



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK MİDE KANSERİ
OLUŞTURULAN FARELERDE İRİSİN
HORMONU VE BAZI KAŞEKTİK
FAKTÖRLERİN EKSPRESYONLARININ
İNCELENMESİ**

Diler US ALTAY

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. E.Edip KEHA

TRABZON - 2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK MİDE KANSERİ
OLUŞTURULAN FARELERDE İRİSİN
HORMONU VE BAZI KAŞEKTİK
FAKTÖRLERİN EKSPRESYONLARININ
İNCELENMESİ**

Diler US ALTAY

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. E.Edip KEHA

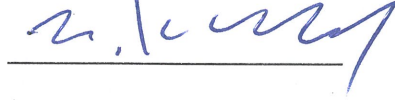
TRABZON - 2015

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

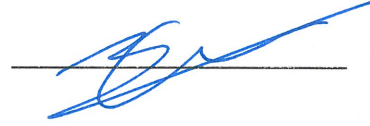
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



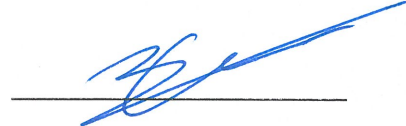
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Diler US ALTAY'ın hazırladığı "Deneysel Olarak Mide Kanseri Oluşturulan Farelerde *İrisin* Hormonu ve Bazı Kaşektik Faktörlerin Ekspresyonlarının İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. E.Edip KEHA

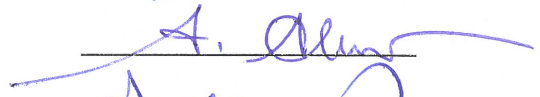


Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

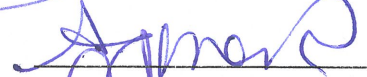
Prof. Dr. E. Edip KEHA



Prof. Dr. Ahmet ALVER



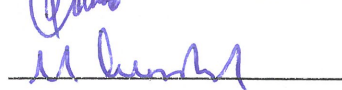
Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ



Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Doç. Dr. Medine CUMHUR CÜRE



Tarih: 29/09/2015

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

29/09/2015

Diler US ALTAY

İTHAF

Bu doktora tezimi, aramızdan erken ayrılan sevgili babalarım Mustafa US ve Kenan ALTAY'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresinde bilimsel, akademik ve insani yönünden daima örnek aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösterici olan, odasının kapılarını sonuna kadar tüm öğrencilerine açan, bir baba gibi gördüğüm, danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA'ya,

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca her anlamda yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım; Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve aramızdan ayrılan, saygıyla andığımız değerli hocamız Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e,

Cerrahi işlemlerin gerçekleştirilmesinde katkısı olan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a, tez savunmama katılan KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU ve Doç. Dr. Medine CUMHUR CÜRE'ye,

Bilimsel ve akademik her anlamda imkanlarını, bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, hiçbir zaman beni geri çevirmeyen Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, emekleri için sonsuz teşekkürü bir borç bildiğim Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN ve Dr. Öğr. İmran İnce'ye, çalışmamın belirli kademelerinde destek ve yardımcı olan Uzm. Dr. Selçuk YAMAN ve Yrd. Doç. Dr. Selim DEMİR başta olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemde; her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve tüm sevdiklerime, özellikle lisansüstü eğitim sürecimde ayrı kaldığımız beni sabırla bekleyen ve akademik yolumda her zaman destekçim olan eşim Can ALTAY'a teşekkür ederim.

Arş. Gör. Diler US ALTAY

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin 9672 nolu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Kanser	4
4.1.1. Mide Kanseri	4
4.2. Kaşeksi	7
4.2.1. Kanser Kaşeksisi	8
4.2.2. Kanser Kaşeksisinde Enerji Kullanımı	9
4.2.3. Kanser Kaşeksisinde Adipoz Doku ve İskelet Kası Değişimleri	10
4.2.4. Kanser Kaşeksisinde Doku Yıkımında Yer Alan Faktörler	10
4.2.4.1. Sitokinler	10
4.2.4.2. Tümör Nekrozis Faktör- α	12
4.2.4.3. İnterlökin-1	13
4.2.4.4. İnterlökin-6	13
4.2.4.5. Lipid Mobilize Edici Faktör / Çinko- α -2 glikoprotein	14
4.2.4.6. Proteoliz İndükleyici Faktör	16
4.3. Yağ Dokusunun Yapısı	18
4.3.1. Yağ Dokusunun Türleri, Vücuttaki Yerleşimi ve Özellikleri	19
4.3.2. Kahverengi Yağ Dokusu ve Uncoupling Protein-1	20

