve adipogenezi etkilediği, hangi transkripsiyon faktörü veya faktörleri üzerinde nasıl bir etki yaptığı aydınlatılmalıdır. Ülkemizde özellikle Akdeniz bölgesinde yaygın olarak üretilen narenciye ürünlerinde yüksek miktarda bulunan bu alkaloidlerin adiposit diferansiyasyonu üzerine etkilerinin gösterilmesi ve buna karışan mekanizmaların aydınlatılabilmesi oldukça

büyük bir sağlık sorunu olan obeziteye karşı yeni moleküllerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği ve ülkemiz açısından kazanım sağlayabilme potansiyeli bulunan bir yaklaşım gibi görünmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Hruby, A., Frank, B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, 33 (7): 673 – 689.
- [2]. Williams, SE., Greene, JL. (2018). Childhood Overweight and Obesity: Affecting Factors. *Education and Intervention. J. Child. Obes.*, 3 (2): 1 – 7.
- [3]. Drolet, R., Richard, C., Sniderman, A.D., Mailloux, J., Fortier, M., et al. (2008). Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes*, 32: 283–291.
- [4]. Tian, Q., Miller, EG., Ahmad, H., Tang, L., Patil, BS. (2001). Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr Cancer*, 40(2):180-4.
- [5]. Abdelgaleil S. A., Hashinaga F., Nakatani M., Pest Manag. (2005). Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. *Pest Manag Sci.*, 61, 186—190.
- [6]. Kurowska, E.M., Borradaile, N. M., Spence, J. D., & Carroll, K. K. (2000). Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutrition Research*, 20, 121-129.
- [7]. Ono, E., Inoue, J., Hashidume, T., Shimizu, M., Sato, R. (2011). Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410,677–681.
- [8]. Halder, D., Das, N.D., Jung, K.H., Choi, M.R., Kim, M.S., Lee, S.R., & Chai, Y.G. (2014). Cyclodextrin-Clathrated Limonin Suppresses Diet-Induced Obesity in Mice. *Journal of Food Biochemistry*, 38, 216-226.
- [9]. Jaffe, T., Schwartz, B. (2008). Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer*, 123, 2543-2556
- [10]. Jensen, MD., Ryan, DH., Apovian, CM., et al. (2013). AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *J Am Coll Cardiol.*, 63(25 Pt B):2985-3023.
- [11]. Whitlock, G., Lewington, S., Sherliker, P., et al. (2009). Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.*, 373(9669);1083-1096.
- [12]. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet.*,390(10113):2627–2642.
- [13]. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.*, 384(9945):766-781.
- [14]. Singh, GM., Danaei, G., Farzadfar, F., et al. (2013). The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: a pooled analysis. *PLoS One*, 8(7): e65174.
- [15]. Czernichow, S., Kengne, AP., Stamatakis, E., et al. (2011). Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk?: evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. *Obes Rev*, 12(9): 680-687.
- [16]. Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., et al. (2016). Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 375(8): 794-798.
- [17]. George, M. D., & Baker, J. F. (2016). The Obesity Epidemic and Consequences for Rheumatoid Arthritis Care. *Current rheumatology reports*, 18(1),6.
- [18]. Choi, H.K., Atkinson, K., Karlson, E.W., Curhan, G. (2005). Obesity, Weight Change, Hypertension, Diuretic Use, and Risk of Gout in Men: The Health Professionals Follow-up Study. *Arch Intern Med.*, 165(7):742–748.
- [19]. Romero-Corral, A., Caples, S. M., Lopez-Jimenez, F., & Somers, V. K. (2010). Interactions between obesity and obstructive sleep apnea: implications for treatment. *Chest*, 137(3), 711–719.

