

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2019;12(2):257-270

doi: 10.26559/mersinsbd.538541

Bakteriyel lipopolisakkaridin preadiposit diferensiyasyonu üzerine etkisi: NO'nun ve Rho-kinaz enziminin olası katkısı

Ahmet Sencer Yurtsever¹, Kansu Büyükafşar²

¹ Mersin Şehir Hastanesi Acil Servis, Mersin, Türkiye

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D., Mersin, Türkiye

Öz

Amaç: Preadipositlerin diferensiyasyonu adipogenezis için önemli basamaklardan biridir. Adipogenezis, düşük düzeyde inflamasyonun eşlik ettiği ve pek çok komplikasyonu olan metabolik bir hastalıktır. Bu çalışmamızda, inflamatuvar yanıt oluşturan bakteriyel endotoksinlerden LPS'nin 3T3-L1 hücrelerinde diferensiyasyon üzerine etkisini ve bu etkiye NO ve Rho/ROCK yolağının katkısını araştırmayı amaçladık. **Yöntem:** Preadipositlerin adipositlere diferensiyasyonu için fibroblast kökenli 3T3-L1 hücreleri kullanıldı. 24 kuyucuklu pleytlere 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve standart preadiposit diferensiyasyon protokolü uygulandı. Diferensiyasyonun indüklenmesi için protokolün 0-2. günü 0.25 µM deksametazon, 0.5mM izobutilmetilksantin ve 1µM insülin içeren %10FBS/DMEM uygulandı. Protokolün 2-4. günleri 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM uygulandı. 4-8. gün ise kuyucuklara sadece %10 FBS/DMEM konuldu. İnkübasyon 8. güne kadar sürdürüldü. Diferensiyasyon protokolünün belirli zaman noktalarında (0-2, 2-4, 4-8, 0-8. günler) bakteriyel LPS (10-100 ng/ml), L-NAME (2-5x10⁻⁴ M) varlığında ya da yokluğunda uygulandı. Diferensiyasyon, 8'inci günde Oil Red-O boyaması ile değerlendirildi. LPS'nin iNOS ve Rho/Rho-kinaz ekspresyonları üzerine etkileri de Western-blot analizi ile değerlendirildi. Ayrıca, kültür ortamında nitrit düzeyleri, LPS ve L-NAME varlığında Griess yöntemi ile ölçüldü. **Bulgular:** LPS uygulaması, 0-2. gün dışındaki zaman aralıklarında diferensiyasyonu anlamlı bir şekilde baskıladı. L-NAME ön uygulaması, bu süpresyonu ortadan kaldırmadı ancak tek başına L-NAME, 0-2. gün dışında tüm zaman aralıklarında diferensiyasyonu süprese etti. LPS hem iNOS hem de ROCK-2 ekspresyonunu arttırdı. LPS'nin ROCK ekspresyonunu arttırıcı etkisi L-NAME tarafından değiştirilmedi. L-NAME tek başına uygulandığında LPS'ye benzer şekilde ROCK-2 ekspresyonunu arttırdı. **Sonuç:** Bir bakteriyel endotoksin olan LPS, 3T3-L1 hücrelerinde diferensiyasyonu baskılamaktadır. Bu etkiye NO değil ancak onun dışındaki bir inflamatuvar mediyatör(ler) aracılık edebilir. Ayrıca LPS, Rho/ROCK bağımlı bir mekanizma ile preadiposit diferensiyasyonunu süprese edebilir.

Anahtar sözcükler: Adiposit, diferensiyasyon, LPS, NO, Rho-kinaz

Yazının geliş tarihi:12.03.2019

Yazının kabul tarihi:05.04.2019

Sorumlu Yazar: Ahmet Sencer Yurtsever, Mersin Şehir Hastanesi Acil Servis, Adres:

Korukent Mh. 96015 Sk. Mersin Entegre Sağlık Kampüsü 33240 Toroslar/Mersin

Tel: 0 3242251000/4337, e-posta: drasencer@gmail.com

Effect of the bacterial lipopolysaccharide on preadipocyte differentiation: possible contribution of the NO and Rho-kinase

Abstract

Aim: Differentiation of preadipocytes is one of important steps for the adipogenesis. Adipogenesis is a metabolic disorder that accompanied by low grade inflammation and posses a lot of complications. We aimed to investigate effect of the LPS which one of the inflammatory response generating endotoxins on differentiation of 3T3-L1 cells and contribution of NO and Rho/ROCK pathways to this effect. **Method:** Fibroblast origin 3T3-L1 cells used for the differentiation of preadipocytes to adipocytes. Seeding was performed as 20000 cells on the every well of 24well plates and standard preadipocyte differentiation protocol was applied. In order to inducing differentiation, 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM izobuthylmethylxhantine and 1 μ M insulin containing 10% FBS/DMEM treated at 0-2th days. Cells treated with 10% FBS/DMEM containing 1 μ M insulin on 2-4th days of the protocol. 10% FBS/DMEM alone applied to wells at 4-8th days. Incubation was maintained until 8th day. LPS (10, 100 ng/ml) treatment was performed with or without L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester, 2 and 5x10⁻⁴ M) on certain time points (0-2, 2-4, 4-8, 0-8th days) of the differentiation protocol. Differentiation evaluated with Oil Red-O staining method performed at 8th day. Effect of the LPS on iNOS and Rho/Rho-kinase enzyme expressions was evaluated with Western Blot analysis. Besides nitrite levels in cell culture media was measured with Griess method on the presence of LPS and L-NAME. **Results:** LPS treatment on 3T3-L1 cell culture is significantly suppressed the differentiation time points except 0-2th days. In spite of the pretreatment of the cells with L-NAME did not any effect on the differentiation suppression produced by LPS, L-NAME treatment significantly suppressing the differentiation every time points except 0-2th days. LPS increased both iNOS and ROCK-2 expression. ROCK expression increasing effect of the LPS did not changed by the L-NAME treatment. When treated alone, L-NAME increased the ROCK-2 expression in a similar vein. **Conclusion:** LPS which is bacterial endotoxin, suppressed the differentiation of 3T3-L1 cells. This effect could mediated by inflammatory mediator(s) other than NO. Besides, LPS could suppressed the preadipocyte differentiation by a Rho/ROCK dependent mechanism.

