



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**3T3-L1 PREADİPOZİTLERİNİN PROLİFERASYON,
DİFERANSİYASYON VE MİGRASYONU ÜZERİNE SİNAPİK
ASİDİN ETKİSİ: HEDGEHOG SİNYAL MEKANİZMASININ ROLÜ**
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE KELEŞ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS-2023

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**3T3-L1 PREADİPOZİTLERİNİN PROLİFERASYON,
DİFERANSİYASYON VE MİGRASYONU ÜZERİNE SİNAPİK
ASİDİN ETKİSİ: HEDGEHOG SİNYAL MEKANİZMASININ ROLÜ**
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE KELEŞ
ORCID ID: 0000-0002-3355-9674

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ AHMET SENCER YURTSEVER

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS-2023

ETİK BEYAN

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

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel 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.

18/08/ 2023

İmza / Signature

Özge KELEŞ

ÖZET

3T3-L1 PREADİPOZİTLERİNİN PROLİFERASYON, DİFERANSİYASYON VE MİGRASYONU ÜZERİNE SİNAPIK ASİDİN ETKİSİ: HEDGEHOG SİNYAL MEKANİZMASININ ROLÜ

Günümüzün en büyük sağlık sorunlarından biri olan obezite, tip II diyabet, hipertansiyon, kanser, safra kesesi hastalığı ve ateroskleroz gibi birçok patolojik durum ile ilişkilidir.

Obezite gelişiminde en önemli mekanizmalardan birisi yağ dokudaki preadipositlerin olgun adipositlere diferansiyasyonudur.

Pirinç, yulaf gibi tahıllarda, biberiye gibi bazı baharatlarda ve çilek, brokoli, limon gibi bazı meyve ve sebzelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan fenolik bir bileşik olan sinapik asidin insan böbrek hücreleri HKE293 ve NIH/3T3 fibroblast hücrelerinde diferansiyasyon üzerine etkileri gösterilmiş ancak, etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, sinapik asidin yanı sıra diğer fenolik bileşikler içeren bitkisel ekstraktın, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde AMPK aktivasyonu aracılığıyla kilo artışı engellediği ve diferansiyasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, sinapik asidin yanı sıra 7 farklı hidroksisinnamik asit türevi içeren yaban mersini ve ahududu ekstraktlarının 3T3-L1 preadipositlerinde PPAR γ , C/EBP α , SREBP1, aP2, FAS, LPL genlerinin ekspresyonlarını azaltarak diferansiyasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Sinapik asidin diferansiyasyon üzerine etkisine AMPK sinyal yolağının aracılık edip etmediği araştırılmış ancak saf sinapik asidin 3T3-L1 hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği yeterli çalışma bulunmamaktadır bu nedenle daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Yakın zamanlı bir çalışmada sineklerden memelilere kadar çok yaygın bir aralıkta eksprese edilen ve hücreler için hayati önem taşıyan diferansiyasyon, proliferasyon ve hücre migrasyonunun yanı sıra kanser gelişiminde de kritik rol oynadığı gösterilen Hedgehog (Hh) sinyal yolağının aktivasyonunun 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle Hedgehog sinyal yolağını aktive eden maddeler, obezite gelişimini önlemek veya tedavi etmek amacıyla kullanılabilir.

Sinapik asidin 3T3-L1 hücrelerinde diferansiyasyonu AMPK veya MAPK sinyal yolları aracılığı ile baskılayabildiği gösterilmiştir ancak preadiposit diferansiyasyonu üzerine etkilerine Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra preadiposit proliferasyonu ve migrasyonu üzerine sinapik asidin etkilerinin incelendiği yeterli sayıda çalışma da bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, sinapik asidin Hedgehog inhibitörü vismodegib varlığında ya da yokluğunda diferansiyasyon sürecinin farklı zaman noktalarında farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinde proliferasyon, diferansiyasyon ve migrasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının aracılık edip etmediğinin araştırılması amaçlandı.

Anahtar Kelimeler: Diferansiyasyon, Sinapik Asit, Hedgehog, Vismodegib, 3T3-L1.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi, A. Sencer Yurtsever, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

THE EFFECT OF SINAPIC ACID ON THE PROLIFERATION, DIFFERENTIATION AND MIGRATION OF 3T3-L1 PREADIPOCYTES: THE ROLE OF THE HEDGEHOG SIGNAL MECHANISM

Obesity, one of the biggest health problems of today, is associated with many pathological conditions such as type II diabetes, hypertension, cancer, gallbladder disease and atherosclerosis.

One of the most important mechanisms in the development of obesity is the differentiation of preadipocytes in the adipose tissue stromal fraction into mature adipocytes.

Although the pathways involved in preadipocyte differentiation are still not fully known, it is a complex process involving many transcription factors.

In cereals such as rice and oats; sinapic acid, a phenolic compound found in high concentrations in some spices such as rosemary and some fruits and vegetables such as strawberries, broccoli and lemons, has been shown to have effects on differentiation in studies conducted in different cell cultures such as HKE293 human kidney epithelial cells and NIH/3T3 fibroblast cells, but its mechanism of action has not been fully elucidated.

In a recent study, it was shown that herbal extract consisting of phenolic compounds, including sinapic acid, prevented weight gain in mice fed a high-fat diet and inhibited differentiation in 3T3-L1 preadipocytes by activating AMPK signaling pathway.

In a study on 3T3-L1 preadipocytes, extracts of 7 different hydroxycinnamic acid derivatives, including sinapic acid, obtained from blueberry and raspberry, it has been shown to inhibit differentiation by reducing PPAR γ , C/EBP α , SREBP1, aP2, FAS, LPL gene expressions that are involved in differentiation.

In another study on 3T3-L1 adipocytes, it was observed that sulforafen inhibited adipocyte differentiation and prevented adipocyte hyperplasia by activating the Hedgehog signaling pathway. Therefore, substances that activate the Hedgehog signaling pathway may be effective agents that can be used to prevent or treat the development of obesity.

It has been shown that sinapic acid can suppress differentiation in 3T3-L1 cells via AMPK or MAPK signaling pathways, but there is no study showing whether Hedgehog signaling pathway is involved in its effects on preadipocyte differentiation. Therefore, our study was conducted to clarify the effects of sinapic acid at different concentrations and at different time points of the differentiation process on proliferation, differentiation and migration in 3T3-L1 cells and whether this effect is mediated by the Hedgehog signaling pathway.

Keywords: Differentiation, Sinapic Acid, Hedgehog, Vismodegib, 3T3-L1.

Advisor: Dr. Öğr. Üyesi, A. Sencer Yurtsever, Department of Medical Pharmacology, Mersin.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde değerli zamanını ayırarak bana yol gösteren, bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sabır ve anlayışla beni destekleyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi A. Sencer YURTSEVER'e,

Her zaman değerli fikirlerini belirtip, bizlere yön gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR 'a, hocam Prof. Dr. İsmail ÜN 'e ve hocam Doç. Dr. Rukiye Nalan TİFTİK 'e;

Yüksek lisansımın ilk gününden son gününe kadar yanımda olan canım arkadaşım Tuğçe COŞKUNCA ve çok değerli katkılarından dolayı Berkay ÖZKAN başta olmak üzere bütün arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında sevgi ve desteklerini hissettiğim kıymetli annem Meryem KELEŞ'e ve canım aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2021-2-TP2-4475 proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Obezite	3
2.1.1. Obezite Epidemiyolojisi	3
2.1.1.1. Dünya’da Obezite	3
2.1.1.2. Türkiye’de Obezite	4
2.1.2. Obezite Patogenezi	5
2.2. Adipoz Doku	5
2.2.1. Adipoz Doku Tiplerinin Sınıflandırılması ve İşlevleri	6
2.3. Preadiposit Diferansiyasyonu	7
2.4. Sinapik Asit	8
2.5. Hedgehog Sinyal Yolağı	11
2.6. Hedgehog Sinyal Yolağının Hücresel Süreçlere Etkisi	18
2.7. Vismodegib	20
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü	22
3.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi	23
3.3. Sinapik Asit ve Vismodegib Çözeltilerinin Hazırlanması	24
3.4. MTT Çalışma Solüsyonu ve Çözücü Solüsyonların Hazırlanışı	24
3.5. Oil Red O Çalışma Çözeltisi Hazırlanışı	24
3.6. Viabilite Deney Serisi	24
3.7. Proliferasyon Deney Serisi	25
3.8. Diferansiyasyon Deney Serisi	26

	Sayfa
3.9. Migrasyon Deneyi	27
3.10. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	28
4.1. Viabilite Deney Sonuçları	28
4.1.1. 24. Saat	28
4.1.2. 48. Saat	28
4.1.3. 72. Saat	29
4.2. Proliferasyon Deney Sonuçları	30
4.2.1. 0-2'nci gün	30
4.2.2. 2-4'üncü gün	30
4.2.3. 0-4'üncü gün	31
4.3. Diferansiyasyon Deney Sonuçları	32
4.3.1. 0-4'üncü gün	32
4.3.2. 4-8'inci gün	33
4.3.3. 0-8'inci gün	34
4.4. Migrasyon Deney Sonuçları	35
4.4.1. 24 Saat	38
4.4.2. 48 Saat	39
4.4.3. 72 Saat	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	56

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Yetişkinler, çocuklar ve adölesanlarda BKİ ile antropometrik değerlendirme	3
Tablo 2.2. Bazı besinlerin içerdiği sinapik asit miktarları	10



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Adipogeneizde aşamalar	8
Şekil 2.2. Sinapik asidin kimyasal formülü	9
Şekil 2.3. Hedgehog proteinlerinin yapısal özellikleri	13
Şekil 2.4. Hedgehog proteininin otoproteolitik aktivasyonunun aşamaları	14
Şekil 2.5. Kolesteroliz aşamaları	15
Şekil 2.6. Vismodegib kimyasal yapısı	21
Şekil 3.1. Thoma lamı	23
Şekil 3.2. Sayım alanı	23
Şekil 4.1. 24 saat süreyle sinapik asit ya da vismodegib uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi üzerine etkisi	28
Şekil 4.2. 48 saat süreyle sinapik asit ya da vismodegib uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi üzerine etkisi	29
Şekil 4.3. 72 saat süreyle sinapik asit ya da vismodegib uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi üzerine etkisi	29
Şekil 4.4. 0-2'nci gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerine etkisi.	30
Şekil 4.5. 2-4'üncü gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerine etkisi	31
Şekil 4.6. 0-4'üncü gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerine etkisi	32
Şekil 4.7. 0-4'üncü gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi	33
Şekil 4.8. 4-8'inci gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi	34
Şekil 4.9. 0-8'inci gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi	34
Şekil 4.10. Vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (0-72. saat).	38
Şekil 4.11. Vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (24. saat)	39

Şekil 4.12. Vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (48. saat)	40
Şekil 4.13. Vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (72. saat)	40



KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACC	Asetil CoA Karboksilaz
aP2	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
ARR	Adduct Recognition Region
BCS	Bovine Calf Serum
BKİ	Beden Kitle İndeksi
CCAAT	Enhancer-Binding Protein (C/EBP)
CXCR4	CXC Chemokine Receptor 4
DISP1	Dispatched
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DHH	Desert Hedgehog
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMA	European Medicines Agency
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
FAS	Yağ Asidi Sentaz
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
GLI	Glioma Associated Oncogene Family Zinc Finger
Hh	Hedgehog
HHAT	Hedgehog Açıltransferaz
HhC	Hedgehog Karboksi Terminal Alanı
HhN	Hedgehog Amino Terminal Alanı
HHIP	Hedgehog Interacting Protein

hMSC	İnsan Mezenkimal Kök Hücreleri
IHH	Indian Hedgehog
MYF-5	Miyojen Faktörü 5
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
NCD-RisC Grubu	Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration
NCHS	The National Center for Health Statistics
NOX4	NADPH Oksidaz 4
PPAR γ	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama
PTCH1	Patched1
PTCH2	Patched2
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
SUFU	Suppressor of Fused
SRR	Sterol Recognition Region
SS	Sinyal Sekansı
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
SREBP1	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 1

1. GİRİŞ

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelen obezite, Dünya Sağlık Örgütü'ne göre "sağlığı olumsuz etkileyecek düzeyde vücutta aşırı yağ birikimi" olarak açıklanmaktadır [1,2].

Obezite, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, kronik böbrek hastalığı, diyabet, metabolik sendrom, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması gibi birçok hastalık için de risk faktörü olarak kabul edilmektedir [2].

Obeziteyi önlemeye ve tedavi etmeye yönelik terapötik yaklaşımlar arasında yaşam tarzı değişikliği, ilaç tedavisi ve cerrahi tedavi yer almaktadır. Yaşam tarzı değişikliği, obezite gelişiminin önlenmesi ve obez bireylerde kilo kaybını sağlamaya yönelik önemli bir yaklaşım olmakla birlikte, uzun dönemde hasta uyumunun zorluğu ve özellikle obezitenin metabolik ya da hormonal bozukluklara sekonder olarak geliştiği aşırı obez (beden kitle indeksi>35) bireylerde yeterli sonuç elde edilememesi nedeni ile tek başına yeterli olmayabilir. Bu nedenle, özellikle aşırı obez bireylerde ilaç tedavisi seçeneği değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda enerji metabolizmasını kontrol eden birçok hormon, mediyatör ve yolak bulunmaktadır. Bu yollardan birinin bloke edilmesi diğer sinyal yollarının aktivitesini etkileyebilir. Dolayısıyla obeziteyi önlemek ve tedavi etmek için kullanılabilen ilaç tedavisinin katkısı, egzersiz ve diyet kontrolü ile en fazla %10-15 düzeyine ulaşabilmektedir. Nitekim fiziksel aktivitenin yanı sıra orlistat ve liraglutid ile yapılan tedavilerde kilo kaybının %5-10 arasında olduğu görülmüştür [3]. Sonuç olarak obezitenin kontrolü için daha etkili ilaçlara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Cerrahi tedavi ise gelişebilen komplikasyonlar, işlemlerin ortaya çıkardığı riskler ve bazı cerrahi işlemler sonrasında hastaların yaşam kalitesinin düşmesi gibi nedenler ile son seçenek olarak değerlendirilmektedir [4]. Obeziteyi önlemeye ve tedavi etmeye yönelik etkili ve güvenilir yeni ajanlar geliştirebilmek için araştırmalar devam etmektedir. Yeni ajanlar geliştirmeye yönelik yapılan çalışmalar arasında; birçok meyve, sebze, tahıl ve baharatlarda yaygın olarak bulunan hidroksisinamik asit türevleri de yer almaktadır, kumarik asidin 3T3-L1 hücrelerinde lipid birikimini azalttığı, başka bir hidroksisinamik asit türevi olan kafeik asidin 3T3-L1 hücrelerinde aP2 ve Fas gibi adipogenezle ilişkili genlerin ifadesini azaltarak obeziteyi önlemeye katkı sağladığı bilinmektedir. Bir hidroksisinamik asit türevi olan ve ülkemizde özellikle Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen narenciye türlerinde yüksek miktarda bulunduğu gösterilen sinapik asidin preadiposit diferansiyasyon ve proliferasyonunu inhibe edici etkilerinin olduğu gösterilmiştir [5]. Bununla birlikte, bu etkiye karışan sinyal yolları henüz ortaya konulamamıştır.

Obezite gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmalar ve aracılık eden sinyal yolları halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte, anti-obezite ajanlarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılan 3T3-L1 hücre hattında, Hedgehog sinyal yolağı aktivasyonun diferansiyasyonu inhibe ederek obeziteyi önlemeye yönelik önemli etkiler oluşturabilecek bir sinyal yolağı olduğu bilinmektedir [6]. Literatürde sinapik asidin Hedgehog sinyal yolağının aktivasyonu üzerine etkisinin incelendiği çalışma sayısı çok azdır. Bununla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada sinapik asidin insan saç folikülü kök hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı ve bu etkiyi kanonik hedgehog sinyal yolağı aktivasyonu aracılığı ile oluşturduğu gösterilmiştir [7]. Ayrıca sinapik asidin dermal papilla hücrelerinde Akt yolağı aracılığı ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonuna yol açtığı da gösterilmiştir [8]. Ancak, sinapik asidin preadiposit diferansiyasyonu ve proliferasyonu üzerine etkisine Hedgehog sinyal yolağının aracılık edip etmediğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla 3T3-L1 hücrelerinde standart diferansiyasyon, proliferasyon ve migrasyon protokolü üzerine sinapik asidin etkisi incelendi ve Hedgehog sinyal yolağı inhibitörü varlığında deneyler sürdürülerek, Hedgehog sinyal yolağının karışık karışmadığı araştırıldı.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Obezite

Uzun dönemde gıdalarla alınan enerji harcanan enerjiden fazla olduğunda harcanmayan enerji vücutta yağ dokuda depolanır. Bunun sonucunda vücuttaki yağ doku kitlesi artar. Bu artışın belirli bir düzeyi geçmesi obezite olarak değerlendirilir [1,9]. Obezite tanım ve derecelendirmesi beden kitle indeksi (BKİ)’ne dayanarak “ $BKİ = \text{Ağırlık (kg)} / \text{Boy (m}^2\text{)}$ ” formülü ile değerlendirilir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Yetişkinler, çocuklar ve adölesanlarda BKİ ile antropometrik değerlendirme [7].

Gruplar	Yetişkinler (BKİ, kg/m ²)	Çocuk ve Adölesanlar BKİ-Z skoru (SD)	Çocuk ve Adölesanlar BKİ-persantil
Zayıf	<18,50	<-2.00 SD	<%5
Normal	18,5 – 24,99	-2.00 – 1.00 SD	≥%5 ile <%85 arasında
Fazla kilolu	25,00 – 29,99	1.01 – 2.00 SD	≥ %85 ile <%95 arasında
Obez	≥30,00	>2.00 SD	≥ %95
Hafif obez	30,00 – 34,99	–	95. persantile karşılık gelen BKİ’nin %100- 120’si
Orta derecede obez	35,00 – 39,99	–	95 persantile karşılık gelen BKİ’nin % 120-140’ı
Morbid obez	40,00 – 49,99	–	95 persantile karşılık gelen BKİ’nin >%140’ı
Süper obez	≥50,00	–	

BKİ: Beden kitle indeksi, SD: standart deviasyon.

2.1.1. Obezite Epidemiyolojisi

2.1.1.1. Dünya’da Obezite

Obezite, oldukça yaygın görülen bir sağlık sorunudur. NCD-RisC Grubu (Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration) tarafından dünya genelinde elde edilen verilere göre 1975 yılında yetişkin nüfusta (18 yaş ve üstü) obezite prevalansı erkeklerde %3,2 ve kadınlarda %6,4 iken 2014 yılında sırasıyla %10,8 ve %14,8’e yükselmiştir [10-12].

Küresel Hastalık Yüku Obezite İş Birliği Grubu’nun (The Global Burden of Disease 2015 Obesity Collaborators) verilerine göre, 2015 yılında dünyada 107,7 milyon çocuk ve 603,7 milyon yetişkin olmak üzere obez nüfus 711,4 milyona ulaşmıştır [13].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tahminlerine göre ise, 1975 yılında 5-19 yaş aralığında bulunan çocuk ve adölesanların %1’den azı obez iken, 2016 yılında kızların %6’sı, erkeklerin %8’i obezdir. Bu yaş grubunda toplamda 124 milyon obez hastanın olduğu ve bu hastaların 41 milyonunu 5 yaşından küçük çocukların oluşturduğu tahmin edilmektedir. 2016 yılında dünya genelinde, yetişkinlerin %39’u fazla kilolu ve %13’ü obezdir [10].

Obezite genellikle yüksek gelirli ya da üst-orta gelir grubundaki ülkelerin sorunu olarak karşımıza çıksa da gelişmekte olan ülkelerde de obezitenin hızla artacağı öngörülmektedir [14].

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi (The National Center for Health Statistics (NCHS))'nin 2017-2018 yılı araştırmalarına göre; ABD'de obezite prevalansının 20-39 yaş arası erişkinlerde %40, 40-59 yaş arası erişkinlerde %44,8 ve 60 yaş ve üstü erişkinlerde %42,8 olduğu hesaplanmaktadır. 2030 yılında pek çok eyalette obezite prevalansının %50'ye ulaşacağı tahmin edilmektedir. Avrupa ülkelerinde de benzer prevalans istatistikleri söz konusudur [15].

2.1.1.2. Türkiye'de Obezite

Ülkemizde hızla değişen yaşam tarzıyla birlikte obezite, halk sağlığı üzerine ciddi tehdit oluşturan ve prevalansı giderek artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Ülkemizde obezite prevalansı kadınlarda daha yüksek olmakla beraber, son yıllarda erkeklerde de hızlı bir artış göstermektedir. Türkiye'de 20 yaş ve üstü 24788 kişinin incelendiği Türkiye Diyabet, Obezite ve Hipertansiyon Epidemiyolojisi Çalışması'nda obezite prevalansının, 1997-98 yıllarında %22,3 (kadın %30, erkek %13) olduğu açıklanmıştır [16-18].

Türkiye Diyabet, Obezite ve Hipertansiyon Epidemiyolojisi Çalışması-II ve Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2016 yılı Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi yaş ve cinsiyet dağılımına göre incelendiğinde, ülkemizde obezite prevalansının 20 yaş ve üzeri yetişkinlerde %29,5 (kadın %35, erkek %23,9) olduğu ve obez birey sayısının ise 15.995.392'ye ulaşmış olduğu görülmüştür [19].

2023 yılında TÜİK tarafından yayınlanan veriler incelendiğinde 15 yaş ve üstü obez bireylerin oranı 2016 yılında %19,6 iken, 2019 yılında %21,1 olduğu ve kadınların %24,8'inin obez ve %30,4'ünün aşırı kilolu, erkeklerin ise %17,3'ünün obez ve %39,7'sinin aşırı kilolu olduğu açıklanmıştır [19].

Ülkemizde son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar 7-8 yaş grubundaki her 4 çocuktan birinin fazla kilolu veya obez olduğunu göstermektedir [18].

DSÖ tarafından 2016 yılında yapılan araştırmada Türkiye'nin 16.092.644 obez birey ve %29,5 prevalans oranı ile Avrupa'da obezitenin en sık görüldüğü ülke olduğu bildirilmiştir [10].

Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü tarafından 2016 yılında, 36 ülkede yapılan araştırmada 15 yaş üstü bireylerin obezite prevalansı değerlendirildiğinde, Türkiye'nin %28,8 ile 6'ncı sırada yer aldığı görülmüştür [20].

2.1.2. Obezite Patogenezi

Uzun dönemde gıdalarla alınan enerji harcanan enerjiden fazla olduğunda vücutta enerji homeostazı bozulur. Obeziteye zemin hazırlayan faktörler arasında; genetik, epigenetik, fizyolojik, davranışsal, sosyokültürel ve çevresel (fiziksel aktivite eksikliği, enerji-yoğun beslenme, sedanter yaşam tarzı, büyük porsiyonlar) pek çok faktör ve bunlara ek olarak yeme bozuklukları da sayılabilir. Ayrıca adipositlerde meydana gelen hipertrofi, hiperplazi ve inflamasyon adipoz dokunun yapısında ve adipokinlerin sekresyonunda birçok değişikliğe yol açar [21].

Çevresel toksinler, beslenme bozukluğu ve obezogenik (yüksek yağlı) diyetle maruziyet obezite ile ilişkili epigenetik değişikliklere neden olarak yağ dokusunun artmasına yol açabilir [21-23].

Obezitede aşırı enerji alımına bağlı yağ dokusunun artması iki farklı mekanizma aracılığıyla gerçekleşir. Bu mekanizmalardan birisi preadipositlerin adipositlere farklılaştığı hiperplazi (hücre sayısı artışı) ve diğer mekanizma olan hipertrofi ise yağ dokudaki olgun adipositlerde fazla miktarda yağ birikimi sonucu hücre çaplarının artmasıdır [23-26].

Hipertrofi, adipoz doku gelişiminde yağ depolama kapasitesine olan ihtiyacı karşılamak için hiperplaziden önce ortaya çıkarken; hiperplazi, adipoz doku gelişiminin yalnızca erken aşamalarında ortaya çıkar [27,28].

2.2. Adipoz Doku

Adipoz doku olarak da adlandırılan yağ dokuda sadece adipositler değil makrofajlar, endotel hücreler, fibroblastlar ve lökositler gibi farklı hücre grupları da yer alır [29].

Yağ dokunun %50'si hipodermiste, %15-20'si üreme organları etrafında, kemik iliğinde ve meme dokusunda, %10-15'i omentum ve mezenterde, %12'si böbreklerde %5-8'i kaslarda bulunur. Kadınlarda tüm vücut ağırlığının ortalama %22'si, erkeklerde ise tüm vücut ağırlığının ortalama %15'i yağ dokudan oluşur. Erkekler daha fazla visceral yağ depolama eğilimindedir, aşırı kilo alımı bel çevresinde kalınlaşmaya yol açar. Bununla birlikte, kadınlar kalça ve uyluklarda daha fazla deri altı yağ depolama eğilimindedir. Bu farklılıklar, erkekler ve kadınlar tarafından üretilen seks hormonlarından kaynaklanmaktadır [30].

Sağlıklı bireylerde beyaz yağ dokusu tüm yağ dokusunun yaklaşık %80'ini oluştururken [31], kahverengi yağ dokusu toplam yağ dokusunun ortalama %1-2'sini oluşturur. Ancak uzun süreli stimülasyonlar, fiziksel aktivitenin azalması, oksidatif stres, hormonal değişiklikler veya soğuğa maruziyet gibi bazı durumlarda bu yağ dokularının dağılımı değişebilir [16,17,32,33].

Yağ dokusunun görevleri arasında enerji depolamak ve organizmanın gereksinim duyduğu zaman depolanan yağı serbest yağ asitleri olarak salıvermek, vücudu ve organları mekanik dış etkilere karşı korumak, zayıf bir ısı iletkeni olduğu için vücudun ısı yalıtımına katkı sağlamak ve derinin kurumasını önlemek sayılabilir [34].

Adipoz doku hem lokal (otokrin/parakrin) hem de sistemik (endokrin) etkiler gösterebilen ve adipokinler olarak da bilinen çeşitli biyoaktif peptidleri eksprese edebilir ve salgılayabilir. Aynı zamanda çok sayıda reseptör içerir. Bu etkileşimli ağ aracılığıyla, yağ dokusu, enerji metabolizması, nöroendokrin işlevi ve bağışıklık işlevi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde de yer alır [35].

2.2.1. Adipoz Doku Tiplerinin Sınıflandırılması ve İşlevleri

Memelilerde yağ dokusu adipositlerin gelişimsel kökenine, hücre kompozisyonuna (lipid damlacıkları boyutu, mitokondri sayısı) ve fonksiyonlarına göre beyaz, kahverengi ve bej yağ dokusu olmak üzere üçe ayrılır [36].

Beyaz yağ doku, nötral yağların depolanması ve gerektiğinde enerji eldesi için serbest yağ asitlerinin salıverilmesinden sorumludur, kahverengi yağ doku ise termojenezde görevlidir. Bej yağ doku morfoloji ve işlev olarak kahverengi yağ dokusuna benzerken köken olarak beyaz yağ dokusuna benzemektedir [37,38].

Beyaz yağ dokusu memeli vücudunda yaygın bir dağılım gösterirken kahverengi yağ dokusu daha sınırlı dağılım gösterir. Yeni doğan bebeklerin büyük interskapular ve perirenal kahverengi yağ doku depoları vardır. Yetişkinlerde, servikal, supraklaviküler, aksiller, periaortik, paravertebral ve böbreküstü bölgelerde kahverengi yağ doku depoları bulunur. Yetişkinlerde kahverengi yağ doku daha soğuk ortamda bulunan bireylerde daha fazladır. Kahverengi yağ doku miktarları bireyler arası değişkenlik gösterebilir [32,39-43].

Beyaz yağ doku hücresi sitoplazmasında az sayıda mitokondri ve unioküler lipid damlacığı ve nükleus içerir. Yağ dokunun rengi genellikle hücrelerin yağ damlacıklarında çözünen karotenoidlerin varlığına bağlı olarak, beyazdan koyu sarıya kadar değişebilir [37]. Kahverengi adipositler ise multiloküler lipid damlacığı ve yüksek sayıda mitokondri içerir. Kahverengi yağ doku hücreleri içerdikleri fazla sayıdaki mitokondriye bağlı olarak, mitokondriyal enzim olan sitokrom oksidazdaki hem kofaktörlerine sahiptir ve bu nedenle makroskobik olarak doku kahverengi görünür [36].

Bej adipositler, beyaz adipositler gibi MYF5-negatif mezodermal kök hücreden köken alırken, kahverengi adipositler miyojen faktörü 5 (MYF5)-pozitif adipomyoblastlardan köken alır [44].

Bej yağ doku hücreleri beyaz yağ doku içinde infiltre olmuşlardır ve fazla sayıda mitokondri içerirler. Kronik soğuğa maruz kalma gibi fizyolojik uyaranlara ek olarak, PPAR γ (Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama) agonisti içeren farmakolojik tedavi ve β -adrenajik stimölasyon, egzersiz, besinsel takviyeler vb. gibi çeşitli uyaranlarla beyaz yağ dokunun indüklenerek bej yağ dokuya dönüşebildiği bilinmektedir [45].

2.3. Preadiposit Diferansiyasyonu

Adipoz doku, preadipositler, adipositler, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, adventisyal, vasküler düz kas hücreleri ve vasküler endotel hücreleri içeren kompleks bir yapıdır [46-48].

Yağ dokusu leptin, resistin ve adiponektin gibi birçok adipokin salgılar ve endokrin, immün ve metabolik sistemlerde düzenleyici rollere sahiptir [46,49].

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH'ler) adipojenik uyaranların varlığında, adipojenik yönelme ile preadipositlere ve ardından terminal farklılaşma ile preadipositlerin olgun adipositlere dönüşmesiyle adipogenez gerçekleşir [48]. Adipogenez yoluyla beyaz yağ doku hücrelerinin hiperplazisi ve hipertrofisi obeziteye neden olur [51,52].

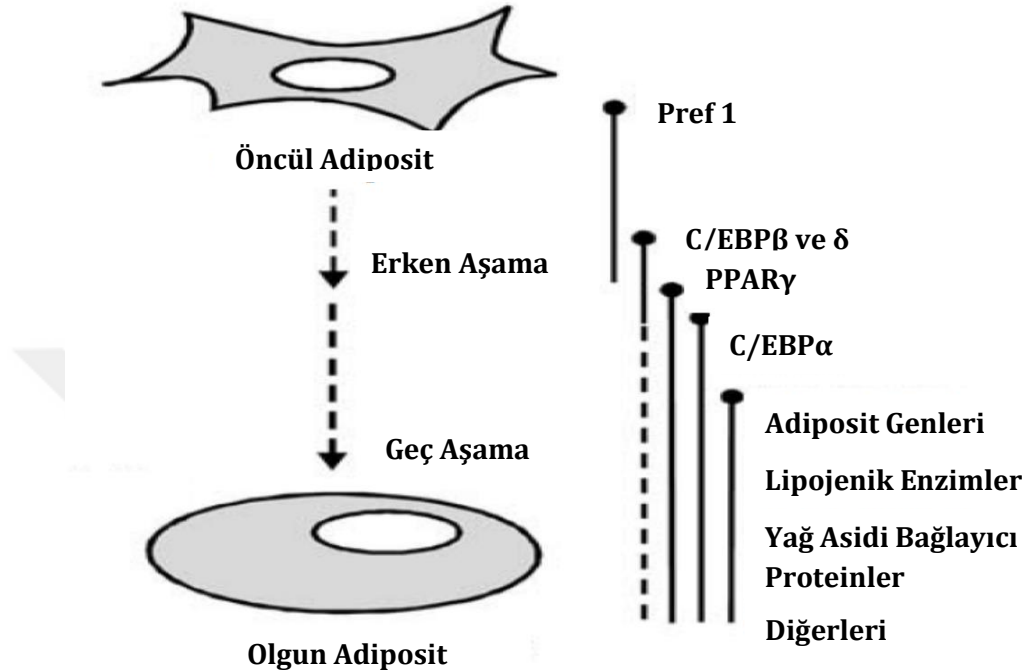
Adipositlerin diferansiyasyonu üç aşamada gerçekleşir;

- 1) Mezenkimal kök hücrelerin adiposit oluşumuna yönelmesi
- 2) Mitotik klonal genişleme
- 3) Terminal farklılaşma

Mitotik klonal genişleme evresi DNA replikasyonunu ve hücrelerin duplikasyonunu içerirken, terminal farklılaşmada CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ailesi, PPAR γ , asetil CoA karboksilaz/ACC, yağ asidi sentaz/FAS ve adiposit yağ asidi bağlayıcı protein/aP2 gibi genlerin ve transkripsiyonel faktörlerin ekspresyonu meydana gelir [53-55].

Terminal farklılaşma aşaması C/EBP β ekspresyonu, cAMP agonisti ve glukokortikoidler gibi bazı moleküller tarafından indüklenir [56,57]. Adiposit diferansiyasyonunun ana düzenleyicisi olarak kabul edilen PPAR γ , C/EBP'ler ve glukokortikoid reseptörü tarafından modüle edilir, PPAR γ yokluğunda diferansiyasyonun terminal farklılaşma aşaması in vitro veya in vivo olarak gerçekleşemez [58]. Yapılan in vitro çalışmalar, adipogenez aktive ya da inhibe eden birçok ligandın bu etkilerini PPAR γ 'nın aktivitesini ve ekspresyonunu modüle ederek ortaya koyduğunu göstermiştir [59]. Yapılan bir çalışmada, C/EBP α eksikliği olan fare embriyonik fibroblastlarında PPAR γ 'nin aşırı ekspresyonunun, adipogenez indüklediği görülürken, PPAR γ eksikliği olan fare embriyonik fibroblastlarında C/EBP α 'nın aşırı ekspresyonunun diferansiyasyonu gerçekleştirmediği görülmüştür, bu durum PPAR γ 'nin adiposit farklılaşmasını belirleyen ana düzenleyici olduğunu gösterir [60,61].

Adipogenez süreci C/EBP β proteininin aktivasyonu ile başlar ve C/EBP β ile C/EBP δ ekspresyonu, diferansiyasyonun erken evresinde (ilk 2 gün) artarak preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşma sürecini başlatır, ardından adipogenezin pozitif modülatörleri olan C/EBP α ve PPAR γ 'nın ekspresyonunu indüklerler [62].



Şekil 2.1. Adipogenezde aşamalar [61].

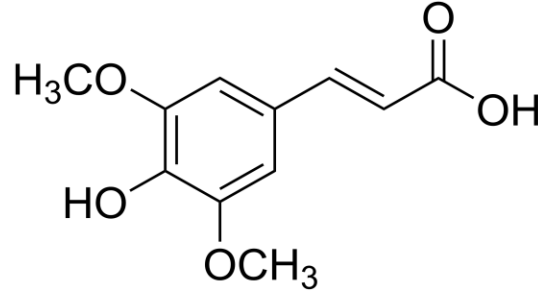
Adipogenez sırasında hücreler fibroblastik şekillerini kaybederler ve küresel hale gelirler bu durum hücre dışı matriste ve hücrelerin hücre iskeleti bileşenlerinde meydana gelen değişimlerin bir göstergesidir [55,64].

2.4. Sinapik Asit

Sinapik asit ($C_{11}H_{12}O_5$, 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinamik asit, sinapinik asit), şeker esterleri (glikozidler) şeklinde veya farklı organik bileşiklerin esterleri olarak bulunabilen bir hidroksisinamik asit türevidir [65].

Molekül ağırlığı 224,21 g/mol olup, rengi sarı kahverengi ve kristal toz şeklindedir. Erime noktası 203-205°C'dir. Sinapik asit suda az çözünür, metanol ve dimetil sülfoksit (DMSO) gibi polar çözücülerde iyi çözünür [66].

Limon, portakal, mandalina gibi turuncgillerde; çilek, ahududu, avokado, armut ve mango gibi çeşitli meyvelerde; brokoli, lahana gibi bazı sebzelerde; yulaf, pirinç gibi bazı tahıllarda ve biber, fesleğen gibi bazı baharatlarda bulunan sinapik asit fenolik bir bileşiktir (Şekil 2.2) [66,67].



Şekil 2.2. Sinapik asidin kimyasal formülü [63].

Sinapik asit üzerinde yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışmalarda antienflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, anksiyolitik, nöroprotektif, kardiyoprotektif, hepaprotektif, antihiperglisemik ve antikanser etkileri de içeren geniş bir yelpazede farmakolojik etkilere yol açtığı gözlenmiştir [68,69].

Sinapik asit çilekte (450 µg/g) ve kıvılcıkta (210 µg/g) yüksek miktarda bulunmaktadır [66]. Bunun yanı sıra aromatik bitkilerden biberiye (*Rosmarinus officinalis* L), kekik (*Thymus vulgaris* L.) ve dereotu (*Anethum graveolens* L.) oldukça yüksek sinapik asit içeriğine sahiptir (sırasıyla kuru ağırlıkları 690 µg/g; 260 µg/g ve 230 µg/g). Cevizin de yüksek miktarda sinapik asit içerdiği (348 µg/g) gösterilmiştir [71].

Sinapik asit ülkemizde Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen limon (*Citrus limon* L.) ve Murcott mandalinada (*C. Reticulata*) sırasıyla kuru ağırlığı 72,1 µg/g ve 50,1 µg/g olarak tespit edilmiştir [72].

Ayrıca sinapik asit ve türevleri hardal, anason, turp, brokoli, fesleğen, şalgam, lahana türleri, karpuz ve hindistan cevizi gibi çeşitli sebze, meyve ve baharatlarda da yaygın olarak bulunur [73].

Tablo 2.2. Bazı besinlerin içerdiği sinapik asit miktarları [71].

	Sinapik Asit (µg/g)
Ahududu (<i>Rubus idaeus</i> L.)	36,89 µg/g
Armut (<i>Pyrus communis</i> L.)	0,96 µg/g
Avokado (<i>Persea Americana</i>)	1,93 µg/g
Çilek (<i>Fragaria ananassa</i> L.)	450,3 µg/g
Elma (<i>Malus domestica</i> L.)	13,42 µg/g
Limon (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.)	72,1 µg/g
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	7,55 µg/g
Murcott mandalina (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)	50,1 µg/g
Pomelo (<i>Citrus grandis</i>)	22,2 µg/g
Portakal (<i>Citrus sinensis</i>)	9,67-17,28 µg/g
Yaban mersini (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	1,1-1,2 µg/g
Brokoli (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>)	25-82 µg/g
Lahana (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	2,42 µg/g
Sarımsak (<i>Allium sativum</i> L.)	0,5 µg/g
Adaçayı (<i>Salvia officinalis</i> L.)	280 µg/g
Anason (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	100 µg/g
Biber (<i>Capsicum</i>)	100 µg/g
Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	690 µg/g
Defne yaprağı (<i>Laurus nobilis</i>)	135 µg/g
Dereotu (<i>Anethum graveolens</i> L.)	230 µg/g
Fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	150 µg/g
Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	260 µg/g
Pirinç (<i>Zizania aquatica</i> L.)	1,05 µg/g
Yulaf (<i>Avena sativa</i> L.)	56,05 µg/g
Hindistan Cevizi (<i>Myristica fragrans</i>)	348 µg/g

Literatürde sinapik asidin etkilerinin incelendiği hücre kültür çalışmaları oldukça kısıtlı sayıdadır. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan bir çalışmada sinapik asidin 3T3-L1 hücrelerinin viabilitesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada diferansiyasyon protokolünün belirli zaman aralıklarında (48 saat veya 10 gün) uygulanan sinapik asidin (100, 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{mol/ml}$) hücre viabilitesini olumsuz etkilemediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Farklılaştırma protokolü uygulanan 3T3-L1 hücrelerinde ise sinapik asit uygulamasının diferansiyasyon belirteçlerinden sayılan PPAR γ , C/EBP β ve SREBP-1c gibi adipojenik transkripsiyon faktörü genlerinin ekspresyonu üzerine etkileri değerlendirildiğinde 1000 μM sinapik asit uygulanan adipositlerde, PPAR γ ve C/EBP β mRNA seviyelerinde 50 kat ve SREBP-1c mRNA seviyesinde 70 kat azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [74]. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise sinapik asidin (100-1000 μM) 3T3-L1 hücrelerinde palmitik asit uygulaması ile indüklenen mitotik klonal ekspansiyonu konsantrasyon bağımlı olarak anlamlı şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. Sinapik asit, palmitik asidin neden olduğu 3T3-L1 hücrelerinin diferansiyasyonundaki artışı da konsantrasyon bağımlı şekilde anlamlı olarak baskılamıştır. Çalışmada preadipositlerin diferansiyasyon protokolü sırasında palmitik asit (100 μM) uygulamasının ekspresyonlarını indüklediği adipojenik transkripsiyon faktörlerinden PPAR γ dışında tüm transkripsiyon faktörlerinin (C/EBP α ve SREBP-1c, FAS ve NOX4) ekspresyonunda anlamlı azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [75]. Bununla birlikte, her iki çalışmada da sinapik asidin etkisine aracılık eden downstream yollar ortaya konulmamıştır.

2.5. Hedgehog Sinyal Yolağı

1970'lerin sonlarında Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarında, Christiane Nüsslein-Volhard ve Eric F. Weischaus tarafından meyve sineği *Drosophila melanogaster* üzerinde yapılan ve embriyogenik gelişim sırasında *Drosophila* larvasının vücut segmentasyonu üzerine doğrudan etkili 50'den fazla farklı gen belirlenmiştir. Bu genlerde mutasyon meydana geldiğinde meyve sineği larvaları kirpilerdekine benzer dikensi yapılar geliştirmiş ve bu gözlemden yola çıkılarak keşfedilen bu genlere Hedgehog (kirpi) ismi verilmiştir [78,79].

Hedgehog geni, embriyonik gelişim ve hücre farklılaşması süreçlerinde önemli rol oynayan bir gen ailesidir. Bu gen ailesi, omurgalı ve omurgasız organizmalarda gelişim ve hücre farklılaşması süreçlerinde rol oynar. Hedgehog geni, morfogolik Hedgehog proteini üretmek için kodlanır. Hedgehog proteini, embriyonik gelişimde hücre farklılaşmasını düzenler, organ oluşumunu kontrol eder ve doku onarımı ile rejenerasyon süreçlerine katkıda bulunur. Ayrıca, Hedgehog proteini hücre büyümesini düzenler [6].

Hedgehog proteini, hücre içinde bir dizi post-translasyonel modifikasyon geçirerek aktif hale gelir ve hücre zarında yer alan ilgili reseptöre bağlanarak hedef hücrelerdeki downstream

sinyal yollarının aktive olmasını ve hedef gen ifadelerinin düzenlenmesini sağlar. Hedgehog geni ve Hedgehog proteini birçok organizmada evrimsel olarak korunmuş olan önemli bir sinyal yolağında rol oynarlar. Bu sinyal yolunun düzenlenmesinde meydana gelebilecek düzensizlikler doğum kusurları ve kanser ve gibi bir dizi sağlık sorununa yol açabilir. Bu nedenle Hedgehog geni ve Hedgehog proteini, bilimsel araştırmaların ve ilaç geliştirme çalışmalarının odak noktalarından biridir [6].

Yapılan araştırmalarda vertebralılarda 3 paralog (yapısal olarak benzer fakat özdeş olmayan işlevlere sahip homolog proteinler) Hedgehog geni bulunduğu belirlenmiş ve bu genlerden ilki Sega firmasının “Sonic the hedgehog” isimli video oyun kahramanından esinlenilerek “Sonic Hedgehog” (SHH) olarak isimlendirilmiş, diğer iki gen ise sırasıyla “Indian Hedgehog” (IHH) ve “Desert Hedgehog” (DHH) olarak adlandırılmıştır. Hedgehog sinyal yolağında Patched1 (PTCH1) ve Patched2 (PTCH2) reseptörleri, Frizzled (F sınıfı) G protein-kenetli bir reseptör olan ve sineklerden insanlara kadar çok geniş bir yelpazede eksprese edilen Smoothed (SMO) proteini ve gliomla ilişkilendirilmiş onkojen 1-2 ve 3 olmak üzere üç transkripsiyon faktörü (Gli1, Gli2, Gli3) görev alır [80].