- [20]. Anstey, KJ., Cherbuin, N., Budge, M., et al. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev*, 12(5): e426- 437.
- [21]. Apovian, C. (2016). Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden. *Am J Manag Care*, 22: 176 – 185.
- [22]. Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 15 (5): 288-298.
- [23]. Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635–643.
- [24]. Rosen, E.D., Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444, 847–853.
- [25]. Arner, P., Spalding, K.L. (2010). Fat cell turnover in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396, 101–104.
- [26]. Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., et al. (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453, 783–787
- [27]. Feng, S., Reuss, L., Wang, Y. (2016). Potential of natural products in the inhibition of adipogenesis through regulation of PPAR γ expression and/or its transcriptional activity. *Molecules*, 21, 1278
- [28]. Thomas, EL., Saeed., N, Hajnal JV., Brynes, A., Goldstone, AP., Frost, G., et al. (1998). Magnetic resonance imaging of total body fat. *J Appl Physiol.*, 85:1778-1785.
- [29]. Shook, B. A., Wasko, R. R., Mano, O., Rutenberg-Schoenberg, M., Rudolph, M. C., Zirak, B., Rivera-Gonzalez, G. C., López-Giráldez, F., Zarini, S., Rezza, A., Clark, D. A., Rendl, M., Rosenblum, M. D., Gerstein, M. B., Horsley, V. (2020). Dermal Adipocyte Lipolysis and Myofibroblast Conversion Are Required for Efficient Skin Repair. *Cell stem cell*, 26(6), 880–895.e6.
- [30]. Després, J. (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med*, 38:52-63.
- [31]. Frayn, KN., Karpe, F., Fielding, BA., Macdonald, IA., Coppack, SW. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27:875– 888.
- [32]. Zhang ,Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425– 432.
- [33]. Bays, HE., González-Campoy, JM., Bray, GA., Kitabchi, AE., Bergman, DA., Schorr, AB., et al. (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, 6:343-368.
- [34]. Tozzi, M., Novak, I. (2017). Purinergic receptors in adipose tissue as potential targets in metabolic disorders. *Front Pharmacol.*,8:878.
- [35]. Kershaw, E.E., Flier, JS. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89:2548-2556.
- [36]. Szatkowski, C., Vallet, J., Dormishian, M., Messaddeq, N., Valet, P., Boulberdaa, M., et al. (2013). Prokineticin receptor 1 as a novel suppressor of preadipocyte proliferation and differentiation to control obesity. *PLoS One.*, 8:e81175.
- [37]. Rao, RR., Long, JZ., White, JP., Svensson, KJ., Lou, J., Lokurkar, I., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell.*, 157:1279-1291.
- [38]. Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Metab.*, 297:E977-E986.
- [39]. Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454:961-967.
- [40]. Hepler, C., Gupta, RK. (2017). The expanding problem of adipose depot remodeling and postnatal adipocyte progenitor recruitment. *Mol Cell Endocrinol.*, 445:95-108.
- [41]. Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Iwanaga, T., et al. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, 58:1526-1531.
- [42]. Virtanen, KA., Lidell, ME., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.*, 360:1518-1525.

- [43]. Hibi, M., Oishi, S., Matsushita, M., Yoneshiro, T., Yamaguchi T, Usui C., et al. (2016). Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes (Lond)*, 40:1655-1661.
- [44]. Sánchez-Gurmaches, J., Guertin, DA. (2014). Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta*, 1842:340-351.
- [45]. Nakamura, Y., Nakamura, K. (2018). Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. *Pflügers Arch*, 470:823-837.
- [46]. Frigolet, ME., Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex*, 156(2):142-149.
- [47]. Harms, M., Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19:1252-1263.
- [48]. Kajimura, S., Spiegelman, BM., Seale, P. (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab*, 22:546-559.
- [49]. Wang, QA., Tao, C., Gupta, RK., Scherer, PE. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*, 19:1338-1344.
- [50]. Kiefer, FW. (2017). The significance of beige and brown fat in humans. *Endocr Connect*, 6:R70-R79.
- [51]. Ishibashi, J., Seale, P. (2010). Beige can be slimming. *Science*, 328:1113-1114.
- [52]. Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*, 2: 282-6.
- [53]. Kiess, W., Petzold, S., Topfer, M., et al. (2008). Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22: 135-53.
- [54]. Laclaustra, M., Corella, D., Ordovas, JM. (2007). Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 17: 125-39.
- [55]. Bernlohr, DA., Jenkins, AE., Bennaars, AA. (2002). Adipose tissue and lipid metabolism. In: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. 4th ed. Vence JE, Vence D (eds.). Elsevier Science, Amsterdam, p. 263-89.
- [56]. Van Gaal, LF., Mertens, IL., De Block, CE. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444:875-80.
- [57]. LeRoith, D., Novosyadlyy, R., Gallagher, EJ., Lann, D., Vijayakumar, A., Yakar, S. (2008). Obesity and type 2 diabetes are associated with an increased risk of developing cancer and a worse prognosis: epidemiological and mechanistic evidence. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*, 116 Suppl 1:S4-6.3.
- [58]. Bluher, M. Adipose tissue dysfunction in obesity. (2009). *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*, 117:241-50.
- [59]. Lehr, S., Hartwig, S., Sell, H. (2012). Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*, 6:91-101.
- [60]. Bluher, M. (2010). Do adipokines link obesity to its related metabolic and cardiovascular diseases? *Clin Lipidol*, 5:95-107.
- [61]. Bays, HE. (2009). "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med*, 122(1 Suppl):S26-37.
- [62]. Siiteri, PK. (1987). Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*, 45(1 Suppl):277-82.
- [63]. Flier, JS., Cook, KS., Usher, P., Spiegelman, BM. (1987). Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. *Science*, 237:405-8.
- [64]. Wajchenberg, BL. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 21: 697-738.
- [65]. Bluher, M., Rudich, A., Kloting, N., Golan, R., Henkin, Y., Rubin, E., Schwarzfuchs, D., Gepner, Y., Stampfer, MJ., Fiedler, M., Thiery, J., Stumvoll, M., Shai, I. (2012). Two patterns of adipokine and other biomarker dynamics in a long-term weight loss intervention. *Diabetes Care*, 35:342-9.
- [66]. Green, H., Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3:127-133.