Keywords: Adipocyte, differentiation, LPS, NO, Rho-kinase

Giriş

Evrimsel olarak kıtlık dönemlerinde insanın hayatta kalmasına yardımcı bir mekanizma olan ve alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması durumunda fazla enerjinin lipid depolarda depolanması sonucu oluşan obezite, son dönemde en önde gelen küresel sağlık sorunu haline gelmiştir.^{1,2} Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya genelinde fazla kilolu insan sayısı 1.9 milyar ve bunların da 600 milyonu obezdir. Obezite prevalansı 1980-2014 yılları arasında 2 kattan fazla artmıştır.³ Obezite, beklenen yaşam süresini kısaltan en önemli etkenlerden birisidir (kadınlar için 5.8 yıl, erkekler için 7.1 yıl).^{4,5} Amerika Birleşik Devletleri'nde her üç yetişkinden ikisi fazla kilolu ya da obez ve 20 yetişkinden birisi de aşırı obezdir.⁶

Obez kemirgenlerde yağ dokudan TNF- α (tümör nekroz faktör- α) salındığı⁷ ve bu adipokinin nötralize edilmesinin insülin direncini düzelttiğinin bulunması⁸ ile birlikte obezitenin inflamatuvar boyutu olabileceği düşünülmeye başlanmıştır. Buna ek olarak, yağ dokudan kaynaklanan düşük düzeyli kronik inflamasyonun insülin direnci ve metabolik sendroma yol açtığı gösterilmiştir.⁹ Sağlıklı erişkinlerde yağ dokusunda bulunan makrofajların yüzdesi %10 civarındayken, bu oran obez bireylerde %40-50'ye kadar çıkabilir.¹⁰

HücreSEL düzeyde değerlendirildiğinde obezitenin mekanizmalarından birisi var olan adipositlerin hacimlerinin artışına ek olarak yağ dokusu stromal vasküler fraksiyonundaki mezenşimal hücrelerin

diferensiye olarak olgun adipositlere dönüşümüdür.¹¹ Preadipositlerin diferensiyasyon sürecine karışan mekanizmaların net olarak ortaya konması, diferensiyasyonun inhibe edilerek vücuttaki adiposit sayısının sınırlandırılmasına yardımcı olabilecek yeni yaklaşımlar geliştirilmesini olası kılacaktır.

Adiposit diferensiyasyonu ile ilgili çalışmalarda kullanılmakta olan hücre hatlarından 3T3-L1 hücreleri en kapsamlı şekilde tanımlanmış ve adipositlerle ilgili diferensiyasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan hücrelerdendir.¹² 3T3-L1 hücreleri uygun diferensiyasyon indükleyicileri ile standardize bir diferensiyasyon sürecinin ardından yapısal ve biyokimyasal olarak in situ adiposit benzeri homojen olgun adiposit hücre popülasyonu oluşturmaları nedeni ile tercih edilmektedir.¹³

NO üç farklı NO sentaz (NOS) izoformu tarafından sentezlenir. Nöronal NOS (nNOS, NOS1) ve endotelial NOS (eNOS, NOS3) yapısal ve intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonlarını arttıran uyarılardan sonra pikomolar düzeyde NO üretirler. İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS2) Ca^{2+} 'dan bağımsızdır; sitokinler ve bakteriyel LPS gibi etkenlerce indüksiyon sonrası makrofajlar ve diğer birçok çekirdekli hücreler tarafından eksprese edilir.¹⁴ iNOS indüklendiğinde yapısal NOS izoformlarına göre çok daha büyük miktarda ve daha uzun süreli NO salınımına neden olur.¹⁵ LPS, interferon-gamma (IFN- γ), TNF- α , interleukin-1 (IL-1) gibi uyaranlara karşı konağın bir savunma cevabı olarak yüksek miktarlarda eksprese edilmektedir.

Visseral obezitede saptanan düşük dereceli kronik inflamasyonun iNOS enziminin indüksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir.¹⁶ Ayrıca endotoksemi sırasında iNOS ekspresyonunun ana kaynağının yağ dokusu olduğu bildirilmiştir.¹⁷

Bununla birlikte, adiposit diferensiyasyonu üzerine NO etkileri ile ilgili sonuçlar tartışmalıdır. NO'in primer sıçan kahverengi yağ doku preadipositlerinin ve sıçan beyaz yağ doku preadipositlerinin diferensiyasyonunu stimüle ettiği¹⁸, 3T3-L1 preadipositlerinde ise diferensiyasyonu süprese ettiği gösterilmiştir.¹⁹ Ayrıca, iNOS

enziminin kronik inflamasyonda adipogenezisi stimüle ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra NO'in lipolizi stimüle ettiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.^{20,21}

Fazla yağlı diyet ile beslenmenin barsaktaki gram (-) bakterilerden köken alan LPS kan düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir.²² Bu tarz beslenme bağırsakta mukozal inflamasyona ve sonucunda permeabilite artışına neden olarak LPS'nin emiliminde artışa ve sonuçta metabolik endotoksemi denilen duruma yol açmaktadır.²³ Metabolik endotoksemi sağlıklı bireylerde LPS kan düzeylerinin 2-3 kat fazla olması ile karakterizedir.^{24,25} LPS'nin hem makrofajların M2 fenotipinden M1 fenotipine geçişi ile hem de kaspaz 4/5/11 aktivasyonu ve sonuçta piroptoz denilen inflamatuvar apoptotik bir sürece yol açarak obezitedeki düşük düzeyli kronik inflamasyona katıldığı ve metabolik sendrom ve insülin direnci ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür.²²

Bunun yanı sıra iNOS indüksiyonu yaptığı birçok çalışma ile ortaya konmuş olan LPS, NF- κ B yolağını da aktive ederek inflamasyonda önemli rol oynamaktadır.²⁶ RAW264.7 kemirgen makrofaj hücrelerinde LPS'nin NF- κ B yolağını aktive ederek iNOS indüksiyonu yaptığı gösterilmiştir.²⁷ Bununla birlikte, LPS tarafından yapılan NF- κ B indüksiyonu için Rho proteinlerinin kritik önemde olduğu gösterilmiştir.²⁸ Bir başka çalışmada LPS'nin rat mezenterik arterlerinde RhoA'nın alt efektörlerinden ROCK-2'nin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.²⁹ Kardiyovasküler sistemde vazodilatör, antiagregan ve antiproliferatif etkili NO ile vazokonstriksiyon ve vasküler düz kas proliferasyonuna karışan Rho/Rho-kinaz yolağı arasında antagonistik ilişki olduğu düşünülmekle beraber, diğer hücre ve dokularda bu antagonistik ilişkiyi düşündürmekten ziyade farklı yorumlanabilecek sonuçlar da ortaya konulmuş olması^{30,31} halen NO ve Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkinin tam olarak aydınlatılmadığını düşündürmektedir. Örneğin endotoksemi, kronik inflamasyon ve diyabet gibi patolojik şartlarda yüksek konsantrasyonlarda salıverilen NO ile Rho/Rho-kinaz yolağı arasındaki ilişkinin detayları çok net bilinmemektedir.

AGC ailesi üyesi bir serin/treonin protein kinaz olan Rho-kinaz'ın (ROCK) başlıca iki izoformu bulunmaktadır: ROK β /Rho-kinaz β / p160ROCK olarak bilinen ROCK 1 ve ROK α /Rho-kinaz α olarak bilinen ROCK-2.³² Her iki izoform birçok dokuda yaygın olarak eksprese edilse de olgun adipositlerde ROCK-2'nin eksprese edildiği gösterilmiştir.³³ 3T3-L1 preadipositlerinde yapılan bir çalışmada non selektif ROCK inhibitörü Y-27632 uygulamasının adipogenez arttırdığı bulunmuştur. Buna ek olarak Y-27632, RhoA aktivatörü lizofosfatidik asit tarafından oluşturulan adipogenez inhibisyonunu ortadan kaldırmıştır.³⁴ Ancak ilginç olarak farelerde fazla yağlı diyetle beslenmenin Rho-kinaz aktivitesini arttığının gösterilmesi, metabolik endotoksemide gözlenen LPS düzeylerindeki artış ile birlikte yorumlandığında LPS'nin Rho-kinaz üzerinden etki gösteriyor olabileceğini akla getirmektedir.

