

**Atf İçin:** Koldemir Gündüz M, Kaymak G, Kanbur E, Berikten D, Şahin MC, Şener H, Yerlikaya A, 2022. Eksenatidin 3D 3T3-L1 adipositleri üzerindeki ekspresyon profilinin mikrodizin analizi ile belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(4): 1995 - 2003.

**To Cite:** Koldemir Gündüz M, Kaymak G, Kanbur E, Berikten D, Şahin MC, Şener H, Yerlikaya A, 2022. Determination of the expression profile of exenatide on 3D 3T3-L1 adipocytes by microarray analysis. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(4): 1995 - 2003.

### **Eksenatidin 3D 3T3-L1 Adipositleri Üzerindeki Ekspresyon Profilinin Mikrodizin Analizi ile Belirlenmesi**

Meliha KOLDEMİR GÜNDÜZ<sup>1\*</sup>, Güllü KAYMAK<sup>1</sup>, Ertan KANBUR<sup>2</sup>, Derya BERİKTEN<sup>1</sup>, Meryem Cansu ŞAHİN<sup>3</sup>, Harun ŞENER<sup>1</sup>, Azmi YERLİKAYA<sup>4</sup>

**ÖZET:** Obezite karmaşık, çok faktörlü ve dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur. Obezite tedavisi için mevcut stratejiler oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle yeni ilaç geliştirilmesi oldukça önemlidir. Çalışmanın amacı, GLP-1 agonisti olan eksenatidin 3 boyutlu (3D) 3T3-L1 adipositleri üzerindeki sitotoksitesinin, tüm genom profili üzerinden araştırmaktır. Bu çalışmada, eksenatidin 3D adipositler üzerindeki apoptotik ve lipolitik etki düzeyleri de araştırıldı. Eksenatidin 3T3-L1 adipositleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile belirlendi. mRNA' ları taramak için fare geni mikrodizisi kullanıldı. Apoptoz çalışmaları ELISA yöntemi ile yapıldı. Lipoliz analizi, Lipolysis Colorimetric Assay Kit ile gerçekleştirildi. 3D yağ doku modellemesinde eksenatid uygulaması apoptoz seviyesini arttırdı ( $p<0.01$ ). 3D 3T3-L1 adipositleri ile yapılan deneyler, eksenatid uygulamasında lipolitik etkinin yüksek olduğunu gösterdi ( $p=0.000$ ). 3D adiposit hücrelerinde mRNA'ların ekspresyon profillerini göstermek için yapılan transkriptom analizlerinde, eksenatid uygulanan grupta kontrol adiposit hücreleriyle kıyaslandığında toplam 3472 mRNA farklı şekilde ifade edildi ( $p<0.05$ ). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, eksenatidin, çeşitli genlerin anlatımını, adiposit apoptozunu ve lipoliz aktivitesini düzenleyerek obezite tedavisinde etkili olduğunu gösterebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Obezite, mikrodizin, eksenatid, 3D hücre kültürü, 3T3-L1 hücresi

### **Determination of the expression profile of exenatide on 3D 3T3-L1 adipocytes by microarray analysis**

**ABSTRACT:** Obesity is a complex, multifactorial and important health problem worldwide. Current strategies for the treatment of obesity are quite limited. Therefore, the development of new drugs is very important. The aim of the study was to investigate the cytotoxicity of the GLP-1 agonist exenatide on 3 dimensional (3D) 3T3-L1 adipocytes through the whole genome profile. In this study, the apoptotic and lipolytic effect levels of exenatide on 3D adipocytes were also investigated. The cytotoxic activity of exenatide on 3T3-L1 adipocytes was determined by MTT method. Mouse gene microarray was used to screen for mRNAs. Apoptosis studies were performed by ELISA method. Lipolysis analysis was performed with the Lipolysis Colorimetric Assay Kit. In 3D adipose tissue modeling, exenatide application increased apoptosis level ( $p<0.01$ ). Experiments with 3D 3T3-L1 adipocytes showed a high lipolytic effect in exenatide administration ( $p=0.000$ ). In transcriptome analyzes performed to show the expression profiles of mRNAs in 3D adipocyte cells, a total of 3472 mRNAs were differentially expressed in the exenatide treated group compared to control adipocyte cells ( $p<0.05$ ). The results obtained from this study may show that exenatide is effective in the treatment of obesity by regulating expression of various genes, adipocyte apoptosis and lipolysis activity.