- [67]. Rosen, E.D., MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 885–896.
- [68]. Otto, T.C., Lane, M.D. (2005). Adipose development: From stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40, 229–242.
- [69]. Scott, R.E., Florine, D.L., Wille, J.J., Jr., Yun, K. (1982). Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 845–849.
- [70]. Pairault, J., Green, H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5138–5142.
- [71]. Reichert, M., Eick, D. (1999). Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene*, 18, 459–466.
- [72]. Tang, Q.Q., Otto, T.C., Lane, M.D. (2003). Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 44–49.
- [73]. Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.*, 4, 263–273.
- [74]. Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P.S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta. Med.*, 64, 353–356.
- [75]. Qiu, Z., Wei, Y., Chen, N., Jiang, M., Wu, J., Liao, K. (2001). DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 276, 11988–11995.
- [76]. MacDougald, O.A., Mandrup, S. (2002). Adipogenesis: Forces that tip the scales. *Trends Endocrinol. Metab.*, 13, 5–11.
- [77]. Tang, Q.Q., Lane, M.D. (2000). Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12446–12450.
- [78]. Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C.N., Leiden, J.M., Hotamisligil, G.S. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*, 290, 134–138.
- [79]. Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289, 950–953.
- [80]. Wu, Z., Bucher, N.L., Farmer, S.R. (1999). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.*, 16, 4128–4136.
- [81]. Smas, C.M., Chen, L., Zhao, L., Latasa, M.J., Sul, H.S. (1999). Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 274, 12632–12641.
- [82]. Cao, Z., Umek, R.M., McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.*, 5, 1538–1552.
- [83]. Jin, S., Zhai, B., Qiu, Z., Wu, J., Lane, M.D., Liao, K. (2000). c-Crk, a substrate of the insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase, functions as an early signal mediator in the adipocyte differentiation process. *J. Biol. Chem.*, 275, 34344–34352.
- [84]. Huang, H., Lane, M.D., Tang, Q.Q. (2005). Effect of serum on the down-regulation of CHOP-10 during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1185–1188.
- [85]. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., Spiegelman, B.M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, 3:151–158.
- [86]. Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Jr., Liu, X.S., Lazar, M.A. (2008). PPAR{gamma} and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*, 22:2941–2952.
- [87]. Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J*, 16:7432–7443.

