

## Araştırma Makalesi

# Preadipositlerde (3T3-L1) Östrojenin Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi: Rho/Rho-kinaz Yolağının Olası Katkısı

## Effects of Estrogen on Adipocyte Differentiation in Preadipocyte Cell Line (3T3-L1): Possible Involvement of Rho/Rho-Kinase Signaling

Mehtap PEKTAŞ<sup>1</sup>, Akif Hakan KURT<sup>1</sup>, Rukiye Nalan TİFTİK<sup>1</sup>, İsmail ÜN<sup>1</sup>, Kansu BÜYÜKAFŞAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin

### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada estrojenin, preadipositlerin (3T3-L1) olgun yağ hücrelerine diferansiyasyonuna olan etkilerinin incelenmesi ve ayrıca bu etkilere, eğer varsa, Rho/Rho kinaz yolağının katkısını araştırılması amaçlandı.

**Yöntem:** 3T3-L1 hücreleri kültür flasklarına ekilerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edildi. Konfluent olan flasklar pasajlanarak çoğaltıldı. Estradiol 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-4</sup>M konsantrasyonda 3T3-L1 hücrelerine 2 ve 8 gün boyunca uygulandı. 8. günde deney sonlandırıldı ve adiposit diferansiyasyonu Oil Red O boyama ile değerlendirildi. Oil Red uygulanmayan hücreler ise homojenize edilerek Western-Blot yöntemi ile RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** 17β-estradiol diferansiyasyon sürecinin başlangıcında (2. günde) uygulandığında diferansiyasyonu azaltmaktadır. Buna karşılık 8 gün boyunca uygulandığında ise etkisiz bulunmuştur. Ayrıca 17β-estradiol RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyon düzeylerini anlamlı olarak değiştirmemiştir.

**Sonuç:** 17β-estradiol, preadiposit diferansiyasyon sürecine farklı zaman dilimlerinde farklı etkilerle katkı sağlamaktadır. Ancak, bu etki Rho/Rho-kinaz yolağı aracılı görünmemektedir.

**Anahtar Sözcükler:** adiposit diferansiyasyonu; östrojen; rho-kinaz

### Abstract

**Aim:** In this study, it was aimed to investigate potential effects of estrogen on the differentiation of preadipocytes (3T3-L1) to mature adipocytes and the possible involvement of Rho/Rho-kinase pathway in this matter.

**Method:** 3T3-L1 cell suspensions were plated and incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Confluent flasks were passaged. Next, 3T3-L1 cells were treated with estradiol at various concentrations (10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-4</sup>M) for a period of 0-2 and 0-8 days. The experiment was concluded on the day of 8. Adipocyte differentiation was assessed by lipid-specific Oil Red O staining. The Oil Red O nontreated cells were homogenized. Subsequently, RhoA, ROCK-1 and ROCK-2 protein expression levels in these cells were measured by Western-Blotting technique.

**Results:** When applied in the beginning of the differentiation process (the 2<sup>nd</sup> day), 17β-estradiol decrease the differentiation. On the contrary, it becomes ineffective when applied for 8 days. In addition, 17β-estradiol did not significantly change ROCK-1, ROCK-2 and RhoA protein expression levels.

**Conclusion:** 17β-estradiol, the main estrogenic hormone, has diverse effects on adipocyte differentiation at different stages of differentiation. However, this impact does not appear to be mediated via Rho/Rho-kinase pathway.

**Keywords:** adipocyte differentiation; estrogen; rho-kinase

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2011;4(2):22-28

Geliş Tarihi : 23.05.2012

Kabul Tarihi : 18.07.2012

Yazışma Adresi: Yrd. Doç. Dr. İsmail ÜN Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, 33342 Mersin

Tel : 0324 3610001/1169

Faks : 0324 3412400

E-posta : unisfarma@yahoo.com

\* Bu çalışma, TÜBİTAK (SBAG 109S126) ve Mersin Üniversitesi (BAP-TF DTB (MP) 2009-2 TU) tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