**Keywords:** Obesity, microarray, exenatide, 3D cell culture, 3T3-L1 cell

<sup>1</sup>Meliha KOLDEMİR-GÜNDÜZ (Orcid ID: 0000-0003-0969-6377), Güllü KAYMAK (Orcid ID: 0000-0001-6309-0208), Derya BERİKTEN (Orcid ID: 0000-0002-8672-4813), Harun ŞENER (Orcid ID: 0000-0003-3521-0684), Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kütahya, Türkiye

<sup>2</sup>Ertan KANBUR (Orcid ID: 0000-0001-8399-8942), Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>3</sup>Meryem Cansu ŞAHİN (Orcid ID: 0000-0002-5743-3734), Uşak Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Uşak, Türkiye

<sup>4</sup>Azmi YERLİKAYA (Orcid ID: 0000-0002-0678-0701), Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: : Meliha KOLDEMİR-GÜNDÜZ, e-mail: meliha.koldemirgunduz@ksbu.edu.tr

Bu çalışma TÜBİTAK "220S827" kodlu projeden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Obezite, yağ dokusundaki anormal birikim olarak ifade edilmektedir. Obezitenin patogenezi çok karmaşıktır ve yaygın olarak genetik faktörler ve çevresel faktörler tarafından ortaklaşa belirlendiğine inanılmaktadır (Caballero, 2007; Prentice ve ark., 2008). Bununla birlikte, kötü beslenme alışkanlıkları, hareketsiz yaşam tarzı ve fiziksel aktivite eksikliği obezite gelişiminin önemli nedenleridir (Hanefeld ve Köhler, 2002; Ivezić-Lalić ve ark., 2013). Genel olarak obezite, enerji alımı ve enerji harcaması arasındaki kronik dengesizlikten kaynaklanır. Aşırı enerji alımı tüketilmediğinde yağa dönüştürülür ve yağ dokusunda depolanarak yağ dokusunun ağırlığında artışa neden olur (Gariani ve ark., 2016).

Son yıllarda obezite çarpıcı biçimde artarak dünya çapında bir halk sağlığı sorunu haline geldi (Chooi, ve ark., 2019). Dünyadaki yetişkinlerin yüzde otuzundan fazlası aşırı kilolu ve yetişkinlerin neredeyse yüzde onu obezdir (Masa ve ark., 2019). Obezite, kanser, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık gibi çeşitli kronik metabolik hastalıkların görülme sıklığının artmasıyla ilişkilidir ve obezitenin şiddetine eşlik eden bozukluğa bağlı olarak 5-20 yıllık ömrü bile azaltır (Blüher, 2019).

Obezite, küresel ölüm ölçeğinde beşinci sırada gelmektedir ve her yıl dünya çapında 2,8 milyon insan obezite ile ilişkili komplikasyonlar nedeniyle ölmektedir (Parratte ve ark., 2014). Klinik çalışmalar, diyet müdahalesinin obezitenin önlenmesinde ve tedavisinde yardımcı olabileceğini göstermektedir (Schmidt ve ark., 2008). Ancak obezite tedavisi için yeni moleküllere ihtiyaç vardır. Artan ilgi, obezite tedavisi için alternatif bir yaklaşım olarak kullanımda olan medikal ilaçların kullanımına odaklanmıştır. Umut verici bir anti-diyabetik ilaç sınıfı olarak, glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistlerinin (GLP-1RA'lar), hipoglisemi riski olmaksızın kan glukoz seviyelerini azaltabilen glukoz bağımlı bir şekilde insülin sekresyonunu güçlendirdiği gösterilmiştir (Drucker ve Nauck, 2006; Drucker ve Yusta, 2014; Drucker ve ark., 2017). Tip II diyabet ilacı olan GL1 reseptör agonisti eksenatidin obeziteyi önleyici etkiler gösterdiği bildirilmektedir. Buna göre, obezitenin önlenmesinde ve ilişkili hastalıkların tedavisinde adiposit farklılaşmasını etkileyen eksenatidin etki mekanizmalarını anlamak obezite tedavisine yardımcı olur. Bu özelliklerin altında yatan mekanizmaları anlamak, obezite salgınını ve sağlık üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

İnsan popülasyonu genetik çalışmalarından elde edilen bilgilerin biyolojik mekanizmalara ve hassas tıp araçlarına dönüştürülmesi, farklı insan popülasyonlarında genetik hassas haritalama, genomik ve epigenomik çalışmalar, bilinen genotipe sahip gönüllüler üzerinde fizyolojik deneyler ve hayvanlarda ve hücre modellerinde mekanik çalışmalar dahil olmak üzere geniş bir stratejiler setinin uygulanmasını gerektirir (Zeggini ve ark., 2019). Bu stratejilerin önemli bir parçası olan hücre modelleri için ortak bir yaklaşım, hücre çizgileri ve birincil hücrelerden oluşan basit in vitro iki boyutlu (2D) modellerin kullanılmasıdır. Bunlar, adiposit davranışını ve farklılaşmasını anlamak ve bileşik tarama için gerekli olan değerli modellerdir (Serrero ve Khoo, 1982; Lefterova ve ark., 2014). Ancak, tek katmanlı modeller, hücre tipleri, hücre etkileşimleri ve morfoloji açısından yetişkin in vivo dokusunun karmaşıklığından yoksundur. Bu nedenle, adipoz gibi belirli organları ve bileşiklere karşı organizmanın tepkisini incelemek için yaygın olarak translasyonel hayvan modelleri kullanılır. Bu tür araştırmalar daha pahalı ve uzun sürelidir. 2D hücre modelleri ile in vivo klinik öncesi modeller arasındaki boşluğu ucuz bir şekilde kapatan modellere ihtiyaç vardır. Böyle bir model, in vivo modellere geçmeden önce mekanik çalışmayı kolaylaştırabilir ve ayrıca bileşiklerin yüksek verimli taranmasına izin verebilir. 3D hücre kültürü sistemi, yağ fizyolojisinin karmaşıklığını ve

işlevsel çıktısını daha doğru bir şekilde temsil ederek bu boşluğu doldurmaya yardımcı olabilir (Graham ve ark., 2020).