- [88]. Siersbæk, R., Nielsen, R., John, S., Sung, M.H., Baek, S., Loft, A., Hager, G.L., Mandrup, S. (2011). Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J*, 30:1459–1472.
- [89]. Jimenez, M.A., Akerblad, P., Sigvardsson, M., Rosen, E.D. (2007). Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol*, 27:743–757.
- [90]. Rajakumari, S., Wu, J., Ishibashi, J., Lim, H.W., Giang, A.H., Won, K.J., Reed, R.R., Seale, P. (2013). EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab.*, 17:562–574.
- [91]. Shapira, S.N., Lim, H.W., Rajakumari, S., Sakers, A.P., Ishibashi, J., Harms, M.J., Won, K.J., Seale, P. (2017). EBF2 transcriptionally regulates brown adipogenesis via the histone reader DPF3 and the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev*, 31:660–673.
- [92]. Yu, K., Mo, D., Wu, M., Chen, H., Chen, L., Li, M., Chen, Y. (2014). Activating transcription factor 4 regulates adipocyte differentiation via altering the coordinate expression of CCATT/enhancer binding protein beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *FEBS J*, 281: 2399 –2409.
- [93]. Sa, P., Richard, A.J., Hang, H., Stephens, J.M. (2017). Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr. Physiol.*, 7, 635–674.
- [94]. Birsoy, K., Chen, Z., Friedman, J. (2008). Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab.*, 7, 339–347.
- [95]. Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., et al. (2005). Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.*, 1, 27–39.
- [96]. Mori, T., Sakae, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N. et al. (2005). Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.*, 280, 12867–12875.
- [97]. Ambele, M.A., Dessels, C., Durandt, C., Pepper, M.S. (2016). Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. *Stem Cell. Res.*, 16, 725–734.
- [98]. Banerjee, S.S., Feinberg, M.W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R.L., Denking, D.J., Kawahara, R., Hauner, H., Jain, M.K. (2003). The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.*, 278, 2581–2584.
- [99]. Sue, N., Jack, B.H., Eaton, S.A., Pearson, R.C., Funnell, A.P., Turner, J., Czolij, R., Denyer, G., Bao, S., Molero-Navajas, J.C., et al. (2008). Targeted disruption of the basic Kruppel-like factor gene (Klf3) reveals a role in adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 3967–3978.
- [100]. Zhang, J.W., Klemm, D.J., Vinson, C., Lane, M.D. (2004). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem*, 279:4471– 4478.
- [101]. Nanbu-Wakao, R., Morikawa, Y., Matsumura, I., Masuho, Y., Muramatsu, M.A., Senba, E., Wakao, H. (2002). Stimulation of 3T3-L1 adipogenesis by signal transducer and activator of transcription 5. *Mol Endocrinol* 16: 1565–1576.
- [102]. Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., Fofelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86:839 – 848.
- [103]. Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., Spiegelman, B.M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4333–4337.
- [104]. Tang, Q.Q., Zhang, J.W., Daniel Lane, M. (2004). Sequential gene promoter interactions of C/EBPβ, C/EBPα, and PPARγ during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319, 235–239.
- [105]. Koerner, A., Kratzsch, J., Kiess, W. (2005). Adipocytokines: Leptin -the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 19, 525–546.

