



Özgün Araştırma / Original Article

Oral Antidiyabetik Kullanımının, Farklılaşmış 3T3-L1 Hücrelerinde Adipogenez Metabolizmasında Görev Alan VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 Gen Anlatım Seviyelerine Etkileri

Meliha Koldemir Gündüz¹, Mehtap Çevik², Penbe Çağatay³, Çavlan Çiftçi⁴, Belgin Süsleyici²

1 Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Mühendislik Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye

2 Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

3 Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilgi Bölümü, Balıkesir, Türkiye

4 Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Geliş: 08.10.2021; Revizyon: 28.12.2021; Kabul Tarihi: 03.01.2022

Öz

Giriş: Yağ doku, obezite ve insülin direnci üzerindeki sistemik etkilere aracılık eden sitokinleri salgılamaktadır. Kullanılan antidiyabetik ilaçlar, 3T3-L1 adiposit hücrelerinde metabolik farklılıklar ve gen anlatım profillerinde farklılıklar oluşmaktadır. Çalışmamızda 3T3-L1 adipositlerde Vitamin D reseptörü (VDR), Sirtuin (SIRT1), Apelin ve Forkhead box protein O1 (FOXO1) gen anlatım seviyelerinin farklı oral antidiyabetik kullanımlarına cevaben değişimleri değerlendirildi.

Yöntemler: 3T3-L1 hücreleri ATCC den temin edildi. Sitotoksitesite testleri iCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak yapıldı. Çalışılan genler, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile belirlendi.

Bulgular: Farklı oral antidiyabetik (akarboz, metformin ve glipizid) etken maddeleri uygulanan adiposit hücreleri kontrol adiposit hücreleri ile karşılaştırıldığında, VDR gen anlatım seviyeleri daha yüksek bulundu. SIRT1 ekspresyonu 6 saat 17 mg/ml akarboz, 6 saat 192 mM metformin ve 24 saat 180 µM glipizid uygulamasında kontrol adiposit hücrelerine kıyasla daha yüksek bulunurken, 6 saat 10 mg/ml akarboz ve 24 saat 175 mM metformin uygulamasında kontrol hücelere göre daha düşük bulunmuştur (p=0.005). Apelin gen anlatım seviyelerini farklı oral antidiyabetik kullanımı ile kontrol hücelere kıyasla azaldığı bulunmuştur (p=0.005). FOXO1 gen anlatım seviyesi 24 saat metformin uygulaması dışında Adiposit hücrelerinde kontrole göre yüksek bulunmuştur (p=0.005).

Sonuç: Sonuçlarımız, glipizid, akarboz ve metforminin obezitede yağ metabolizmasının düzenlenmesi üzerindeki faydalı etkilerine dair yeni fikirler vermesinin yanı sıra, terapötik yolları hedefleyen çalışmalar için yeni stratejiler sağlayabilir düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: obezite, 3T3-L1 hücreleri, oral antidiyabetik, gen anlatımı

DOI: 10.5798/dicletip.1086326

Yazışma Adresi / Correspondence: Belgin Süsleyici, Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Göztepe-İstanbul Türkiye e-mail: belgin.susleyici@marmara.edu.tr

Effects of oral antidiabetic use on gene expression levels of VDR, SIRT1, Apelin and FOXO1, which are involved in adipogenesis metabolism in differentiated 3T3-L1 cells

Abstract

Objective: Adipose tissue secretes cytokines that mediate systemic effects on obesity and insulin resistance. Antidiabetic drugs used, metabolic differences in 3T3-L1 adipocyte cells and differences in gene expression profiles occur. This study, changes in the expression levels of Vitamin D receptor (VDR), Sirtuin (SIRT1), Apelin and Forkhead box protein O1 (FOXO1) in 3T3-L1 adipocytes in response to different oral antidiabetic use were evaluated.

Methods: 3T3-L1 cells were obtained from ATCC. Cytotoxicity tests were performed in real time with the iCELLigence system. The studied genes were identified by real-time polymerase chain reaction (qPCR).

Results: When adipocyte cells treated with different oral antidiabetic agents (acarbose, metformin and glipizide) were compared with control adipocyte cells, VDR gene expression levels were found to be higher. While SIRT1 expression was higher in 6 hours of 17 mg/ml acarbose, 6 hours of 192 mM metformin and 24 hours of 180 µM glipizide compared to control adipocyte cells, it was found to be lower in 6 hours of 10 mg/ml acarbose and 175 mM metformin for 24 hours compared to control cells. (p=0.005). Apelin gene expression levels were found to be decreased with the use of different oral antidiabetic agents compared to control cells (p=0.005). FOXO1 gene expression level was found to be higher in Adipocyte cells compared to control, except for 24 hours of metformin administration (p=0.005).