Bu nedenle, bu çalışmanın amacı inflamatuvar yanıt oluşturan bakteriyel endotoksinlerden LPS'nin 3T3-L1 hücrelerinde diferensiyasyon üzerine etkisini incelemektir. Ayrıca eğer varsa bu etkiye NO ve Rho/ROCK yolağının katkısını araştırmaktır. Bu amaçla, preadiposit bir hücre hattı olan 3T3-L1 hücrelerinde LPS'nin diferensiyasyona olan etkisi incelendi. Ayrıca iNOS ve Rho-kinaz enzim düzeyleri western blot analizi ile, kültür ortamındaki nitrit düzeyleri de Griess yöntemi ile değerlendirildi.

Yöntem

Bu çalışma için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (04.12.2008 tarih, 2008/39 sayı) onayı alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları

Adiposit diferensiyasyonu ile ilgili olarak yapılan bu çalışmada Amerikan Tıp Hücre Koleksiyonundan (ATCC-CL-173) 1 ml vial içerisinde dondurulmuş olarak satın alınan 3T3-L1 hücre hattı kullanıldı. 3T3-L1 hücreleri 37°C'de sıcak su banyosu içerisinde 1-2 dk. içerisinde çözdürüldü ve ardından 15 ml hacmindeki tüpe alınarak üzerine üreticinin talimatlarına uygun olarak hazırlanan ve 37°C sıcaklıktaki komplete

medyum [%10 buzağı serumu, %1 glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum (DMEM)] konulup 15 ml'ye tamamlandı. Ardından, 37°C sıcaklıkta 1800 g'de 10 dakika süresince santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant döküldü. Alttaki pelletin üzerine 4-6 ml hacminde komplete medyum eklenip pipetaj yapılarak hücrelerin homojen bir şekilde karışması sağlandı. Ardından hücreler içinde 4 ml komplete medyum bulunan 25 ml hacmindeki flaslara ekim yapılarak inkübatöre kaldırıldı. CO₂ konsantrasyonu %5 olan inkübatörde 37°C ortam sıcaklığındaki 25 ml flask içerisinde pH değeri 7.0-7.4 olan %10 FBS, %1 Penisilin, %1 Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren DMEM içerisinde pasajlandı.

Inkübatördeki hücrelerin medyumunu gün aşırı değiştirildi. Bu esnada flaslaklar inverted mikroskopta incelenerek hücre yoğunluğu değerlendirildi. Hücrelerin yoğunluğu flask tabanının %70-80'ine ulaştığında pasajlama yapıldı. Flaslaklar PBS tamponu ile yıkanıp üzerine 1-1.5 ml kadar tripsin eklenerek beş dakika süre ile 37°C inkübatörde inkübe edildi. Beş dakika sonra flaslaklar inverted mikroskopta incelenerek hücrelerin flask tabanından tümüyle ayrıldığından emin olunduktan sonra pipetaj yapılarak hücreler 15 ml'lik tüpe aktarıldı. Tüpteki hücrelerin üzeri PBS tamponu ile 13-14 ml hacme tamamlandı ve 37°C sıcaklıkta 1800 g'de 10 dk. süresince santrifüjlendi. Santrifüjden alınan tüpteki süpernatant döküldü ve dipteki pelletin üzeri komplete medyum ile tamamlandı ve 1:3 oranında pasaj yapıldı. Pasajlama sonrası flaslaklardaki hücrelerin medyumları gün aşırı değiştirildi. Hücreler %70-80 konfluent olduklarında tripsinizasyon yapılarak pasajlandı. Pasajlama sırasında diferensiyasyon deneyleri için gereken miktar dışındaki hücreler 1 ml hacminde viallerde -80°C derin dondurucuda saklandı.

3T3-L1 preadiposit diferensiyasyon protokolü

Hücre sayımının ardından 24 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Her bir kuyucuktaki hücre süspansiyonları komplete medyum [%10 buzağı serumu (calf serum /CS), %1 Penisilin/streptomisin ve %1 glutamin içeren DMEM] ile 1 ml hacme

tamamlandı. Medyum değişimi gūnaşırı yapıldı. Flasklardaki hücrelerin yoğunluğu inverted mikroskopta izlendi. Hücrelerin tam konfluent oldukları gün -2. gün kabul edildi. Hücreler buzağı serumu içeren komplete medyumda 2 gün daha bekletildi. Postkonfluent 2. gün diferensiyasyon protokolünün 0. günü olarak kabul edildi. Deney protokolünün 0-2. günü adiposit diferensiyasyonunun indüklenmesi için kuyucuklardaki hücrelere 0.25 µM deksametazon, 0.5 mM IBMX ve 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM uygulandı. 2 gün sonra kuyucuklardaki hücrelere 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM uygulandı (2-4. gün). Deney protokolünün 4. günü kuyucuklara %10 FBS içeren komplete medyum konuldu. Gūnaşırı medyum değişimi yapılarak inkübasyon 8. güne kadar sürdürüldü (4-8. gün). Diferensiyasyon protokolünün 8. gününde deney sonlandırılarak kuyucuklardaki hücrelere Oil Red-O boyama yapılarak adiposit diferensiyasyonu değerlendirildi.

Oil Red-O çalışma solüsyonunun hazırlanması

0.7 gr Oil Red-O 200 ml izopropanol içerisinde çözüldü. 1 gece +4°C sıcaklıkta bekletildi. Ertesi gün 0.22 µm membran filtresinden geçirildi ve +4°C'de bekletildi. Oil Red-O stok solüsyonu kullanılacağı zaman 6 birim stok solüsyon 4 birim dH₂O ile karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında bekletilip 0.22 µm membran filtresinden geçirilerek kullanıldı.

Oil Red-O boyama ile adiposit diferensiyasyonunun değerlendirilmesi

Adiposit diferensiyasyon protokolünün 8. gününde deney sonlandırıldı. Kuyucuklardaki medyum boşaltılıp %10'luk formalin eklenerek beş dakika bekletildi. Ardından kuyucuklardaki formalin taze formalin ile değiştirildi. Hücreler oda sıcaklığında formalin içerisinde bir saat inkübe edildi. Kuyucuklardaki formalin boşaltılıp kuyucuklar %60'luk izopropanol ile yıkandı. Yıkamadan sonra kuyucuklar dikkatlice boşaltılarak pleytler iyice kurutuldu. Her kuyucuğa 200 µl Oil Red-O çalışma solüsyonu konuldu ve 10 dakika inkübe edildi. Ardından Oil Red-O solüsyonu hızlıca boşaltılarak kuyucuklar dört kez dH₂O ile yıkandı. Bu aşamada

pleytler inverted mikroskopta görüntüledi. Ardından kuyucuklar boşaltılarak iyice kurutuldu. Boyanmış hücrelerden Oil Red-O solüsyonunu açığa çıkarmak için kuyucuklara %100 izopropanol konuldu. Pleytler 10 dakika süresince döner çalkalayıcıda 1000 rpm hızda, oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde birkaç kez pipetaj yapılarak her kuyucuktan 200 µl 96'lık eliza pleytlerine aktarıldı. ELISA okuyucu cihazda 490 nm optik adsorbansta ölçüm yapıldı.