4.4. Peroksisom Proliferatörleri İle Aktifleştirilen Reseptör- γ Koaktivatör-1 (PGC-1) Ailesi	21
4.4.1. PGC-1 Ailesi Koaktivatörlerinin Yapı ve Fonksiyonu	21
4.4.2. PGC-1 Koaktivatörlerinin Doku Spesifik Metabolik Durumlar	22
4.4.2.1. Beyin	22
4.4.2.2. Kalp	22
4.4.2.3. İskelet Kası	22
4.2.4. Kahverengi Yağ Dokusu	23
4.5. İskelet Kası	23
4.6. Fibronektin Tip III Domainini İçeren 5. Protein/ İrisin	24
4.6.1. İrisin'in Yapısı, İzolasyonu ve Adlandırılması	24
4.6.1.1. İrisin Sentezleyen Başlıca Organlar ve İrisinin Biyokimyasal Etkileri	25
4.6. 1.2. İrisin ve Metabolik Hastalıklarla Olan İlişkisi	26
4.7. N-Metil N-Nitrozoüre (MNU)	27
4.8. Tümör Belirteçleri	30
4.8.1. Tümör Belirteçlerinin Tanımı ve Klinik Kullanımı	31
4.8.1.1. Karsino Embriyonik Antijen (CEA)	31
4.8.1.2. Karbohidrat Antijen 72-4 (CA 72-4)	31
4.9. Real-Time PCR	32
5. GEREÇ ve YÖNTEM	34
5.1. Gereçler	34
5.1.1. Kullanılan Fareler	34
5.1.2. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	34
5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler	36
5.2. Yöntemler	36
5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	37
5.2.2. Farelere Oral Yolla Verilen MNU'nun Hazırlanması	38
5.2.3. Serum IL-6 Seviyesinin Ölçülmesi	39
5.2.4. Serum IL-1 α Seviyesinin Ölçülmesi	41
5.2.5. Serum TNF- α Seviyesinin Ölçülmesi	42
5.2.6. Serum CEA Seviyesinin Ölçülmesi	43

5.2.7. Serum CA 72-4 Seviyesinin Ölçülmesi	45
5.2.8. Serum PIF/DCD Seviyesinin Ölçülmesi	45
5.2.9. Serum ZAG (AZGP1) Seviyesinin Ölçülmesi	46
5.2.10. Serum FNDC5/İrisin Seviyesinin Ölçülmesi	47
5.3. Total RNA İzolasyonunda Kullanılan Dietilpirokarbonat(DEPC)'li Su Hazırlanışı	48
5.3.1. İskelet Kası, Mide ve Yağ Dokusundan Total RNA İzolasyonu	48
5.3.2. RNA'nın Miktersal Ölçümü (Kantitasyonu)	49
5.4. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	50
5.5. Real Time PCR Protokolü	51
5.5.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	54
5.6. İstatistiksel Yöntemler	56
6. BULGULAR	57
6.1. Morfolojik Bulgular	57
6.2. Serum Örneklerinde Ölçülen Parametrelerin Düzeyleri	62
6.2.1. Kanser Belirteçleriyle İlgili Bulgular	62
6.2.2. Kaşektik Faktörlerle İlgili Bulgular	64
6.2.3. İrisinle İlgili Bulgular	65
6.2.4. İnflamatuar Belirteçlerle İlgili Bulgular	66
6.2.5. Serum Örneklerinde Ölçülen Parametrelerle İlgili Korelasyon Analizleri	68
6.2.5.1. Kanser Grubundaki Parametreler Arasındaki Korelasyonlar	68
6.3. Doku Örneklerinde Ölçülen Parametrelerin Ekspresyon Analiz Sonuçları	69
6.3.1. Mide Dokusunda Ölçülen Genlerin Ekspresyonları İle İlgili Bulgular	69
6.3.2. Beyaz Yağ Dokusunda Ölçülen Genlerin Ekspresyon Sonuçları	70
6.3.3. Kahverengi Yağ Dokusu <i>Zag</i> , <i>Ucp1</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	72
6.6.3.1. Kahverengi Yağ Dokusu <i>Fndc5</i> , <i>Pgc-1α</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	73
6.6.4. İskelet Kasında Ölçülen Genlerin Ekspresyonu İle İlgili Bulgular	75
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
8. KAYNAKLAR	88
9. ETİK KURUL ONAYI	103
10. ÖZGEÇMİŞ	104