Conclusions: We believe that our results may provide new insights into the beneficial effects of glipizide, acarbose and metformin on the regulation of fat metabolism in obesity, as well as new strategies for studies targeting therapeutic pathways.

Keywords: obesity, 3T3-L1 cells, oral antidiabetic, gene expression.

GİRİŞ

Obezite, enerji alımı ve harcaması arasındaki dengesizlik nedeniyle artan vücut yağ birikimine atfedilebilen aşırı vücut ağırlığı olarak tanımlanmaktadır¹. Obez bireylerin sayısındaki sürekli artış, obezitenin küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmesine neden olmuştur^{1,2}. Obez bireylerin genellikle aşırı lipid içeriğine sahip genişlemiş adipositlere sahip olduğu bilinmektedir; fazla lipidler işlevsiz yağ dokusundan salgılanır, böylece diğer dokuları aşırı lipidlere maruz bırakarak karaciğer, iskelet kası ve pankreas gibi ektopik yağ birikimine yol açar³. Obezite, birçok epidemiyolojik araştırmanın gösterdiği gibi, özellikle derin karın bölgesinde aşırı yağ birikimi depolandığında, insülin direnci, hipertansiyon, diyabet ve iskemik kalp hastalığı gibi metabolik komplikasyonlarla önemli ölçüde ilişkilidir⁴.

Vitamin D reseptörü (VDR), nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir⁵. Yüksek afiniteli ligandı, D vitamininin hormonal formu olan 1,25-dihidroksivitamin D'dir (1,25(OH)2D3). Kalsiyum homeostazının düzenlenmesindeki

klasik rolüne ek olarak, D vitamini hormonu, adiposit biyolojisinin düzenlenmesi dahil olmak üzere çok sayıda kalselik olmayan aktiviteye sahiptir⁶. 1,25(OH)2D3, NIH3T3-L1 preadiposit modelinde adiposit farklılaşmasını inhibe eder⁷. VDR-null farelerin beyaz yağ dokularında artan oksidasyon tespit edilmiştir⁶. VDR'nin geniş kapsamlı düzenleyici aktiviteleri göz önüne alındığında, VDR-null modelinde VDR'nin global inaktivasyonu, metabolik verilerin yorumlanmasını zorlaştıran çoklu dokuların fonksiyonunu etkiler. Bu nedenle, adipositlerdeki VDR sinyalleşmesinin enerji metabolizmasına katkısı belirsizliğini korumaktadır⁶.

Sirtuin 1 (SIRT1), memeli hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve birçok dokuda (karaciğer, iskelet kası, yağ dokusu, pankreas β-hücreleri) çalışılmıştır⁸⁻¹⁰. SIRT1, NAD bağımlı protein deasetilazdır ve hücrel enerji durumuna yanıt olarak önemli bir metabolik sensördür¹¹. SIRT1, yağ dokusundan lipid oksidasyonunu ve inflamasyonu düzenlemek için yağ mobilizasyonunu destekler¹². SIRT1

adipoz dokusunun genetik olarak silinmesi, adiposit kütlesi, inflamasyon ve metabolik bozuklukların artmasına neden olur¹³. Artan SIRT1, insülin duyarlılığını artırarak insülin direncini azaltır. Hücresel enerji algılayan bir molekül olan SIRT1, lipid metabolizmasını düzenlemesi nedeniyle obezite ve obezite ilişkili hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için bir hedef olarak tanımlanmıştır¹.

Biyoaktif bir peptit olan Apelin, insanlarda ve farelerde olgun adipositler tarafından sentezlenen APJ reseptörünün bir ligandıdır¹⁴. Apelin, glikoz ve lipid metabolizmasında anahtar bir düzenleyicidir ve insülin direnci ve tip 2 diyabetin patogeneğinde önemli rol oynar¹⁴. Bazı çalışmalar, obezite ve insülin direncinde apelin gen anlatım seviyesinde artış olduğunu tanımlamıştır^{15,16}. Son çalışmalar, fizyolojik bir aralıkta uygulanan apelinin, normal ve insüline dirençli yüksek yağlı farelerde, insüline duyarlı dokularda glukoz kullanımını artırarak in vivo glukoz metabolizmasını iyileştirdiğini göstermiştir¹⁷. Apelin'in bu ve diğer faydalı etkileri nedeniyle, aşırı apelin üretiminin insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi obezite ile ilişkili bozuklukların ortaya çıkmasından önceki son koruyucu savunmalardan biri olabileceği öne sürülmüştür¹⁸.