Bu çalışmanın amacı, GLP-1 reseptörü agonisti olan eksenatidin 3 boyutlu doku modellemesi ile 3T3-L1 adiposit hücrelerindeki etkilerinin tüm genom transkriptom profillemesi üzerinden araştırılarak eksenatidin koruyucu etkisinde yer alan mRNA 'ları belirlemektir. 3T3-L1 adiposit 3 boyutlu doku modelleme çalışmamızda ayrıca hücre canlılığı, apoptoz ve lipoliz testleri yapıldı.

## MATERYAL ve METOT

### 2D Hücre Kültürü

3T3L-1 fibroblast hücre soyu American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA) ticari olarak temin edildi. 3T3L-1 hücreleri, DMEM'e (Dulbecco's modified Eagle's medium)+%10 Fetal Bovin Serum (FBS)+ penisilin (100 unit/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) eklendi ve flasklar nemli bir atmosferde (37 °C, %5 CO<sub>2</sub>) kültürlendi. 3T3-L1 fibroblast hücrelerinin farklılaşması Miard ve ark. (2009) protokolüne göre, hücrelere DMEM-FBS içine 10µg/ml insülin + 1µM deksametazone + 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine eklenerek yapıldı. Hücrelerdeki farklılaşma oil red o boyama yöntemi ile morfolojik olarak belirlendi (Lillie ve Ashburn, 1943).

### 3D hücre kültürü çalışması ve tedavi

3D biobasım için aljinat ve kollejenin birlikte olduğu bioink besiyeri içerisinde steril şartlarda hazırlandı. 0.1 gr/ml aljinat (Alfasol, Türkiye) besiyeri içerisinde 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece bekletilerek çözündürüldü. 15 mg/ml kollojen (Bugamed Biyoteknoloji, Türkiye) 1.1 gr/ml aljinat ile karıştırılarak 1.5 M NaOH ile pH= 7 ye ayarlandı. Hazırlanan bioinkler basım işlemi yapılana kadar steril şartlarda +4°C'de saklandı.

3D Bio yazıcı (AXODUALX, Türkiye) aljinat ve kollejen ile hazırlanan bioink basım için kullanıldı. Solidworks® programı aracılığıyla 3 boyutlu doku modeli şekli oluşturuldu. 2x10<sup>7</sup> hücre/mL kollejen ve aljinattan oluşan bioink ile karıştırılarak süspansiyon edildi. Hücre ve biyoçözelti karışımları, 0.26 mm V tipi iğne ile ekstrüzyon için 3D yazıcının baskı arabasına yerleştirilen ekstrüzyon kartuşlarına yerleştirildi. Hücre-hidrojel karışımı biyoyazıcı şırıngasında x-y-z düzlemleri boyunca ekstrüde edildi. Baskıdan sonra, 3D yapıların polimerizasyonu, %10 CaCl<sub>2</sub> ile inkübe edilerek gerçekleştirildi. Kültürün ikinci gününde besiyerinin tamamı adipojenik farklılaşma ortamıyla değiştirildi. 3 boyutlu ortamda adiposit farklılaşması gerçekleştirildi.

Çalışmamızda GLP1-RA olarak, eksenatid kullanıldı. GLP-1RA çözeltisi, besiyeri içerisinde mekanik olarak hazırlandı. 3T3-L1 adipositlere 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 5 ve 1 nM eksenatid ilave edildi ve hücreler 48 saat inkübe edildi. Kontrol hücrelerine sadece kültür ortamı eklendi.

### Hücre sitotoksitesite analizi

MTT [3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] yöntemi ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik olarak tespit edildi. Hücrelere farklı dozlarda eksenatid uygulandı ve MTT analizi, Yerlikaya ve ark. (2010) yöntemine göre yapıldı. Veriler, GraphPad Prism 5.0 programı (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ABD) ile analiz edildi. IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması için, GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi ile veriler normalize edildi.

### RNA ekstraksiyonu, saflaştırma ve kalite kontrol

Toplam RNA, üreticinin talimatları izlenerek RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak ekstre edildi ve saflaştırıldı. Nano-300 spektrofotometre (AllSheng, China) ile RNA'lara ait 260/A280 ve A260/A230 oranları kaydedildi. Uygun saflıktaki RNA'ların entegrasyonunu kontrol

etmek için Agilent Bioanalyzer 2100 ile RNA 6000 Nano Assay Kit (RNA Series II Kit) (Cat. 5067-1511, Agilent Technologies) kullanılarak RNA Integrity Number (RIN) değerleri kontrol edildi. Ardından, nitelikli kalitedeki RNA'lar, mikrodizin deneylerinde kullanıldı.