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Mide kanseri ile ilişkilendirilmiş genler ve tümör oluşumundaki rolleri	5
Tablo 2.	Kaşexsinin Aşamaları	8
Tablo 3.	Kemirgenlerde beyaz ve kahverengi yağ dokusu belirteç farklılıkları	20
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	34
Tablo 5.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve satın alındıkları firmalar	35
Tablo 6	Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmalar	36
Tablo 7.	RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri	50
Tablo 8.	RT-PCR'da ekspresyonu ölçülmek istenen hedef genler	51
Tablo 9.	Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri	52
Tablo 10.	RT-PCR protokolü	53
Tablo 11.	Agaroz jele yüklenen örnekler	54
Tablo 12.	Farelerin 5 aylık deney süresi boyunca yedikleri toplam ve bir günde tüketilen yaklaşık yem miktarları	58
Tablo 13.	5 aylık süre sonunda farelerin ortalama ağırlıkları ve standart sapma değerleri	59
Tablo 14.	Patoloji sonuçlarına göre oluşturulan grupların deney süresi sonundaki ağırlıkları	61
Tablo 15.	Serum örneklerinde ölçülen CEA ve CA 72-4 düzeyleri	62
Tablo 16.	Serum örneklerinde ölçülen ZAG ve PIF düzeyleri	64
Tablo 17.	Serum örneklerinde ölçülen irisin düzeyleri	65
Tablo 18.	Serum örneklerinde ölçülen TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri	66
Tablo 19.	Beyaz Yağ Dokusuna ait gen ekspresyon sonuçları	71
Tablo 20.	Kahverengi Yağ Dokusuna ait <i>Zag</i> , <i>Ucp1</i> ekspresyon sonuçları	72
Tablo 21.	Kahverengi Yağ Dokusuna ait <i>Fndc5</i> , <i>Pgc-1α</i> ekspresyon sonuçları	74
Tablo 22.	İskelet kasına ait <i>Fndc5</i> ve <i>Pgc1-α</i> ekspresyon sonuçları	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Kanser kaşeksisinde artmış sitokin sentezi ve akut faz cevabı	14
Şekil 2. Adipoz dokuda lipid sentezi ve yıkımı	16
Şekil 3. Dermisidin proteininin alt birimleri	17
Şekil 4. İrisin'in etki mekanizması	25
Şekil 5. MNU(N-Metil-N-Nitrozoüre)'nun kimyasal yapısı	29
Şekil 6. IL-6 standart grafiği	40
Şekil 7. IL-1 α standart grafiği	42
Şekil 8. TNF- α standart grafiği	43
Şekil 9. CEA standart grafiği	44
Şekil 10. CA 72-4 standart grafiği	45
Şekil 11. PIF/DCD standart grafiği	46
Şekil 12. ZAG standart grafiği	47
Şekil 13. FNDC5/irisin standart grafiği	48
Şekil 14. RT-PCR'dan sonra agaroz jelde ürünlerin görüntüsü	55
Şekil 15. Gruplar arasında 5 aylık deney süresi sonunda kilo değişimleri	62
Şekil 16. Gruplar arasında CEA konsantrasyonları	63
Şekil 17. Gruplar arasında CA 72-4 konsantrasyonları	63
Şekil 18. Gruplar arasında ZAG konsantrasyonları	64
Şekil 19. Gruplar arasında PIF konsantrasyonları	65
Şekil 20. Gruplar arasında irisin konsantrasyonları	66
Şekil 21. Gruplar arasında TNF- α konsantrasyonları	67
Şekil 22. Gruplar arasında IL-6 konsantrasyonları	67
Şekil 23. Kanser grubunda CA 72-4 ile IL-6 korelasyon grafiği	68
Şekil 24. Kanser grubunda ZAG ile PIF korelasyon grafiği	69
Şekil 25. Kanser grubunda IL-1 ile CEA korelasyon grafiği	69
Şekil 26. Beyaz Yağ Dokusuna ait <i>Fndc5</i> , <i>Zag</i> , <i>Pgc-1α</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	71
Şekil 27. Kahverengi Yağ Dokusuna ait <i>Zag</i> , <i>Ucp1</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	73