Hedgehog genleri arasında embriyo ve erişkin dokularında en sık eksprese edilen Sonic hedgehogdur [81].

Hedgehog proteinleri hücre proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu, doku paterninin oluşumunu yönetmektedir. Sineklerde Hedgehog sinyali doğru segmentleşmeyi ve kanatların gelişimini kontrol ederken vertebralılarda sağ-sol asimetrisini, ekstremitelerin, iskelet sisteminin, kas yapılarının, gözlerin, akciğerlerin, dişlerin, sinir sisteminin ve bağırsakların oluşumunu, sperm ve kıkırdak diferansiyasyonunu indüklemektedir. Hedgehog sinyal yolağındaki defektler fetusta beyin, yüz ve diğer orta hat anomalilerine neden olmaktadır. Ön beyin gelişim bozukluğu sonucu oluşan holoprosensefali (fetüste erken embriyonik evrede ön beyin gelişiminin sekteye uğraması sonucunda hemisferlerin ayrılmasında bozukluk ile karakterize yapısal bir beyin anomalisi), ayrıca mikroensefali ve siklopi (orbitaların bölünmesinde bozukluk sonucu birbirine çok yakın iki orbita ya da tek orbita bulunması ile karakterize nadir bir konjenital sendrom), burun gelişiminin olmaması ve yarı damak bu anomalilere örnek olarak verilebilir [82-84].

Hedgehog yolağının stimülasyonunun anjiogenez ve yara iyileşmesini indüklediği gösterilmiştir. Memelilerde Hedgehog sinyal yolağının anormal aktivasyonunun bazal hücreli karsinoma, medulloblastoma, pankreas, meme, prostat, akciğer kanserlerinin gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [83,84].

Hedgehog proteininin sentezi, çeşitli hücrel ve moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenir ve embriyonik gelişim, yaralanmalar, yaralanma sonrası dokulardaki inflamatuvar veya rejeneratif süreçler, oksidatif stres veya inflamasyon gibi bazı hücrel stres durumları Hedgehog proteinlerinin sentezini başlatabilir. Hedgehog proteininin sentezi, hücrenin sitoplazmasında yer alan ribozomlarda başlar. Sentez, genetik bilginin mRNA (messenger RNA) tarafından ribozomlara taşınması ve amino asitlerin doğru sıralamasına göre sentezlenmesiyle endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşir [85].

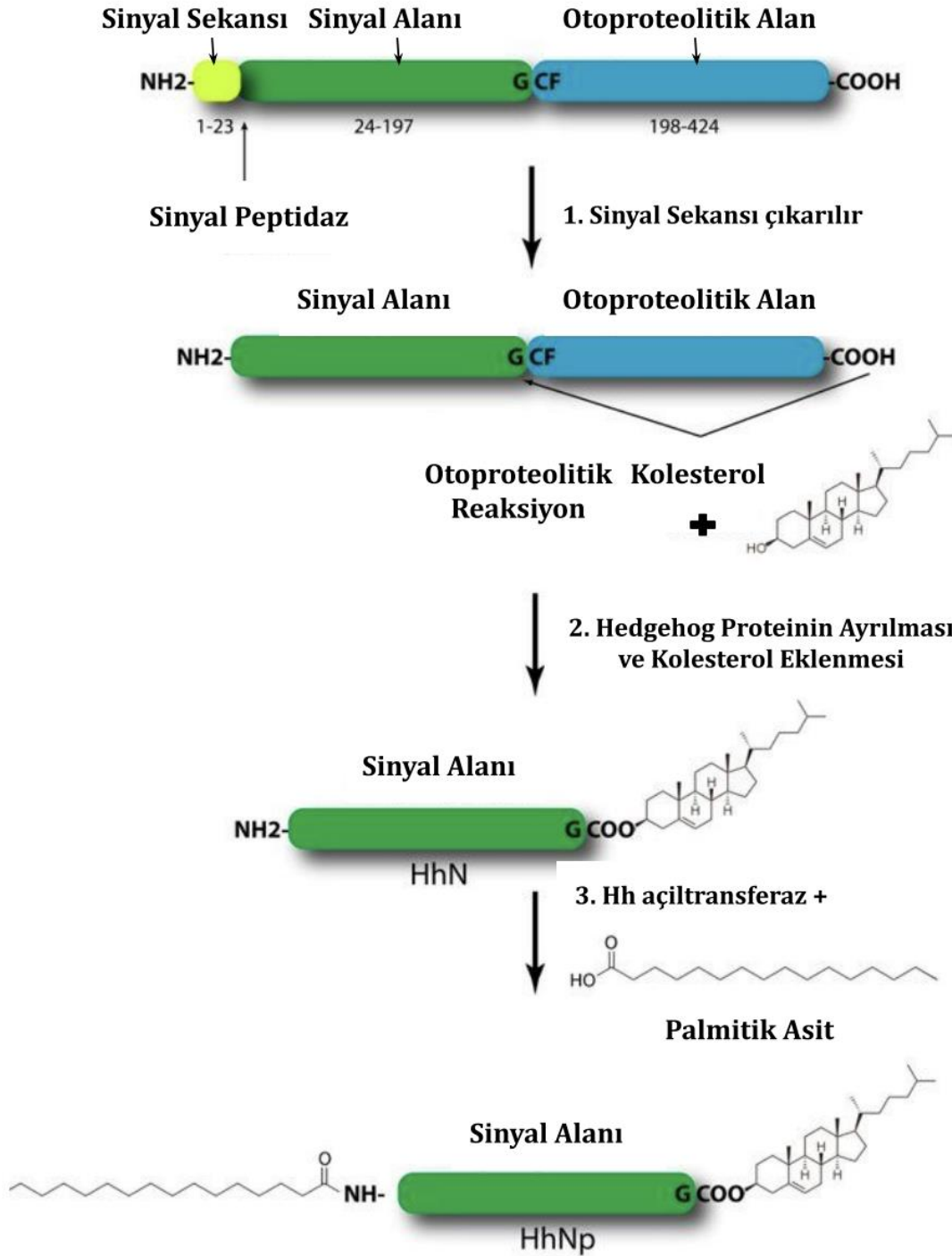
Hedgehog proteini, endoplazmik retikuluma yönelme için N-ucunda bir sinyal peptidi segmenti içerir. Bu sinyal peptidi endoplazmik retikulumun membranında yer alan özel translokon kompleksi tarafından sağlanır. Endoplazmik retikulum lümenine geçen Hedgehog proteinleri işlenerek, Hedgehog proteininin aktif formuna dönüşmesini sağlar. İşlenmiş Hedgehog proteinleri endoplazmik retikulumdan eksositoz ile hücre dışına salınır. Hedgehog proteinlerinin salınmasının ardından, alıcı hücrelerde bulunan Hedgehog reseptörleri proteinlerini tanıır ve etkileşime girer [85].

Hedgehog proteinleri, amino-terminal 'Hedge' alanı (HhN, 20 kDa) ve karboksi-terminal 'Hog' alanı (HhC, 26 kDa) olmak üzere iki farklı alandan oluşur [86].



Şekil 2.3. Hedgehog proteinlerinin yapısal özellikleri. Sinyal sekansı (SS, Signal Sequence, sarı), amino terminal alanı (HhN), karboksi terminal alanı (HhC) bulunur. Karboksi terminal alanı iki bölgeye ayrılır; ilk üçte ikilik peptid dizisi HINT olarak adlandırılır ve kalan üçte birlik kısımda sterol tanıma bölgesi (sterol recognition region, SRR) veya Eklenti tanıma bölgesi (adduct recognition region, ARR) bulunur [86-88].

Hedgehog protein yapısında bulunan SS alanı hedgehog proteinin endoplazmik retikuluma translokasyonunda görev alır. Hedge alanı biyolojik sinyal aktivitesine sahipken, Hog alanı Hedgehog proteinin iki parçaya ayrılarak HhN'ye bir kolesterol parçası eklenmesini sağlayan otokatalitik karboksi terminal alana sahiptir. HINT alanı hedgehog proteinin N' Hedge alanından ayrılmasını sağlar. HINT alanını bir kolesterol bağlama alanı takip eder bu kısım Hedgehog proteinlerinde kolesterolü bağlar ve sterol tanıma bölgesi (sterol recognition region, SRR) veya Hedgehog dışındaki diğer Hog proteinlerinde eklenti tanıma bölgesi (adduct recognition region, ARR) bulunur, ARR bölgesine bağlanan eklentinin ne olduğu henüz açık değildir [86,88,89].



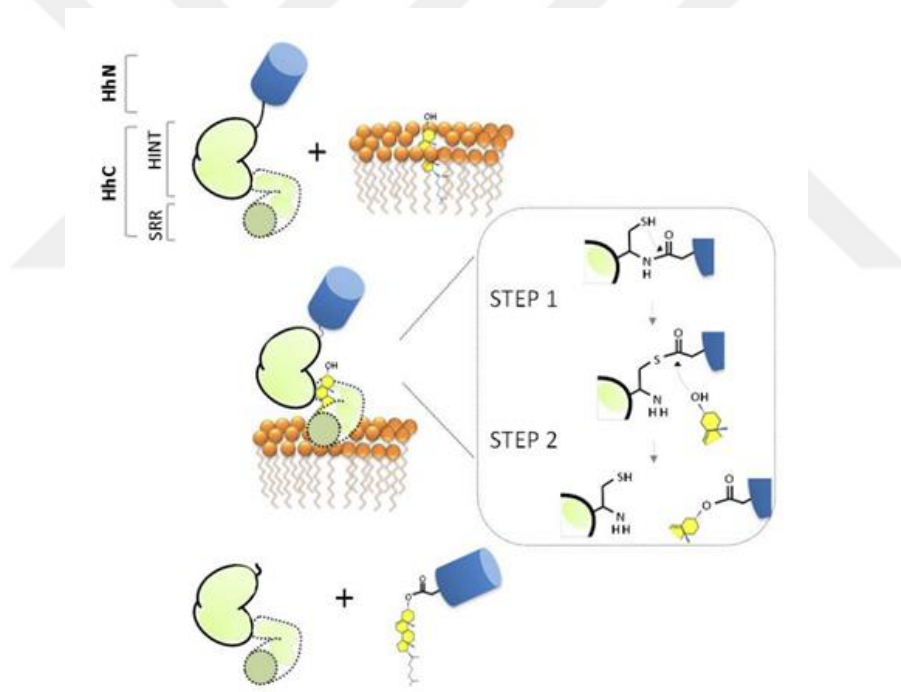
Şekil 2.4. Hedgehog proteininin otoproteolitik aktivasyonunun aşamaları [Varjosalo 2008'deki değişikliklerle yeniden çizildi].

Hedgehog endoplazmik retikulumda, yapısında N-terminal sinyal bölgesi olan HhN ve herhangi bir polipeptidden kimyasal olarak ayrılabilme veya peptidleri birbirine bağlayabilme özelliklerine sahip HINT/HOG intein bölgesine sahip HhC bölgelerini içeren bir prekürsör protein olarak sentezlenir [91].

Hedgehog prekürsörü çeşitli aşamalardan geçerek otoproteolitik olarak aktive olur. Aktivasyonun birinci basamağında prekürsör Hedgehog proteinin yapısında bulunan HhN

terminalinden önce gelen ve Hedgehog proteinini endoplazmik retikulum lümenine yönlendiren SS bölgesi bir sinyal peptidaz tarafından kesilir. Böylece palmitoilasyon için kritik önemde olan sistein rezidüsü HhN polipeptidinin ilk amino asidi konumuna gelir [90].

2. adımı Hedgehog'un C-terminalinde yer alan HINT bölgesi katalize eder. Bu sürecin ilk aşamasında sistein ve glisin amino asitleri arasındaki peptid bağı bir tiyoester oluşturacak şekilde yeniden düzenlenir (N-S asil kayması). Kolesterolizin ilk adımı olan N-S asil kayması için HINT alanının gerekli olduğu ortaya konulmuştur. Kolesterol bağlanmasında SRR alanı rol oynar. Eklenen kolesterol molekülünün 3β -OH grubunun oksijeni HhN alanında yer alan tiyoester grubunun karbonilinden kükürtü koparır ve Hedgehog prekürsörünü, HhN'ye ve serbest HhC'ye ayırır. Sadece Hedgehog proteinlerine özgü olarak kolesterol tarafından gerçekleştirilen bu otoproteolitik ayrılma peptid bağı kolesterolizi olarak adlandırılır. Kolesterol modifikasyonu HhN'nin plazma membranına bağlanmasına yardımcı olur. Kolesterolün yanı sıra 3β -OH grubuna sahip birçok sterol, Hedgehog modifikasyonunu yönlendirebilir [81,93].



Şekil 2.5. Kolesteroliz aşamaları [90].

Hedgehog prekürsörünün aktivasyonu için gerekli iki lipid modifikasyonundan biri kolesterol modifikasyonunu sağlayan kolesteroliz, diğeri ise N terminal palmitoilasyondur. Yağ asidi modifikasyonundan (palmitoilasyon) farklı olarak, kolesterol modifikasyonu için hiçbir kofaktör veya yardımcı protein gerekmez, katalizör Hedgehog proteininin kendisidir. Yapılan mutagenез çalışmaları sonucunda kolesterolizin azaltılmasıyla Hedgehog ligand saliverilmesinin de azaldığı, Hedgehog ligandlarının erken degradasyonuna yol açtığı ve böylece

sinyal akışının bozulduğu göz önüne alındığında kolesterolizin Hedgehog proteinin aktivasyonunda kritik bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Kolesterol modifikasyonunun Hedgehog sinyalini 10 katın üzerinde artırdığı görülmüştür [94-97].

Aktivasyon sürecinin 3. adımı sineklerde Skinny hedgehog, omurgalılarda Hedgehog açıltransferaz (HHAT) olarak adlandırılan endoplazmik retikulumda yerleşik, zara bağlı olarak bulunan O-asiltransferaz tarafından katalize edilir. HHAT aracılığıyla gerçekleşen N-terminal sisteinin tiyol grubu ile palmitoil koenzim A arasındaki tiyoester değiş tokuş reaksiyonu sonucunda palmitoil ile HhN arasında amid bağı oluşarak, HhN bölgesi N-terminaline palmitik asit eklenir. Bu olaya palmitoilasyon denir [95].

Palmitoilasyon, Hedgehog sinyal yolağı açısından kritik öneme sahiptir. Yapılan in vitro deneylerde Hedgehog'un palmitoilasyonu ile hidrofobisitesinin artması sonucu proteinin aktivitesinin 30 kata kadar artabildiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra her ne kadar Hedgehog sinyal yolağı aktivasyonu için şart olmasa da, Hedgehog proteinlerinin yüksek molekül ağırlığına sahip solubl multimerik kompleksler oluşturması için de palmitoilasyon gereklidir [98,99].

HhC alanı; HhN kolesterolizasyonunu tamamladıktan sonra endoplazmik retikulum ilişkili degradasyon (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation-ERAD) ile yıkılır. ERAD, HhC'nin yanı sıra sentez sırasında oluşabilen kolesteroliz kusuru bulunan Hedgehog prekürsörlerinin de yıkımını gerçekleştirir [100].

HhN peptidinin sistein amino asidine palmitat ve glisin amino asidine kolesterol bağlanması ile Hedgehog aktif sinyal molekülü oluşur ve aktif Hedgehog proteinleri hücre içindeki kesecikler veya veziküller aracılığıyla hücre zarına, oradan da hücre dışına salıverilir. Sahip olduğu iki lipid molekülü nedeni ile oldukça hidrofobik yapıdaki Hedgehog proteinleri hücre membranına bağlı durumdadır. Hedgehog proteinlerinin oluşturduğu sinyal transdüksiyonu temel olarak kısa ya da uzun mesafeli olarak gerçekleşebilir. Kısa mesafeli sinyal transdüksiyonunda Hedgehog proteinleri tarafından bitişik hücrelere direkt temas yolu ile justakrin sinyal aktarımı gerçekleşebilir. Bu mekanizma için aracı proteinlerin varlığı gerekli değildir. Bununla birlikte aköz bir ortam olan ekstrasellüler aralıkta Hedgehog proteinlerinin taşınarak uzun mesafeli sinyal aktarımının gerçekleşebilmesi için birtakım şaperonların varlığı gereklidir. Öncelikle yüksek düzeyde hidrofobik yapıdaki Hedgehog proteinlerinin membrandan ayrılması ve sonrasında taşınma için lipid eklentilerin bazı yapılar içerisinde korunarak transportun gerçekleşmesi sağlanır. Transmembran bir protein olan Dispatched (DISP1) Hedgehog proteininin yapısındaki kolesterol eklentisine bağlanarak plazma membranından ayrılmasını ve taşıyıcı proteinlere bağlanmasını organize eder. Hedgehog proteinlerinin bağlandığı taşıyıcılar lipoproteinler, Scube ailesi sekrete proteinler, ekstrasellüler vesikülleri

içerir: Bu taşıyıcıların yanı sıra, Hedgehog proteinleri ekstrasellüler ortamda hidrofobik lipid eklentilerinin iç kısmında yer aldığı multimerik oluşumlar halinde organize olarak da hedef hücrelere taşınabilirler. Hedgehog proteinlerinin hücreler arası taşınmasına aracılık eden diğer önemli mekanizma ise yapısında bir veya daha fazla heparan sülfat glikozaminoglikan yan zinciri içeren heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanmasıdır. Henüz tüm detayları açıklığa kavuşturulamayan bu yolun Hedgehog proteinlerinin taşınmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. İlginç olarak, membrana bağlı Hedgehog proteinleri uzun, aktin esaslı hücresel uzantılar olan sitonemler aracılığı ile membrandan ayrılmadan uzaktaki hedef hücrelere taşınabilirler [101].

Hedgehog sinyal yolağı, hedef hücrelerde kanonik ve non-kanonik olarak adlandırılan iki farklı yolla aktive olabilir.

Kanonik Hedgehog Sinyal Yolağı (PTCH/GLI Yolağı)

Kanonik Hedgehog sinyal yolağı, Hedgehog ligandının hücre zarındaki PTCH reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Bu yolağın aktivasyonu hücre proliferasyonu ve survivalini promote eden GLI transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır [98].

Hedef hücrelerde Hedgehog ligandı yokluğunda PTCH, yoğunlukla primer silyumda bulunurken smoothened intrasellüler kompartmanlara lokalize durumdadır ve SMO'nun inhibe durumda tutulmasını sağlamaktadır. Hedgehog ligandının bağlanması, PTCH reseptörünü inhibe eder. Bunun sonucunda SMO'nun inhibisyonu ortadan kalkar ve Hedgehog bağlı PTCH silyumdan uzaklaşarak degrade edilirken, aktive Smoothened silyuma akümüle olur [98].

Aktive olan Smoothened reseptörü, SUFU (Suppressor of Fused) proteini ile etkileşime girer. Fizyolojik koşullarda SUFU, GLI transkripsiyon faktörlerini baskılayarak onların çekirdeğe taşınmasını engeller. Aktive Smoothened, SUFU'nun inhibisyonunu ortadan kaldırarak GLI transkripsiyon faktörlerinin serbest kalmasını sağlar. Serbest bırakılan GLI transkripsiyon faktörleri, çekirdeğe doğru taşınır. Çekirdekte, GLI faktörleri bazı hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. Hedgehog sinyal yolunun etkisiyle hedef genlerin ekspresyonu ve bu genlerin kodladığı proteinlerin sentezi değişir. Bu da çeşitli biyolojik yanıtlara yol açar. Örneğin, hücre farklılaşması, hücre büyümesi, hücre hayatta kalması, doku onarımı ve organ gelişimi gibi süreçler Hedgehog sinyal yolunun etkisiyle düzenlenir [98].

Non-kanonik Hedgehog Sinyal Yolağı

Non-kanonik Hedgehog sinyali, Hedgehog sinyal yolunun geleneksel veya "kanonik" olarak adlandırılan yoldan farklı bir mekanizma üzerinden işleyen bir sinyal yoludur. Kanonik Hedgehog sinyal yolunun aktivasyonu GLI transkripsiyon faktörlerini etkinleştirirken, non-kanonik Hedgehog sinyali aktivasyonu, Smoothened ve GLI sinyal transdüksiyonu olmadan da

gerçekleşebilen bir dizi sinyal yolunu içerir [102].

GLI'den bağımsız olarak etki oluşturan nonkanonik Hedgehog sinyali iki şekilde gerçekleşir. Tip 1 non-kanonik Hedgehog sinyal yolağı SMO'nun aktin hücre iskeleti ve hücre içi Ca^{2+} düzeylerini modüle etmesi yolu ile etki oluştururken tip 2 non-kanonik Hedgehog sinyal yolağı aktivasyonu SMO'dan bağımsızdır. Hedgehog ligandı PTCH'e bağlandığında siklin B1 ile PTCH'nin etkileşimini bozar, bunun sonucunda hücre survivali ve proliferasyonu indüklenir [102]. PTCH, SMO'dan bağımsız olarak apoptozis, hücre döngüsü düzenlemesi, hücre migrasyonu gibi süreçleri etkileyebilir [104].

Non-kanonik Hedgehog sinyalizasyonu hala tam olarak anlaşılmamış olsa da, araştırmalar bu sinyal yolunun gelişim, doku homeostazı, apoptozis, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu gibi birçok biyolojik süreci etkileyebildiğini göstermektedir [104].

2.6. Hedgehog Sinyal Yolağının Hücresel Süreçlere Etkisi

Proliferasyon

Hücre proliferasyonu, hücrelerin çoğalması veya çoğalma yeteneğidir. Hücreler normal bir hücre döngüsü sürecinde bölünerek ve yeniden çoğalarak büyürler. Hücre proliferasyonu normal büyüme ve gelişmenin yanı sıra yaraların iyileşmesi, dokuların ve organların yenilenmesi gibi süreçlerde önemli bir rol oynar. Ancak, hücre proliferasyonu kanser gibi patolojik durumların da temel bir özelliğidir. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde çoğalabilir [105].