Obezite vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin, yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize olan kronik bir hastalıktır (1). Obezitenin etiolojisinde birçok faktörün yer alması ve obezitenin gelişiminin nasıl önleneceği tam olarak anlaşılabilmesi önemli bir sorun olarak görünmektedir (2). Tüm dünyada obezite ve eşlik eden metabolik sendrom (diyabet, bozulmuş glukoz toleransı ve insülin direnci ile birlikte hipertansiyon, hiperlipidemi, santral obezite ve mikroalbuminüriden en az ikisinin eşlik etmesi) sıklığının epidemik olarak artıyor olması, bir metabolik ve endokrin organ olan yağ dokusuna olan ilgiyi arttırmıştır (3).

Hormonlar, adiposit gelişimi ve fonksiyonları için önemlidir ve adipoz dokunun major düzenleyicisidir. Bu hormonlar arasında büyüme hormonu, tiroid hormonu, glukokortikoidler, katekolaminler, insülin ve insülin-benzeri büyüme faktörü gibi birçok hormon yer almaktadır (2).

Adipoz doku insanlarda vücut yağ dağılımında cinsiyete göre farklılık gösterir. Kadınlarda erkeklere göre subkutanöz yağın birikimi daha fazladır. Kadınlarda subkutanöz yağ birikiminin puberteyle birlikte artış göstermesi subkutanöz yağ depolanmasında östrojenin rolünün olabileceğini göstermektedir. Buna karşın erkekler abdominal yağ depolanmasına meyilli iken premenapozal dönemde kadınlarda abdominal yağ birikimi östrojen tarafından inhibe edilmektedir. Kadınlarda adiposit kitlesinde artış adiposit sayısı ve aynı zamanda adiposit boyutlarında artış ile sonuçlanmaktadır. Bu veriler östrojenlerin adipositlerin gelişiminde, erişkin adiposit boyutları ve sayısının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (4).

1970'lerde östrojenin insan preadiposit proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilmiş, farklı türlerde ve deney sistemlerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir (4). Östrojenin preadiposit proliferasyonunu stimüle ettiğine dair tutarlı bulgular olmasına rağmen, adiposit diferansiyasyonu üzerine östrojenin etkisine dair veriler çelişkilidir (2). Sıçan preadipositleri ve mezenkimal kök hücrelerde yapılan çalışmalarda östrojenin adiposit diferansiyasyonu stimüle ettiği (4-6) bununla birlikte primer kemik iliği stromal hücre kültürlerinde veya kemik iliği stromal hücre hatlarında ise adipogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir (7-9).

Ayrıca seks hormonları birçok dokuda hem genomik hem de nongenomik mekanizmaların aracılığıyla etkisini göstermektedir. Nongenomik etkide hormonlar plazma membranındaki reseptörlere bağlanır ve etkileri ikincil haberciler ile taşınır (10). Bu nongenomik etkilere, MAPK/ERK1/2, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-kinaz) ve çeşitli tirozin kinaz gibi farklı yolların aracılık ettiği gösterilmiştir (11). Yapılan çalışmalar, küçük GTP-bağlayıcı protein Rho ve efektorü Rho-kinaz (ROK/ROCK)'ın düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti organizasyonu, hücre adezyonu ve motilitesi, sitokinez ve gen ekspresyonunu içeren birçok hücre fonksiyonunda rol oynadığını göstermiştir. Birçok dokuda östrojenin etkisine Rho/Rho kinaz yolağının aracılık ettiği gösterilmiştir. Östrojenin ayrıca ER/α13/RhoA/ROCK-2/moesin kaskadı

yoluyla endotelial hücre migrasyonuna öncülük ettiği de gösterilmiştir (12). Yine aynı şekilde ERα'nın, Ga13/Rho A/ROCK /moesin kaskadı yoluyla östrojen bağımlı meme kanser hücrelerinin hareketi, invazyonu ve buna bağlı olarak kanser metastazıyla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (13). Chrissobolis ve ark. (14) dişi sıçanların serebral dolaşımında Rho-kinaz fonksiyonunun baskılandığını ve bu etkinin endojen östrojene bağlı olduğunu göstermişler ve bu etkinin premenapozal kadınlarda inme insidansının azalmasına katkı sağlayabileceğini işaret etmişlerdir.