- Şekil 28.** Kahverengi Yağ Dokusuna ait *Fndc5*, *Pgc1a* mRNA ekspresyon analizi sonuçları 74
- Şekil 29.** İskelet kasma ait *Fndc5*, *Pgc1a* mRNA ekspresyon analizi sonuçları 75

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. MNU uygulanmış farelerde, glandular mide tümörünün makroskopik görüntüsü	6
Resim 2. Gastrik adenokarsinomun histopatolojik görünümü (Endoskopik biyopsi materyalinde H&E boyamada, signet ring cells (tek yüzük hücreler) görünmekte)	7
Resim 3. Deney başlangıcındaki farelerin görüntüsü	57
Resim 4. Deney süresi sonunda farelerin görüntüsü A) kontrol, B) MNU kimyasalı uygulanan grup	58
Resim 5. Normal mide mukozası	59
Resim 6. MNU verildiği halde kanser oluşmayan gruptaki farelerin midelerinde meydana gelen patolojik değişimler	60
Resim 7. Kanser öncesi (preneo) grubundaki farelerin midelerinde meydana gelen patolojik değişimler	60
Resim 8. Kanser (neo) grubundaki farelerin midelerinde meydana gelen patolojik değişimler (1)	61
Resim 9. Kanser (neo) grubundaki farelerin midelerinde meydana gelen patolojik değişimler (2)	61
Resim 10. Mide dokusunda <i>Pgc1a</i> , <i>Zag</i> , <i>Fndc5</i> mRNA ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	70
Resim 11. Beyaz yağ dokusunda <i>Zag</i> , <i>Fndc5</i> mRNA ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	71
Resim 12. Kahverengi yağ dokusunda <i>Zag</i> , <i>Ucp1</i> mRNA ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	72
Resim 13. Kahverengi yağ dokusunda <i>Fndc5</i> , <i>Pgc-1a</i> mRNA ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	73
Resim 14. İskelet kasında <i>Fndc5</i> , <i>Pgc-1a</i> mRNA ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	74

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AMPK	AMP aktiveli protein kinaz
APR	Akut faz cevap
CaMK	Kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz
cAMP	siklik AMP
CA 72-4	Karbohidrat antijen 72-4
cDNA	Komplementer DNA
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CA 19-9	Karsinoembriyonik antijen 19-9
CNTF	Ciliary nörotrofik faktör
CREBP	cAMP cevap elementi bağlayıcı protein
CRP	C reaktif protein
DCD	Dermisidin
DMBA	7,12-dimetil-benz[a]antrasen
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNMT	DNA metiltransferaz
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent assay
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ERK	Östrojen ilişkili kinaz
FGF21	Fibroblast büyüme faktörü 21
FNDC5	Fibronektin tip III domainini içeren 5. Protein
FRCP2	Fibronektin tip III domainini içeren 2. Protein
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
GLUT4	Glukoz transporter 4
GR	Glukokortikoid reseptör
GTP	Guanozin trifosfat
HSL	Hormon sensitif lipaz
IGF-1	İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
IFN-γ	Interferon- γ

IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-15	İnterlökin-15
JAK/STAT	Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription
KYD	Kahverengi yağ dokusu
LXR	Liver X reseptör
LRG-1	Lösinden zengin glikoprotein-1
MAPK	p38 mitojen aktiveli protein kinaz
MHC-1	Major histocompability kompleks-1
MNU	N-Metil-N-Nitrozoüre
MNNG	N-metil N-nitro-N-nitrozoguanidin
mTNFα	Transmembran domaini TNF α
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NRF-1	Nükleer respiratory factor-1
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate buffered saline
PeP	Peroksizomal protein
PGC1A	Peroksizom proliferatörleri ile aktifleştirilen reseptör- γ -koaktivatör 1- α
PIF	Proteoliz indükleyici faktör
PKC	Protein kinaz C
PRC	PGC-1 ilişkili protein
REE	Resting energy expenditure (İstirahat halinde enerji tüketimi)
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RXR	Retinoik asit X reseptör
SOD	Süperoksit dismutaz
STNFα	Soluble TNF α
TACE	TNF- α dönüştürücü enzim
TAG	Triaçilgliserol
TCA	Trikloroasetik asit
TAE	Tris-Asetikasit-EDTA