Forkhead box protein O1 (FoxO1), yüksek oranda korunmuş bir çatal DNA bağlama alanı ile karakterize edilen çatalı transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz, DNA onarımı, inflamasyon ve stres yanıtı, insülin duyarlılığı ve enerji metabolizması gibi biyolojik süreçte yer alan genlerin transkripsiyonunu düzenler¹⁹. İnsülin etkisinin önemli bir efektörü olarak FoxO1, pankreas ve karaciğer, iskelet kası, beyaz ve kahverengi yağ dokusu ve beyin dahil olmak üzere insüline duyarlı dokularda yüksek oranda eksprese edilir²⁰. SIRT1, FoxO1'in deasetilasyonu ile FoxO1'in nükleer retansiyonunu destekler,

böylece FoxO1'in transkripsiyonel aktivitesini düzenler¹.

Çalışmamız, oral antidiyabetiklerin adipositler üzerindeki rollerinin daha iyi tanımlanması amacıyla, 3T3-L1 adipositlerde VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 'in mRNA seviyelerindeki farklılıkları ve bu genlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin araştırılmasını kapsamaktadır.

YÖNTEMLER

A. 3T3-L1 hücre kültürü ve farklılaşması

Çalışmada kullanılan 3T3L-1 fibroblast (CL-173™) hücre soyu American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA) ticari olarak temin edildi. Hücreler Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) medyumumu+%10 Fetal Bovin Serum (FBS; ATCC, USA)+ penisilin / streptomycin (100 µg/ml; Gibco, US) içeren besi yeri içerisinde 37 ° C'de % 5'lik CO₂ etüvde kültürlendi. 3T3-L1 fibroblast hücrelerinin farklılaşması Miard ve ark.²¹ protokolüne göre yapıldı. 3T3-L1 fibroblast hücrelerine DMEM-FBS içine 10µg/ml insülin + 1µM dexametazone + 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine eklenmiş besi yeri ilave edildi ve 3 gün inkübasyon yapıldı. Daha sonra 2'şer gün aralıklarla DMEM-FBS +10µ/ml insülin içeren besi yeri ile hücrelerin 3 kez besi yeri yenilemesi yapıldı. 3T3-L1 fibroblast hücrelerinin adiposit hücrelerine farklılaşmasıyla oluşan lipid içeriği, oil red O boyama yöntemi ile belirlendi²².

B. Adipositlere Oral Antidiyabetik İlaç Uygulaması

Farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerine akarboz, glipizid ve metformin eklendi. Hücrelere 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25 ve 50 mg/ml akarboz; 100 µM, 250 µM ve 500 µM glipizid ve 5, 10, 25, 50, 100, 150 ve 250 mM metformin uygulandı 96 saat boyunca ve 15 dk' lık periyotlarda ölçümler alındı. Kontrol hücrelerine sadece kültür medyumumu eklendi.

C. iCELLigence sistemi ile sitotoksosite testi

Flasklarda çoğaltılan hücreler uygulama yapılmadan 24 saat önce iCELLigence E-8 platlere 50000 hücre /300µl besi yeri olacak şekilde ekilerek inkübasyona bırakıldı. Hücrelere farklı dozlarda oral antidiyabetik ilaç (akarboz, glipizid ve metformin) uygulandı. Kontrol hücre grubuna sadece kültür ortamı eklendi. Tüm deneyler 96 saat boyunca izlendi. Bu deneyde IC₅₀ half maximum inhibitory concentrations) analizleri, Sigmoidal dose-response (Variable slope) formülü ile hesaplandı.

D. mRNA seviyelerinin analizi

Total RNA, üretici talimatlarına göre High Pure RNA doku kiti (Roche, Almanya) kullanılarak hücrelerden ekstrakte edildi. Toplam RNA örnekleri DNase-RNase içermeyen steril suda seyreltildi ve kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı. cDNA sentezi için transkriptör HiFi cDNA sentez kiti (Roche) kullanıldı. VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 genlerine ait ekspresyon seviyeleri, qPCR cihazı (LightCycler Nano, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak tespit edildi. Çalışmada LightCycler nano (Roche, Almanya) qPCR cihazına uygun FastStart Essential DNA Probes Master kiti (Roche, Almanya) kullanıldı. Her numune için en az üç kez ölçümler yapıldı. Ekspresyon miktarları, referans genin, GAPDH'nin ekspresyonu ile hesaplandı. Spesifik gen ürünlerinin varlığı, erime eğrisi analizi kullanılarak doğrulandı. GAPDH için primer seti, Refseq Accession NM_001289726.1'e göre seçilmiştir. Fare VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 için polimeraz zincir reaksiyonu primer seti, sırasıyla Refseq Accession NM_009504.4, NM_001159589.2, NM_013912.4 ve NM_019739.3. Gen ekspresyon çalışmaları beş kez tekrarlandı.