Bu çalışmada 17β-estradiolün, preadipositlerin (3T3-L1) olgun yağ hücrelerine diferansiyasyonuna olan etkilerini ve bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının olası katkısının belirlenmesi amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

### 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü

Bu çalışmada Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC-CL-173) dondurulmuş olarak satın alınan beyaz yağ hücresi öncülü fare embriyonik fibroblast klon hücre tipi olan 3T3-L1 hücreleri kullanıldı.

### Diferansiyasyon Protokolü

Hücre sayımı yapıldıktan sonra her kuyucuğa  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24'lü kuyucuğun her bir kuyucuğuna 1 ml besiyeri [%10 buzağı serumu (CS)/%1 Penisilin/streptomisin/%1 glutamin/Dulbecco'nun modifiye Eagle mediumu (DMEM)] ilave edildi. 2 günde bir mediumları değiştirilen hücrelerin inverted mikroskopta büyümeleri izlendi.

0. günde adiposit diferansiyasyonu indüklemesi için 0.5mM IBMX, 0.25µM dekzametazon ve 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM (fetal sığır serumu/Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum) ve estradiol  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$ M konsantrasyonda 3T3-L1 hücrelerine 2 gün boyunca uygulandı (0-2. gün). Diğer gruba 8 gün boyunca  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$ M konsantrasyonda estradiol ve 1µM insülin içeren %10 FBS/DMEM (0-8. gün) uygulandı ve 8. günde deney sonlandırılarak adiposit diferansiyasyonu Oil Red O boyama ile değerlendirildi. Oil red O uygulanan hücreler ELISA okuyucu cihazda 490 nm optik adsorbansta değerlendirildi.

### Western-Blot Analizi

İkinci ve 8. günün sonunda ekim yapılan 25 mm'lik flaskların mediumları alındı. PBS ile flasklar yıkandıktan sonra hücre lizisi için flasklara RIPA lizis tamponu konularak +4 °C'de 5 dk muamele edildi. Flasklardan elde edilen homojenatlar Western blot için kullanıldı. Eşit miktarlarda protein %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jele (SDS-PAGE) yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu. Jelde büyüklüklerine göre ayrılan ve bantlar oluşturan proteinler elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz bir membrana aktarıldı. RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 (Santa Cruz Biotechnology) antikoru 1 saat muamele edildi. Bu işlem sonrasında HRP (horseradish peroxidase) bağlı sekonder antikor ile (1:2000 dilüsyonda) yine bir saat muamele edildi. Daha sonra membranlar ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit (Amersham Biosciences, Freiburg Germany) görüntüleme solüsyonu ile 5 dakika karanlıkta muamele edildikten sonra görüntüldü.

*İstatistiksel Analizler*

Western Blot tekniği ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programı kullanıldı. Veriler, ortalama±standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve Dunnet testi post hoc testi kullanıldı.  $p<0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