Hedgehog sinyal yolu hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve doku oluşumunu düzenleyen önemli bir sinyal yolağıdır. Hedgehog sinyal yolağının aşırı veya anormal aktivasyonu, hücre proliferasyonunu düzenleyen dengeyi bozabilir ve kanser gibi patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olabilir. Örneğin, pankreas adenokarsinomunun köken aldığı Panc-1 hücre hatlarında, resveratrol uygulamasının Hedgehog sinyal yolunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği düşünülmüştür [106]. Ayrıca fare modeli üzerinde Hedgehog sinyal yolu inhibitörü olan GANT-61 uygulamasının hem in vitro hem de in vivo olarak mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, Hedgehog sinyal yolu aktivasyonunun ise proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir [107].

3T3-L1 hücre kültüründe yapılan bir çalışmada Hedgehog sinyal yolunun negatif bir düzenleyicisi olan HHIP'in (Hedgehog interacting protein) adiposit proliferasyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir [108]. İnsan mezenkimal kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada Hedgehog sinyal inhibitörü olan siklopaminin hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir [109].

Diferansiyasyon

Hedgehog sinyal yolunun birçok hücre tipinde diferansiyasyon için kritik önemde olduğu gösterilmiştir. Hedgehog sinyal yolu aktivasyonu saç folikülünde saç tellerinin büyümesinde rol alan keratinositlerin farklılaşmasını, dorsoventral farklılaşma ve nöral tüpün farklılaşmasını promote ederken aynı zamanda Hedgehog sinyal yolağının aşırı aktivasyonu epidermisin alt tabakasında bulunan bazal hücrelerin diferansiyasyonunu azaltarak hücrelerin normal epidermal hücrelere dönüşmesini engelleyerek bazal hücre karsinomaya neden olabilir [110,111]. Bunun yanı sıra Hedgehog sinyal yolunun inhibisyonunun da hücre diferansiyasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Hedgehog sinyal yolağının alt efektörü Smoothened antagonisti BMS-833923'ün insan kemik iliği kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastik diferansiyasyonunu azalttığı gösterilmiştir [112].

Preadiposit diferansiyasyonu üzerine Hedgehog aktivasyonunun süprese edici etkisi bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan ve Hedgehog aktivatörü purmorfamin ve Hedgehog inhibitörü siklopaminin primer domuz mezenkimal kök hücrelerinin adipojenik diferansiyasyonu üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada Hedgehog sinyal yolağı aktivasyonunun adipojenik diferansiyasyonu süprese ettiği, inhibisyonunun ise adiposit diferansiyasyonunu artırdığı gösterilmiştir [113]. Bununla birlikte Hedgehog sinyal yolağının preadiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Cousin ve ark. 3T3-L1 preadipositlerinde Hedgehog inhibitörü siklopamin uygulamasının diferansiyasyonu artırmadığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra siklopaminin adipojenik transkripsiyon faktörlerinden C/EBP α ve antiadipojenik bir transkripsiyon faktörü olan Pref-1 düzeyleri üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını göstermişlerdir [114]. Buna karşıt olarak Hedgehog inhibitörü siklopaminin insan yağ doku kökenli multipotent mezenkimal kök hücrelerinin diferansiyasyonunu anlamlı şekilde baskıladığı ve bu bulguyu destekleyecek şekilde Hedgehog aktivatörü purmorfaminin adiposit diferansiyasyonunu baskıladığı ortaya konulmuştur [115].

Migrasyon

Migrasyon, hücrelerin bir yerden başka bir yere doğru hareket etme sürecidir. Bu süreç, embriyonik gelişim sırasında hücrelerin doğru konumlarına yerleşmeleri, doku onarımı ve organ oluşumu gibi birçok biyolojik süreçte önemlidir. Hedgehog sinyal yolağı, embriyonik gelişim sürecinde hücrelerin doğru yerleşimini ve farklılaşmasını düzenleyen sinyal mekanizmalarından biridir [116].

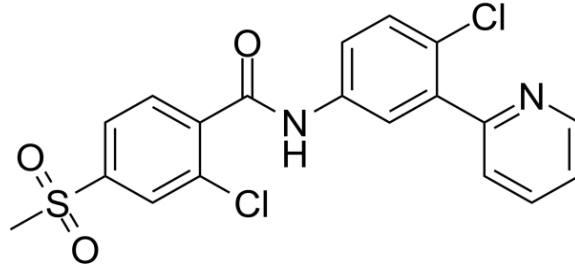
Yağ dokunun gelişimi sırasında ilk aşamada preadipositlerin yağ hücresi kümelerine migrasyonun gerçekleştiği ve ardından diferansiye olarak adipositleri oluşturdukları bildirilmiştir [117]. Bunun yanı sıra yüksek miktarda yağ doku kitlesinin varlığı ve iskelet kaslarının zayıflığı ile karakterize bir klinik durum olan sarkopenik obezitede iskelet kaslarındaki ektopik yağ doku birikiminin yağ dokudan migrate olarak kas dokuyu infiltre eden ve burada diferansiye olarak olgun adipositlere dönüşen preadipositler tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir. Yağ dokunun mezenkimal kök hücrelerden zengin bir doku olduğu ve subkütan yağ dokudan preadipositlerin dolaşıma salıverildiği bulunmuştur [118]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelere CXCR4 (CXC chemokine receptor 4) antagonisti uygulanmasının mezenterik ve subkütan yağ doku mezenkimal hücre içeriğinde hızlı ve belirgin bir azalmaya yol açtığı ve bu azalmanın hücre ölümüne ya da uygulanan antagonistin mezenkimal hücre fenotipinde bir değişikliğe değil, mezenkimal kök hücrelerin yağ dokudan salıverilmesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Bunu destekleyecek şekilde, CXCR4 antagonisti uygulanan farelerde iskelet kasında ektopik yağ birikimi saptanmıştır [119]. Yağ dokunun inert bir yapı değil değişen koşullara göre büyük bir plastisite gösterebilen dinamik bir doku olduğu bilinmektedir. Konjenital lipodistrofi, Cushing sendromunda gözlenen lipodistrofi, uzun süreli kortikosteroid ya da kullanımı, HIV enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan proteaz inhibitörlerinin advers etkisi olarak gelişen lipodistrofide vücuttaki yağ doku dağılımının belirgin ölçüde değiştiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra yaşlanma da yağ doku dağılımını önemli ölçüde değiştirmektedir. Yaşlılıkla birlikte deri altı yağ doku miktarı azalırken visceral ve iskelet kasında ektopik yağ doku birikimi de görülmektedir. Bu değişikliklerin gerçekleşmesi lipoliz, hipertrofi, hiperplazi gibi mekanizmaların yanı sıra preadiposit migrasyonunu da içeriyor gibi görünmektedir [120-122].

Hücrel gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynayan Hedgehog sinyal yolağının migrasyon üzerindeki etkisi hedef hücre tipine göre değişiklik gösterebilir. Hedgehog sinyal yolunun aktivasyonu bazal hücreli karsinom gibi bazal hücre kökenli cilt kanserlerinde, koku alma işlevini yerine getiren olfaktör nöronların burun boşluğundan beyine doğru göç etmesinde, germ hücrelerinin gonadlara doğru göçünde rol oynarak migrasyonu artırabilir [116,123,124]. İnsan mide epitel hücre hattı GES-1 üzerinde yapılan bir çalışmada Hedgehog sinyal yolunun baskılanmasının GES-1 hücrelerinin migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir [125]. Bununla birlikte preadiposit migrasyonu üzerine Hedgehog sinyal yolunun etkileriyle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

2.7. Vismodegib

Küçük moleküllü Hedgehog sinyal yolağı inhibitörü olan vismodegib, DMSO ve etanolde iyi, suda az çözünen, molekül ağırlığı 421.2971 g/mol olan bir etkin maddedir. Benzanilidler

olarak bilinen organik bileşikler sınıfına ait olan Vismodegibin molekül formülü şu şekildedir; $C_{19}H_{14}Cl_2N_2O_3S$ [121].



Şekil 2.6. Vismodegib kimyasal yapısı

Vismodegib radyoterapi ya da cerrahi tedavi endikasyonu olmayan ilerlemiş ya da metastatik bazal hücreli karsinom hastalarında klinikte kullanıma sunulan ilk Hedgehog inhibitörüdür [126]. Vismodegib GDC-0449 kodu ve Erivedge ticari ismi ile 2012 yılında FDA (Food and Drug Administration) ve 2013 yılında EMA (European Medicines Agency) tarafından antineoplastik bir ajan olarak onay almıştır [127,128].

Vismodegib antineoplastik etkisini, Hedgehog sinyal yolağında rol alan Smoothened proteinine bağlanıp aktivasyonunu engelledikten sonra hedgehog sinyal transdüksiyonunu bloke ederek gösterir. Smoothened aktivasyonu hedgehog sinyal iletimi ile birlikte, GLI transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonuna, nükleer lokalizasyonuna ve hedgehog hedef genlerinin indüklenmesine neden olur. Bu genlerin birçoğu sağkalım, çoğalma ve farklılaşmada rol oynar [127].

Caco-2 ve HT-29 insan kolon kanseri hücre hatları [129] ve pankreas hücre hatları olan AsPC-1, PANC-1 and MIA PaCa2 hücrelerinde yapılan çalışmalarda vismodegib uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir [129]. Vismodegib'in bazal hücreli karsinomada da hücre proliferasyonunu baskılayarak anti-tümör etki gösterdiği ortaya konulmuştur [126]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise gebe ICR farelerine vismodegib uygulamasının mezenkimal kök hücre proliferasyonunu azaltarak mandibula gelişimini bozduğu ve embriyolarda mikrognati oluşmasına yol açtığı gösterilmiştir [131]. Bununla birlikte preadiposit proliferasyonu üzerine vismodegibin etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. 3T3-L1 hücre hattında yapılan bir çalışmada sülförafen uygulamasının adipogenezi baskıladığı ve bu etkisinin Hedgehog sinyal yolu inhibitörü olan vismodegib ön uygulaması ile ortadan kalktığı gösterilmiştir [132]. Ancak, vismodegibin adipogenez üzerine etkisinin incelendiği çalışmalar kısıtlı sayıdadır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Kültürü

Deneyisel çalışmalar Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) ve Tıp Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarında yapıldı.

Çalışmamızda dondurulmuş hücrelerin çözündürülerek kültüre edilmesi sırasında ve diferansiyasyon protokolünün 0. gününden bitimine kadar olan dönemde hücreler fetal sığır serumu (Fetal bovine serum-FBS) içeren komplete medyum [%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco'nun Eagle Medyum (DMEM)] içerisinde kültüre edildi. Hücrelerin pasajlanması ve çoğaltılması sırasında ise sığır buzağı serumu (Bovine calf serum-BCS) içeren komplete medyum (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) içerisinde kültüre edildi.

Çalışmamızda kullanılan 3T3-L1 hücre hattı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı adına Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan -80°C derin dondurucudan soğuk zincir koşullarında MEİTAM hücre kültürü laboratuvarına getirildi ve çalışmaya başlamadan hemen önce dondurulmuş hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda 1-2 dakika içerisinde çözülürdü.

Kriyoprotektif ajan olarak dondurulmuş 3T3-L1 preadiposit hücre hattında % 10'luk DMSO bulunmaktadır. DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak amacıyla hücreler çözündürüldükten sonra her bir kriyo tüpte bulunan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve üzerine DMEM eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet üzerine FBS içeren komplete medyumdan eklenerek hücrelerin iyice süspande olması sağlandı ve 25 cm²'lik flaslara ekim yapılarak %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatöre kaldırıldı.

Pasajlama

3T3-L1 hücrelerinin karakteristik özelliklerinin bozulmaması için pasajlama, hücreler %70-80 konflüe durumda iken yapılmalıdır.

Bu nedenle hücreler %70-80 konflüe olduklarında flaslardaki medyum uzaklaştırılıp, 2-3 ml serum içermeyen DMEM ile yıkama yapıldı ve medyum uzaklaştırıldıktan sonra flaska 1 ml tripsin eklendi. Tripsinizasyon sırasında 5 dakika süresince flaska hafif hafif vurularak hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılması sağlandı. Hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılması inverted mikroskopta gözlendikten sonra flask içerisindeki hücre solüsyonu hafifçe pipetaj yapılarak alınıp 15 ml'lik falcon tüpe konularak, üzerine 10 ml DMEM eklendi ve 1800 rpm hızda 37°C sıcaklıktaki santrifüj cihazında 10 dakika süre ile santrifüj yapıldı. Santrifüj işlemi tamamlanınca süpernatant uzaklaştırılıp hücre pelletinin üzerine 7,5 ml BCS içeren komplete

medyum koyuldu, tüpe hafif hafif vurarak hücre pelletinin ayrılması sağlandıktan sonra birkaç kez pipetaj yaparak hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı ve flasklara 2,5 ml hücre çözeltisinden koyularak üzerine 2,5 ml komplete medyum eklendi. Böylece hücreler 1:3 oranında pasajlandı. Flask içindeki atık medyum, komplete medyumla günaşırı değiştirildi.

3T3-L1 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

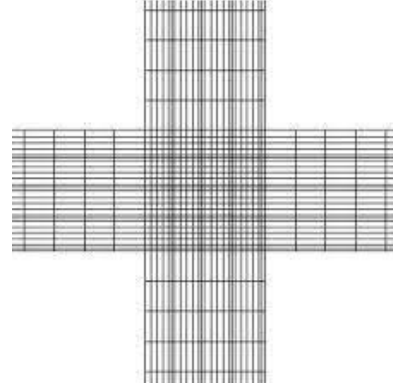
Hücrelerin bir kısmı daha sonra çalışılmak üzere dondurularak saklandı. Dondurulmak istenen hücrelere tripsinizasyon işlemi yapıldı Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletin üzerine 10 ml freeze medyum (%10 DMSO ve %10 FBS içeren DMEM) eklenip pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağılması sağlandı. Çözelti kriyoviallere 1,5 ml olacak şekilde bölüştürüldü ve kapakları kapatıldıktan sonra +4°C'de 2 saat, -20°C'de 2 saat bekletilip daha sonra -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi

Hücre kültürü deneylerinde her kuyucukta eşit sayıda hücre olması için ekime başlamadan önce ml'deki canlı hücre sayısı hesaplanır. Hücre sayımı için hücreler tripan mavisini ile boyanarak thoma lamında canlı-ölü hücre sayımı yapıldı. Tripsinizasyon sonrası ekim yapılmak üzere falkon tüplere alınan hücreler tripan mavisini ile vialde karıştırılarak, ölü hücrelerin içine tripan mavisinin girmesi için 2-3 dk bekletildi, pipetaj yapılarak karışımdan Thoma lamına aktarıldı



Şekil 3.1. Thoma lamı



Şekil 3.2. Sayım alanı

Thoma lamında 2 ayrı bölgedeki seçili karelerde bulunan canlı hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra bulunan hücre sayısı 20.000 ile çarpılarak 1 ml'deki ortalama hücre sayısı bulundu. Hücreler çok yoğun halde ise süspansiyon hücreler seyreltilerek bulunan sonuç dilüsyon katsayısı ile çarpıldı.

3.3. Sinapik Asit ve Vismodegib Çözeltilerinin Hazırlanması

Sigma markalı sinapik asit ve MedChem markalı vismodegib ticari olarak satın alındı. Sinapik asit 80 μM , vismodegib 10 μM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek stok çözeltiler hazırlandı. Deney serilerinde kullanmak için sinapik asit 5 μM , 10 μM ve 20 μM olacak şekilde stok çözelti DMSO ile seyreltilerek hazırlanıp viallere koyuldu; vismodegib için ise 10 μM olarak hazırlanan çözelti viallere koyularak -20 °C de saklandı.

3.4. MTT Çalışma Solüsyonu ve Çözücü Solüsyonların Hazırlanışı

MTT stok çözeltisi hazırlamak için karanlık ortamda 5 mg MTT hassas terazide tartılıp folyo ile sarılmış falkon tüp içerisine alındı ve üzerine hazırlanan PBS tampon çözeltisinden 10 ml eklenerek çözdürülmüş 5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan çözelti 0,2 μm 'lik filtreden geçirildi ve +4 °C de 1 gün muhafaza edildi. MTT çalışma solüsyonu ise final konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde deney günü hazırlandı.

Formazan kristallerini çözmek için kullanılacak izopropil alkol, HCl eklenerek pH'sı 2 olacak şekilde asidifiye edildi, +4 °C de saklandı.

3.5. Oil Red O Çalışma Çözeltisi Hazırlanışı

175 mg Oil Red O hassas terazide tartılıp, 50 ml falkon tüpe alındı, izopropanol ile 50 ml'ye tamamlandı. Tüp, folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Hazırlanan karışım çözünmesi için vortekslendi ve 2 defa 0,2 μm filtreden geçirildi. Hazırlanan stok çözelti 1 gün +4°C'de bekletildi, ertesi gün stok çözeltiden 6 birim, distile sudan 4 birim karıştırılarak seyreltildi. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,2 μm filtreden geçirilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

3.6. Viabilite Deney Serisi

Sinapik asit ve vismodegibin hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirildiği deney gruplarında hücre kültür ortamına belirli zaman noktalarında (24, 48 ve 72 saat süresince) vismodegib (10 μM) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 μM) uygulandı ve belirlenen sürelerin bitiminde deney sonlandırılarak hücre viabilitesi MTT yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

Deney serisinin başlangıcında hücre sayımı yapıldıktan sonra 24'lük pleytlere her kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı, hücreler %100 konflüe olana kadar güneşirı medyum değişimi yapıldı. Hücreler %100 konflüe olduktan sonra belirlenen dozlarda sinapik asit ve vismodegib uygulaması yapıldı. Kontrol grubu olarak yine aynı hacimde DMSO uygulandı.

Deney serileri:

- 1,25 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 2,5 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 5 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 20 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- DMSO Kontrol grubu (n=4)

MTT Analizi

MTT analizi yapılacak olan pleytin kuyucuklarındaki medyum uzaklaştırılıp PBS tamponu ile yıkama işlemi yapıldı, kuyucuklara MTT çalışma solüsyonu uygulandı. Pleytlerin ışık alması önlemleri ve 37°C'de 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolan pleytlerdeki MTT çözeltisi uzaklaştırılıp oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara asidifiye izopropanol uygulandı. 10 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda sallandıktan sonra her bir kuyucuğa pipetaj yapılarak alınan örnekler 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine konuldu ve ELISA okuyucuda 570 nm absorbansta ölçüm yapıldı.

3.7. Proliferasyon Deney Serisi

Proliferasyonun değerlendirilmesi için hücrelere vismodegib (10 μ M) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulanarak 0-2, 2-4 ve 0-4'üncü gün deney serileri oluşturuldu ve deney protokolünün 4'üncü günü deneyler sonlandırılarak MTT analizi yapıldı. Deneylerin başlangıcında pleytlere her kuyucuğa 50.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak hücreler %100 konflü olana kadar gün aşırı medyum değişimi yapıldı.

Hücrelerin %100 konflü olduğu gün -2'nci gün olarak kabul edildi ve medyum değişimi yapılarak 2 gün daha bekletildi. Postkonfluent 2'nci gün standart diferansiyasyon protokolünün 0'ıncı günü olarak kabul edildi ve deney gruplarına göre belirli günlerde kuyucuklara ilaç uygulamaları yapıldı. Kontrol grubu olarak aynı hacimde DMSO uygulandı.

Deney serileri;

- 5 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 20 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- 5 μ M Sinapik asit + 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Sinapik asit + 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- 20 μ M Sinapik asit + 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- DMSO Kontrol grubu (n=4)

3.8. Diferansiyasyon Deney Serisi

Vismodegib (10 μ M) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulamasının 3T3-L1 hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği deney serilerinde belirli zaman noktalarında (0-4, 4-8 ve 0-8'inci gün) ilaç uygulamaları yapıldı ve diferansiyasyon sürecinin 8'inci günü Oil Red O boyama yöntemi ile hücre diferansiyasyonu değerlendirildi. Deney başlangıcında pleytlere her kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak hücreler %100 oranında konflüe olana kadar BCS içeren komplete medyum ile gün aşırı medyum değişimi yapıldı. Konflüe oldukları gün -2'nci gün olarak kabul edildi, hücreler 2 gün daha bekletilerek diferansiyasyon protokolünün 0'ıncı günü olarak kabul edildi. Deney protokolünün 0'ıncı gününde diferansiyasyonu indüklemek amacıyla kuyucuklara 0,25 μ M deksametazon, 0,5 mM izobutilmetilksantin (IBMX) 1 μ M insülin içeren FBS'li komplete medyum uygulandı. Diferansiyasyon protokolünün 2'nci gününde kuyucuklara 1 μ M insülin içeren %10 FBS'li komplete medyum, protokolün 4'üncü günü kuyucuklara %10 FBS içeren komplete medyum uygulandı. Kuyucukların medyumunu gūnaşırı değiştirilerek 8'inci güne kadar inkübe edildi ve 0-4, 4-8 ve 0-8'inci gün aralığında kuyucuklara ilaç uygulamaları yapıldı. Kontrol grubu olarak DMSO kullanıldı.

Deney serileri:

- 5 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 20 μ M Sinapik asit uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- 5 μ M Sinapik asit + 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- 10 μ M Sinapik asit + 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- 20 μ M Sinapik asit + 10 μ M Vismodegib uygulaması yapılan grup (n=4)
- DMSO Kontrol grubu (n=4)

Oil Red O Analizi

Protokolün 8'inci gününde deney sonlandırılarak, kuyucuklardan medyum uzaklaştırılıp, kuyucuklara %10 formalin eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. Kuyucuklardan formalin uzaklaştırıldıktan sonra tekrar formalin eklendi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun bitiminde kuyucuklardaki formalin tamamen uzaklaştırılıp, kuyucuklar %60'luk izopropanol ile yıkandı ve kurutuldu. Her kuyucuğa Oil red O çalışma solüsyonundan eklendi, 10 dakika inkübe edildi. Oil Red O solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırılıp, kuyucuklar 4 kez distile su ile yıkandı, pleytler inverted mikroskop altında fotoğraflandı. Distile su kuyucuklardan uzaklaştırılıp kuyucuklar kurutuldu, kuyucuklara %100 izopropanol eklendi. Pleytler 10 dakika orbital çalkalayıcıda sallandı ve kuyucuklardan pipetaj yapılarak 96'luk ELISA pleytlerine uygulandı. 490 nm absorbansta ölçüm yapıldı.