E. İstatistiksel Analizler

iCELLigence sisteminden elde edilen sitotoksosite sonuçlarının değerlendirilmesi için, istatistiksel analizler iCELLigence sistemi

yazılımı kullanılarak, logaritmik yarım maksimum inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri Sigmoidal dose-response (Variable slope) formülü ile hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistical Package for Social Sciences)21.0 programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama ± standart hata (SH) ve medyan (min-maks) olacak şekilde ifade edildi. A1, A2, A3, A4, A5 gruplarının karşılaştırmasında Kruskal Wallis test kullanılarak yapıldı. p< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmaları bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney-U test kullanılarak yapıldı (düzeltilmiş anlamlılık sınırları sırasıyla p=0.010, p=0.025 olarak kabul edildi) p< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

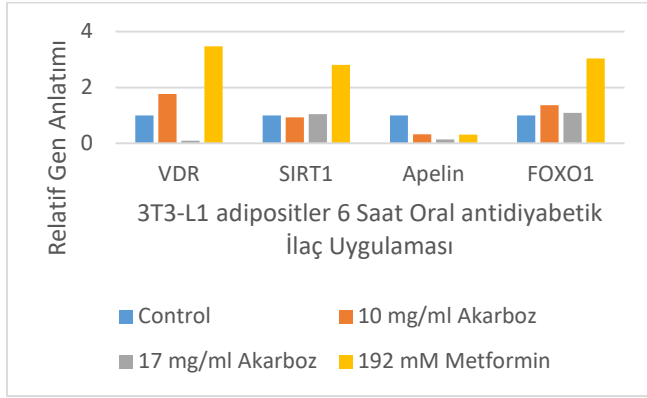
BULGULAR

3T3-L1 Adipositlerinde Oral Antidiyabetik İlaçlara Yanıt Olarak VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 Gen Anlatımlarının İlişkileri

3T3-L1 adipositlerine farklı konsantrasyonda 6 saat ve 24 saat uygulanan glipizid, akarboz ve metforminin VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 gen anlatım düzeyleri Tablo I'de verilmiştir.

6 saat 10 mg/ml akarboz uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında oral antidiyabetik etken maddesi uygulanan hücrelerde VDR ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin sırasıyla 1.761 ve 1.364 (p=0.005) kat arttığı; SIRT1 ve Apelin gen anlatım seviyelerinin sırasıyla 0.931 ve 0.322 (p=0.005) kat azaldığı tespit edildi (Tablo I, Şekil 1). 6 saat 17 mg/ml akarboz uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında madde uygulanan hücrelerde SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin sırasıyla 1.047 ve 1.091 (p=0.005) kat arttığı; VDR ve Apelin gen anlatım seviyelerinin sırasıyla 0.094 ve 0.136 (p=0.005) kat azaldığı tespit edildi (Tablo I, Şekil 1). 6 saat 192 mM metformin uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında madde

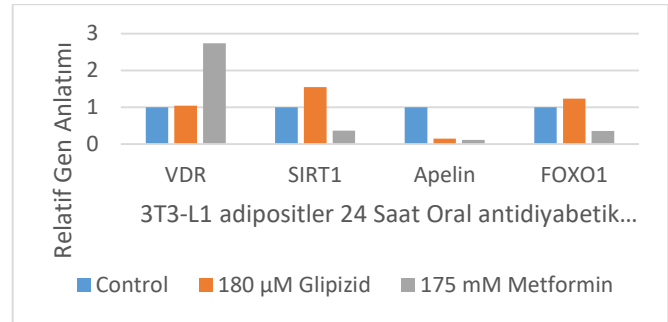
uygulanan hücrelerde VDR, SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin sırasıyla 3.471, 2.809 ve 3.041 ($p=0.005$) kat arttığı; Apelin gen anlatım seviyesinin 0.314 ($p=0.005$) kat azaldığı tespit edildi (Tablo I, Şekil 1).



Şekil 1. Farklı dozlarda (10 ve 17 mg/ml) akarboz ve metforminin 6 saat uygulanması sonucu adipositlerde VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin karşılaştırılması.

24 saat 180 μ M glipizid uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında oral antidiyabetik etken maddesi uygulanan hücrelerde VDR, SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım

seviyelerinin sırasıyla 1.042, 1.547 ve 1.232 ($p=0.005$) kat arttığı; Apelin gen anlatım seviyesinin 0.142 ($p=0.005$) kat azaldığı tespit edildi (Tablo I, Şekil 2). 24 saat 175 mM metformin uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında madde uygulanan hücrelerde VDR gen anlatım seviyesinin 2.74 ($p=0.005$) kat arttığı; SIRT1, Apelin ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin sırasıyla 0.362, 0.112 ve 0.355 ($p=0.005$) kat azaldığı tespit edildi (Tablo I, Şekil 2).