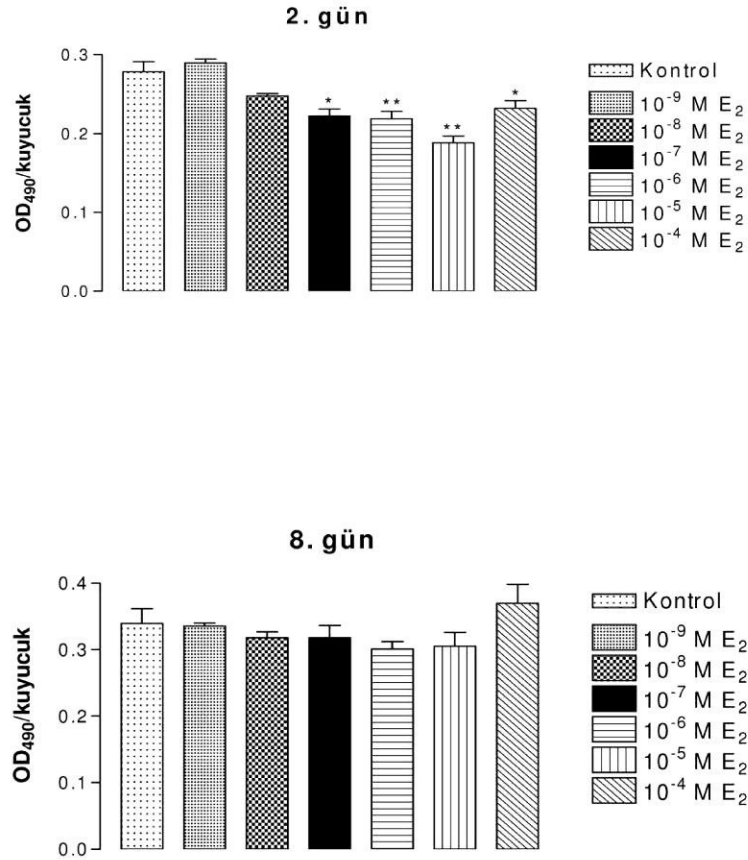
**Bulgular***17β-Estradiol'ün Adiposit Diferansiyasyonu Üzerine Etkisi*

Post-konfluent hücelere 0. günden 2. güne ve 0. günden 8. güne kadar uygulanan 17β-estradiol'ün ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$ M), adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi Oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 0. günden 2. güne kadar 17β-estradiol

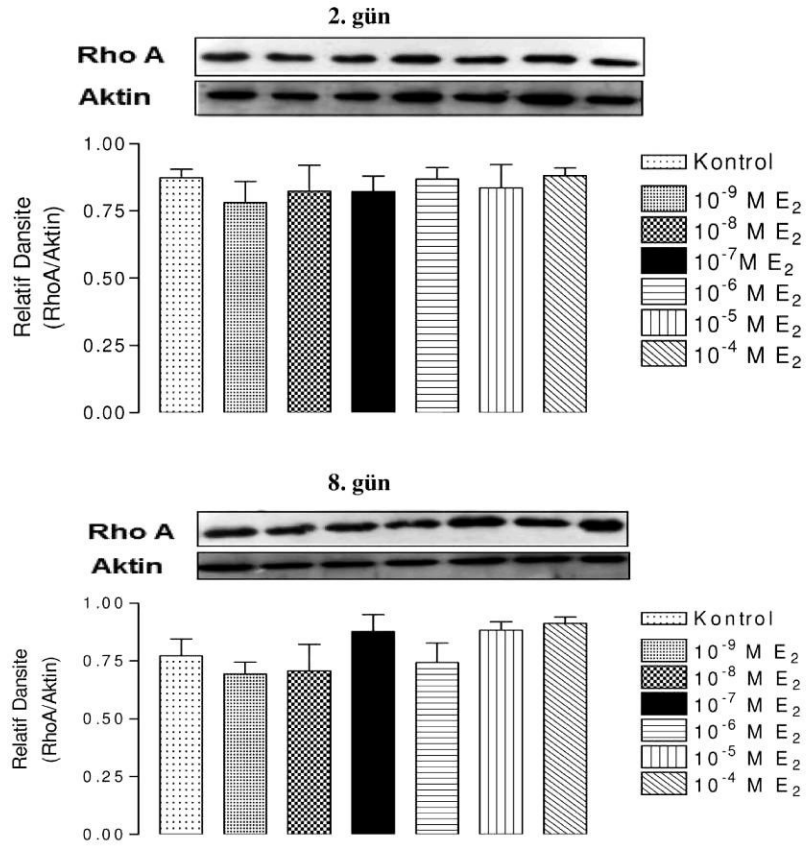
düşük konsantrasyonlarda ( $10^{-9}$  ve  $10^{-8}$ M) değil fakat daha yüksek konsantrasyonlarda ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$ M) adiposit diferansiyasyonunu azalttı. 0. günden 8. güne kadar uygulanan konsantrasyonlarda 17β-estradiol adiposit diferansiyasyonunu etkilemedi (Şekil 1).