- [106]. Payne, V.A., Au, W.S., Lowe, C.E., Rahman, S.M., Friedman, J.E., O'Rahilly, S., Rochford, J.J. (2009). C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochem. J.*, 425, 215–223.
- [107]. Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M. (2002). C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : A unified pathway. *Genes Dev.*, 16, 22–26.
- [108]. Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, 78(3); 783-809.
- [109]. Manners, G.D. (2007). Citrus limonoids: Analysis, bioactivity, and biomedical prospects. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8285–8294.
- [110]. Wang, S., Tu, H., Wan, J., Chen, W., Liu, X., Luo, J., Xu, J., Zhang, H. (2016). Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in Citrus fruits. *Food Chem.*, 199, 8–17.
- [111]. Yang, Y., Zhao, X.J., Pan, Y., Zhou, Z. (2016). Identification of the chemical compositions of Ponkan peel by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Methods*, 8, 893–903.
- [112]. Russo, M., Arigò, A., Calabrò, M.L., Farnetti, S., Mondello, L., Dugo, P. (2016). Bergamot (Citrus bergamia Risso) as a source of nutraceuticals: Limonoids and flavonoids. *J. Funct. Food*, 20, 10–19.
- [113]. Li, S., Wang, Z., Ding, F., Sun, D., Ma, Z., Cheng, Y., Xu, J. (2014). Content changes of bitter compounds in “Guoqing No. 1” Satsuma mandarin (Citrus unshiu Marc.) during fruit development of consecutive 3 seasons. *Food Chem.*, 145, 963–969.
- [114]. Baldwin, E., Plotto, A., Manthey, J., McCollum, G., Bai, J., Irey, M., Cameron, R.; Luzio, G. (2010). Effect of Liberibacter infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: Chemical and physical analyses. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 1247–1262.
- [115]. Berhow M. A., Hasegawa S., Manners G. D. (2000). Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Foods *American Chemical Society, Washington, D.C.*
- [116]. Jitpukdeebodindra, S., Chantachum, S., Ratanaphan, A., Chantrapromma, K. (2005). Stability of Limonin From Lime Seeds. *EJEAFChe*, 4 (3) : 938-944.
- [117]. Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357–367.
- [118]. Giles, P.M., Jr. (1999). Revised Section F: Natural products and related compounds. *Pure Appl. Chem.*, 71, 587–643.
- [119]. Heasley, B. (2011). Synthesis of limonoid natural products. *Eur. J. Org. Chem.*, 19–46.
- [120]. Gualdani, R., Cavalluzzi, M.M., Lentini, G., Habtemariam, S. (2016). The chemistry and pharmacology of citrus limonoids. *Molecules*, 21, 1530.
- [121]. Bissim, S.M., Kenmogne, S.B., Tcho, A.T., Lateef, M., Ahmed, A., Happi, E.N., Wansi, J.D., Ali, M.S., Waffo, A.F.K. (2019). Bioactive acridone alkaloids and their derivatives from Citrus aurantium (Rutaceae). *Phytochem. Lett.*, 29, 148–153.
- [122]. Roy, A., Saraf, S. (2006). Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 191–201.
- [123]. Huang, S., Liu, X., Xiong, B., Qiu, X., Sun, G., Wang, X., Zhang, X., Dong, Z., & Wang, Z. (2018). Variation in limonin and nomilin content in citrus fruits of eight varieties determined by modified HPLC. *Food science and biotechnology*, 28(3), 641–647.
- [124]. Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2014). An overview on chemical aspects and potential health benefits of limonoids and their derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(2), 225–250.
- [125]. Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2013). Citrus limonoids and curcumin additively inhibit human colon cancer cells. *Food & function*, 4(5), 803–810.
- [126]. Langeswaran, K., Gowthamkumar, S., Vijayaprakash, S., Revathy, R., & Balasubramanian, M. P. (2013). Influence of limonin on Wnt signalling molecule in HepG2 cell lines. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 4(1), 126–133.