Western Blot yöntemi

3T3-L1 hücrelerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklar bir kez dikkatlice PBS ile yıkanarak flasklara RIPA lizis tamponu (25mM Tris•HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodyum deoksikolat, %0.1 SDS) eklenerek +4°C'de beş dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kazıma yapılarak elde edilen homojenatlar 1 ml'lik viallerde 200 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi. Ardından süpernatant alındı. Her tüpteki süpernatanttan 10 µl alınarak Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı. Her kuyucukta 150 µl protein olacak şekilde poliakrilamid jeldeki kuyucuklara yüklenerek elektroforez yapıldı. Ardından gece boyunca +4°C sıcaklıkta blotlama yapılarak poliakrilamid jeldeki bantların PVDF membrana transferi gerçekleştirildi. Membranlar %2'lik Tween-20 ve yağsız süt tozu içeren Tris solüsyonu (TBS-T) ile dairesel çalkalayıcıda düşük hızda çalkalanarak bir saat bloklandı. ROCK-2 primer antikoru (1:500) ile +4°C sıcaklıkta dairesel çalkalayıcıda düşük hızda iki saat inkübe edildi. Ardından membranlar TBS-T solüsyonu ile üç defa 10'ar dakika yıkanarak bağlanmamış primer antikor uzaklaştırıldı. Membranlar HRP (horseradish peroxidase) bağlı sekonder antikor (1:2.000) ile bir saat inkübe edildi. Ardından membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı ve karanlık odada ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit görüntüleme solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde görüntüleme solüsyonu alınarak membranlar karanlık odada medikal röntgen filme basılarak görüntüledi.

Nitrit ölçümü:

Griess metodu ile nitrit ölçümü için bir eliza pleytinin yan yana ilk iki kuyucuğuna 200 µl 1x reajan dilüenti eklendi. Ardından 50µl nitrit standardı 1-7 yan yana kuyucuklara duplike olarak eklendi. 50µl 1x reajan dilüenti sıfır standart olarak yan yana iki kuyucuğa eklendi ve sırayla kuyucuklara 50 µl örnek eklendi. Blank kuyucukları dışındaki tüm kuyucuklara 50 µl Griess reajanı I eklendi. Ardından blank dışındaki tüm kuyucuklara 50 µl Griess reajanı II eklendi ve iyice karıştırıldı. Pleyt oda sıcaklığında 10 dakika süresince inkübe edildi ve eliza okuyucuda 540 nm dalga boyunda absorbanası ölçüldü.

İstatistiksel analiz

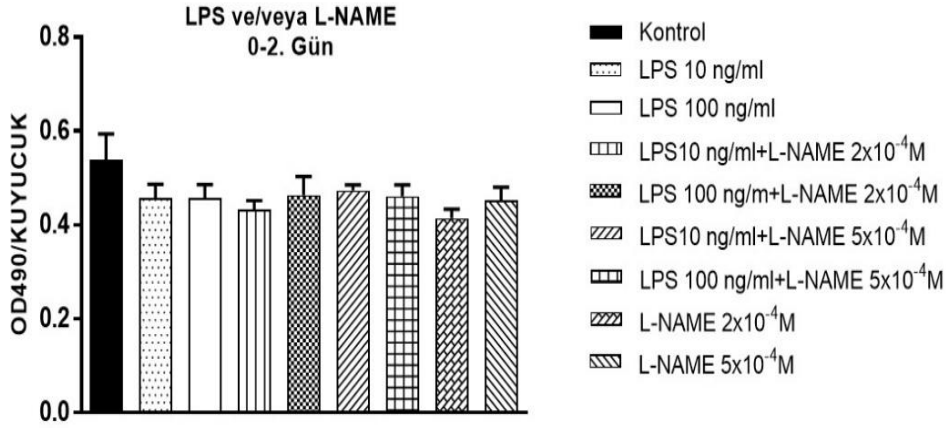
Diferensiyasyon kolorimetrik olarak değerlendirildi ve veriler ortalama \pm

standart hata olarak ifade edildi. Western Blot tekniği ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programından faydalandı. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA'yı takiben Dunnet veya Bonferroni post-hoc testi kullanıldı. $p<0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

Bulgular

1. LPS, L-NAME ve bunların kombinasyonunun diferensiyasyon üzerine etkisi

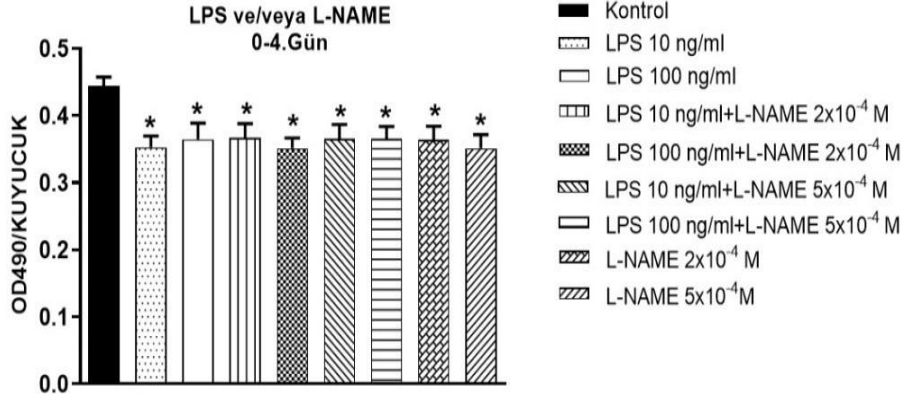
1.1. 0-2. Gün: Diferensiyasyon sürecinin 0-2. gününde hücre kültür ortamına eklenen LPS (10, 100 ng/ml, n=4) ve L-NAME (2×10^{-4} ve 5×10^{-4} M) diferensiyasyonu etkilemedi. Bunların birlikte uygulanması da diferensiyasyona etki yapmadı (Şekil 1.).



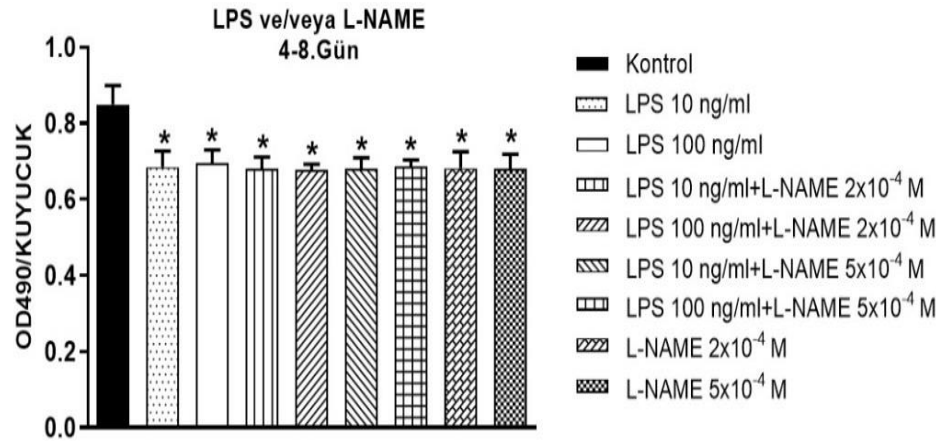
Şekil 1. 0-2. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi (n=4)

1.2. 0-4. Gün: Diferensiyasyon protokolünün 0-4. gününde hücre kültür ortamına eklenen LPS (10, 100 ng/ml, n=4) adiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı. L-NAME (2×10^{-4} ve 5×10^{-4} M) ön uygulaması bu etkiyi değiştirmedii. L-NAME'nin tek başına uygulanması da LPS gibi diferensiyasyonu anlamlı olarak süprese etti (Şekil 2.).