*17β-Estradiol'ün RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 Ekspresyonu Üzerine Etkileri*

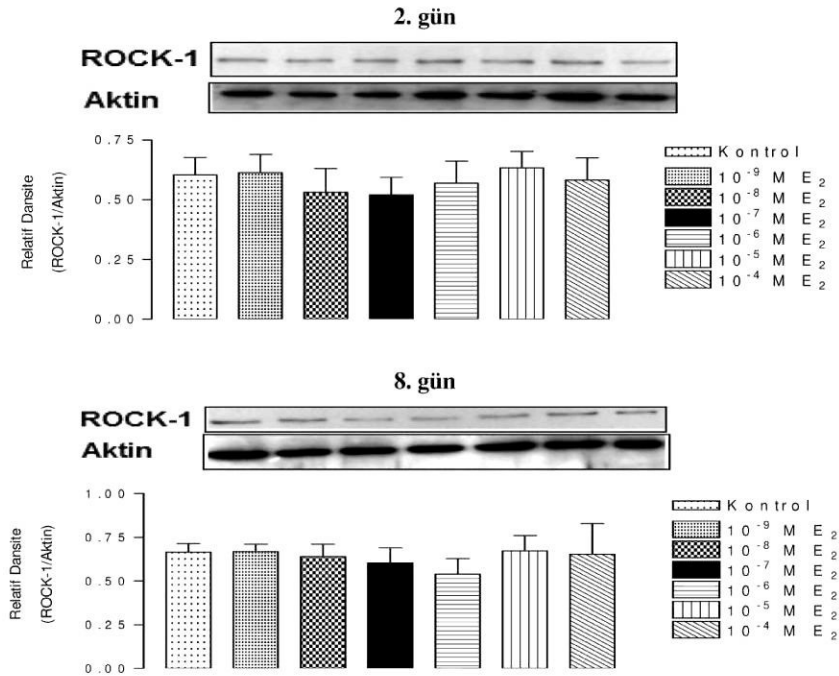
3T3-L1 preadiposit hücelere 0-2. ve 0-8. gün süresince uygulanan 17β-estradiolün ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$ M) RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyonları üzerine etkisi, Western blot yöntemi ile araştırıldı. Kullanılan konsantrasyonlarda ve uygulanan sürede 17β-estradiol, RhoA (Şekil 2), ROCK-1 (Şekil 3) ve ROCK-2 (Şekil 4) protein düzeylerini değıştirmemi.



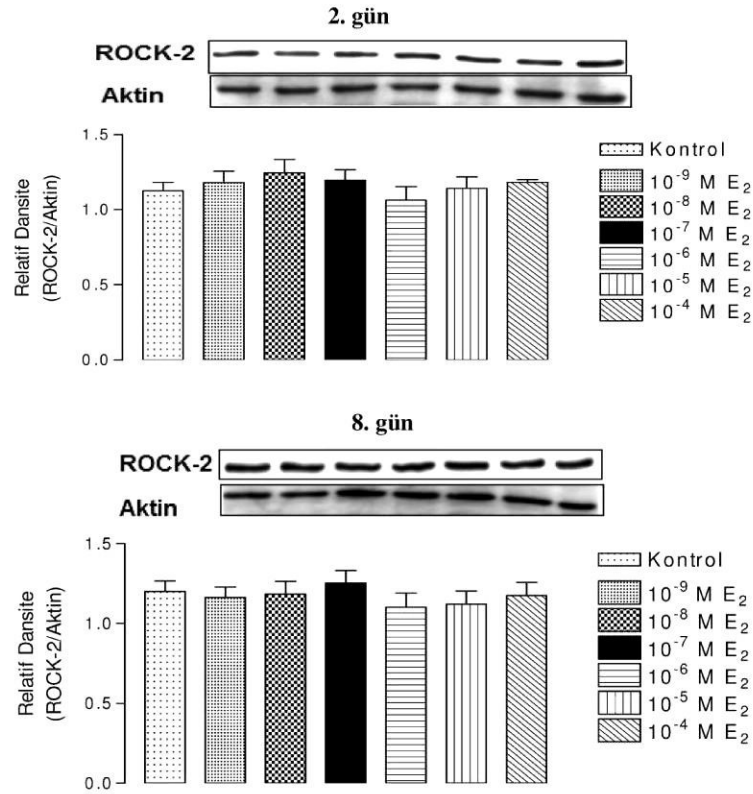
**Şekil 1.** 3T3-L1 preadiposit hücre kültüründe 17β-estradiol'ün farklı konsantrasyonlarının adiposit diferansiyasyonu üzerine etkisi. (n=4, \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ ) (Veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi).