TFAM	Mitokondriyal transkripsiyon faktör A
TGF	Transforming büyüme faktör
TIMP-4	Tissue inhibitor matriks metalloproteinase-4
TNF-α	Tümör necrosis factor alpha
TRPD	Teriparatide
UCP1	Uncoupling protein-1
UPL	Universal Probe Library
VEGF-β	Vasküler endotel growth faktör
VKİ	Vücut kitle indeksi
β_3-AR	β_3 -adrenerjik reseptör
ZAG	Çinko- α -2 glikoprotein

Simgeler

α-A	Alfa
β	Beta
γ	Gama
m	Mili
μ	Mikro
κ	Kappa
p	Piko
n	Nano
g	Gram
U	Unite
L	Litre
C	Santigrat

Formüller

KCl	Potasyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
NaCl	Sodyum klorür
C₂H₅OH	Etanol
H₃PO₄	Fosforik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
NaEDTA. 2H₂O	Sodyum EDTA dihidrat
CH₃OHCH₃	İzopropilalkol

1. ÖZET

Deneyisel Olarak Mide Kanseri Oluşturulan Farelerde İrisin Hormonu ve Bazı Kaşektik Faktörlerin Ekspresyonlarının İncelenmesi

İrisin, fibronektin tip 3 domaini içeren 5. protein (FNDC5)'in ekstraselüler kısmının proteoliziyle iskelet kasından kana salınan ve adipoz dokuda yağ oksidasyonunu artırarak kilo kaybına sebep olan yeni tanımlanmış bir miyokindir. İrisinle ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup, etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Zayıflamanın sıklıkla görüldüğü (mide, pankreas vb.) kanserlerle olan ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Bu çalışmada irisinin, kilo kaybına sebep olan özelliği dikkate alınarak, deneysel olarak mide kanseri oluşturulan farelerin tümör dokusundan salgılanıp salgılanmadığının ve kanser kaşeksisinde etkili olup olmadığının aydınlatılması amaçlandı.

Çalışmamızda, 60 adet *Balb/c* ırkı fareden kontrol olarak 12, N-metil-N-nitrozoüre (MNU) ile kanser oluşturmak üzere 48 fare ayrıldı ve 150 günlük oral yolla MNU uygulanmasının ardından sağ kalan farelerin dekapitasyonu ile kan, mide, iskelet kası, kahverengi ve beyaz yağ dokuları alındı. Mide dokularının histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda; kontrol, MNU uygulanıp kanser oluşmayan, kanser öncesi ve kanserli olmak üzere 4 grup oluşturulması uygun görüldü. Doku örneklerinde *Fndc5* ve kaşeksiyle ilişkili bazı proteinlerin ekspresyonları, serumlarda ise FNDC5/irisin, bazı inflamatuvar ve kanser belirteçleriyle birlikte bazı kaşektik faktörlerin seviyeleri ölçüldü. Serum örneklerinde ölçülen kaşektik ve inflamatuvar belirteçlerle, FNDC5/irisin seviyeleri kanserli grupta kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Kontrol ve kanserli mide dokularında *Fndc5* ve kaşektik faktörlerden çinko- α -2 glikoprotein (*Zag*) genlerinin ekspresyonunun olmadığı, beyaz ve kahverengi yağ dokularında kanserli grupta kontrol grubuna göre *Fndc5* ekspresyonunun anlamlı yüksek olduğu belirlendi. Sonuç olarak, mide kanserinin oluşturulduğu farelerin kahverengi ve beyaz yağ dokularında artmış *Fndc5* ekspresyonu, bu proteinin kanser kaşeksisinde kaşektik faktörler gibi etkili bir faktör olabileceği kanaatine varıldı. Ancak, midedeki kanserleşme ile irisinin kaşektik etkisi arasındaki ilişkinin mekanizması aydınlatılamadı.

Anahtar Sözcükler: FNDC5/irisin, Kaşeksi, Mide Kanseri, Miyokin

2. SUMMARY

Investigation of The Expression of Irisin and Some Cachectic Factors of Experimentally Gastric Cancer Developed Mice

Irisin is a recently defined myokine which is released into blood by proteolysis of the extracellular domain of fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) and which causes weight loss by increasing fat oxidation in adipose tissue. Researches made on irisin are limited and its mechanism of action has not yet been elucidated. No study showing its relationship with the neoplasms in which weight loss is frequently seen such as gastric and pancreatic cancers has been found. By taking the weight reducing effect of irisin into consideration, to elucidate if irisin is secreted by experimentally developed mice gastric tumor cells and also if it has any effect on cancer cachexy.