1.3. 4-8. Gün: Diferensiyasyon sürecinin 4-8. gününde hücre kültür ortamına eklenen LPS (10, 100 ng/ml, n=4) preadiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı, L-NAME (2×10^{-4} ve 5×10^{-4} M) ön uygulaması bu etkiyi değiştirmedii. Tek başına L-NAME (2×10^{-4} ve 5×10^{-4} M) LPS gibi diferensiyasyonu anlamlı olarak süprese etti (Şekil 3.).



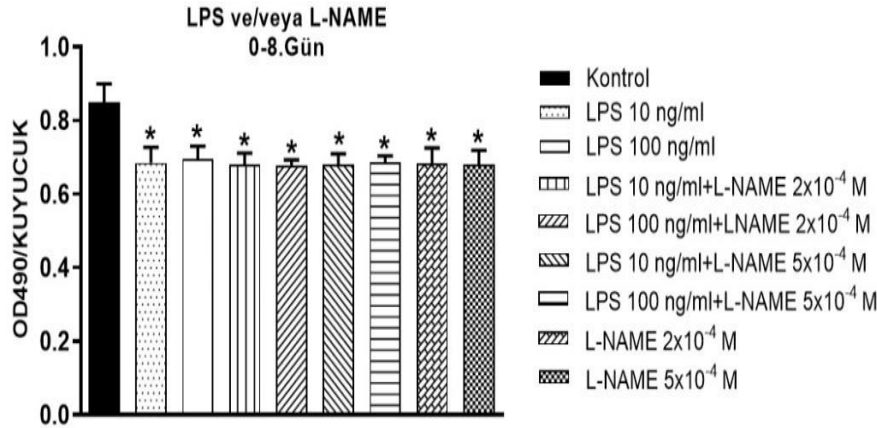
Şekil 2. 0-4. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi (*: $p < 0.05$).



Şekil 3. 4-8. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi (*: $p < 0.05$).

1.4. 0-8. Gün: Diferensiyasyon sürecinin 0-8. günü boyunca hücre kültür ortamına eklenen LPS (10, 100 ng/ml, n=4), preadiposit diferensiyasyonunu anlamlı olarak azalttı, L-

NAME ön uygulaması bu etkiyi değiştirmedir. Tek başına L-NAME (2×10^{-4} ve 5×10^{-4} M), LPS gibi diferensiyasyonu anlamlı olarak süprese etti (Şekil 4.).



Şekil 4. 0-8. gün L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS uygulamasının diferensiyasyon üzerine etkisi (*: $p < 0.05$).

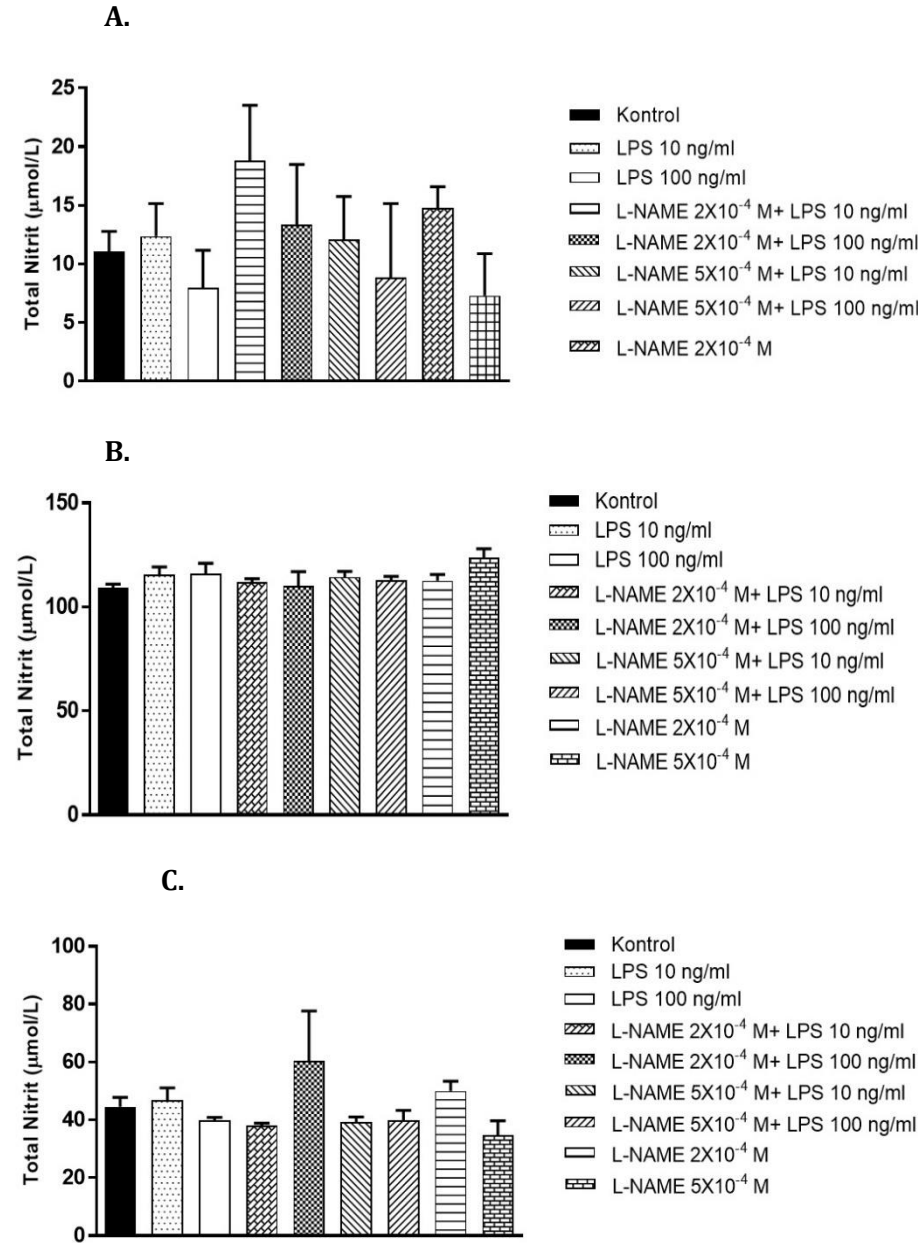
2. LPS ve L-NAME'nin 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit düzeyleri üzerine etkisi