### RNA mikrodizin analizi

RNA Mikrodizin deneyi için "Tek-Renk Mikrodizin Temelli Gen Ekspresyon Analizi" (Agilent) kullanıldı. Mikrodizi (dizayn ID: 74809) toplamda 62976 transkript içermektedir. Bu transkriptlerden 1313 kontrol probudur. Fare mikrodizisi G4858A-074809 G3 Mouse GE-G2534-60014 SEM AŞ. Tarafından geliştirilmiştir. Bu mikrodizi mRNA 'ları profillemek için kullanıldı.

### RNA etiketleme ve dizi hibridizasyonu

Toplam RNA, üreticinin talimatları izlenerek, Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Cat. 5190-2305, Agilent Technologies) ile amplifiye edildi ve etiketlendi. Etiketli cRNA'lar, Absolutely RNA Nanoprep Kit (Cat. 400753, Agilent Technologies) ile saflaştırıldı.

Her slayt, üreticinin talimatlarına göre hibridizasyon fırınında 600 ng Cy3 etiketli cRNA ve Gene Expression Hybridization Kiti (Cat. 5188-5242, Agilent Technologies) kullanılarak hibridize edildi. 17 saatlik hibridizasyondan sonra, slaytlar, üreticinin talimatlarına göre Gene Expression Wash Buffer Kit (Cat. 5188- 5327, Agilent Technologies) ile boyama kaplarında yıkandı.

### Veri toplama ve analizi

Slaytlar, varsayılan ayarlarla Agilent Microarray Tarayıcı (Cat. G2565CA, Agilent Technologies) ile tarandı. Mikrodizin taraması sonrası elde edilen görüntü dosyaları GeneSpring 14.9 (Agilent) yazılımı ile incelendi. Yazılım internet veri tabanından mm9:NCBI37:Jul2007 kopya sayısı değişikliği karşılaştırma verilerine göre yapıldı. RNA örneklerinin normalizasyonu için GeneSpring yazılımı üzerinden Quantile Normalization yöntemi kullanıldı. İki grup arasındaki önemli ölçüde eksprese edilen mRNA'ların eşik değerlerinin kat değişiklikleri  $\geq 2.0$  ve p değeri  $< 0.05$  seçildi.

### Apoptoz düzeylerinin belirlenmesi

3D 3T3-L1 adiposit hücrelerine 48 saat 392.5 nM eksenatid uygulamasından sonra elde edilen lizatlara ait örneklerden anneksin V düzeyleri Uscn ELISA kit (Uscn Life Science Inc. Wuhan) kullanılarak belirlendi.

### Lipoliz analizi

Eksenatid uygulanmış 3D adiposit hücrelerindeki lipoliz analizi ticari kit (Lipolysis Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich) kullanılarak yapıldı. Adiposit hücrelerine ilaç etken maddesi uygulanmasının ardından, üreticinin belirttiği protokol kullanılarak serbest gliserol içeriği analiz edildi.

### İstatistiksel analizler

Hücre canlılığı MTT analizi, GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, inc.) kullanılarak yapıldı. Lipoliz analizi ve gen anlatım sonuçlarının istatistiksel analizi IBM SPSS Statistic 23 bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Çalışma bulguları ortalama $\pm$ standart hata (SH) şeklinde ifade edildi. Mikrodizin verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi için istatistiksel T-Testi (NoCorrection Moderated T-Test) uygulandı. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Obezite, adipositlerdeki lipid metabolizması yoluyla kontrol edilebilen bir enerji dengesizliğinden kaynaklanır. Preadipositler kullanılarak olgun adipositlere farklılaşmayı azaltarak adipogenezi baskılamak için birçok çalışma yapılmıştır (Lim ve ark., 2021: Koldemir-Gündüz ve ark.,

2022). Obezite tedavisi için kullanılan mevcut terapötik ilaçların sayısı oldukça azdır ve bu ilaçlar yan etkileri nedeniyle sıklıkla tercih edilmemektedir. Bu nedenle alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Eksenatid, glisemik kontrolü iyileştirmek için T2DM'li yetişkinlerde kullanılan glukagon benzeri bir peptid-1 reseptör agonistidir. Eksenatidin tokluk duygularını artırma ve iştahı bastırma yeteneği yoluyla BMI, vücut ağırlığı ve vücut yağımı (Buse ve ark., 2010; Rosenstock ve ark., 2010) önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ancak, yağ dokusundaki aktivitesinin altında yatan kesin mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir.

### **Farklı eksenatid konsantrasyonlarında 3T3-L1 adiposit hücre büyümesinin inhibisyonu**

1 ile 1000 nM arasında değişen konsantrasyonlarda 48 saat boyunca eksenatid tedavisine yanıt olarak adiposit hücrelerinin canlılığı, MTT hücre proliferasyon deneyi ile izlendi. IC<sub>50</sub> konsantrasyonu 392.5 nM olarak hesaplandı.