3.9. Migrasyon Deneyi

Her kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılan pleytlerde hücreler konflüe hale geldiğinde kuyucuklara 200 µl pipet ucu kullanılarak düz bir yara açıldı ve bu yaranın genişliği 3 farklı noktadan ölçülerek fotoğrafları çekildi. Fotoğraflama 24, 48 ve 72'nci saatlerde aynı noktalardan tekrar yapılarak ölçümler karşılaştırılıp yara açıklığının değerlendirmesi yapıldı. Pleytlerdeki medyumun değişimi gūnaşırı yapıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz

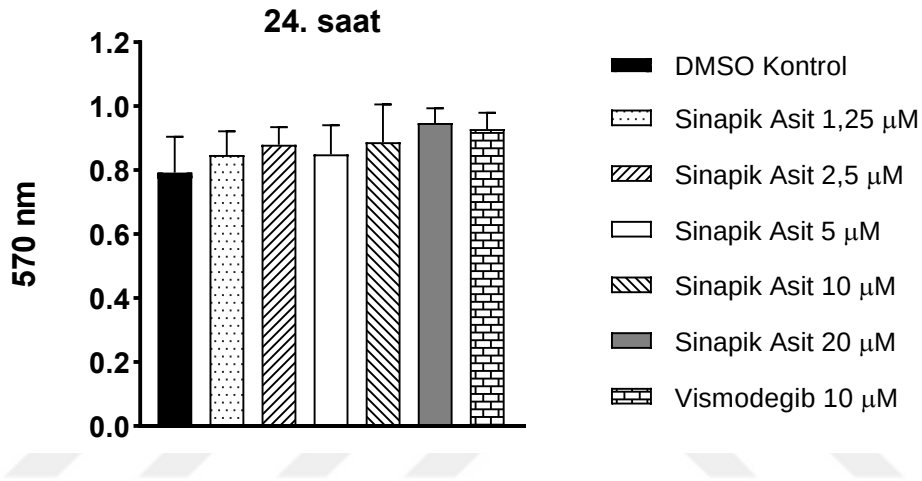
Deney serileri kolorimetrik olarak değerlendirildi ve veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü ANOVA'yı takiben Dunnet post- hoc testi kullanıldı, $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Viabilite Deney Sonuçları

4.1.1. 24. Saat

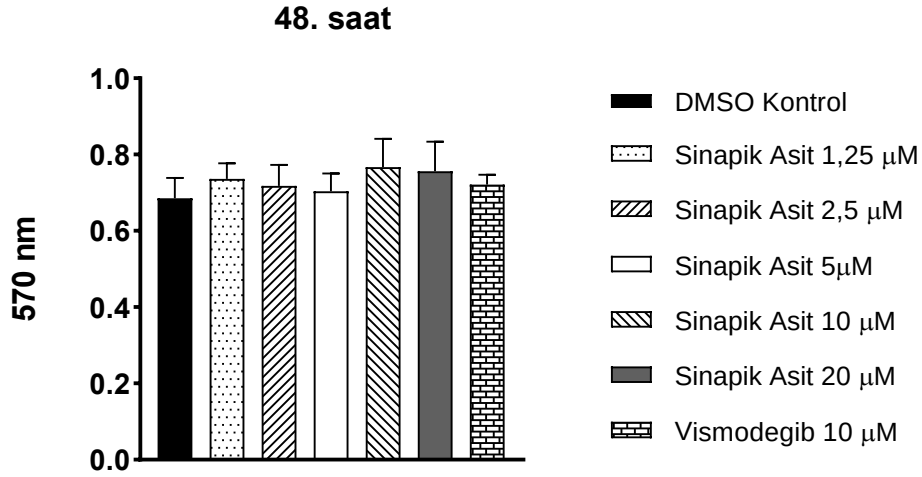
3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerine sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 μM) ve vismodegibin (10 μM) etkisini incelemek amacıyla hücrelere sinapik asit ve vismodegib uygulandı, 24 saatin sonunda deney sonlandırıldı ve MTT analizi yapıldı. Sinapik asit ve vismodegib uygulamasının 24 saatin sonunda viabilite üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 24 saat süreyle sinapik asit ya da vismodegib uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine vismodegib (10 μM) ve sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 μM) uygulandı. 24 saatin sonunda viabilite MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.1.2. 48. Saat

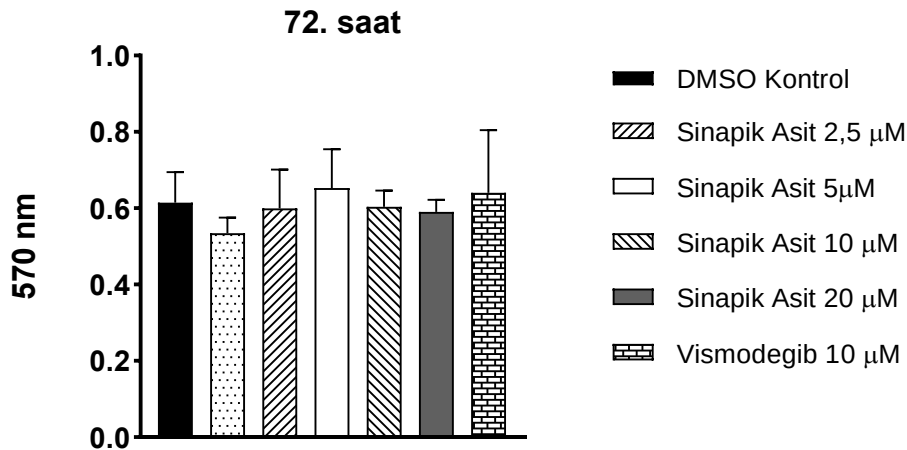
Sinapik asit ve vismodegibin 3T3-L1 preadiposit hücreleri viabilitesi üzerine etkisini incelemek için hücrelere sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 μM) ve vismodegib (10 μM) uygulandı, 48 saatin sonunda deney sonlandırılarak MTT analizi yapıldı. Sinapik asit ve vismodegibin seçilen konsantrasyonlarda uygulanmasının 48 saatin sonunda viabilite üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 48 saat süreyle sinapik asit ya da vismodegib uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 µM) ve vismodegib (10 µM) uygulaması yapıldıktan 48 saat sonra MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.1.3. 72. Saat

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerine sinapik asit ve vismodegibin etkisini incelemek için hücrelere sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 µM) ve vismodegib (10 µM) uygulaması yapıldı, 72 saatin sonunda viabilite MTT yöntemi kullanılarak analiz edildi. Sinapik asit ve vismodegibin seçilen dozlarda uygulanmasının 72 saatin sonunda viabilite üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.3).

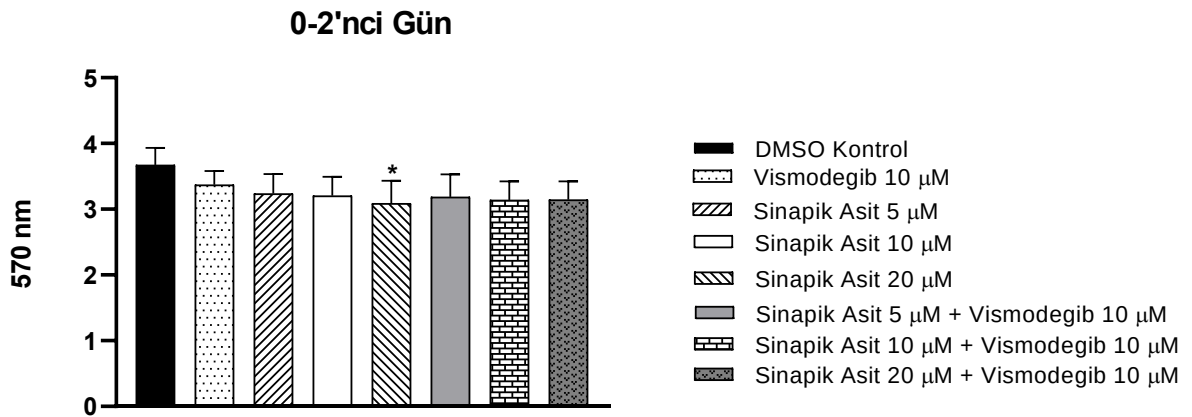


Şekil 4.3. 72 saat süreyle sinapik asit ya da vismodegib uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine sinapik asit (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 µM) ve vismodegib (10 µM) uygulaması yapıldıktan 72 saat sonra hücre viabilitesi MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.2. Proliferasyon Deney Sonuçları

4.2.1. 0-2'nci Gün

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin proliferasyonu üzerine diferansiyasyon protokolünün 0-2'nci günleri arasında uygulanan sinapik asidin etkisini incelemek ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilen deneyde protokolün 2-4'üncü gün aralığında vismodegib ($10 \mu\text{M}$) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5 , 10 ve $20 \mu\text{M}$) uygulandı. Deney 4'üncü gün sonlandırılarak hücre proliferasyonu MTT analizi ile değerlendirildi. 5 ve $10 \mu\text{M}$ sinapik asit uygulaması ile 3T3-L1 hücre proliferasyonunda azalma görülmekle birlikte bu azalma anlamlı bulunmazken, $20 \mu\text{M}$ sinapik asit uygulanmasının 3T3-L1 hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığı görüldü. Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması sinapik asidin oluşturduğu proliferasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdı (Şekil 4.4).

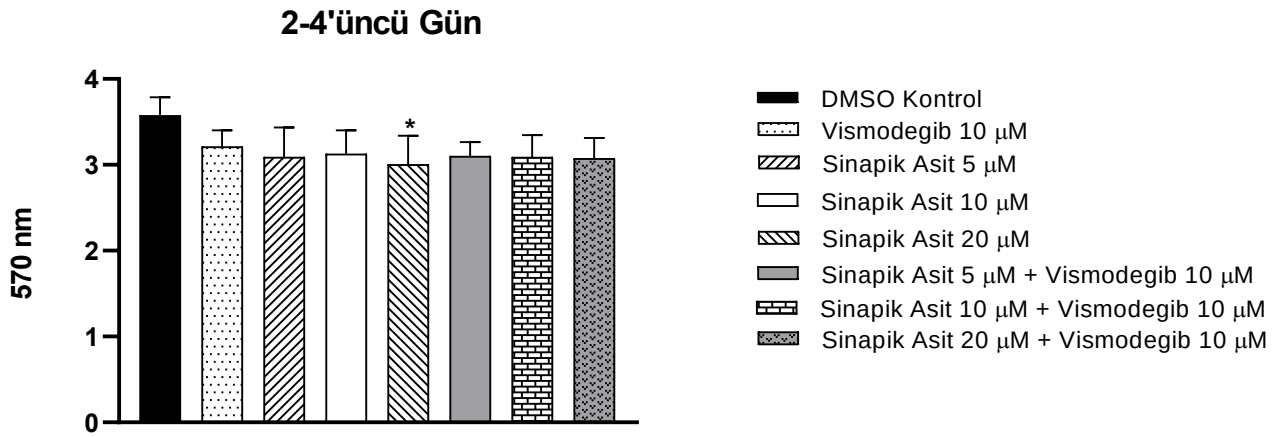


Şekil 4.4. 0-2'nci gün aralığında vismodegib ($10 \mu\text{M}$) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5 , 10 ve $20 \mu\text{M}$) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine 0-2'nci günler arasında vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulandı ve 4'üncü günün sonunda proliferasyon MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.2.2. 2-4'üncü Gün

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin proliferasyonu üzerine diferansiyasyon protokolünün 2-4'üncü günleri arasında uygulanan sinapik asidin etkisini incelemek ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilen deneyde protokolün 2-4'üncü gün aralığında vismodegib ($10 \mu\text{M}$) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5 , 10 ve $20 \mu\text{M}$) uygulandı. Deney 4'üncü gün sonlandırılarak hücre proliferasyonu MTT analizi ile değerlendirildi. Sinapik asit 5 ve $10 \mu\text{M}$ konsantrasyonda uygulandığında hücre

proliferasyonunda bir miktar azalma gözlenmekle birlikte bu azalma anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte, 20 μ M sinapik asit uygulaması hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttı, Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması sinapik asidin 20 μ M konsantrasyonda uygulandığında oluşturduğu proliferasyonu baskılayıcı etkiyi ortadan kaldırdı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Diferansiyasyon protokolünün 2-4'üncü günleri arasında vismodegib varlığında ya da yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerine etkisi. Protokolün 2-4'üncü günleri arasında vismodegib (10 μ M) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulandı. Protokolün 4'üncü günü sonunda deney sonlandırıldı ve proliferasyon MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.2.3. 0-4'üncü Gün

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin proliferasyonu üzerine diferansiyasyon protokolünün 0-4'üncü günleri arasında uygulanan sinapik asidin etkisini incelemek ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilen deneyde protokolün 0-4'üncü günleri arasında vismodegib (10 μ M) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulandı. Deney 4'üncü gün sonlandırılarak hücre proliferasyonu MTT analizi ile değerlendirildi. Sinapik asit 5 ve 10 μ M konsantrasyonda uygulandığında hücre proliferasyonunda bir miktar azalmaya neden olsa da bu azalma anlamlı bulunmadı. Sinapik asit 20 μ M konsantrasyonda uygulandığında hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttı. Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması 20 μ M sinapik asit uygulamasının proliferasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdı (Şekil 4.6).



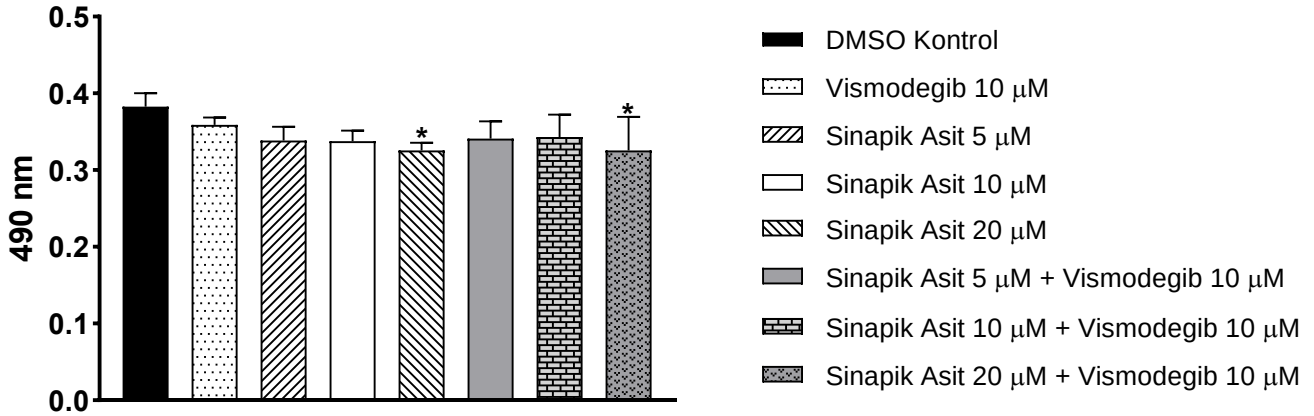
Şekil 4.6. 0-4'üncü gün aralığında vismodegib varlığında ya da yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyonu üzerine etkisi. Protokolün 0-4'üncü günleri arasında vismodegib (10 µM) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulandı. Protokolün 4'üncü günü sonunda deney sonlandırıldı ve hücre proliferasyonu MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc test* olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.3. Diferansiyasyon Deney Sonuçları

4.3.1. 0-4'üncü Gün

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine deney protokolünün 0-4'üncü günleri arasında uygulanan sinapik asidin etkisini incelemek ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilen deneyde protokolün 0-4'üncü gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulandı, 8'inci günün sonunda deney sonlandırıldı ve diferansiyasyon Oil Red O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Sonuçlara göre, 0-4'üncü gün arasında 20 µM sinapik asit uygulaması diferansiyasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olurken, Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması ise 20 µM sinapik asidin diferansiyasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmadı (Şekil 4.7).

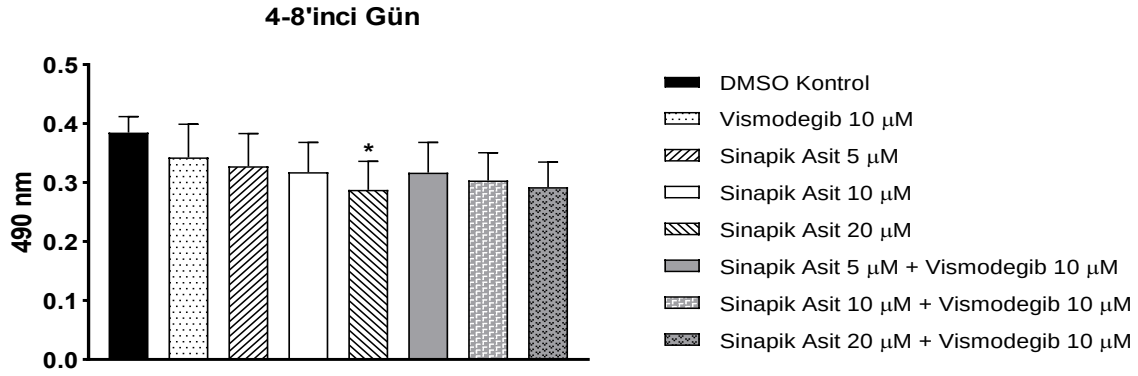
0-4'üncü Gün



Şekil 4.7. 0-4'üncü gün aralığında vismodegib varlığında ya da yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine diferansiyasyon protokolünün 0-4'üncü gün aralığında vismodegib (10 µM) ve sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulandı 8'inci günün sonunda MTT yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.3.2. 4-8'inci Gün

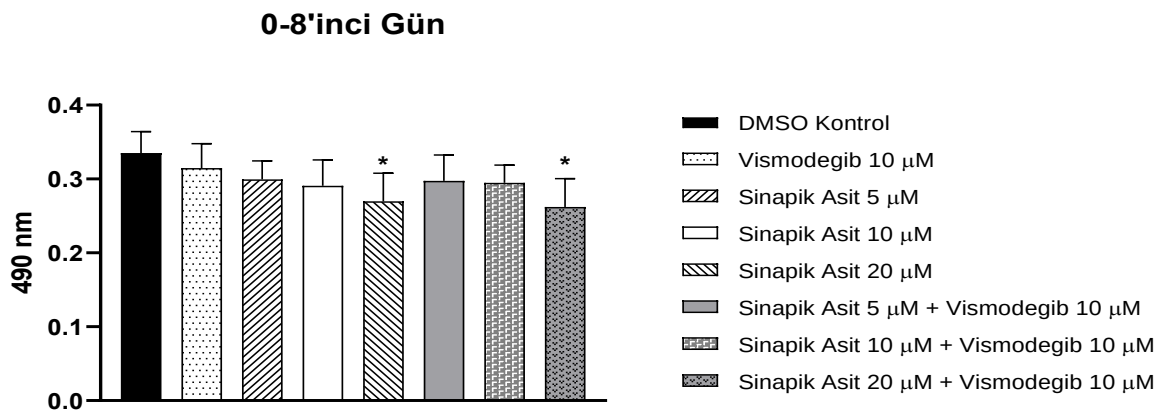
3T3-L1 preadiposit hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine deney protokolünün 4-8'inci günleri arasında uygulanan sinapik asidin etkisini incelemek ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilen deneyde protokolün 4-8'inci günleri arasında vismodegib (10 µM) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulandı, 8'inci günün sonunda deney sonlandırıldı. Diferansiyasyon Oil Red O boyama yöntemi ile değerlendirildi. Bulgulara göre, 4-8'inci gün aralığında 20 µM sinapik asit uygulaması diferansiyasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya neden oldu. Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulamasının sinapik asidin diferansiyasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 4-8'inci gün aralığında vismodegib varlığında ya da yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine 4-8'inci gün aralığında vismodegib (10 µM) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulandı. Protokolün 8'inci günü sonunda deney sonlandırılarak diferansiyasyon Oil Red O boyama yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.3.3. 0-8'inci Gün

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine deney protokolünün 0-8'inci günleri arasında uygulanan sinapik asidin etkisini incelemek ve bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının karışıp karışmadığını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilen deneyde diferansiyasyon süreci boyunca (0-8'inci gün) vismodegib (10 µM) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulaması yapıldı ve diferansiyasyon süreci 8'inci günün sonunda sonlandırılıp Oil Red O boyaması yapıldı. Sonuçlara göre, 0-8'inci gün arasında 20 µM sinapik asit uygulaması diferansiyasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olurken, Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulamasının ise sinapik asidin tek başına uygulandığında oluşturduğu diferansiyasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmadığı görüldü (Şekil 4.9).