**Şekil 2.** Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$ M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben RhoA ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi (Veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi).



**Şekil 3.** Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$  M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben Rho-kinaz-1 (ROCK-1) enzim ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi (Veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi).



**Şekil 4.** Post-konfluent 3T3-L1 hücrelerinde 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-4</sup>M, 0-2 ve 0-8 gün, n=4) uygulanmasını takiben Rho-kinaz 2 (ROCK-2) enzim ekspresyonlarının Western-blot tekniği ile gösterilmesi (Veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi)

## Tartışma

Bu çalışmada seks steroid hormonu olan östrojenin kültüre edilmiş fibroblast kökenli preadiposit hücreler olan 3T3-L1 hücrelerinde diferansiyasyon üzerine etkileri ve bu etkilere Rho/Rho-kinaz yolağının olası katkısı araştırıldı.

Östrojenin insan mezenkimal kök hücrelerinde, insan adipoz kökenli stromal hücrelerinde (5,6) ve sıçan preadipositlerinde adiposit diferansiyasyonu stimüle ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (4). Bununla birlikte 3T3-L1 hücre hattında yapılan bir çalışmada (15) ve östrojenin primer kemik iliği stromal hücre kültürlerinde veya kemik iliği stromal hücre hatlarında adiposit diferansiyasyonu üzerine inhibitör etkili olduğu gösterilmiştir (7-9). Ancak bu çalışmalarda östrojenin adiposit diferansiyasyonu üzerine olan etkileri farklı zaman dilimlerinde değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda farklı günlerde uyguladığımız östrojenin adiposit diferansiyasyonu üzerine farklı etkileri olduğu görüldü. Post-konfluent hücelere 2 gün süreyle uygulanan 17 $\beta$ -estradiol, adiposit diferansiyasyonunu azaltırken, 8 gün boyunca uygulanan östrojen diferansiyasyon üzerine etki göstermedi. Bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerinde adiposit diferansiyasyon sürecinin farklı basamaklarında (erken, orta ve geç) kullanılan bir ajanın, farklı etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (16).

Lipoprotein lipazın (LPL) ekspresyonunun, büyüme durması aşamasını (GD) yani erken diferansiyasyon basamağını yansıttığı, bundan dolayı adiposit diferansiyasyonunun erken belirteci olarak tanımlandığı bilinmektedir (17,18). Daha önceki çalışmalar östrojenin, lipogenezi azaltma yoluyla adipoz depolanmayı direkt olarak inhibe edebileceğini ve bu etkinin adipositlere lipid alımını düzenleyen bir enzim olan LPL aktivitesinin azaltılması yoluyla ortaya çıkabileceğine işaret etmektedir (19,20). Östrojenin LPL üzerine olan bu etkisi, bu çalışmada 2. günde görülen adiposit diferansiyasyonundaki azalma ile uyumlu görünmektedir.

Hücre iskeleti organizasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gen regülasyonu gibi farklı hücresel olaylarda rol oynayan Rho proteinleri ile Rho-kinaz enziminin birçok dokuda eksprese edildiği bilinmektedir (21-25). Ayrıca 3T3-L1 hücrelerinde yapılan bir çalışmada Rho/Rho-kinaz yolağının adipogenezde yer aldığı ve adipogenez sürecinde eksprese edildiği gösterilmiştir (26). Rho A, ROCK-1 ve ROCK-2'nin 3T3-L1 preadipositlerde ve matür adipositlerde eksprese olduğu fakat uygulanan konsantrasyonlarda östrojenin bu proteinlerin ekspresyon düzeylerini değiştirmediği gözlemlendi. Bununla birlikte bizim laboratuvarımızda sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada 17 $\beta$ -estradiol'ün ROCK-2 enzim ve RhoA protein ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi (27).