Şekil 2. 24 saat glipizid ve metformin uygulanması sonucu adipositlerde VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin karşılaştırılması.

Tablo I: 3T3-L1 adipositlere oral antidiyabetik ilaçlara yanıt olarak VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 gen anlatım seviyeleri

	VDR Gen Anlatımı Ort. \pm SH;Medyan p (Min-Max)	SIRT1 Gen Anlatımı Ort. \pm SH;Medyan p (Min-Max)	Apelin Gen Anlatımı Ort. \pm SH;Medyan p (Min-Max)	FOXO1 Gen Anlatımı Ort. \pm SH;Medyan p (Min-Max)
Kontrol	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
A1	1.76 \pm 0.00; 1.76 (1.76-1.77) 0.005	0.93 \pm 0.00; 0.93 (0.93-0.94) 0.005	0.32 \pm 0.00; 0.32 (0.32-0.33) 0.005	1.36 \pm 0.00; 1.36 (1.36-1.37) 0.005*
A2	1.09 \pm 0.00; 1.09 (1.09-1.10) 0.005	1.04 \pm 0.00; 1.04 (1.04-1.05) 0.005	0.13 \pm 0.00; 0.13 (0.13-0.14) 0.005	1.09 \pm 0.00; 1.09 (1.09-1.10) 0.005*
A3	3.47 \pm 0.00; 3.47 (3.47-3.48) 0.005	2.80 \pm 0.00; 2.80 (2.80-2.81) 0.005	0.31 \pm 0.00; 0.31 (0.31-0.32) 0.005	3.04 \pm 0.00; 3.04 (3.04-3.05) 0.005*
A4	1.04 \pm 0.00; 1.04 (1.04-1.05) 0.005	1.54 \pm 0.00; 1.54 (1.55-1.54) 0.005	0.14 \pm 0.00; 0.14 (0.14-0.15) 0.005	1.23 \pm 0.00; 1.23 (1.23-1.24) 0.005*
A5	2.74 \pm 0.00; 2.74 (2.74-2.75) 0.005	0.36 \pm 0.00; 0.36 (0.36-0.37) 0.005	0.11 \pm 0.00; 0.11 (0.11-0.12) 0.005	0.35 \pm 0.00; 0.35 (0.35-0.36) 0.005*

Değerler ortalama \pm standart hata; medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. n=5. A1: 6 saat 10 mg/ml akarboz uygulanmış adiposit hücreleri. A2: 6 saat 17 mg/ml akarboz uygulanmış adiposit hücreleri. A3: 6 saat 192 mM metformin uygulanmış adiposit hücreleri. A4: 24 saat 180 μ M glipizid uygulanmış adiposit hücreleri. A5: 24 saat 175 mM metformin uygulanmış adiposit hücreleri

Düzeltilmiş anlamlılık sınırı $p=0.010$. (Mann-Whitney Test test ile yapıldı. Her grup kontrol ile karşılaştırıldı)

Oral Antidiyabetik İlaç Etkisindeki 3T3-L1 Adipositlerde VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 Gen Anlatımlarının Korelasyonu

3T3-L1 adipositlerde 6 saat 10 mg/ml akarboz uygulamasında VDR ve SIRT1 gen anlatım

seviyeleri arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($r_s= 0.89$, $p=0.04$)(Tablo II). 6 saat 192 mM metformin uygulanmış adiposit hücrelerinde VDR ve SIRT1 gen anlatım seviyeleri arasında negatif korelasyon tespit edildi ($r_s= -1.00$, $p=0.005$)(Tablo II).

Tablo II:Antidiyabetik ilaç uygulanmış 3T3-L1 adipositlerdeki VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 genlerinin anlatım düzeylerinin korelasyonu.