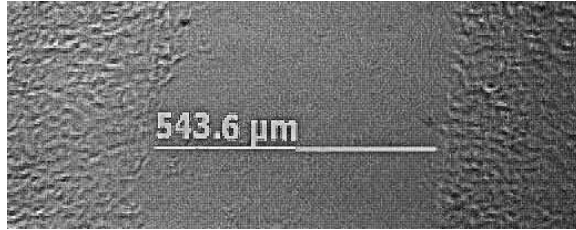


Şekil 4.9. 0-8'inci gün aralığında vismodegib varlığında ya da yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi. 3T3-L1 hücrelerine 0-8'inci gün aralığında vismodegib 10 µM ve sinapik asit (5, 10 ve 20 µM) uygulandı .8'inci günün sonunda diferansiyasyon Oil red O boyama yöntemi ile analiz edildi. Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

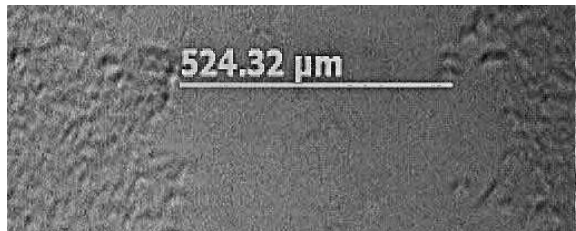
4.4. Migrasyon Deneyi Sonuçları

Sinapik asit 5 μ M

0. saat



24. saat



48. saat

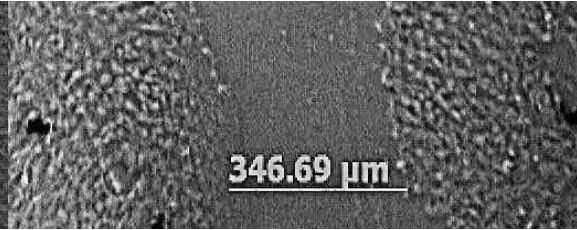


72. saat

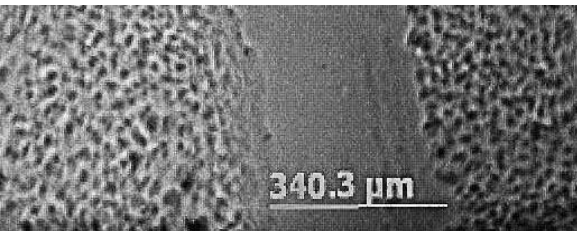


Sinapik asit 10 μ M

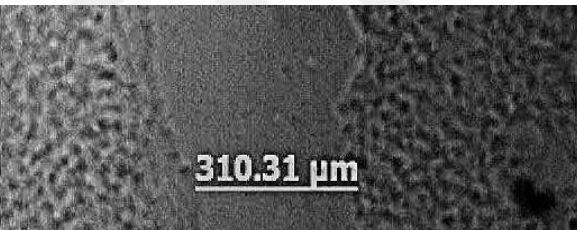
0. saat



24. saat



48. saat

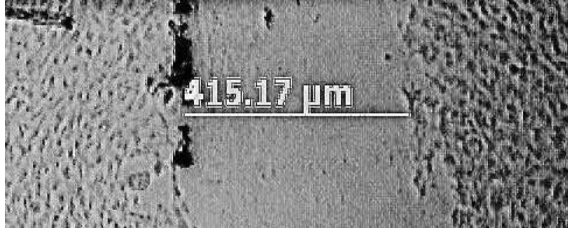


72. saat

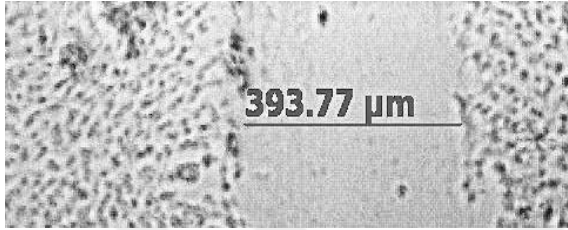


Sinapik asit 20 µM

0. saat



24. saat



48. saat

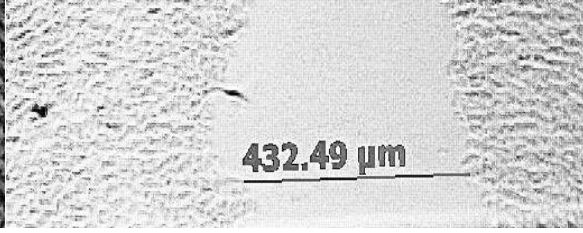


72. saat

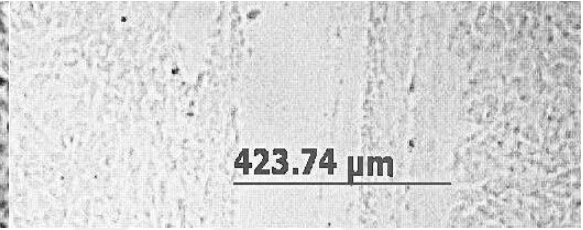


Vismodegib 10 µM

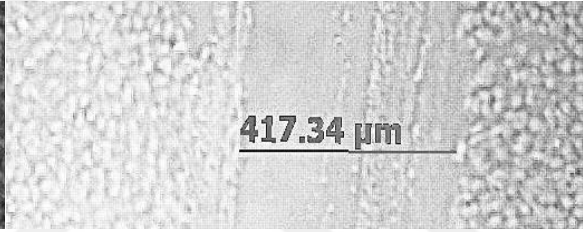
0. saat



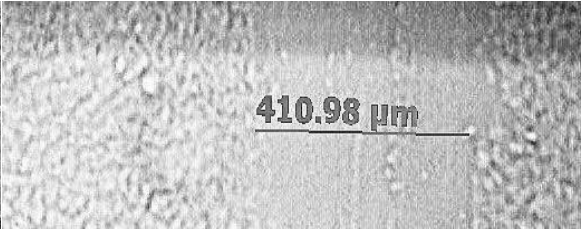
24. saat



48. saat

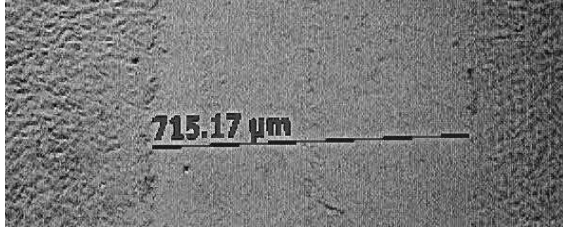


72. saat

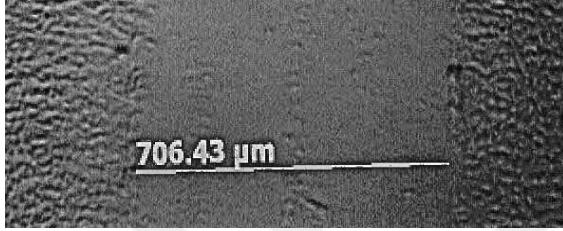


Sinapik asit 5 μ M + Vismodegib 10 μ M

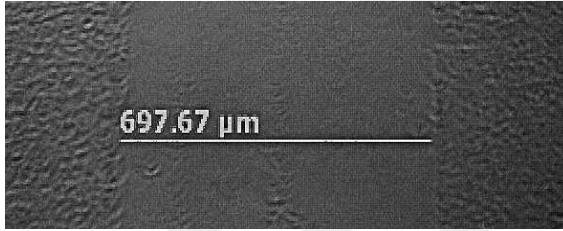
0. saat



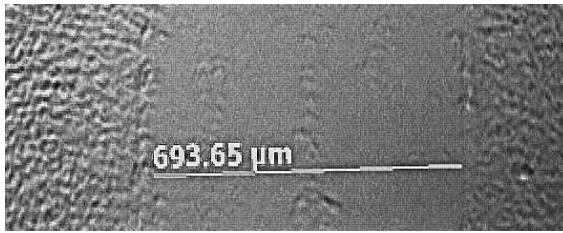
24. saat



48. saat

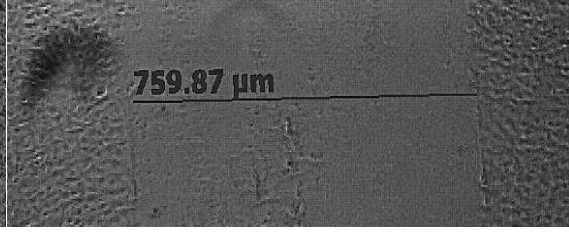


72. saat



Sinapik asit 10 μ M + Vismodegib 10 μ M

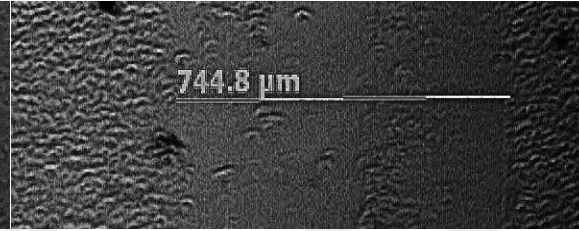
0. saat



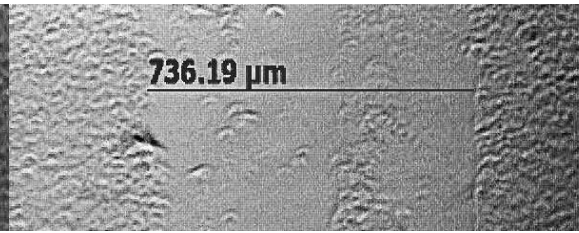
24. saat

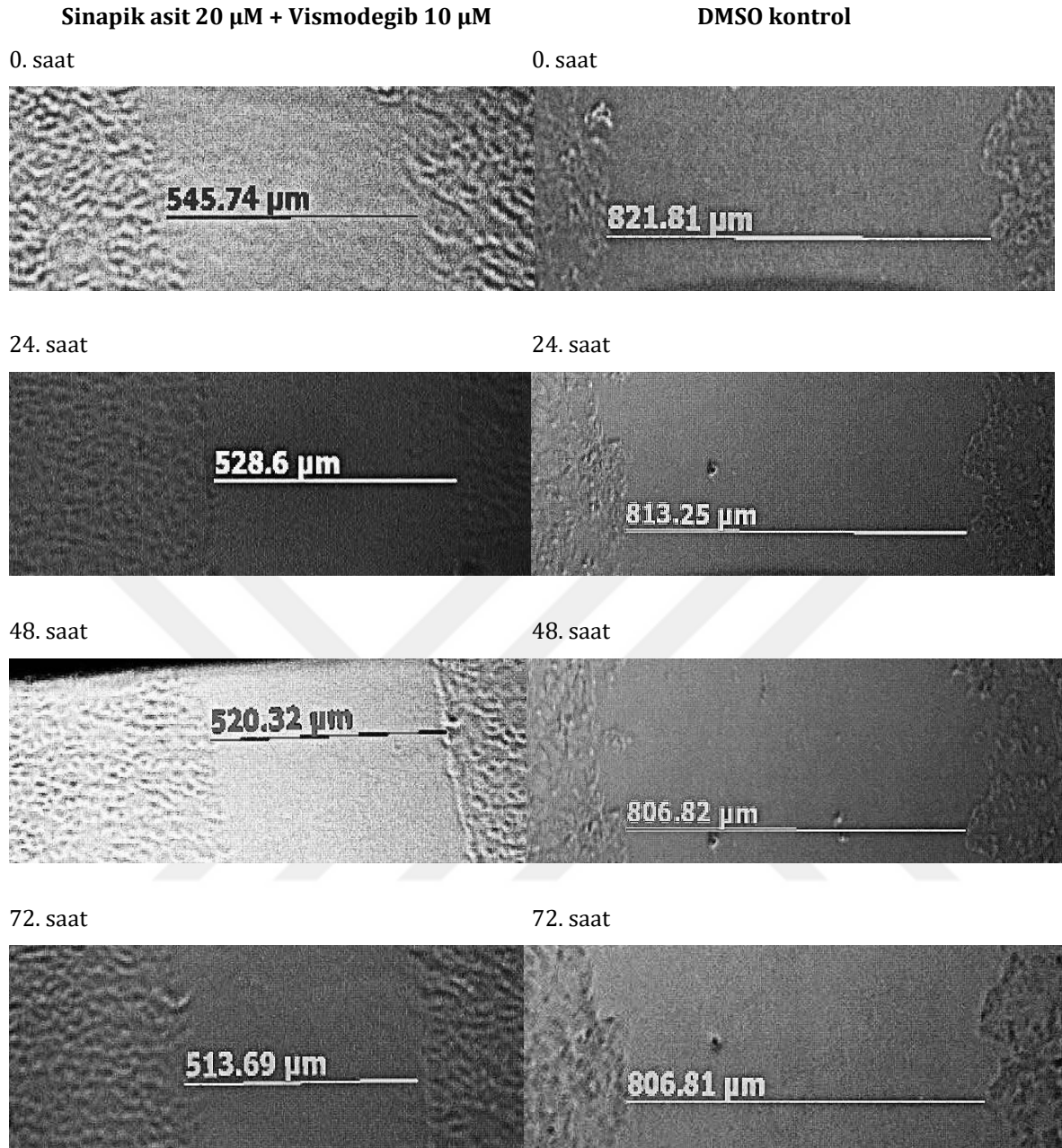


48. saat



72. saat





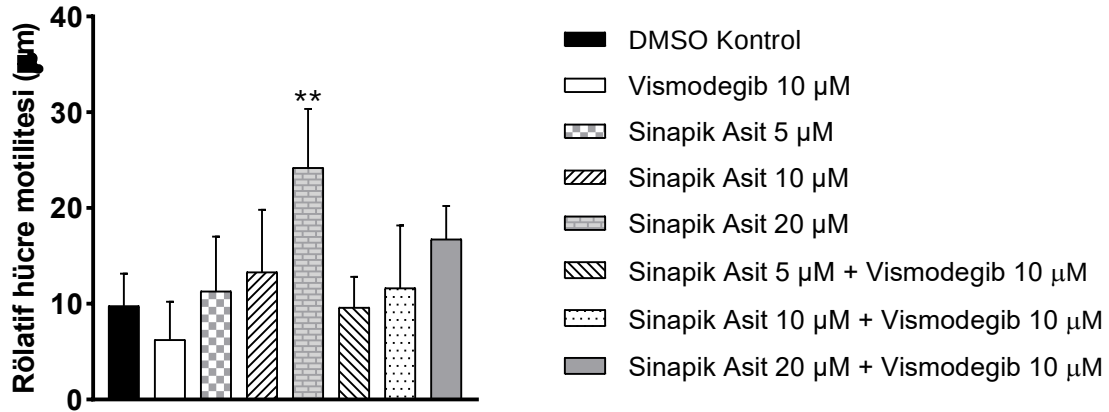
Şekil 4.10. Vismodegib varlığında ya da yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (0-72. saat). Protokolün 24, 48 ve 72 saatleri boyunca hücelere vismodegib (10 μ M) varlığında ve yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulandı.

4.4.1. 24 Saat

Hücre ekimi yapılmadan önce, yakın noktalardan ölçüm yapabilmek amacı ile pleytlerin alt kısmına 3'er adet yatay referans çizgisi çizildi. Deney serisinin başlangıcında her kuyucuğa 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücre ekimi yapıldıktan sonra beklenen düzeyde konflüe olunca kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı. Uç kısmından 2-3 mm uzaklıktan kesilerek genişliği artırılmış 200 μ l pipet uçları kullanılarak pleytlerde yer alan referans çizgilerinin tam ortasından dikey bir şekilde yara açıldı. Yara açıldıktan sonra kuyucukların tabanından kalkan hücrelerin uzaklaştırılması için dikkatlice DMEM ile yıkama işlemi yapıldı.

Kuyucuklara BCS içeren komplete medyum eklendi ve vismodegib (10 μ M) varlığında ya da yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulaması yapıldı. Kontrol grubu olarak aynı hacimde DMSO uygulandı. Migrasyonun değerlendirilmesi için 24 saatin sonunda hücrelerin bulunduğu pleyt 4x büyütmede ayarlanan mikroskop altında görüntülendi ve referans çizgileri baz alınarak yara açıklığının ölçümü yapılarak fotoğraflandı (Şekil 4.10).

24 Saat



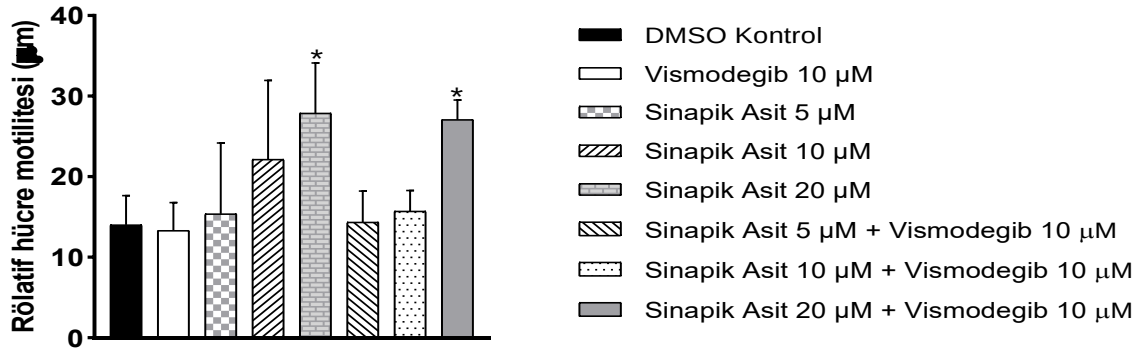
Şekil 4.11. Vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (24. saat). Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnet *post-hoc* test kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

24 saat boyunca hücrelere 5, 10 ve 20 μ M sinapik asit uygulanması migrasyonda doza bağımlı bir artışa neden oldu ancak bu artış sadece 20 μ M sinapik asit uygulamasında anlamlı bulundu. Sadece vismodegib uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre migrasyonda azalma görüldü ancak bu azalma anlamlı bulunmadı. 20 μ M sinapik asit uygulamasının migrasyonda neden olduğu artış vismodegib ön uygulaması ile ortadan kaldırıldı.

4.4.2. 48 Saat

Hücrelerin bulunduğu kuyucuklara vismodegib (10 μ M) varlığında veya yokluğunda 48 saat süre ile sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) ve kontrol grubu olarak aynı hacimde DMSO uygulandı. Migrasyonun değerlendirilmesi için 48 saatin sonunda mikroskop yardımıyla yara açıklığı ölçüldü (Şekil 4.10).

48 Saat



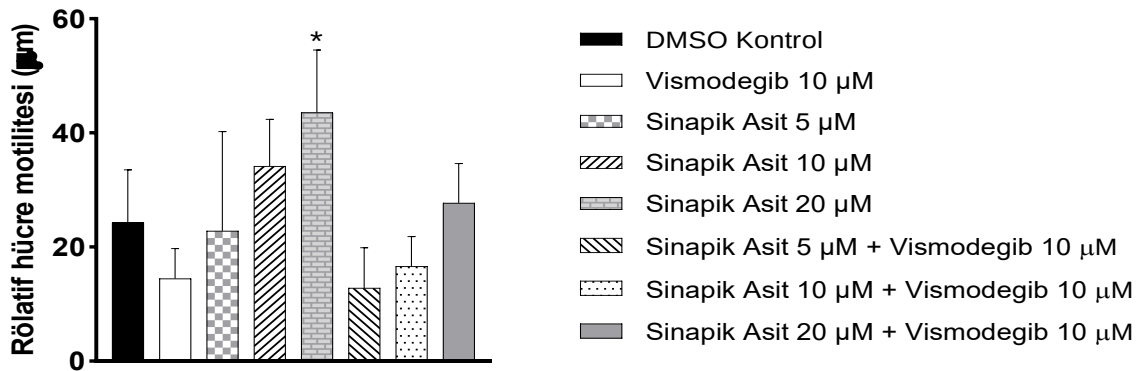
Şekil 4.12. Vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (48. saat). Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnet *post-hoc* test kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

48 saat boyunca hücrelere 5, 10 ve 20 μM sinapik asit uygulanması migrasyonda doza bağımlı bir artışa neden oldu ancak bu artış sadece 20 μM sinapik asit uygulamasında anlamlı bulundu. Vismodegib ön uygulaması 20 μM sinapik asidin migrasyonda neden olduğu artışı bir miktar azalttı, ancak ortadan kaldırmadığı görüldü.

4.4.3. 72 Saat

72 saat süre ile hücrelerin bulunduğu kuyucuklara vismodegib (10 μM) varlığında veya yokluğunda sinapik asit (5, 10 ve 20 μM) ve kontrol grubu olarak aynı hacimde DMSO uygulaması yapıldı. Migrasyonun değerlendirilmesi için 72 saatin sonunda mikroskop yardımıyla yara açıklığı ölçüldü (Şekil 4.10).

72 Saat



Şekil 4.13. Vismodegib varlığında veya yokluğunda sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonu üzerine etkisi (72. saat). Veriler DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnet *post-hoc* test kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

Hücrelere 72 saat boyunca 5, 10 ve 20 μM sinapik asit uygulanması migrasyonda doza bağımlı bir artışa neden oldu ancak bu artış sadece 20 μM sinapik asit uygulamasında anlamlı bulundu. Sadece vismodegib uygulamasının migrasyonda azalmaya neden olduğu görülmekle birlikte bu azalma anlamlı bulunmadı. Vismodegib ön uygulaması 20 μM sinapik asit uygulamasının migrasyonda neden olduğu artışı ortadan kaldırdı.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Vücutta aşırı yağ birikimiyle karakterize olan obezite fazla kalori alımı, hareketsiz yaşam tarzı, genetik faktörler ve çevresel etkenler gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilir. Obezite, kalp hastalığı, yüksek tansiyon, diyabet ve diğer sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilir ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilir [1,2].

Obezitede vücut yağ doku miktarındaki artışa yol açan iki mekanizmadan birisi preadiposit diferansiyasyonu sonucu gerçekleşen adipogenez sürecidir. Çalışmamızda 3T3-L1 preadiposit hücrelerinde, antiadipojenik etkilere sahip olabileceği düşünülen sinapik asidin hücre viabilitesi, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkileri araştırıldı ve Hedgehog sinyal yolağının bu etkilere aracılık edip etmediği incelendi.

Hücre kültüründe viabilite, hücrelerin canlılık ve hayatta kalma yeteneğini ifade eder. Hücre viabilitesi, özel boyama veya analiz yöntemleri kullanılarak canlı ve ölü hücrelerin sayısı ile değerlendirilir. 3T3-L1 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada sinapik asidin 1, 2, 5, 10 ve 20 μ M konsantrasyonlarda uygulanmasının adiposit canlılığı üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir [5]. Daha önce 3T3-L1 hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda Hedgehog inhibitörü olarak kullanılan 10 μ M vismodegib, hücre viabilitesi üzerinde olumsuz etki göstermemiştir [132].

Çalışmamızda hücre viabilitesi deney serilerinde kullanılmak üzere seçilen 5 farklı sinapik asit dozunun (1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 μ M) ve Hedgehog sinyal yolağı inhibitörü olan vismodegibin (10 μ M) hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmedi. Hücre viabilitesi üzerinde olumsuz etkisi bulunmadığı gözlenen sinapik asidin proliferasyon, diferansiyasyon ve migrasyon deneylerinde kullanılmak üzere 3 farklı dozu (5, 10 ve 20 μ M) seçildi.