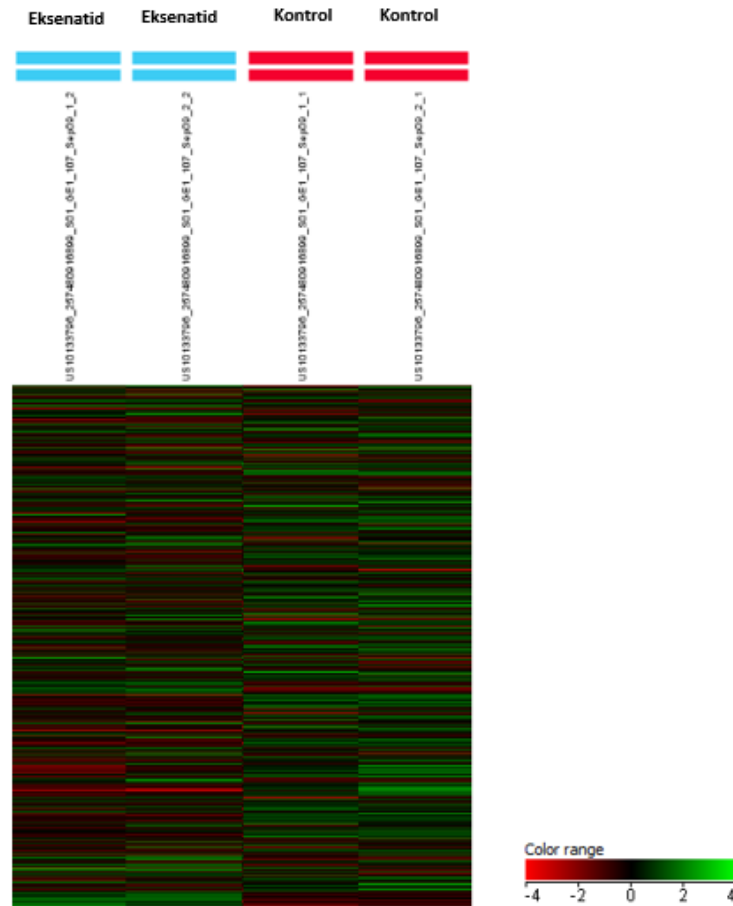
### **3D adipositlere eksenatid uygulaması sonucunda elde edilen mikrodizi veri analizi**

3D 3T3-L1 adiposit hücrelerine IC<sub>50</sub> düzeyinde (392.5 nM) eksenatid uygulamasında sitotoksikite ilişkili moleküler mekanizmaları ve tepkileri bulmak için mikroarray analizi yapıldı. 3D Mikrodizin taraması sonrası GeneSpring yazılımı kullanılarak analiz yapıldı. Eksenatid ve kontrol gruplarını oluşturduktan sonra “Kat sayısı değeri” (Fold Change) 2,0 ve üzeri olan problemler seçildi ve kontrole kıyasla anlamlı derecede değişiklik göstermiş problemlere NoCorr T-Testi (p<0,05) uygulanması sonrası toplam 3472 transkript tespit edildi. Diferansiyel olarak ifade edilen transkriptler arasında ısı haritasında görselleştirilen 1411 aşağı ve 2061 yukarı anlamlı değişiklik bulundu (**Şekil 1**). Bu genler arasından kat sayısı en fazla olan 20 aşağı regüle gen **Çizelge 1**'de ve 20 yukarı regüle gen **Çizelge 2**'de sunulmuştur.

3T3-L1 adiposit hücrelerinde eksenatidin fonksiyonlarını daha iyi anlamak için, ilgili moleküler mekanizmaları tanımlamak esastır. Bu çalışmada, eksenatid ile tedavi edilen 3D 3T3-L1 adiposit hücrelerinin mikrodizi verilerini analiz ettik. Mikrodizin taraması sonrası GeneSpring yazılımı kullanılarak yapılan analizde 74809 prob noktası bulundu. Bu noktalardan eksenatid uygulanan hücreler ile kontrol hücreler kıyaslandığında 1411 aşağı regüle ve 2061 yukarı regüle anlamlı değişiklik bulundu. Bunların 40 tanesi analiz edilen tüm numunelerden önemli ölçüde değiştiği, 20 tanesinin aşağı regülasyonlu ve 20 tanesinin yukarı regülasyonlu olduğu bulundu ve gen ekspresyon değişiklikleri Şekil 1'de verildi. Mikrodizi sonuçlarına göre, en çok aşağı regüle edilen beş gen CCK, CSF3, SPRR2E, MMP10 ve CELSR1 ve en yukarı regüle edilen beş gen ise sırasıyla OGN, OAS1G, APOD, THRSP ve RSAD2'dir.

Lipojenik dokulardaki THRSP gen ekspresyonu ve protein seviyeleri tiroid hormonu, insülin ve glikoz ile güçlü bir şekilde bağlantılı olan spesifik bir faktördür. THRSP geni obez bireylerde zayıf bireyler ile karşılaştırıldığında daha az ifade edilir (Ortega ve ark., 2010; Chen ve ark., 2019). Mikrodizin çalışması sonucunda elde ettiğimiz bulgularda eksenatid ile tedavi sonucunda kontrol adiposit hücrelerine göre gen anlatım seviyesi artmıştır. Bu sonuç eksenatidin etki mekanizmalarından birinin THRSP üzerinden obeziteyi tedavi ettiğini gösterebilir.