In this research, 12 of total 60 *Balb/c* mice were taken as control group and N-nitroso-N-methylurea (MNU) had been administered orally to the remaining 48. After 150 days, the survived mice were killed by decapitation and their blood and stomach, skeletal muscle, brown and white adipose tissues were taken. At the end of the histopathological evaluation of the stomach tissues, it was decided to create 4 groups of which one for the control group, and the remaining three for MNU administered mice as; with no cancer, precancer and cancer. For the tissue samples, gene expression analyzes of *Fndc5* and some cachexy related proteins had been made and in the serum samples the levels FNDC5/irisin, some inflammatory and tumor markers together with cachectic factors had been determined. The levels of the inflammatory and tumor markers and the cachectic factors in the serum samples were found to be significantly higher in the cancer group with respect to the control group. No expression of *Fndc5* and zinc- α -2 glycoprotein (*Zag*), a cachectic factor, was seen in the gastric tissues of the control and MNU administered groups, whereas a significantly increased *Fndc5* expression was found in the both white and brown adipose tissues of the cancer group. In conclusion, it can be mentioned that the increased *Fndc5* expression in the white and brown adipose tissues of the cancer developed mice could have a cachectic effect. But, it is not possible to explain the mechanism of the relationship between irisin and gastric cancer development with the results of this study.

Key Words: FNDC5/irisin, Cachexy, Gastric cancer, Miyokine

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İrisin, Böstrom ve arkadaşları tarafından 2012 yılında keşfedilmiş, ekspresyonu peroksizom proliferatörleri ile aktive edilen reseptör- γ -koaktivatör 1- α (PGC1- α) tarafından düzenlenen, tip I membran proteini olarak bilinen FNDC5'in ekstraselüler kısmının (amino ucunun) bilinmeyen bir proteaz tarafından proteolitik olarak kesilmesi sonucu iskelet kasından kana salınan ve adipoz doku üzerinde reseptörüne bağlanarak, termogenik fonksiyonu aktive eden 112 amino asitlik polipeptid yapılı bir miyokindir (1). Bu miyokin bazal seviyede kanda bulunmakta olup, akut egzersiz (kısa ve yoğun egzersiz) ile iskelet kasından kana salınımının arttığı ve subkutan (derialtı) adipoz doku üzerindeki henüz tanımlanmamış reseptörüne bağlanarak, toplam vücut enerjisinin harcanmasında önemli artışa ve zayıflamaya sebep olduğu bildirilmiştir (2, 3). Yeni keşfedilen bir protein olmasından dolayı irisin ile ilgili çalışmalar sınırlıdır ve literatür incelendiğinde bu miyokinin kanser ve kanserde meydana gelen aşırı zayıflama (kansere kaşeksisi) ile olan ilişkisini inceleyen *in vivo* ve *in vitro* herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu durumdan yola çıkılarak kanser ve kansere kaşeksisi ile irisin ilişkisinin olup olmadığının araştırılması planlanmıştır.

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelir. Kanserli olguların % 30-80'inde hastalık seyri içinde kilo kaybı, kaşeksi ortaya çıkmaktadır (4). Özellikle, mide ve pankreas tümörlerinde kilo kaybı çok hızlıdır. Kanserde kilo kaybı ve kaşeksinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bu süreçte, tümör hücrelerinden salınan proteoliz indükleyici faktör (PIF), ZAG ve vücut tarafından aşırı sentez edilen tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuvar sitokinlerin önemli olduğu ifade edilmiş ve kansere kaşeksisine sebep olan faktörlerin araştırılmasına halen devam edilmektedir (5).

Bu çalışmada, irisin kilo kaybına sebep olan özelliği dikkate alınarak, bu miyokinin tümör dokusundan salgılanıp salgılanmadığı ve kaşekside etken bir faktör olup olmadığının araştırılması amaçlandı. Deneysel olarak mide kanseri oluşturulan farelerin tümör, iskelet kası, beyaz ve kahverengi yağ dokularında ve serumlarında bazı kaşektik faktörler (ZAG, PIF), bazı inflamatuvar ve tümör belirteçler beraberliğinde FNDC5/irisin'in ekspresyonu ve seviyeleri ilk kez belirlendi. Böylelikle irisin kanser ve kansere kaşeksisi ile bir ilişkisinin olup, olmadığı ortaya konulmuş oldu.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelir (6). Hastalık bu anormal hücrelerin köken aldığı organ (akciğer, meme, mide, prostat kanseri, vb.) ve hücre tipine göre adlandırılmaktadır. Kanseri, gelişmiş ülkelerdeki istatistiklere göre ölüme yol açan nedenler arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alır ve tüm ölümlerin % 22.3'ünden sorumlu tutulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2001 yılındaki kayıtlarına göre dünyada her yıl 10 milyon kişi kanser tanısı almakta ve 6 milyon kişi de kanserden ölmektedir (7).