	VDR Gen Anlatımı		SIRT1 Gen Anlatımı		APELIN Gen Anlatımı		FOXO1 Gen Anlatımı	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
A1								
VTD Gen Anlatımı	1.00	-	0.89	0.04*	0.66	0.22	-0.05	0.93
SIRT1 Gen Anlatımı	0.89	0.04*	1.00	-	0.56	0.32	0.35	0.55
APELIN Gen Anlatımı	0.66	0.22	0.56	0.32	1.00	-	-0.40	0.50
FOXO1 Gen Anlatımı	-0.05	0.93	0.35	0.55	-0.40	0.50	1.00	-
A2								
VTD Gen Anlatımı	1.00	-	0.23	0.70	-0.35	0.55	-0.23	0.70
SIRT1 Gen Anlatımı	0.23	0.70	1.00	-	-0.82	0.09	0.82	0.08
APELIN Gen Anlatımı	-0.35	0.55	-0.82	0.09	1.00	-	-0.68	0.20
FOXO1 Gen Anlatımı	-0.23	0.70	0.82	0.08	-0.68	0.20	1.00	-
A3								
VTD Gen Anlatımı	1.00	-	-1.00	0.005**	-0.20	0.74	0.05	0.93
SIRT1 Gen Anlatımı	-1.00	0.005**	1.00	-	0.20	0.74	-0.05	0.93
APELIN Gen Anlatımı	-0.20	0.74	0.20	0.74	1.00	-	0.82	0.08
FOXO1 Gen Anlatımı	0.05	0.93	-0.05	0.93	0.82	0.08	1.00	-
A4								
VTD Gen Anlatımı	1.00	-	-0.23	0.70	0.56	0.32	0.35	0.55
SIRT1 Gen Anlatımı	-0.23	0.70	1.00	-	0.35	0.55	-0.71	0.17
APELIN Gen Anlatımı	0.56	0.32	0.35	0.55	1.00	-	-0.30	0.62
FOXO1 Gen Anlatımı	0.35	0.55	-0.71	0.17	-0.30	0.62	1.00	-
A5								
VTD Gen Anlatımı	1.00	-	0.41	0.49	0.05	0.93	0.30	0.62
SIRT1 Gen Anlatımı	0.41	0.49	1.00	-	-0.86	0.05	-0.56	0.32
APELIN Gen Anlatımı	0.05	0.93	-0.86	0.05	1.00	-	0.79	0.11
FOXO1 Gen Anlatımı	0.30	0.62	-0.56	0.32	0.79	0.11	1.00	-

Değerler Spearman korelasyon katsayısı (r_s) ve istatistiksel (p) anlamlılık olarak ifade edildi.

A1: 6 saat 10 mg/ml akarboz uygulanmış adiposit hücreleri. A2: 6 saat 17 mg/ml akarboz uygulanmış adiposit hücreleri. A3: 6 saat 192 mM metformin uygulanmış adiposit hücreleri. A4: 24 saat 180 μ M glipizid uygulanmış adiposit hücreleri. A5:24 saat 175 mM metformin uygulanmış adiposit hücreleri * $p<0.05$, ** $p<0.01$

TARTIŞMA

Obezite, büyük ölçüde insülin direnci, tip 2 diyabet, dislipidemi ve kanser gibi ilişkili hastalıklar tarafından yönlendirilen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Obezitenin etiyolojisi, çevresel ve genetik etkilerle birlikte

karmaşıktır. Gelişiminin temel mekanizması, vücut tarafından alınan ve harcanan enerji arasındaki dengesizliktir. Alınan enerjinin fazlası yağ dokusu olarak depolanır²³. Ancak, bu modülasyona transkripsiyon faktörlerinin katılımı hakkında çok az şey biliyoruz.

Oral antidiyabetik ilaç maruziyetine yanıt olarak 3T3-L1 adipositlerde VDR, SIRT1, Apelin ve FOXO1 gen ekspresyon seviyelerini gösterdik. Adiposit hücrelerine 6 saat 10 mg/ml akarboz uygulaması sonucunda VDR ve FOXO1 gen anlatım seviyeleri artarken, SIRT1 ve Apelin gen anlatım seviyeleri azalma göstermiştir. Adiposit hücrelerine 6 saat 17 mg/ml akarboz uyguladığımızda SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyeleri artış gösterirken, VDR ve Apelin gen anlatım seviyeleri kontrol hücrelerine kıyasla azalma göstermiştir. Aynı sürede farklı dozlarda akarboz uygulaması FOXO1 ve Apelin geninin anlatım yönlerini değiştirmezken VDR ve SIRT1 gen anlatım yönlerini değiştirmiştir. Doza bağlı olarak FOXO1 gen anlatım seviyesi azalarak, 17 mg/ml akarboz uygulamasında kontrole yakın değerdedir (1.091, $p=0.005$). Artan dozda akarboz uygulamasında Apelin gen anlatım seviyesi doza bağlı olarak azalma göstermiştir. Apelin seviyesindeki azalma akarbozun, adipositlerdeki insulin direncinin ilaç etkisiyle azaldığını ve lipid metabolizmasının düzenlendiğini gösterebilir. Akarboz uygulama dozuna bağlı olarak SIRT1 geninde anlatım seviyelerinde farklılıklar oluşmuştur. Doz artmasına bağlı olarak SIRT1 gen seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Bu durumun akarboz dozuna bağlı olarak adipogenezin gecikmesi ve lipolizin artmasını sağladığını düşünmekteyiz. Wong ve ark. VDR'nin adiposit biyolojisindeki rolünü daha fazla tanımlamak için yapmış oldukları çalışmaya göre, VDR'nin adiposit hücrelerinde yağ asidi taşınması, termojeniz ve lipoliz düzenlenmesinde yer alan genlerin ekspresyonu ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu belirlemişlerdir⁵. Çalışmamızda, doz artışına bağlı olarak VDR gen anlatımında yaklaşık 1.5 katlık bir azalma tespit ettik. Bu durum doza bağlı olarak akarbozun insulin salgılama düzenleyicisinin azalmasını yansıtabilir.