**Şekil 1.** 3D 3T3-L1 kontrol adiposit ve eksenatid uygulanmış 3D 3T3-L1 adiposit hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilmiş genlerin hiyerarşik kümeleme analizi. Kontrol (n=2) ve eksenatid uygulanmış adiposit (n=2) hücreleri farklı şekilde eksprese edilmiş. Kırmızı ve yeşil renk, sırasıyla yukarı ve aşağı düzenlenmiş transkriptleri gösterir.

**Çizelge 1.** Eksenatid uygulanmış 3D 3T3-L1 adiposit hücrelerinin kontrol hücrelerle kıyaslandığında anlamlı derecede farklı bulunmuş aşağı regüle problemler, değişim katsayıları, ilgili genler

	Değişim Katsayısı (Fold Change)	Gen Sembolü	Gen Adı
A_55_P1977431	-58.06789	Cck	cholecystokinin
A_51_P317176	-40.383533	Csf3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
A_55_P2109569	-34.620014	Sprp2e	small proline-rich protein 2E
A_51_P120830	-34.21705	Mmp10	matrix metalloproteinase 10
A_51_P440743	-32.84106	Celsr1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
A_65_P13459	-30.49064	Cd300lb	CD300 molecule like family member B
A_55_P1989653	-30.138548	Slco4a1	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1
A_51_P397437	-30.070122	Prss46	protease, serine 46
A_52_P75777	-25.827394	Lgr6	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6
A_55_P1967325	-23.883871	Tafa5	TAFI chemokine like family member 5
A_51_P504815	-23.12242	Stfa3	stefin A3
A_52_P203440	-21.03211	U90926	cDNA sequence U90926
A_66_P128210	-18.410847	1600019K03	RIKEN cDNA 1600019K03 gene
		Rik	
A_52_P161488	-16.916111	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e
A_65_P14247	-16.069529	Il18rap	interleukin 18 receptor accessory protein
A_55_P2014555	-14.954309	Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor
A_51_P185688	-14.937267	Mmp1a	matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)
A_65_P03926	-14.642097	Etv1	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630029O05 product:hypothetical protein
A_55_P2038217	-14.636051	Atp13a4	ATPase type 13A4
A_51_P107752	-14.615738	Nav2	neuron navigator 2

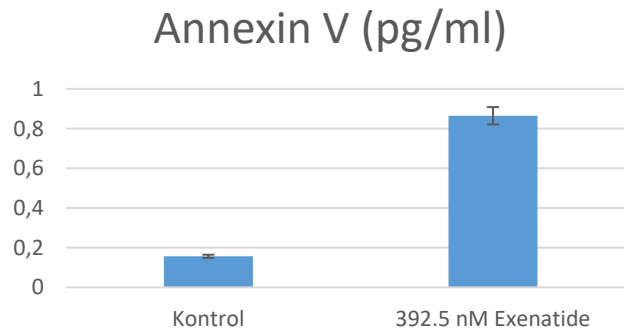
**Çizelge 2.** Eksenatid uygulanmış 3D 3T3-L1 adiposit hücrelerinin kontrol hücrelerle kıyaslandığında anlamlı derecede farklı bulunmuş yukarı regüle problemler, değişim katsayıları, ilgili genler

Prob Adı	Değişim Katsayısı (Fold Change)	Gen Sembolü	Gen Adı
A_51_P295085	51.260113	Ogn	osteoglycin
A_66_P105132	49.947323	Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G
A_51_P366811	38.33023	Apod	apolipoprotein D
A_51_P194099	34.443268	Thrsp	thyroid hormone responsive
A_55_P2093286	33.73982	Apod	apolipoprotein D
A_51_P505132	30.056627	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
A_55_P1972872	27.289303	Ifit3b	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3B
A_66_P120667	26.601332	Gm46558	predicted gene, 46558
A_51_P459477	25.463867	Col11a1	collagen, type XI, alpha 1
A_51_P441426	24.95545	Pf4	platelet factor 4
A_52_P507877	24.482927	Col11a1	collagen, type XI, alpha 1
A_66_P139683	24.392183	Zbp1	Z-DNA binding protein 1
A_55_P2903297	24.337261	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript
A_55_P2062246	23.931868	Tgtp2	T cell specific GTPase 2
A_55_P2018666	22.737516	Thrsp	thyroid hormone responsive
A_66_P121110	22.097113	Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
A_51_P389265	21.98632	Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3
A_55_P2019719	21.640148	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2
A_52_P412585	20.534498	Ear1	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 1
A_55_P1966838	20.322218	Xaf1	XIAP associated factor 1 (Xaf1)

### Apoptoz analizi

3D adiposit hücrelerine 48 saat 392.5 nM eksenatid uygulaması, kontrol adiposit hücreleri ile karşılaştırıldığında ilaç uygulanan gruplar istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0.001) (Şekil 2).