Kanserli vakaların % 30-80'inde hastalığın seyri boyunca kilo kaybı görülmekte, kilo kaybının miktarı ve gelişim süresi; etkilenen dokuya, tümörün tipine, büyüklüğüne, çoğalma hızına ve evresine göre değişiklik göstermektedir (4). Özellikle mide ve pankreas tümörlerinde kilo kaybı çok hızlıdır. Bunları akciğer, prostat, kolon tümörleri ve hematolojik maligniteler izlemektedir. Mide ve pankreas kanserlerinde hasta çoğunlukla hastalığın ileri evresinde aşırı kilo kaybı kliniğiyle doktora başvurmaktadır.

4.1.1. Mide Kanseri

Mide kanseri, azalan sıklığına rağmen kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindedir (8-10). Son on yılda oranların düşmesi ile birlikte, Kuzey Amerika ve Afrika'nın birçok yerinde nadir kanserler arasında yer almaya başlamış olup, Doğu Asya, Avrupa ve Güney Amerika'da halen yaygın olarak görülmektedir. 2008 yılında yapılan bir araştırmanın sonucuna göre mide kanseri dünyada 4. en yaygın kanser olup, ölüme sebep olan kanserler arasında 2. sırada yer almaktadır (11). Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Derneği'nin kayıtlarına göre mide karsinomu kanserler arasındaki görülme sıklığına göre erkeklerde 2. kadınlarda ise 5. sıradadır. Bu kanserden ölüm oranı kolon, meme ve prostat kanserleri gibi malignitelerden daha yüksektir.

Mide kanseri, birçok faktörün rol oynadığı çok aşamalı bir süreçtir. Bu kanserin gelişimi kompleks olup; onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin, deoksiribonükleik asit (DNA) tamir genlerinin, hücre döngüsü düzenleyicilerinin ve sinyal moleküllerinin çok sayıda genetik ve epigenetik değişimlerini içermektedir. Mide kanseri seyrinin, farklı aşamalarında onkogenler aktive olup bazı tümör supresör genleri inaktive olmaktadır. Yakın zamanlarda, mide kanseri ile ilişkili yeni onkogenler ve tümör baskılayıcı genler

aydınlatılmış ve bu genler Tablo 1’de özetlenmiştir. Mide kanserinin erken tanı ve tedavisinde etkili olacak yeni hedeflerin bulunması klinik olarak çok önemlidir (12).

Tablo 1. Mide kanseri ile ilişkilendirilmiş genler ve tümör oluşumundaki rolleri (Dinççelik’ten, 13)

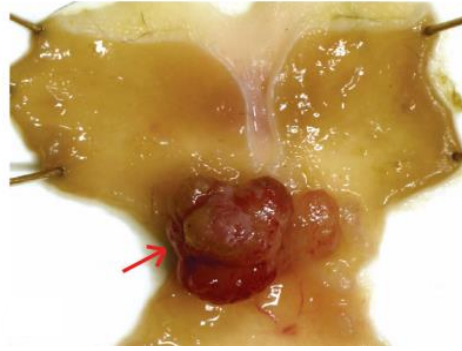
Genler	Fonksiyon	Mutasyon tipi	Tümöregenez ile ilişkisi
c-met	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu, kötü prognoz
K-sam	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Kötü prognoz
C-erbB2	Onkogen	Aşırı ekspresyon	Tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu
K-ras	Onkogen	Nokta mutasyonu	Tümör ilerlemesi, metastaz
c-myc	Onkogen	Amplifikasyon	Kötü prognoz
p-53	Tümör baskılayıcı	Nokta Mutasyonu	Çoğalma, lenf nodu tutulumu
p-27	Tümör baskılayıcı	Baskılanmış ekspresyon	Tümör invazyonu, metastaz
p-16	Tümör baskılayıcı	Baskılanmış ekspresyon	Lenf nodu tutulumu