Çalışmamızda östrojenin RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 protein ekspresyon düzeylerine bir etkisinin olmaması, bu hormonlar ile ilgili sinyal transdüksiyon mekanizması arasında bir etkileşimin olmadığı anlamına gelmemektedir. Gelecekte Rho-kinaz aktivasyonu da araştırılabilir.

Sonuç olarak; 17 $\beta$ -estradiol, preadiposit diferansiyasyon sürecine farklı zaman dilimlerinde farklı etkilerle katkı sağlamaktadır fakat bu etki Rho/Rho-kinaz yoluyla aracılı görünmemektedir.

## Kaynaklar

- Jaffe T, Schwartz B. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer* 2008;123(11):2543-56.
- Cooke PS, Heine PA, Taylor JA, Lubahn DB. The role of estrogen and estrogen receptor- $\alpha$  in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178(1-2):147-54.
- Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, Martini C, Marino M. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infect Disord Drug Targets* 2008;8(1):52-60.
- Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y. Adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Endocrinology* 2000;141(2):649-56.
- Hong L, Colpan A, Peptan IA. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006;12(10):2747-53.
- Hong L, Colpan A, Peptan IA, Daw J, George A, Evans CA. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2007;13(6):1197-203.
- Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004;145(2):848-59.
- Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 2002;143(6):2349-56.
- Dang ZC, van Bezooijen RL, Karperien M, Papapoulos SE, Löwik CW. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res* 2002;17(3):394-405.
- Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004;5(4):197-216.
- Jaubert AM, Mehebig-Mojaat N, Lacasa D, Sabourault D, Giudicelli Y, Ribière C. Nongenomic estrogen effects on nitric oxide synthase activity in rat adipocytes. *Endocrinology* 2007;148(5):2444-52.
- Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR. Estrogen receptor  $\alpha$  interacts with G $\alpha$ 13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/Moesin pathway. *Mol Endocrinol* 2006;20(8):1756-71.
- Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, Sarotto I, Baldacci C, Garibaldi S, Mannella P, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR, Simoncini T. Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PLoS ONE* 2008;3(5):2790.
- Chrissobolis S, Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. Evidence that estrogen suppresses Rho-kinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke* 2004;35(9):2200-5.
- Lea-Currie YR, Monroe D, McIntosh MK. Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999;123(1):17-25.
- Kang SI, Ko HC, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Lee NH, Kim SJ. Fucoxanthin exerts differing effects on 3T3-L1 cells according to differentiation stage and inhibits glucose uptake in mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;409(4):769-74.
- MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;64:345-73.
- Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines. *Cytokine* 1996;8(7):525-33.
- Hamosh M, Hamosh P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 1975;55(5):1132-5.
- Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* 2004;229(11):1127-35.
- Büyükaşar K, Yalçın I, Kurt AH, Tiftik RN, Sahan-Firat S, Aksu F. Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *Eur J Pharmacol* 2006;541(1-2):49-52.
- Inan S, Büyükaşar K. Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. *Br J Pharmacol* 2008;155(1):44-51.
- Iwamoto H, Nakamuta M, Tada S, Sugimoto R, Enjoji M, Nawata H. A p160ROCK-specific inhibitor, Y-27632, attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Hepatol* 2000;32(5):762-70.
- Takano H, Komuro I, Oka T, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. The Rho family G proteins play a critical role in muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 1998;18(3):1580-9.
- Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003;113(2):147-58.

27. Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Itoh H, Narumiya S, Nakao K. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem* 2007;282(40):29574-83.
28. Kurt AH. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe androjenik ve estrojenik hormonların rho-kinaz enzim ekspresyonu üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2007.