Obezite tedavisi için ilaç geliştirilmesinin zorluğu kanıtlanmıştır. Kilo vermek için mevcut ilaç stratejilerinin birçok yan etkisi vardır, bu nedenle acilen yeni tedavilere ihtiyaç vardır. Yağ kaybı, apoptoz yoluyla adipositlerin boyutunda ve sayısında bir azalma sağlayabilir. Apoptoz indüksiyonu, obez hastalarda adipositleri uzaklaştırmanın makul bir yoludur. Adiposit apoptozunun indüklenmesinde birçok adipokin ve doğal ürünün rol oynadığı bildirilmektedir (Zhang ve Huang, 2012). Bu nedenle, adipositlerde apoptoz indüksiyonu, adiposit sayısını azaltmak için çekici bir yöntem olabilir. 48 saat 392.5 nM eksenatid uygulanan 3D adiposit hücreleri ile 3D kontrol adiposit hücrelerindeki apoptoz seviyeleri karşılaştırıldığında, eksenatid uygulanan grupta toplam apoptoz arttı. Bu sonuçlar, eksenatidin adiposit hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir.



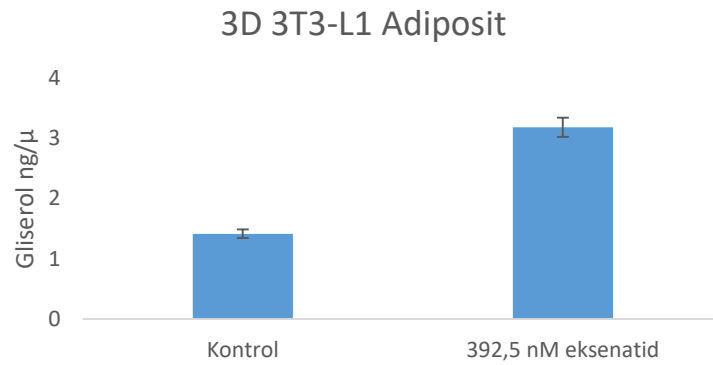
**Şekil 2.** 3D 3T3-L1 adiposit hücrelerinde 392.5 nM sonucunda anneksin V seviyeleri

### Eksenatidin lipoliz üzerindeki etkileri

Eksenatidin adiposit fonksiyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için, 3D 3T3-L1 adipositlerine 392.5 nM eksenatid eklendi ve 48 saat inkübe edildi. Eksenatid uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında 3D (Şekil 3) hücre kültürü ortamlarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

( $p=0.000$ ). 3 boyutlu adipositlere 392.5 nM eksenatid uygulaması sonucunda kontrole kıyasla lipoliz miktarı yaklaşık 2 kat artmıştır. Farklılaşmış 3D olgun adipositlerde GLP-1RA önemli bir lipolitik etki gösterdi (Şekil 3).

Vendrell ve ark. (2011) GLP-1 reseptörünün obezite ve insülin direnci ile ilişkisini araştırdıkları çalışmada, GLP-1 uygulamasının 3T3-L1 adiposit hücrelerinde ortama gliserol salınımı ile ölçülen lipolizde önemli bir artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bizde çalışmamızda 3D 3T3-L1 adipositlerine uyguladığımız ilaç dozları ile kontrol adiposit hücreleri karşılaştırıldığında ölçülen lipoliz oranında anlamlı bir artış tespit ettik. Elde edilen bu sonuçlar, eksenatidin adiposit hücrelerinde kilo kaybına yol açan lipolitik bir etki meydana getirdiğini göstermektedir.



**Şekil 3.** 3D 3T3-L1 adiposit hücrelerinde 392.5 nM eksenatid uygulaması sonucunda lipoliz miktarı

## SONUÇ

Bu bulgular, metabolik bozuklukların moleküler mekanizmaları ve bu bozukluklar için risk biyobelirteçlerine dair ipuçları sağlayan 3D adiposit hücreleri ve kontrol gruplarının transkriptomları arasındaki önemli farklılıkları ortaya koymaktadır. Apoptoz sonuçlarımız 3D adipositlere eksenatid uygulamasının apoptozu arttırdığını ve obeziteyi adiposit apoptozu üzerinden de tedavi ettiğini gösterebilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından “220S827” kodlu proje ile desteklenmiştir. Bioink üretimi ile ilgili geri bildirimleri ve tavsiyeleri için Bugamed Teknoloji’ye (Türkiye) teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Blüher M, 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5): 288.
- Buse JB, Drucker DJ, Taylor KL, Kim T, Walsh B, Hu H, Wilhelm K, Trautmann M, Shen LZ, Porter LE, DURATION-1 Study Group, 2010. DURATION-1 Study Group. DURATION-1: exenatide once weekly produces sustained glyceemic control and weight loss over 52 weeks. *Diabetes Care*, 33:1255–1261.
- Caballero B, 2007. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. *Epidemiologic Reviews*, 29(1): 1-5.
- Chen YT, Tseng PH, Tseng FY, Chi YC, Han DS, Yang WS, 2019. The serum level of a novel lipogenic protein Spot 14 was reduced in metabolic syndrome. *Plos one*, 14(2): e0212341.
- Chooi YC, Ding C, Magkos F, 2019. The epidemiology of obesity. *Metabolism*, 92: 6-10.