Bakteriyel endotoksin olan LPS'nin post-konfluent 3T3-L1 hücrelerine 10 ve 100 ng/ml konsantrasyonda belirli zaman aralıklarında (0-2, 0-4 ya da 0-8 gün boyunca) uygulanması kültür ortamında nitrit düzeylerinde belirgin bir değişiklik yapmadı. Ayrıca L-NAME (2×10^{-4} ve 5×10^{-4}

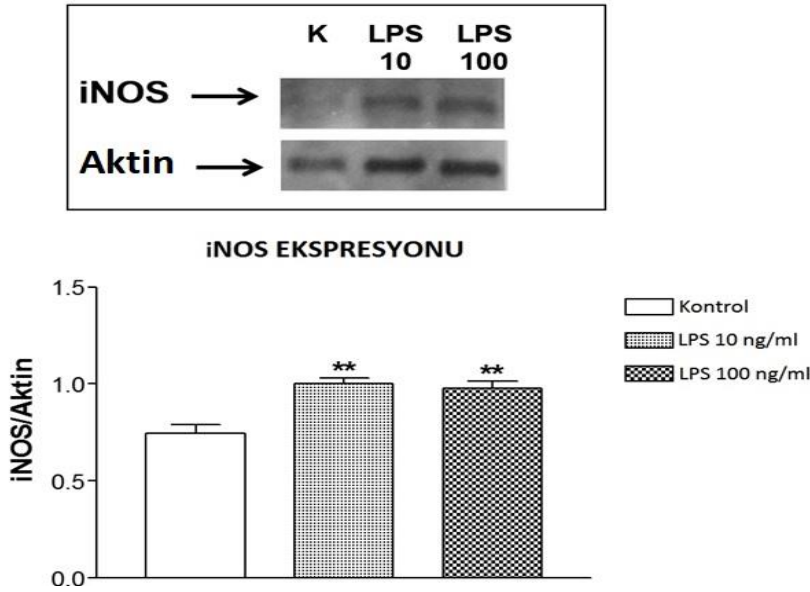
M) ön uygulaması da ortamdaki nitrit düzeyini etkilemedi (Şekil 5).

3. LPS'nin 3T3-L1 hücrelerinde iNOS enzim ekspresyonu üzerine etkisi

8 gün boyunca uygulanan LPS (10, 100 ng/ml) 3T3-L1 hücrelerinde iNOS ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdı. Bu artış konsantrasyon-bağımlı değildi (Şekil 6).



Şekil 5. L-NAME ve LPS'nin belirli zaman aralıklarında (A. 0-2 gün boyunca, B. 0-4 gün boyunca, C. 0-8 gün boyunca) birlikte ya da ayrı ayrı uygulanmasının 3T3-L1 hücrelerinin kültür ortamındaki nitrit/nitrat düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 6. LPS'nin 3T3-L1 hücrelerinde iNOS enzim ekspresyonu üzerine etkisi (**: $P < 0.01$).

4. LPS ve L-NAME'nin ROCK-2 enzim ekspresyonu üzerine etkisi

LPS (10, 100 ng/ml), 3T3-L1 hücrelerinde ROCK-2 enzim up-regülasyonuna neden oldu (Şekil 7.A). Non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME (2×10^{-4} M), LPS'nin ROCK-2 enzim ekspresyonu üzerine olan etkisini değiştirmedir. Tek başına L-NAME uygulaması da ROCK-2 ekspresyonunda anlamlı bir artış oluşturdu (Şekil 7.A). Benzer şekilde daha yüksek konsantrasyonda uygulanan LPS (100 ng/ml) de ROCK-2 ekspresyonunu anlamlı olarak artırırken yine L-NAME, bu artış üzerine etkisiz bulundu. Ayrıca L-NAME tek başına ROCK-2 ekspresyonunu anlamlı olarak artırdı (Şekil 7.B).

Tartışma

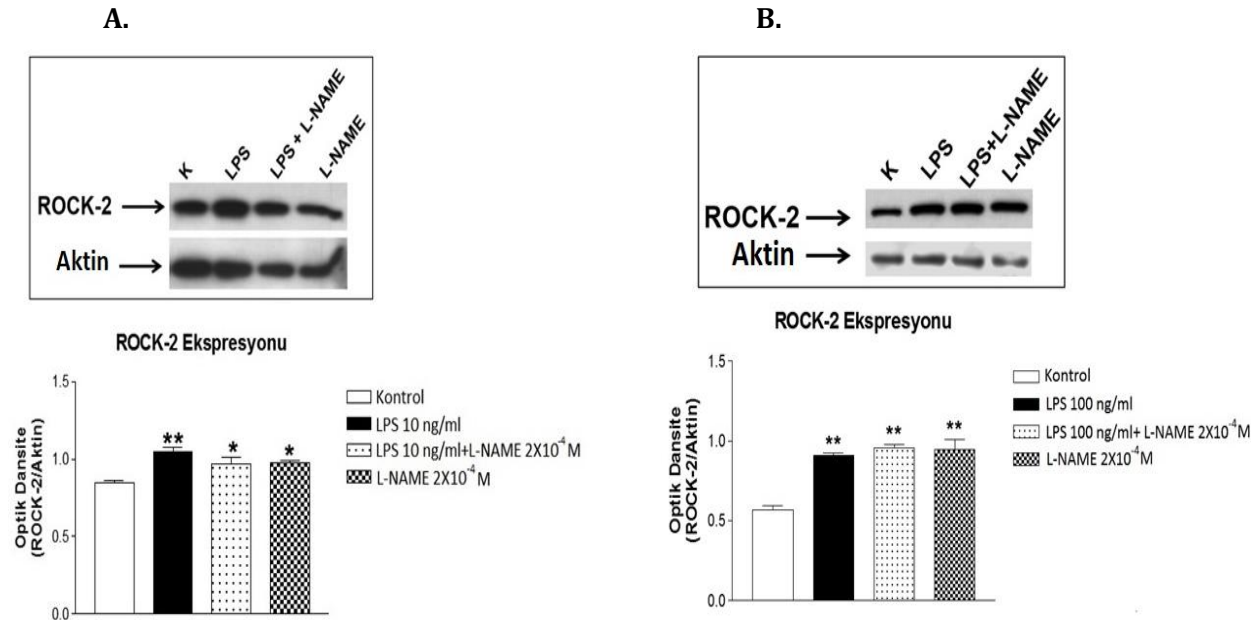
Bu çalışma obezite gelişiminde temel mekanizmalardan birisi olan stromal vasküler fraksiyondaki preadipositlerden yeni yağ hücreleri oluşumunu sağlayan preadiposit diferensiyasyonu üzerine çeşitli çalışmalarda obez bireylerde yüksek düzeylerde bulunduğu gösterilmiş olan LPS'nin etkisini göstermek ve oluşan etkinin LPS tarafından indüklendiği bilinen iNOS ile ilişkisini ortaya koymak amacı ile yapıldı. Bunun yanı sıra adiposit diferensiyasyonu sırasında LPS ile Rho/ROCK yolağı arasındaki ilişki de değerlendirildi.