Çalışmamızda farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerine 6 saat 192 mM metformin uygulamasına cevaben

VDR, SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyeleri yaklaşık 3 kat artış gösterirken, apelin gen anlatım seviyeleri ise kontrol hücrelerine göre belirgin şekilde düşüş göstermiştir. Apelin seviyesinin azalması metforminin adiposit hücrelerinde glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlendiğini gösterebilir düşüncesindeyiz. Metformin uygulaması sonucunda SIRT1 geninin artması adipositlerde insulin direncinin azaldığını gösterebilir. FOXO1 gen anlatım seviyesinin artması, adipositlerde oluşan inflamasyon ve stresin azaldığını gösterebilir. 24 saat 175 mM metformin uygulaması sonucunda VDR gen anlatım seviyesi artarken SIRT1, apelin ve FOXO1 gen anlatım seviyeleri azaldı. Caton ve ark. metforminin, obez farelerin beyaz adipoz dokusunda, bozulmuş AMPK ve SIRT1 işlevine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, metforminin lipid birikiminde AMPK-NAMPT-SIRT1 aracılı, obezite için kronoterapötik tedavi yaklaşımlarını desteklediğini tespit etmişlerdir²⁴. Uzun süreli metformin uygulamasında SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin yaklaşık 3 kat azalması, metformin etkisinde bu genlerin birbirleriyle koordineli çalışarak adipositlerdeki insulin direncinin azaldığını gösterebilir. Böylece yağ dokudaki glikoz metabolizması düzlenebilir. VDR gen anlatım seviyesinin kısa süreli metformin kullanımına göre uzun süreli metformin kullanımında azalması, metforminin uzun sürede hücrel enerji metabolizmasını düzenlediğini gösterebilir.

3T3-L1 adipositlere 24 saat 180 μ M glipizid uygulaması sonucunda VDR, SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyeleri arttı ve apelin gen anlatım seviyesi azaldı. Glipizid uygulaması sonucunda apelin gen seviyesinin azalması, adipositlerde insulin direncinin azaldığını ve glikoz metabolizmasının düzenlendiğini gösterebilir. VDR, SIRT1 ve FOXO1 gen anlatım seviyelerinin artması glipizidin glikoz metabolizmasındaki iyileştirici etkilerini bu genler üzerinden gerçekleştirdiğini gösterebilir.

İnsanlarda, obez hastalarda kalori kısıtlı diyet, yağ dokusunda apelin gen ekspresyonunu azaltmaktadır²⁵. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan oral antidiyabetikler apelin gen anlatım seviyesini azaltmıştır. Bu durum oral antidiyabetiklerin yağ hücrelerindeki lipit ve glikoz metabolizmasını apelin geni üzerinden düzenlediğini gösterebilir.

Sülfonilüreler ve SIRT1 aktivitesi arasındaki ilişkiye odaklanan çok az çalışma vardır²⁶. Sentetik bir sülfonilüre bileşiği (G004), ateroskleroz tedavisi için faydalı bulunan SIRT1/eNOS ekseninde aktive edici etki göstermiştir. Ayrıca, aynı mekanizmanın metabolik hafıza etkileri için de faydalı olduğu düşünülmektedir²⁶. Çalışmamızda sülfonilüre grubu olan glipizidin adipositlere uygulanması sonucunda SIRT1 gen anlatım seviyesini arttırdığını tespit ettik.

3T3-L1 murin adipositlerinde, 6 saatlik akarboz, metformin ve 24 saatlik glipizid uygulaması sırasında FOXO1 gen anlatım seviyesinde ilerleyici bir artış gözlemledik. Besin algılayıcı FoxO1 transkripsiyon faktörünün kalori kısıtlaması sırasında lipit katabolizmasını iyileştirdiği öne sürülmektedir²⁷. Barbato ve ark. yapmış oldukları çalışmada 10 gün boyunca 400mg/kg metformin uyguladıkları farelerde FoxO1 proteinin arttığını göstererek hücrelerdeki yağ birikiminin azaldığını göstermişlerdir²⁷. Bu durumun kalori kısıtlaması ile metformin kullanımının aynı özelliklere sahip olduğunu gösterdiğini belirlemişlerdir²⁷. Bizde çalışmamızda benzer olarak 6 saat 175 mM metformin uygulaması sonucunda FOXO1 gen anlatım seviyesinin arttığını tespit ettik.