- [127]. Perez, J.L., Jayaprakasha, G.K., Cadena, A., Martinez, E., Ahmad, H., Patil, B.S. (2010). In vivo induction of phase II detoxifying enzymes, glutathione transferase and quinone reductase by citrus triterpenoids. *BMC Complement. Altern. Med.*, 10, 51.
- [128]. Kim, J., Jayaprakasha, G.K., Muthuchamy, M., Patil, B.S. (2011). Structure-function relationships of citrus limonoids on p38 MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 670, 44–49.
- [129]. Mahmoud, M. F., Hamdan, D. I., Wink, M., & El-Shazly, A. M. (2014). Hepatoprotective effect of limonin, a natural limonoid from the seed of *Citrus aurantium* var. bigaradia, on D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(3), 251–261.
- [130]. Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., et al. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 714–719.
- [131]. Svensson, P. A., Olsson, M., Andersson-Assarsson, J. C., Taube, M., Pereira, M. J., Froguel, P., & Jacobson, P. (2013). The TGR5 gene is expressed in human subcutaneous adipose tissue and is associated with obesity, weight loss and resting metabolic rate. *Biochemical and biophysical research communications*, 433(4), 563–566.
- [132]. Velazquez-Villegas, L. A., Perino, A., Lemos, V., Zietak, M., Nomura, M., Pols, T., & Schoonjans, K. (2018). TGR5 signalling promotes mitochondrial fission and beige remodelling of white adipose tissue. *Nature communications*, 9(1), 245.
- [133]. Kang, M.C., Kang, N., Ko, S.C., Kim, Y.B., Jeon, Y.J. (2016). Anti-obesity effects of seaweeds of Jeju Island on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet. *Food Chem. Toxicol.*, 90, 36–44.
- [134]. Kimira, Y., Taniuchi, Y., Nakatani, S., Sekiguchi, Y., Kim, H. J., Shimizu, J., Ebata, M., Wada, M., Matsumoto, A., & Mano, H. (2015). Citrus limonoid nomilin inhibits osteoclastogenesis in vitro by suppression of NFATc1 and MAPK signaling pathways. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 22(12), 1120–1124.
- [135]. Qian, S. W., Li, X., Zhang, Y. Y., Huang, H. Y., Liu, Y., Sun, X., Tang, Q. Q. (2010). Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC Dev Biol*, 10, 47, 1-11.
- [136]. Entenmann, G., Huner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. (1996). *Am. J. Physiol. 270 (Cell Physiol. 39):* C1011 – C1016.
- [137]. Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews*, 78(3), 783–809.
- [138]. Marquez, M. P., Alencastro, F., Madrigal, A., Jimenez, J. L., Blanco, G., Gureghian, A., Keagy, L., Lee, C., Liu, R., Tan, L., Deignan, K., Armstrong, B., & Zhao, Y. (2017). The Role of Cellular Proliferation in Adipogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells and development*, 26(21), 1578–1595.
- [139]. Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., Safe, S., & Patil, B. S. (2021). Citrus limonoids induce apoptosis and inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells. *Food & function*, 12(3), 1111–1120.
- [140]. Artiss, J. D., Brogan, K., Brucal, M., Moghaddam, M., & Jen, K. L. (2006). The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and selected blood parameters in rats. *Metabolism: clinical and experimental*, 55(2), 195–202.
- [141]. Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14; 1293–1307.
- [142]. Freytag, S. O., Paielli, D. L., & Gilbert, J. D. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes & development*, 8(14), 1654–1663.
- [143]. Lin, F. T., & Lane, M. D. (1992). Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes & development*, 6(4), 533–544.

- [144]. Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P., & Camp, H. S. (2002). PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes & development*, 16(1), 27–32.
- [145]. Huang, C., Zhang, Y., Gong, Z., Sheng, X., Li, Z., Zhang, W., & Qin, Y. (2006). Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPARgamma pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(2), 571–578.
- [146]. Kim, H. J., Yoon, B. K., Park, H., Seok, J. W., Choi, H., Yu, J. H., ... Kim, J. (2016). Caffeine inhibits adipogenesis through modulation of mitotic clonal expansion and the AKT/GSK3 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *BMB Reports. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports*.
- [147]. Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., & Meydani, M. (2009). Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *The Journal of nutrition*, 139(5), 919–925.
- [148]. Rahman, N., Jeon, M., & Kim, Y. S. (2016). Delphinidin, a major anthocyanin, inhibits 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation through activation of Wnt/ β -catenin signaling. *BioFactors (Oxford, England)*, 42(1), 49–59.
- [149]. Harmon, A. W., Patel, Y. M., & Harp, J. B. (2002). Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. *The Biochemical journal*, 367(Pt 1), 203–208.
- [150]. Min, S. Y., Yang, H., Seo, S. G., Shin, S. H., Chung, M. Y., Kim, J., Lee, S. J., Lee, H. J., & Lee, K. W. (2013). Cocoa polyphenols suppress adipogenesis in vitro and obesity in vivo by targeting insulin receptor. *International journal of obesity* (2005), 37(4), 584–592.
- [151]. Watanabe, M., Houten, S. M., Matakai, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J. W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A. C., & Auwerx, J. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439(7075), 484–489.
- [152]. Wang, X. X., Edelstein, M. H., Gafter, U., Qiu, L., Luo, Y., Dobrinskikh, E., Lucia, S., Adorini, L., D'Agati, V. D., Levi, J., Rosenberg, A., Kopp, J. B., Gius, D. R., Saleem, M. A., & Levi, M. (2016). G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 Activation Inhibits Kidney Disease in Obesity and Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27(5), 1362–1378.
- [153]. Chen, Y. Y., Lee, M. H., Hsu, C. C., Wei, C. L., & Tsai, Y. C. (2012). Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(4), 955–963.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı

Doğum Tarihi

E-mail

Öğrenim Durumu



Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans			
Yüksek Lisans			