Çalışmamızda farklı zaman aralıklarında 3T3-L1 hücre kültür ortamına uygulanan LPS'nin 0-2. gün dışında tüm zaman aralıklarında preadiposit diferensiyasyonunu anlamlı bir şekilde baskıladığını gösterdik. LPS tarafından diferensiyasyonda oluşturulan baskılanma non spesifik NOS inhibitörü L-NAME tarafından geri döndürülemedi. L-NAME tek başına uygulandığında LPS'ye benzer bir biçimde diferensiyasyonda anlamlı bir azalmaya yol açtı. Bu iki bulgu bir arada değerlendirildiğinde aydınlatılmaya muhtaç görünmektedir. Çeşitli çalışmalarda iNOS indüksiyonu yaptığı gösterilmiş inflamatuvar bir etken olan LPS'nin etkisinin iNOS inhibisyonu yapan L-NAME tarafından değiştirilememesi akla LPS'nin diferensiyasyon üzerine etkisini iNOS indüksiyonu dışında bir yolla yapıyor olabileceğini getirmektedir. Bunun yanısıra L-NAME'in tek başına uygulandığında LPS'ye benzer bir tarzda diferensiyasyonu süprese etmesi durumu daha ilginç bir hale getirmektedir. Bu bulgu 3T3-L1 hücrelerinde bazal bir NOS aktivitesi olduğunu gösteriyor olabilir. Nitekim çeşitli çalışmalarda yağ dokuda eNOS ve iNOS izoformlarının eksprese edildiği gösterilmiş^{35,36} ve buna ek olarak 3T3-L1 preadipositlerinde diferensiyasyon süreci sırasında eNOS ekspresyonu ortaya konulmuştur.³⁷ Buna göre non spesifik NOS inhibitörü L-NAME,

3T3-L1 hücrelerindeki bazal eNOS aktivitesini inhibe ederek etki gösteriyor olabilir. Ancak, bu durum daha çok araştırmaya gerek duyuyor gibi görünmektedir.

Western blot deneylerinde bakteriyel bir endotoksin olan LPS'nin 3T3-L1 hücre kültür ortamına uygulandığında iNOS enzim ekspresyonlarını arttırdığını gösterdik. Bu bulgu literatürle uyumlu ve beklendiği gibidir. Ancak, LPS iNOS enzim ekspresyonlarını arttırmasına rağmen Griess metodu ile yapılan ölçümlerde nitrit/nitrat düzeylerini arttırmadı. Bu ilk bakışta çelişkili gibi görünen bir durumdur. Çünkü iNOS enzim ekspresyonundaki artışın total nitrit/nitrat düzeylerinde artışa neden olacağı düşünülebilir. Ancak, literatür değerlendirildiğinde durumun biraz daha karmaşık olabileceği görülecektir. Yakın zamanda inflamatuvar bir durum olan periodontitli hastalarda nitrit/nitrat düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir.³⁸ Ayrıca multipl apikal periodontitli ratlarda NO ekspresyonu belirgin şekilde artmasına karşın serum NO düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.³⁹ LPS tarafından yapılan iNOS indüksiyonunun

mekanizması önce LPS'nin TNF- α , IL-1, IL-6, interferon γ gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımını indüklemesi ve bu mediyatörlerin de kombine bir etki ile iNOS indüksiyonu yapması gibi görünmektedir.⁴⁰ Yapılan bir çalışmada adipositlerde LPS tek başına uygulandığında iNOS enzim ekspresyonunu arttırmasına rağmen, nitrit/nitrat düzeylerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı ancak IL-1, IL-6 ve TNF- α ile kombine olarak uygulandığında nitrit/nitrat düzeylerinde belirgin artışa yol açtığı gösterilmiştir.¹⁷ Bu bulgu, çalışmamızda gösterdiğimiz veriler ile uyumludur. Bunun yanı sıra, diğer çalışmalar olgun adipositler üzerinde yapılmıştır ancak çalışmamızda LPS fibroblastların sonunda olgun adipositlere dönüştüğü dinamik bir süreç olan diferensiyasyon sırasında farklı zaman noktalarında uygulanmıştır. Ayrıca ortamda TNF- α ve IL-1, IL-6 ve interferon γ gibi proinflamatuvar etkenlerin yokluğunda LPS uygulaması yapılmıştır. Bu etkenler değerlendirildiğinde LPS'nin iNOS proteininin ekspresyonunda up-regülasyon yapmasına rağmen nitrit/nitrat düzeylerinde değişiklik olmaması anlaşılabilir olmaktadır.



Şekil 7. 2×10^{-4} M L-NAME varlığında ya da yokluğunda LPS'nin (10 ng/ml) (Şekil 7.A) ve 100 ng/ml) (Şekil 7.B) 3T3-L1 hücrelerinde ROCK-2 enzim ekspresyonu üzerine etkisi (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Western blot bulguları çalışmamızda iNOS indüksiyonu yaparak etki elde etmeyi umduğumuz LPS'nin iNOS indüksiyonunun yanı sıra birçok inflamatuvar olaya karıştığı gösterilmiş olan ROCK-2'nin²⁹ ekspresyonunu arttırdığını gösterdi. LPS'nin ROCK-2 ekspresyonunu artırması diferensiyasyonu baskılayıcı bir etki göstermesi ile birlikte düşünülünce LPS, bizim başlangıçta beklediğimizden farklı olarak hem iNOS indüksiyonu yapmakta hem de Rho/Rho-kinaz yolağını aktive etmekte ve ortaya çıkan etkide Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonu daha baskın bir rol oynuyor gibi görünmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgunun yanı sıra, L-NAME ön-uygulaması, LPS uygulaması ile oluşan ROCK-2 ekspresyonundaki artış üzerine anlamlı bir etki göstermedi. Bu durum LPS tarafından oluşturulan ROCK-2 up-regülasyonunun NO yolağı dışında başka mekanizmalarla olabileceğini ima etmektedir. Sonuç olarak, LPS 3T3-L1 hücrelerinde ROCK-2 ekspresyonunda artışa yol açmaktadır ve bu up-regülasyon NO dışında başka sinyal yolları aracılığı ile oluyor gibi görünmektedir.