SONUÇ

Sonuç olarak, adipogenez metabolizmasında rolü olan Apelin mRNA ekspresyonunun oral antidiyabetik kullanımında azalması, obezite ve komorbidite riskinin azalmasıyla ilişkili olabilir. SIRT1 gen anlatım seviyesinin 175 mM

metformin kullanımı ile azalması metforminin hücrelerdeki lipit oksidasyonunu artırarak inflamasyonu azalttığını ve hücreleri tedavi ettiğini gösterebilir. Metformin tedavisinin FOXO1'in gen ekspresyon seviyelerini değiştirerek insülin direncini iyileştirmede etkili olabileceğini düşündürmektedir. Farklı oral antidiyabetik ilaç kullanımı adipositlerdeki lipit ve glikoz metabolizmasını düzenlemektedir. Sonuçlarımız terapötik etkileri bu yolları hedefleyen çalışmalar için yeni stratejiler sağlayabilir.

Etik Kurul Kararı: Hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul iznine gerek yoktur.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Wang N, Wang N, Luo G, et al. Lutein attenuates excessive lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 cells and abdominal adipose tissue of rats by the SIRT1-mediated pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021; 133: 1357-2725.
2. Güven M. Association of Initial HbA1c Level with Obesity Medical Treatment Success in Morbidly Obese Patients. *Dicle Med J.* 2021; 48: 316-27.
3. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* 2008; 94: 206-18.
4. Crowley VE. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann Clin Biochem.* 2008; 45: 245-55.
5. Wong KE, Kong J, Zhang W, et al. Targeted Expression of Human Vitamin D Receptor in Adipocytes Decreases Energy Expenditure and

- Induces Obesity in Mice. *J Biol Chem.* 2011; 30: 33804-10.
6. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008; 29: 726–76.
7. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290: 916–24.
8. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature.* 2009; 460: 587–91.
9. Kwon HS, Ott M. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33: 517–25.
10. Sinclair DA, Guarente L. Unlocking the secrets of longevity genes. *Sci Am.* 2006; 294: 48–51, 54–7.
11. Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, et al. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. *Mol Cell Biochem.* 2010; 339: 285–92.
12. Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. SIRT1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature.* 2004; 429: 771–6.
13. Mayoral R, Osborn O, McNelis J, et al. Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPAR γ activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. *Mol Metab.* 2015; 4: 378–91.
14. Yuzbashian E, Zarkesh M, Asghari G, et al. Is apelin gene expression and concentration affected by dietary intakes? A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018; 58: 680-8.
15. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology.* 2005;146:1764–71.
16. Ringstrom C, Nitert MD, Bennet H, et al. Apelin is a novel islet peptide. *Regul Pept.* 2010; 162: 44–51.
17. Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2008; 8: 437–45.
18. Wei L, Hou X, Tatemoto K. Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept.* 2005; 132: 27–32.
19. Monsalve M, Olmos Y. The complex biology of FOXO. *Curr Drug Targets.* 2011; 12: 1322–50.
20. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone.* 2012; 50: 437–43.
21. Miard S, Dombrowski L, Carter S, et al. Aging alters PPAR γ in rodent and human adipose tissue by modulating the balance in steroid receptor coactivator-1. *Aging Cell.* 2009; 8: 449-59.
22. Lillie RD and Ashburn LL. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Archs Path.* 1943; 36: 432-40.
23. Hammes TO, dos Santos Costa C, Rohden F, et al. Parallel down-regulation of FOXO1, PPAR γ and adiponectin mRNA expression in visceral adipose tissue of class III obese individuals. *Obes Facts.* 2012; 5: 452-9.
24. Caton PW, Kieswich J, Yaqoob MM, et al. Metformin opposes impaired AMPK and SIRT1 function and deleterious changes in core clock protein expression in white adipose tissue of genetically-obese db/db mice. *Diabetes Obesity and Metabolism.* 2011; 13: 1097–104.
25. Castan-Laurell I, Dray C, Valet P. The therapeutic potentials of apelin in obesity-associated diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2021; 529: 111278.
26. Stelmaszyk A, Mikołajczak P, Dworacka M. Sirtuin 1 as the mechanism of action of agents used in the diabetes mellitus pharmacotherapy. *European Journal of Pharmacology.* 2021; 907: 174289.
27. Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, et al. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell Death Dis.* 2013; 17; 4: e861-e861.