- Drucker DJ, Habener JF, Holst JJ, 2017. Discovery, characterization, and clinical development of the glucagonlike peptides. *J Clin Invest*, 127: 4217-4227.
- Drucker DJ, Nauck MA, 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, 368: 1696-1705.
- Drucker DJ, Yusta B, 2014. Physiology and pharmacology of the enteroendocrine hormone glucagon-like peptide. *Annu Rev Physiol*, 76: 561-583.
- Gariani K, Ryu D, Menzies KJ, Yi HS, Stein S, Zhang H, Perino A, Lemos V, Katsyuba E, Jha P, Vijgen S, Rubbia-Brandt L, Kim YK, Kim JT, Kim KS, Shong M, Schoonjans K, Auwerx J, 2017. Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 66(1): 132-141.
- Graham AD, Pandey R, Tsancheva VS, Candeo A, Botchway SW, Allan AJ, Teboul L, Madi K, Babra TS, Zolkiewski LAK, Xue X, Bentley L, Gannon J, Olof SN, Cox RD, 2020. The development of a high throughput drug-responsive model of white adipose tissue comprising adipogenic 3T3-L1 cells in a 3D matrix. *Biofabrication*, 12(1): 015018.
- Hanefeld M, Köhler C, 2002. The metabolic syndrome and its epidemiologic dimensions in historical perspective. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich*, 96(3): 183-188.
- Ivezić-Lalić D, Marković BB, Kranjčević K, Kern J, Vrdoljak D, Vučak J, 2013. Diversity of metabolic syndrome criteria in association with cardiovascular diseases—a family medicine-based investigation. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 19: 571.
- Koldemir Gündüz, M, 2022. BGM, a Newly Synthesised Boron Compound, Induces Apoptosis and Reduces Oxidative Stress by Inhibiting Lipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes via PPAR $\gamma$  and CTRP3. *Biological Trace Element Research*, 1-10.
- Lefterova MI, Haakonsson AK, LazarMA, Mandrup S, 2014. PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol. Metab*, 25: 293–302.
- Lillie RD, Ashburn LL, 1943. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique *Archs.Path.*, 36:432.
- Lim SH, Lee HS, Han HK, Choi CI, 2021. Saikosaponin A and D Inhibit Adipogenesis via the AMPK and MAPK Signaling Pathways in 3T3-L1 Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 11409.
- Masa JF, Pépin JL, Borel JC, Mokhlesi B, Murphy PB, Sánchez-Quiroga MÁ., 2019. Obesity hypoventilation syndrome. *European Respiratory Review*, 28(151): 180097.
- Ortega FJ, Vazquez-Martin A, Moreno-Navarrete JM, Bassols J, Rodriguez-Hermosa J, Gironés J, Ricart W, Peral B, Tinahones FJ, Fruhbeck G, Menendez JA, Fernández-Real JM, 2010. Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects. *International Journal of Obesity*, 34(3): 487-499.
- Parratte S, Pesenti S, Argenson JN, 2014. Obesity in orthopedics and trauma surgery. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 100(1): 91-97.
- Prentice AM, Hennig BJ, Fulford AJ, 2008. Evolutionary origins of the obesity epidemic: Natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? *International Journal of Obesity*, 32(11): 1607-1610.
- Rosenstock J, Klaff LJ, Schwartz S, Northrup J, Holcombe JH, Wilhelm K, Trautmann M, 2010. Effects of exenatide and lifestyle modification on body weight and glucose tolerance in obese subjects with and without pre-diabetes. *Diabetes Care*, 33:1173–1175.
- Schmidt H, Bechtold-Dalla Pozza S, Bonfig W, Schwarz HP, Dokoupil K, 2008. Successful early dietary intervention avoids obesity in patients with Prader-Willi syndrome: a ten-year follow-up. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 21(7): 651-656.
- Serrero G, Khoo JC, 1982. An in vitro model to study adipose differentiation in serum-free medium *Anal. Biochem.*, 120: 351–359.
- Vendrell J, Bekay ER, Peral B, García-Fuentes E, Megia A, Macias-Gonzalez M, Fernández Real J, Jimenez-Gomez Y, Escoté X, Pachón G, Simó R, Selva DM, Malagón MM, Tinahones FJ, 2011. Study of the Potential Association of Adipose Tissue GLP-1 Receptor with Obesity and Insulin Resistance. *Endocrinology*, 152(11): 4072–4079.
- Yerlikaya A, Okur E, Şeker S, Erin N, 2010. Combined effects of the proteasome inhibitor bortezomib and Hsp70 inhibitors on the B16F10 melanoma cell line. *Mol Med Rep*, 3: 333–339.
- Zeggini E, Gloyn AL, Barton AC, Wain LV, 2019. Translational genomics and precision medicine: moving from the lab to the clinic. *Science*, 365: 1409–1413.
- Zhang Y, Huang C, 2012. Targeting adipocyte apoptosis: A novel strategy for obesity therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417: 1–4.