Bu bulgu, LPS'nin inflamatuvar rolü ile uyumludur. Zira çalışmamızda LPS, birçok inflamatuvar süreçte etkin rol oynadığı gösterilen Rho-kinaz enziminin ekspresyonunda da up-regülasyona yol açmıştır. Birçok inflamatuvar süreçte ve hücre diferensiyasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilen⁴¹ TGF- β 'nin, fare embriyonik fibroblast ve Swiss 3T3 fibroblast hücre kültürlerinde Rho-kinaz aktivasyonuna yol açtığı ortaya konulmuştur.⁴² Bu, çalışmamızda LPS tarafından oluşturulan ROCK-2 ekspresyonundaki artışı açıklayabilir. Çünkü LPS uygulamasının PC3 insan prostat epitel hücre kültüründe TGF- β ekspresyon ve salınımını arttırdığı gösterilmiştir.⁴³ Bunun yanı sıra yağ dokuda yaygın olarak eksprese edilen ve diferensiyasyon sırasında adipositlerde ekspresyonunun arttığı gösterilen TLR-4'ün (Toll like receptor-4)⁴⁴ LPS'nin bu etkisine katkıda bulunması olasıdır. Günümüzde LPS reseptörü olarak kabul edilen TLR-4'ün⁴⁵ obez bireylerde yağ dokudaki adipositlerde ve stromal vasküler fraksiyondaki monositlerde

ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.⁴⁶ TLR-4'ün LPS tarafından aktive edildiği ve TGF- β 'yi aktive ettiği ve böylece obezitede gözlenen sistemik düşük düzeydeki inflamasyona neden olduğu ortaya konulmuştur. Böylece LPS'nin hem TLR-4 hem de TGF- β aktivasyonu aracılığı ile ROCK-2 aktivasyonuna yol açabileceği akla gelmektedir. Bunun yanı sıra Rho/Rho-kinaz sinyal yolağının obezitede gözlenen sistemik düşük düzeydeki inflamasyonda stromal vasküler fraksiyondaki fibroblastların olgun adipositlere diferensiyasyonunu engellediği düşünülebilir.

Sonuç olarak, bakteriyel bir endotoksin olan LPS, 3T3-L1 hücrelerinde diferensiyasyonu baskılamaktadır. Bu etkiye NO değil ancak onun dışındaki bir inflamatuvar mediyatör(ler) aracılık edebilir. Ayrıca LPS, Rho/ROCK bağımlı bir mekanizma ile preadiposit diferensiyasyonunu süprese edebilir.

Yazar katkıları : Dr. A. Sencer Yurtsever ve Prof. Dr. Kansu Büyükaşar çalışmanın tasarımına, ön çalışmalara, istatistiksel analiz ve verilerin yorumlanmasına katkıda bulunmuştur. Her iki yazar makalenin hazırlanmasına ve düzeltilmesine katkıda bulunmuşlardır.

Çıkar çatışması : Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE F (ASY) 2009-1 DR no'lu proje olarak ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından TÜBİTAK-SBAG 110S451 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan maddeler, yöntemler ve cihazlar ve çalışma konusu ile ilgili olarak başka hiçbir kişi, kurum ya da kuruluş ile finansal ya da başka şekilde bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010;303(3):235-241.

2. Finucane M, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ at al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011;377(9765):557-567.
3. Obesity and overweight. *Who Factsheet* No:311, 2015. Erişim yeri: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>, Erişim tarihi:08.03.2019
4. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 2005;293:1861-1867.
5. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis. *Ann Intern Med* 2003;138:24-32.
6. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *JAMA* 2012;307(5):491–497.
7. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87–91.
8. Hotamışlıgil G. S, Murray D. L, Choy L. N, Spiegelman B. M. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4854–4858.
9. Shah A, Nehal MN, Reilly MP. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *J Parenter Enteral Nutr* 2008;32(6):638–644.
10. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, immunity and metabolic disease. *Immunity* 2014;41:36–48.
11. Crossno JT Jr, Majka SM, Grazia T, Gill RG, Klemm DJ. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest* 2006;116:3220-3228.
12. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(a008417):1-19.
13. Ghorbani A, Abedinzade M. Comparison of in vitro and in situ Methods for studying lipolysis. *ISRN Endocrinology* 2013;205385:1-6.
14. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006;17:55-57.
15. Denninger JW, Marletta M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411,334-350.
16. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheum* 2007;3(12):716-724.
17. Kapur S, Marcotte B, Marette A. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol Endoc M* 1999;276:635-641.
18. Yan H, Aziz E, Shillabeer G, Wong A, Shanghavi D, Kermouni A, Abdel-Hafez M, Lau DCW. Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture. *J Lipid Res* 2002;43,2123-2129.
19. Hiroyuki K, Naoko M, Takako K, Shin-Ya T, Megumi W, Tohru M, Teruo K, Hideo Y. Nitric oxide suppresses preadipocyte differentiation in 3T3-L1 culture. *Mol Cell Biochem* 2007;300(1-2):61-67.
20. Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Brit J Pharmacol* 1999;26:1639–1645.
21. Penfornis P, Marette A. Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J Lipid Res* 2005;46:135-142
22. Hersoug LG, Moller P, Loft S. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Obes Rev* 2016;17(4):297-312.
23. Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut Microbiome and obesity: a plausible

- explanation for obesity. *Curr Obes Rep* 2015;4(2):250-261.
24. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57(6):1470-1481.
25. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56(7):1761-1772.
26. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3(3):207-215.
27. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(20):9730-9734.
28. Hippenstiel S, Soeth S, Kellas B, Fuhrmann O, Seybold J, Kröll M, et al. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 2000;95:3044-3051.
29. Büyükafşar K, Arıkan O, Ark M, Kubat H, Özveren M. Upregulation of Rho-kinase (ROCK-2) expression and enhanced contraction to endothelin-1 in the mesenteric artery from lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2004;498:211-217.
30. Matsumura S, Abe T, Mabuchi T, Katano T, Takagi T, Okuda-Ashitaka E, et al. Rho-kinase mediates spinal nitric oxide formation by prostaglandin E2 via EP3 subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:550-557.
31. Cetin S, Leaphart CL, Li J, Ischenko I, Hayman M, Upperman J, et al. Nitric oxide inhibits enterocyte migration through activation of RhoA-GTPase in a SHP-2-dependent manner. *Am J Physiol Gastr L Physiol*, 2007;292:G1347-G1358.
32. Riento K, Ridley AJ. Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:446-456.
33. Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, Araki K, Choi CS, Kim HJ, et al. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005;2:119-129.
34. Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, et al. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-Associated Kinase II enhances adipogenesis. *J Biochem* 2007;282(40):29574-29583.
35. Ribiere, C, Jaubert AM, Gaudiot N, Sabourault D, Marcus ML, Boucher JL, et al. White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *BBRC* 1996;222:706-712.
36. Elizalde M, Rydén M, Harmelen VV, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 2000;41:1244-1251.
37. Yamada Y, Eto M, Ito Y, Mochizuki S, Son BK, Ogawa S, et al. Suppressive role of PPARγ-regulated endothelial nitric oxide synthase in adipocyte lipolysis. *PLoS ONE* 2015;10(8):e0136597.
38. Andrukhov O, Haririan H, Bertl K, Rausch WD, Bantleon HP, Moritz A, Rausch-Fan X. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. *J Clin Periodontol* 2013;40:916-923.
39. Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AOS, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VMF, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *JOE* 2016;42(5):747-751.
40. Andersson J, Nagy S, Bjork L, Abrams J, Holm S, Andersson U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev* 1992;127:69-96.

41. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:2-3:111-119.
42. Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor. *J Biol Chem* 2005;280(12):11448-11457.
43. Pei Z, Lin D, Song X, Li H, Yao H. TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFb1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. *Cell Immunol* 2008;254:20-27.
44. Kopp A, Buechler C, Neumeier M, Weigert J, Aslanidis C, Schölmerich J, Schäffler A. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity* 2009;17:648-656.
45. Palsson-Mcdermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004;113:153-162.
46. Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, Bennakhi A, Dermime S, Behbehani K. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J Inflamm* 2012;9(48):1-11.