Hücre proliferasyonu, hücrelerin çoğalma yeteneğidir [105]. Proliferasyon sürecinin 0-2, 2-4 ve 0-4'üncü gün aralığında 5 ve 10 μ M sinapik asit uygulamasının hücre proliferasyonunda azalmaya neden olduğu gözlenmekle birlikte bu azalma anlamlı bulunmazken, 20 μ M sinapik asit uygulaması hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttı. Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması ise sinapik asidin tek başına uygulandığında neden olduğu proliferasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdı. Bu sonuçlar ışığında, sinapik asidin antiproliferatif etkisine Hedgehog sinyal yolağı aracılık ediyor gibi görünmektedir.

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin diferansiyasyon aşaması kademeli ve karmaşık bir şekilde, başta PPAR γ ve C/EBP protein grubu olmak üzere önemli diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte düzenlenir. Yapılan bir çalışmada sinapik asidin de içinde yer aldığı 3 farklı bitkiden elde edilen ekstraktın 3T3-L1 hücrelerinde lipid birikimini azalttığı ve PPAR γ , C/EBP α ,

aP2, FAS, LPL, HSL gen ekspresyonlarını inhibe ederek adipogenez ve lipogenezin baskılanmasını sağladığı gösterilmiştir. 3T3-L1 preadiposit hücrelerine verilen farklılaştırma kokteyli ile birlikte diferansiyasyon süreci başlar ve ilk 2 gün diferansiyasyon sürecinin erken evresi olarak kabul edilir. Diferansiyasyon sürecinin erken evresinde C/EBP δ ile C/EBP β aktive olur ve bu transkripsiyon faktörleri, önce PPAR- γ hemen ardından C/EBP α proteinlerinin aktivasyonunu sağlayarak diferansiyasyonun erken evresinden olgun adiposit oluşumuna kadar ekspresyonları devam eder [53].

Yönlenme gerçekleştikten sonra hücrelere farklılaştırma kokteyli uygulanarak diferansiyasyon süreci başlatılır. Diferansiyasyon protokolünün 0-4, 4-8 ve 0-8'inci günleri arasında sinapik asit 5 ve 10 μ M konsantrasyonda uygulandığında diferansiyasyonu bir miktar baskıladığı görülmekle birlikte diferansiyasyondaki bu azalmanın anlamlı bulunmadığı görüldü. Benzer şekilde sadece vismodegib 10 μ M uygulaması da diferansiyasyon üzerine anlamlı bir etki oluşturmadi. Bununla birlikte 0-4, 4-8 ve 0-8'inci günler arasında 20 μ M sinapik asit uygulaması hücre diferansiyasyonunda anlamlı bir azalmaya neden oldu. İlginç olarak diferansiyasyon protokolünün 0-4 ve 0-8'inci günleri arasında Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması 20 μ M konsantrasyonda uygulanan sinapik asidin diferansiyasyonu azaltıcı etkisini değiştirmemişken, 4-8'inci günler arasında vismodegib ön uygulaması ise sinapik asidin diferansiyasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdı.

Çalışmamızda, 3T3-L1 hücrelerine 0-2, 2-4 ve 0-4'üncü gün aralığında 20 μ M sinapik asit uygulamasının hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azaltması da göz önüne alındığında, sinapik asidin diferansiyasyon protokolünün 4-8'inci günleri arasında 20 μ M konsantrasyonda uygulandığında diferansiyasyonu baskılayıcı etkisinin vismodegib ön uygulaması ile ortadan kalkması ancak, diferansiyasyon protokolünün 0-4 ve 0-8'inci günleri arasında vismodegib ön uygulamasının sinapik asidin (20 μ M) diferansiyasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmaması çelişkili görünmektedir. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan bir çalışmada sinapik asidin preadiposit diferansiyasyonu üzerine baskılayıcı etkisine AMPK sinyal yolağının karıştığı göz önüne alındığında sinapik asidin deney protokolünün diferansiyasyonun başladığı orta-geç aşamasında uygulandığında Hedgehog sinyal yolağı dışında başka sinyal yolları aracılığı ile etki ediyor olabileceği öne sürülebilir [5,133,134]. Bununla birlikte, bu çıkarımın doğrulanabilmesi için ek deneylerin yapılmasına gereksinim bulunmaktadır.

AMPK sinyal yolağı, vücutta enerji homeostazının düzenlenmesinde yağ asitlerinin sentezine ve parçalanmasına aracılık ederek kritik bir rol oynar. AMPK sinyal yolağı aktive edildiğinde, karbonhidrat ve lipidlerin metabolizması için hedef proteinleri fosforile eder. Aktif AMPK, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 (SREBP-1), C/EBP α , PPAR γ ve yağ asidi sentezin (FAS) ekspresyonunu inhibe ederek adipogenez sırasında lipid birikimini azaltır [133].

3T3-L1 hücrelerinde yapılan bir çalışmada AMPK sinyal yolağının aktivasyonunun adipogenezin erken aşamasında diferansiyasyonu baskıladığı bulunmuştur [134]. Ayrıca 3T3-L1 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada sinapik asit uygulamasının AMPK sinyal yolunu aktive ederek adipogenez baskıladığı gösterilmiştir [5]. Dolayısıyla 0-4 ve 0-8'inci gün aralığında sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 hücre kültüründe hem Hedgehog sinyal yolağı aktivasyonu hem de AMPK sinyal yolağı aktivasyonu ile diferansiyasyonu erken aşamada baskıladığı ve sadece Hedgehog sinyal yolağı inhibitörü olan vismodegib ön uygulamasının bu baskılamayı ortadan kaldırmak için yeterli olmadığı düşünülebilir.

Kolesterol ve doymamış yağ asidi sentezinde kilit bir rol oynayan SREBP1 (Sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1; Sterol regulatory element-binding protein 1), adipoz dokuda yüksek düzeyde eksprese edilen ve adiposit diferansiyasyonunu modüle eden bir transkripsiyon faktörüdür [135]. Yakın zamanda 3T3-F442 ve 3T3-L1 preadipositlerinin farklılaşması sırasında SREBP1'in indüklendiği bulunmuştur [133]. 3T3-L1 hücrelerinde diferansiyasyon protokolünün birinci günü SREBP1'in ekspresyonunun artmaya başladığı ve artışın diferansiyasyon protokolünün 4'üncü günü zirveye ulaştığı gösterilmiştir [136]. SREBP1'in adipogenezde kilit rol oynayan PPAR γ ekspresyonunu indüklediği ve diferansiyasyonu stimüle ettiği bilinmektedir [137]. Aşırı yağlı diyetle beslenen hamsterler üzerinde yapılan bir çalışmada diyetle eklenen sinapik asidin SREBP1 aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada sinapik asit hamsterlerin kilo alımını anlamlı olarak azaltmış, yağ dokuda inflamasyon belirteçlerinde belirgin azalmaya yol açmış ve aşırı yağlı diyetle beslenen hamsterlerde gözlenen perirenal, inguinal ve epididimal yağ kitlesi artışında anlamlı oranda düşmeye neden olmuştur [138]. Bu bilgiler ışığında sinapik asidin diferansiyasyonun erken evresinden itibaren uygulanması durumunda diferansiyasyon üzerine baskılayıcı etkisine SREBP1 aktivasyonunun inhibe edilmesinin de aracılık ediyor olabileceği akla gelmektedir.

ERK, p38 ve JNK mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler), çoğalma ve farklılaşma gibi birçok temel hücresel süreçte görev alan hücre içi sinyal yollarıdır. MAPK'ler, çeşitli uyarılar tarafından aktive edilerek adiposit farklılaşmasında görev alabilirler [139]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerine diferansiyasyon protokolünün 0'ıncı ve 2'nci günlerinde sinapik asit uygulamasının p38/MAPK/CREB sinyalini indüklediği [134]; diğer bir çalışmada ise MAPK aktivasyonunun 3T3-L1 hücrelerinde diferansiyasyonu 0-2'nci gün aralığında baskıladığı gösterilmiştir [140]. Dolayısıyla 0-4 ve 0-8'inci günler arasında sinapik asidin diferansiyasyonu baskılayıcı etkisine p38/MAPK/CREB sinyal aktivasyonunun da aracılık ediyor olabileceği düşünülebilir.

Sinapik asidin farklı hücre tiplerinde migrasyon üzerine etkisini gösteren çalışma sayısı oldukça kısıtlı olmakla birlikte, sinapik asidin de içinde bulunduğu fenolik bileşikler içeren *H. Pseudoleave* (Keşiş kantaronu) ekstresinin in vitro yara iyileşme modelinde L929 fare dermal fibroblastlarının migrasyonunu anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir [141]. Başka bir çalışmada ise aralarında sinapik asidin de bulunduğu hidroksisinamik asit türevlerini yüksek düzeyde içeren *Brassica carinata* A. Braun (Etiyopya hardalı) ekstraktı uygulanmasının sağlıklı Swiss Albino farelerinde yara iyileşmesini belirgin ve anlamlı olarak artırdığı ve oluşturulan tam kat yara dudaklarının kapanmasını hızlandırdığı bulunmuştur [142,143]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise %1 sinapik asit içeren jel uygulamasının streptozosin ile indüklenen diyabetli Wistar albino sıçanlarda yara iyileşmesini belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada sinapik asidin yara bölgesine epitel hücresi migrasyonunu artırdığı da bulunmuştur [144]. Bu sonuçlarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da hücrelere tüm zaman aralıklarında (24, 48 ve 72 saat) sinapik asit (5, 10 ve 20 μ M) uygulanması kontrol grubuna göre migrasyonu doza bağımlı bir şekilde artırmakla birlikte bu artış 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda anlamlı değildi. Bununla birlikte 20 μ M sinapik asit uygulaması tüm zaman aralıklarında hücre migrasyonunda anlamlı artışa yol açtı. İlginç olarak, sinapik asidin migrasyon üzerine etkisi hücre tipi seçici gibi görünmektedir. Kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda sinapik asidin hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Sinapik asidin PANC-1 ve SW1990 pankreas kanseri hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunu azalttığı ancak HPDE normal pankreatik duktal epitelyal hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu etkilemediği bulunmuştur [145]. Benzer şekilde, sinapik asit uygulaması HT-29 kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamıştır [146]. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada sinapik asidin PC-3(A) ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinin migrasyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, söz konusu çalışmada kullanılan sinapik asit konsantrasyonları çok yüksektir (250-4000 μ M) ve sinapik asidin uygulanan konsantrasyonlarda hücre viabilitesinde belirgin azalmaya da neden olduğu görülmektedir [147]. Literatürden elde edilen bilgiler değerlendirildiğinde sinapik asidin kanser hücrelerinin migrasyonunu azaltırken sağlıklı hücrelerde migrasyonu artırıcı etkilerinin bulunduğu söylenebilir. Bununla birlikte, belirtilen çalışmalarda sinapik asidin bu etkiyi hangi sinyal yolları aracılığı ile ortaya koyduğu karanlıktadır. Bizim çalışmamızda ise sinapik asidin 24 ve 72 saat süresince hücre kültür ortamına 20 μ M konsantrasyonda uygulandığında oluşturduğu migrasyon artışının Hedgehog inhibitörü vismodegib ön uygulaması tarafından ortadan kaldırılmış olması, bu etkiye Hedgehog sinyal yolağının aracılık ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, 20 μ M sinapik asitin 48 saat boyunca uygulamasının migrasyonu artırıcı etkisinin vismodegib ön uygulaması ile ortadan kalkmaması açıklanmaya muhtaç gibi görünmektedir.

Çalışmamızda hücre migrasyonunun değerlendirilmesi için uygulanan in vitro yara iyileşme modeli çok basit, düşük maliyetli ve uygulanabilirliği kolay bir yöntem olması nedeni ile hücre migrasyonunu değerlendirmek için çok yaygın olarak kullanılmaktadır [148]. Bununla birlikte yöntemin uygulanışından kaynaklanan birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Genellikle monolayer hücre kültürlerinde uygulanan bu yöntem ucu bir miktar kesilerek genişletilmiş pipet uçları kullanılarak hücrelerin tutundukları zeminde bir açıklık yaratılarak bu açıklığın belli bir zaman aralığında o bölgeye göç eden hücrelerce kapanma hızının değerlendirilmesine dayanır. Zeminde manuel olarak oluşturulan açıklığın genişliği ve derinliği standart olmamakta, aynı deney serisinde farklı kuyucuklarda birbirinden oldukça farklı yara genişlikleri açıldığı görülebilmektedir. Bu durum da ölçüm yapılırken zorluk oluşturmaktadır. Çalışmamızda ucu kesilerek genişletilmiş bir pipet yardımı ile kuyucuklarda manuel bir şekilde oluşturulan yara açıklığının, sabit bir değer olmaktan uzak olup 300-820 nm boyut arasında değişkenlik gösterdiği de göz önünde tutulduğunda bu farklı genişlikteki yara açıklıklarının ölçümlerin tutarlılığını etkilemiş olması mümkün görünmektedir. Ölçümlerin doğruluğunu etkileyen bir diğer faktör de kazıma işlemi sırasında oluşan yara kenarlarının düzensiz olmasıdır. Özellikle çok kuyucuklu pleytlerde farklı zaman noktalarında çoklu ölçümler yapıldığında uygulayıcı tarafından aynı noktanın tespit edilerek ölçülmesi zorlaşmakta, buna bağlı olarak ölçüm hataları olabilmektedir [149]. Yara açıklığı modelinin diğer bir dezavantajı da kazıma işlemi sırasında kimi zaman hasar görmüş hücrelerin ve hücre kalıntılarının yara kenarlarında kalmasıdır. Bu durum hem 0'ıncı saatte yapılan ölçümde hataya neden olabilmekte hem de migrate olan hücrelerin ilerlemesine zorluk çıkararak ölçümleri etkileyebilmektedir [150,151]. Bunun yanı sıra ölçümler yapılırken uzun süreler boyunca pleytlerdeki kuyucukların aynı bölümlerinin mikroskop altında bulunması sonucunda hücrelerin uzun süre ışığa maruz kalmasının hücrelere zarar verebildiği ve yara kenarlarının kapanmasını etkileyerek sonuçları değiştirebildiği belirtilmiştir [148]. Deneylerin gerçekleştirildiği MEİTAM hücre kültürü laboratuvarında bulunan inverted mikroskobun görüntüleme yazılımındaki sorundan ötürü fotoğraflama sırasında görüntü ayarlarının yapılabilmesi için uzun süre uğraşmayı gerektirmekte idi. Bu nedenle ölçüm yapılan günlerde hücreler görüntüleme ve fotoğraflama aşamasında çok uzun süre ile mikroskop altında tutulmak zorunda kalındı. Bu durumun ölçüm sonuçlarının güvenilirliğini etkilemesi olasılık dahilinde görünmektedir.

Migrasyon modülasyonunda rolü olduğu düşünülen Hedgehog sinyal yolağının preadipositlerin migrasyonu üzerindeki etkileri henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar mevcuttur. Yakın zamanda MCF10DCIS.com insan meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Hedgehog sinyal yolağı inhibitörleri siklopamin ve vismodegibin hücre migrasyonunu belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir [152].

Benzer şekilde yumurtalık kanser hücresi üzerinde yapılan bir çalışmada lizofosfatidik asit uygulaması Hedgehog sinyal yolağının aktivasyonunun da içinde yer aldığı bir dizi mekanizma ile hücre göçünü ve invazyonu artırarak metastaza neden olabilirken, resveratrol uygulamasının Hedgehog sinyal yolağını inhibe ederek kanser hücrelerinin migrasyonunun inhibisyonuna katkıda bulunabildiği açıklanmıştır [153]. Aynı zamanda Glioblastoma hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada da Hedgehog sinyal yolu aktivasyonunun hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığı gösterilmiştir [154].

Bizim çalışmamızda ise 24 ve 72 saat boyunca 20 μ M sinapik asit uygulamasının migrasyonda neden olduğu artışın, vismodegib ön uygulaması ile ortadan kaldırılması Hedgehog sinyal yolağı aktivasyonun 3T3-L1 hücre göçünde rol oynuyor olabileceğini düşündürmekle birlikte; sinapik asidin AMPK, MAPK gibi bazı sinyal yolları üzerinde de etkisinin olması deney sonuçlarının yorumlanmasını zorlaştırarak durumu karmaşık hale getirmektedir.

Antioksidan, antimikrobiyal, anksiyolitik, nöroprotektif, kardiyoprotektif etkileri olduğu bilinen ve potansiyel antiadipojenik etkilere sahip olduğu tahmin edilen sinapik asidin, çalışmamızda kullanılan konsantrasyonlarda 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin canlılığını azaltmadığı, 20 μ M sinapik asit uygulaması ile diferansiyasyonun önemli bir aşaması olan proliferasyonu baskıladığı ve bu baskılamayı vismodegib varlığında ortadan kaldırması nedeniyle Hedgehog sinyal yolu aktivasyonunun proliferasyonda rolü olduğu düşünülürken, diferansiyasyonun bütün zaman aralıklarında 20 μ M sinapik asit uygulaması ile baskılanması ve bu baskılamının vismodegib varlığında sadece 0-8'inci gün aralığında ortadan kaldırılması ile sinapik asidin diferansiyasyon üzerine etkilerine Hedgehog sinyal yolağıyla birlikte AMPK, MAPK, Wnt/ β -katenin sinyal yolları gibi çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunun ve aynı zamanda SREBP1 aktivasyonunun azaltılmasının aracılık ediyor olabileceği düşünüldü. Sinapik asidin artan konsantrasyonlarda migrasyonu artırması ve vismodegib varlığında bu etkinin 24 v3 72 saat uygulamalarında ortadan kaldırılması nedeniyle sinapik asit uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin migrasyonunu artırdığı ve Hedgehog sinyal yolu aktivasyonunun bu etkiye aracılık ediyor olabileceği düşünülmektedir. Ancak sinapik asidin preadiposit proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkileri ve bu etkilerin hangi sinyal yolları aracılığı ile ilgili olabileceğini açıklamak için yeterli çalışma bulunmamakla birlikte, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin, reseptörlerin ve Hedgehog sinyal yolu proteinlerinin ekspresyonlarının ölçüldüğü yeni çalışmalar yapılması konunun aydınlatılması için gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Obesity, World Health Organization (WHO), https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1 (26.04.2023).
2. Mechanick, J. I., Apovian, C., Brethauer, S., et al. (2019). Clinical Practice Guidelines for the Perioperative Nutrition, Metabolic, and Nonsurgical Support of Patients Undergoing Bariatric Procedures Update: Cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology, The Obesity Society, American Society for Metabolic and Bariatric Surgery, Obesity Medicine Association, and American Society of Anesthesiologists. *Obesity*, 2020, 28(5), 1-58.
3. Valladales, F. L., Ramírez, N. S., Usma a. F., Mendoza A. G., Machado M. E., Machado J. E. (2023). Effectiveness, persistence of use, and safety of orlistat and liraglutide in a group of patients with obesity. *Expert Opin Pharmacother*, 24(4), 535-543.
4. Tong, Y., Xu, S., Huang, L. (2022). Obesity and insulin resistance: Pathophysiology and treatment. *Drug Discovery Today*, Volume 27, Issue 3, Pages 822-830.
5. Bae, I.-S., & Kim, S. H. (2020). Sinapic Acid Promotes Browning of 3T3-L1 Adipocytes via p38 MAPK/CREB Pathway. *BioMed Research International*, 1-8.
6. Sasai, N., Toriyama, M., & Kondo, T. (2019). Hedgehog Signal and Genetic Disorders. *Frontiers in Genetics*, 10.
7. Hu, X. M., Li, Z. X., Zhang, D. Y., Yang, Y. C., Fu, S. A., Zhang, Z. Q., Yang, R. H., Xiong, K. (2021). A systematic summary of survival and death signalling during the life of hair follicle stem cells. *Stem Cell Res Ther.*, 11;12(1):453.
8. Woo, H., Lee, S., Kim, S., Park, D., & Jung, E. (2017). Effect of sinapic acid on hair growth promoting in human hair follicle dermal papilla cells via Akt activation. *Archives of Dermatological Research*, 309(5), 381-388. doi:10.1007/s00403-017-1732-5
9. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (2019, Nisan). Obezite Tanı ve Tedavi Kılavuzu.
10. Obesity and overweight, World Health Organization (WHO), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (26.04.2023).
11. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 2016;387:1377-96.
12. World Health Organization (1998). Obesity Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation on Obesity. WHO/NUT/NCD/1998. The World Health Organization, Geneva.
13. GBD 2015 Obesity Collaborators (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *The New England Journal of Medicine*, 377, 13-27.
14. Olaya, B., Moneta, M. V., Pez, O., et al. (2015). Country-level and individual correlates of overweight and obesity among primary school children: a cross-sectional study in seven European countries. *BMC Public Health*, 15:475.
15. Centers For Disease Control and Prevention (2020 Temmuz). National Health and Nutrition Examination Survey. https://www.cdc.gov/nchs/about/factsheets/factsheet_nhanes.htm adresinden (26.04.2023).
16. Satman, I., Yilmaz, T., Sengul, A., et al. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25(9):1551-56.
17. Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., et al. (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*, 28(2):169-80.
18. Satman, İ. (2016). Türkiye’de obezite sorunu. *Turkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol-Special Topics*, 9(2):1-11.

19. Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK). Türkiye Sağlık Araştırması, 2019. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Turkey-Health-Survey-2019-33661> (26.04.2023).
20. OECD Health Statistics, 2017. Health At A Glance. <http://dx.doi.org/10.1787/888933602956> (28.04.2023).
21. Hoed, M., Loos, R. J. F. (2014). Genes and the predisposition to obesity. In: Bray GA, Bouchard C (Editors). Handbook of Obesity, Vol. 1, 3rd Ed. CRC Press, New York, pp.105-19.
22. Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Zeltser, L. M., et al. (2017). Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*, 38:267-96.
23. Comuzzie, A. G., Allison, D. B. (1998). The search for human obesity genes. *Science*, 280: 1374-1377.
24. Barsh, G. S., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S. (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature*, 404: 644-651.
25. Almind, K., Kahn, C. R. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*, 53: 3274-3285.
26. Marti, A., Martinez-Gonzalez, M. A., Martinez, J. A. (2008). Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proc Nutr Soc*, 67: 1-8.
27. 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.
28. Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453: 783-787.
29. Luo, L., Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. in *Journal of Endocrinology*, 231(3):R77-R99.
30. You and Your Hormones. "Adipose Tissue". <https://www.yourhormones.info/glands/adipose-tissue/>. (07.05.2023).
31. Reddy, P., Lent-Schochet, D., Ramakrishnan, N., McLaughlin, M., Jialal, I. (2019). Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: a conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clin Chim Acta*, 496:35-44.
32. Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C. M., Hassan, G., Gupta, R. K., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P. E., Oz, O. K. (2018). An adipose tissue atlas: an image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents. *Cell Metab*, 27:252-262.e3
33. Kahn, C. R., Wang, G., Lee, K. Y. (2019). Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 129:3990-4000.
34. Cleveland, Clinic. "Adipose Tissue (Body Fat)". <https://my.clevelandclinic.org/health/body/24052-adipose-tissue-body-fat#:~:text=Adipose%20tissue%20is%20a%20connective,system%2C%20to%20regulate%20your%20metabolism.> (08.05.2023).
35. Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109:433-438.
36. Cedikova, M., Kripnerová, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., et al. (2016). Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. *Stem Cells Int*.
37. Saely, C. H., Geiger, K., Drexel, H. (2010). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*, 58: 15-23.
38. Bonet, M. L., Oliver, P., Palou, A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(5):969-85.
39. Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293:E444-E452.

40. Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360:1509–1517.
41. Van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., Teule, G. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, 360:1500–1508.
42. Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S., Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, 360:1518–1525.
43. Ouellet, V., Labbe, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guerin, B., Haman, F., Turcotte, E. E., Richard, D., Carpentier, A. C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Investig*, 122:545–552.
44. Kaisanlahti, A., Glumoff, T. (2029). Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J Physiol Biochem*, 75(1):1-10.
45. Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., Kajimura, S., et al. (2012). PPARgamma Agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion Through Stabilization of PRDM16 Protein. *Cell Metab*, 15(3):395–404.
46. Bijland, S., Mancini, S. J., and Salt, I. P. (2013). Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin. Sci.* 124, 491–507.
47. Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* 9, 191–200.
48. Schling, P., and Löffler, G. (2018). Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiol. Sci.* 17, 99–104.
49. Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J., and Foster, M. (2015). Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig*, 21, 57–74.
50. Cristancho, A. G.; Lazar, M. A., (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 722-34.
51. Tang, Q. Q., and Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu. Rev. Biochem*, 81, 715–736.
52. Haider, N., and Larose, L. (2019). Harnessing adipogenesis to prevent obesity. *Adipocyte* 8, 98–104.
53. Lefterova, M. I., and Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 107–114.
54. Khalilpourfarshbafi, M., Gholami, K., Murugan, D. D., Abdul Sattar, M. Z., and Abdullah, N. A. (2018). Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. *Eur. J. Nutr.* 0, 1–21.
55. Kowalska, K., Olejnik, A., Szwajgier, D., Olkiewicz, M. (2017). Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose cells. *National Center For Biotechnolgy*, 12(11): 0188583.
56. 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, 4471-8.
57. Wiper-Bergeron, N., Salem, H. A., Tomlinson, J. J., Wu, D., Hache, R. J. (2007). Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2703-8. 389.
58. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., et al. (1999). PPARγ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.
59. Sarjeant, K., and Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a008417.
60. Rosen, E. D.; Hsu, C. H.; Wang, X.; Sakai, S.; Freeman, M. W.; Gonzalez, F. J.; Spiegelman, B. M. (2002). C/EBPα induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*, 16, 22-6

61. Steger, D. J.; Grant, G. R.; Schupp, M.; Tomaru, T.; Lefterova, M. I.; Schug, J.; Manduchi, E.; Stoeckert, C. J., Jr.; Lazar, M. A. (2010). Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev*, 24, 1035-44.
62. Rosen, E., Eguchi, J., and Xu, Z. (2009). Transcriptional targets in adipocyte biology. *Expert Opin. Ther. Targets*, 13, 975-986.
63. Gregoire, F.M., Smas, C.M. and Sul, H.S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, 78(3); 783-809.
64. Niemälä, S., Miettinen, S., Sarkanen, J. R., and Ashammakhi, N. (2008). Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. *Top. Tissue Eng.* 4, 1-26.
65. Mattila, P., Pihlava, J., Hellstrom, J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J Agric Food Chem*, 53:8290-5.
66. Shirley, A. M., Chapple, C. (2003). Biochemical characterization of sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. *J Biol Chem*, 278:19870-7.
67. Hameed, H., Aydın, S., & Başaran, N. (2017). Sinapic Acid : Is It Safe for Humans ? *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1):39-49.
68. Engels, C., Schieber, A., Ganzle, M. G. (2012). Sinapic acid derivatives in defatted "oriental mustard (*Brassica juncea* L.) seed meal extracts using UHPLC-DADESI-MSn and identification of compounds with antibacterial activity. *Eur Food Res Technol*, 234:535-42.
69. Yun, K. J., Koh, D. J., Kim, S. H., Park, S. J., Ryu, J. H., Kim, D. G., Lee, J. Y., Lee, K. T. (2008). Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- κ B inactivation. *J Agric Food Chem*, 56:10265-72.
70. Russell, W. R., Labat, A., Scobbie, L., Duncan, G.J., Duthie, G. G. (2009). Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chem*, 115:100-4.
71. Niciforovic, N., & Abramovic, H. (2013). Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 34-51.
72. Wang, Y. C., Chuang, Y. C., Ku, Y. H. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chem*, 102:1163-71.
73. Chen, C. Y., Milbury, P. E., Kwak, H. K., Collins, F. W., Samuel, P., Blumberg, J. B. (2004). Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr*, 134, 1459-66.
74. John, C. M., Arockiasamy, S. Sinapic acid prevents adipogenesis by regulating transcription factors and exerts an anti-ROS effect by modifying the intracellular anti-oxidant system in 3T3-L1 adipocytes. (2022). *Iran J Basic Med Sci*, 25(5):611-620.
75. John, C.M., Arockiasamy, S. Inhibition of palmitic acid induced adipogenesis by natural polyphenols in 3T3-L1 adipocytes. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 58, 396-407 (2022).
76. Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* 2004;6(2):R63-74.
77. Wang C, Song JL. Effects of Sinapic Acid Combined with Cisplatin on the Apoptosis and Autophagy of the Hepatoma Cells HepG2 and SMMC-7721. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021 Oct 12;2021:6095963.
78. Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L., Giannis, A. (2010). Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem*, 18:6613-24.
79. Gupta, S., Takebe, N., LoRusso, P. (2010). Targeting the hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2:237-50.

80. Jia, Y., Wang, Y., & Xie, J. (2015). The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Archives of Toxicology*, 89(2), 179–191.
81. Daya-Grosjean, L., Couvé-Privat, S. (2005). Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *Cancer Lett*, 225:181-92.
82. Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., et al. (1996). Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet*, 14:357-60.
83. Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., et al. (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet*, 14:353- 56.
84. Rubin, L. L., Sauvage, F.J. (2006). Targeting the hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5:1026-33.
85. Parchure, A., Vyas, N., & Mayor, S. (2018). Wnt and Hedgehog: Secretion of Lipid-Modified Morphogens. *Trends in Cell Biology*, 28(2), 157–170.
86. Genome Biology. "The Hedgehog protein family".
<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-11-241>. (14.05.2023).
87. Hall, T. M. T., Porter, J. A., Young, K. E., Koonin, E. V., Beachy, P. A., Leahy, D. J. (1997). Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins. *Cell*, 91: 85-97.
88. Beachy, P. A., Cooper, M. K., Young, K. E., von Kessler, D. P., Park, W-J., Hall, T. M. T., Leahy, D. J., Porter, J. A. (1997). Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62: 191-204.
89. Mann, R. K., Beachy, P. A. (2004). Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem*, 73: 891-923.
90. Varjosalo, M., Taipale, J. (2008). Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev*, 22, 2454–2472.
91. Callahan, B. P., Wang, C. (2015). Hedgehog Cholesterolysis: Specialized Gatekeeper to Oncogenic Signaling. *Cancers (Basel)*, 14:7(4):2037-53.
92. Johansson, D. G., Wallin, G., Sandberg, A., Macao, B., Aqvist, J., Hard, T. (2009). Protein autoproteolysis: Conformational strain linked to the rate of peptide cleavage by the pH dependence of the N → O acyl shift reaction. *J. Am. Chem. Soc*, 131, 9475–9477.
93. Lewis, C.A., Wolfenden, R. (2011). Amide bonds to the nitrogen atoms of cysteine and serine as "weak points" in the backbones of proteins. *Biochemistry*, 50, 7259–7264.
94. Baker, D. P., Taylor, F. R., Pepinsky, R. B. (2007). Purifying the hedgehog protein and its variants. *Methods Mol. Biol*, 397, 1–22.
95. Buglino, J. A., Resh, M. D. (2008). Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J. Biol. Chem*, 283, 22076–22088.
96. Buglino, J. A., Resh, M. D. (2012). Palmitoylation of hedgehog proteins. *Vitam. Horm*, 88, 229–252.
97. Chen, X., Tukachinsky, H., Huang, C. H., Jao, C., Chu, Y. R., Tang, H. Y., Mueller, B., Schulman, S., Rapoport, T. A., Salic, A. (2011). Processing and turnover of the hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*, 192, 825–838.
98. Petrov, K., Wierbowski, B. M., Salic, A. (2017). Sending and Receiving Hedgehog Signals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 33:6.1–6.24.
99. Resh, M. D. (2021). Palmitoylation of Hedgehog proteins by Hedgehog acyltransferase: roles in signalling and disease. *Open Biol*, 11: 200414.
100. Hampton, R. Y. (2002). Er-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*, 14, 476–482.
101. Kong, J. H., Siebold, C., Rohatgi, R. (2019). Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development*, 15;146(10):dev166892.
102. Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal*, 21:1023–1034.
103. Carballo, G. B., Honorato, J. R., de Lopes, G. P. et al. (2018). A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*, 16, 11.

104. Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M., Riobo, N. A. (2012). Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam Horm*, 88:55-72.
105. Yang, N., Ray, S. D., & Krafts, K. (2014). Cell Proliferation. *Encyclopedia of Toxicology*, 761-765.
106. Mo, W., Xu, X., Xu, L., Wang, F., Ke, A., Wang, X., Guo, C. (2011). Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell. *Pancreatology*, 11(6):601-9.
107. Chakrabarti, J., Holokai, L., Syu, L., Steele, N. G., Chang, J., Wang, J., Ahmed, S., Dlugosz, A., Zavros, Y. (2018). Hedgehog signaling induces PD-L1 expression and tumor cell proliferation in gastric cancer. *Oncotarget*, 21,9(100):37439-37457.
108. Wei, H., Li, J., Shi, S., Zhang, L., Xiang, A., Shi, X., Chu, G. (2019). Hhip inhibits proliferation and promotes differentiation of adipocytes through suppressing hedgehog signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
109. Plaisant, M., Giorgetti-Peraldi, S., Gabrielson, M., Loubat, A., Dani, C., Peraldi, P. (2011). Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 3;6(2):e16798.
110. Wong, S. Y., Reiter, J. F. (2011). Wounding mobilizes hair follicle stem cells to form tumors with basal cell carcinoma-like features. *Science*.
111. Abe, Y., Tanaka, N. (2017). Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Epidermal and Hair Follicle Development, Homeostasis, and Cancer. *J Dev Biol*, 20;5(4):12.
112. AlMuraikhi, N., Almasoud, N., Binhamdan, S., Younis, G., Ali, D., Manikandan, M., Vishnubalaji, R., Atteya, M., Siyal, A., Alfayez, M., Aldahmash, A., Kassem, M., Alajezi, N. M. (2019). Hedgehog Signaling Inhibition by Smoothed Antagonist BMS-833923 Reduces Osteoblast Differentiation and Ectopic Bone Formation of Human Skeletal (Mesenchymal) Stem Cells. *Stem Cells Int*. 21;2019:3435901.
113. Fan, C., Zhang, Y., Wang, J., & Cheng, J. (2018). Roles of Hedgehog signaling pathway in adipogenic differentiation potential of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47(0).
114. Cousin, W., Dani, C., & Peraldi, P. (2006). Inhibition of the anti-adipogenic Hedgehog signaling pathway by cyclopamine does not trigger adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(2), 799-803.
115. Fontaine, C., Cousin, W., Plaisant, M., Dani, C., & Peraldi, P. (2008). Hedgehog Signaling Alters Adipocyte Maturation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(4), 1037-1046.
116. Shimada, I. S., Kato, Y. (2022). Ciliary signaling in stem cells in health and disease: Hedgehog pathway and beyond. *Semin Cell Dev Biol*.129:115-125.
117. Omatsu-Kanbe, M., Inoue, K., Fujii, Y., Yamamoto, T., Isono, T., Fujita, N., Matsuura, H. (2006). Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J*, 1;393(Pt 1):171-80.
118. Favaretto, F., Bettini, S., Busetto, L., Milan, G., Vettor, R. (2022). Adipogenic progenitors in different organs: Pathophysiological implications. *Rev Endocr Metab Disord*, 23(1):71-85.
119. Gil-Ortega, M., Garidou, L., Barreau, C., Maumus, M., Breasson, L., Tavernier, G., García-Prieto, C. F., Bouloumié, A., Casteilla, L., Sengenès, C. (2013). Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem Cells*, 31(7):1309-20.
120. Li, Q., Chen, R., Moriya, J., Yamakawa, J., Sumino, H., Kanda, T., & Takahashi, T. (2008). A Novel Adipocytokine, Visceral Adipose Tissue-derived Serine Protease Inhibitor (Vaspin), and Obesity. *Journal of International Medical Research*, 36(4), 625-629.
121. Maurice, F., Gaborit, B., Vincentelli, C., Abdesselam, I., Bernard, M., Graillon, T., Dutour, A. (2018). Cushing Syndrome Is Associated With Subclinical LV Dysfunction and Increased Epicardial Adipose Tissue. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(18), 2276-2277.

122. Zammouri, J., Vatier, C., Capel, E., Auclair, M., Storey-London, C., Bismuth, E., Mosbah, H., Donadille, B., Janmaat, S., Fève, B., Jérü, I., Vigouroux, C. (2022). Molecular and Cellular Bases of Lipodystrophy Syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne)*,3;12:803189.
123. Alvarez, J. I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P. J., Terouz, S., Prat, A. (2011). The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence. *Science*, 334(6063), 1727–1731.
124. Le, H., Kleinerman, R., Lerman, O. Z., Brown, D., Galiano, R., Gurtner, G. C., Saadeh, P. B. (2008). Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(6), 768–773.
125. Yan, R., Peng, X., Yuan, X., Huang, D., Chen, J., Lu, Q., Luo, S. (2013). Suppression of growth and migration by blocking the hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. *Cellular Oncology*, 36(5), 421–435.
126. Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., et al. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for. *Nucleic Acids Res*, 46(D1):D1074-D1082. <https://go.drugbank.com/drugs/DB08828> (11.07.2023).
127. "FDA approves Erivedge (vismodegib) capsule, the first medicine for adults with advanced basal cell carcinoma". Roche. (2012).
128. National Library of Medicine (NIH). "Vismodegib" <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383648/> (09.05.2023).
129. Wu, C., Hu, S., Cheng, J., Wang, G., & Tao, K. (2017). Smoothed antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits proliferation and triggers apoptosis in colon cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(5), 2529–2536.
130. Singh, B. N., Fu, J., Srivastava, R. K., & Shankar, S. (2011). Hedgehog Signaling Antagonist GDC-0449 (Vismodegib) Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics: Molecular Mechanisms. *PLoS ONE*, 6(11), e27306.
131. Guo Y, Wu D, Xu Q, Chen W. (2022). Inhibition of smoothed receptor by vismodegib leads to micrognathia during embryogenesis. *Differentiation*, 125:27-34.
132. Chen, J., Bao, C., Kim, J.T., Cho, J.S., Qiu, S., Lee, H. J. (2018). Sulforaphene inhibits adipogenesis via Hedgehog signaling in 3T3-L1 adipocytes. *American Chemical Society*, 45: 11926–11934.
133. Lee, J.-E., & Ge, K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell & Bioscience*, 4(1), 29.
134. Jang, Y. J., Koo, H. J., Sohn, E.-H., Kang, S. C., Rhee, D.-K., & Pyo, S. (2015). Theobromine inhibits differentiation of 3T3-L1 cells during the early stage of adipogenesis via AMPK and MAPK signaling pathways. *Food & Function*, 6(7), 2365–2374.
135. Crewe, C., Zhu, Y., Paschoal, V. A., Joffin, N., Ghaben, A. L., Gordillo, R., Oh D. Y., Liang, G., Horton, J. D., Scherer, P. E. (2019). SREBP-regulated adipocyte lipogenesis is dependent on substrate availability and redox modulation of mTORC1. *JCI Insight*, 16;5(15):e129397.
136. Inoue, j., Kumagai, H., Terada, T., Maeda, M., Shimizu, M., Sato, R. (2001). Proteolytic Activation of SREBPs during Adipocyte Differentiation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 283, Issue 5, Pages 1157-1161.
137. Jia, Y., Wu, C., Kim, J., Kim, B., & Lee, S.-J. (2016). Astaxanthin reduces hepatic lipid accumulations in high-fat-fed C57BL/6J mice via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and inhibition of PPAR γ and Akt. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 9–18.
138. Wang, K., Liang, C., Cao, W., Luo, G., Zhong, S., Zeng, Z., Dai, L., Song, J. L. (2022). Dietary sinapic acid attenuated high-fat diet-induced lipid metabolism and oxidative stress in male Syrian hamsters. *J Food Biochem*, 46(11):e14203.
139. Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., & Binétruy, B. (2005). The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie*, 87(1), 51–56.
140. Ando, Y., Sato, F., Fukunaga, H., Iwasaki, Y., Chiba, Y., Tebakari, M., Kamei, J. (2019). Placental extract suppresses differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to mature

- adipocytes via accelerated activation of p38 MAPK during the early phase of adipogenesis. *Nutrition & Metabolism*, 16(1).
141. Kaptaner, İğci, B., Aytaç, Z. (2020). An Investigation on the In Vitro Wound Healing Activity and Phytochemical Composition of *Hypericum pseudolaevae* N. Robson Growing in Turkey. *Turk J Pharm Sci.*, 23;17(6):610-619.
 142. Nguyen, V. P. T., Stewart, J. D., Ioannou, I., Allais, F. (2021). Sinapic Acid and Sinapate Esters in Brassica: Innate Accumulation, Biosynthesis, Accessibility via Chemical Synthesis or Recovery From Biomass, and Biological Activities. *Front Chem.*, 14;9:664602.
 143. Alemu, B. K., Ayalew, Getahun, K., Kahaliw, W. (2020). In vitro Antioxidant and in vivo Wound Healing Activities of the 80% Methanol Extract and Solvent Fractions of Seeds of *Brassica carinata* A. Braun (Brassicaceae) in Mice. *J Exp Pharmacol*, 6;12:463-474.
 144. Kaltalioglu, K. (2023). Sinapic acid-loaded gel accelerates diabetic wound healing process by promoting re-epithelialization and attenuating oxidative stress in rats. *Biomed Pharmacother*, 163:114788.
 145. Huang, Z., Chen, H., Tan, P., Huang, M., Shi, H., Sun, B., Cheng, Y., Li T., Mou Z, Li Q, Fu W. (2022). Sinapic acid inhibits pancreatic cancer proliferation, migration, and invasion via downregulation of the AKT/Gsk-3 β signal pathway. *Drug Dev Res.*, 83(3):721-734.
 146. Taştumur, Ş., Hacısüleyman, L., Karataş, Ö., Yulak, F., Ataseven, H. (2023). Anticancer activity of sinapic acid by inducing apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line. *Can J Physiol Pharmacol*, 1;101(7):361-368.
 147. Eroğlu, C., Avcı, E., Vural, H., Kurar, E. (2018). Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene*, 10;671:127-134.
 148. Liang, C. C., Park, A., Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2, 329-333.
 149. Michael, L., De Ieso, Pei, J. V. (2018). An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. *Biosci Rep.*, 38 (5): BSR20180698.
 150. Ascione, F., Caserta, S., Perris, R., Guido, S. (2014). Investigation of cell dynamics in vitro by time LapseMicroscopy and image analysis. *Chem. Eng. Trans.* 38, 517-522.
 151. Cochet-Escartin, O., Ranft, J., Silberzan, P., Marcq, P. (2014). Border forces and friction control epithelial closure dynamics. *Biophys. J.* 106, 65-73.
 152. Bao, C., Namgung, H., Lee, J., Park, H.-C., Ko, J., Moon, H., Lee, H. J. (2014). Daidzein Suppresses Tumor Necrosis Factor- α Induced Migration and Invasion by Inhibiting Hedgehog/Gli1 Signaling in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3759-3767.
 153. Ferraresi, A., Esposito, A., Girone, C., Vallino, L., Salwa, A., Ghezzi, I., Thongchot, S., Vidoni, C., Dhanasekaran, D. N., Isidoro, C. (2021). Resveratrol Contrasts LPA-Induced Ovarian Cancer Cell Migration and Platinum Resistance by Rescuing Hedgehog-Mediated Autophagy. *Cells*, 17;10(11):3213.
 154. Torrisi, F., Alberghina, C., Lo Furno, D., Zappalà, A., Valable, S., Li Volti, G., Tibullo D., Vicario, N., Parenti, R. (2021). Connexin 43 and Sonic Hedgehog Pathway Interplay in Glioblastoma Cell Proliferation and Migration. *Biology (Basel)*, 12;10(8):767.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Özge KELEŞ

Doğum Tarihi : 

E-mail : 

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Eczacılık	Hacettepe Üniversitesi	2014-2019
Yüksek Lisans	Tıbbi Farmakoloji	Mersin Üniversitesi	2020-2023
Lisans	Veteriner Fakültesi	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi	2021-Halen