Mide kanserlerinde gen inaktivasyonunu sağlayan birçok epigenetik mekanizma bilinmekte ve bunların başında “DNA metilasyonu yoluyla epigenetik susturulma” gelmektedir. Memelilerde DNA metilasyonu çoğunlukla CpG adacıklarında gözlenir. CpG adacıkları genlerin promotor veya diğer cis-etkili düzenleyici dizilerinde bulunmaktadır. DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri bu bölgelerde yer alan sitidinleri 5. pozisyonlarından metillemektedir. Bugüne kadar memelilerde DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b olmak üzere CpG metilasyonundan sorumlu üç enzim tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, değişik tümör tiplerinde karsinogenez ile ilişkili genlerin anormal metilasyonu saptanmıştır (13).

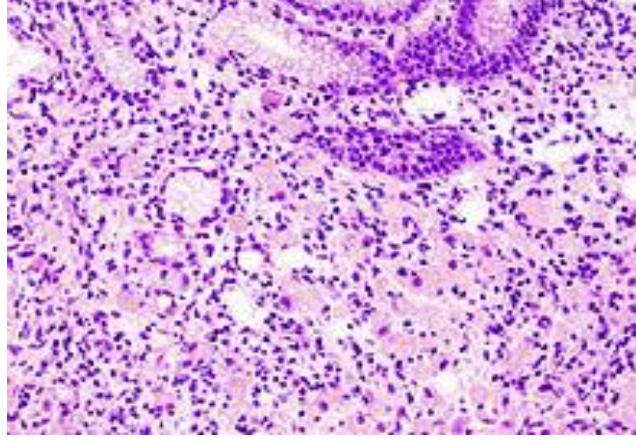
İnsanlarda mide kanseri etiyojisi, diyet, genetik, *Helicobacter pylori* gibi diyetle ilgili olmayan çeşitli predispozan faktörleri içermektedir. Diyetle ilişkili risk faktörleri, yüksek miktarda nitrat ve tuz alımıdır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu mide kanseri patogenezinde önemlidir (14). Azalmış antioksidan savunma, artmış oksidatif stres ve lipid

peroksidasyonunun, gastrik karsinogenezisde rol oynadığı görüşü savunulmaktadır (15, 16). Mide kanserini önlemek için; meyve ve sebze içerikli dengeli diyet programı uygulamak, hijyen ve sağlık önlemlerini artırmak, kanser öncülü lezyonları takip etmek, *Helicobacter pylori* taraması yaptırmak ve varsa tedavi olmak gerekmektedir. Mide kanseri sinsi seyirli bir hastalık olup oldukça geç belirti verir ve belirtiler hastalığa özgü değildir, erken aşamada yakalanıldığında bu hastalığın 5 yıllık sağ kalımı % 90'lara ulaşmaktadır. Japonya gibi mide karsinomunun sık görüldüğü bazı ülkelerde, tarama programları uygulanarak erken evrede tanı ile tedavide yüksek başarı oranları elde edilmektedir (17).

Mide kanserleri, genellikle ileri aşamada keşfedilmektedir. İleri mide kanserlerinin prognozu kötü olup, tedavisi için tek çare cerrahidir. Tedavide iyi sonuçlar alabilmek için mide kanserinin erken belirlenmesi önemlidir ve bu nedenle spesifik tarama programlarına ihtiyaç vardır (18). İnsan ve hayvan deneyleri ile kanser öncesi lezyonlarda dahil olmak üzere bu kanserin patolojik ve biyolojik analizleri yapılmıştır (19). Resim 1'de MNU uygulanmış farelerde glandular mide tümörünün makroskobik, Resim 2'de ise hematoxilen-eozin boyaması sonucu mide adenokarsinom oluşumunun histopatolojik görüntüsü yer almaktadır.



Resim 1. MNU uygulanmış farelerde, glandular mide tümörünün makroskobik görüntüsü (Tsukamoto'dan, 19)



Resim 2. Gastrik adenokarsinom histopatolojik görünümü (Endoskopik biyopsi materyalinde H&E boyamada, tek yüzük hücreleri görünmekte (Wikipedia’ dan, 20)

4.2. Kaşeksi

Kaşeksi, Yunanca “kakos hexis” den türevlenmiş “kötü durum” anlamına gelen, kanser hastaları arasında morbidite ve mortalitenin temel sebebi olmasına rağmen mekanizması halen tam olarak bilinmeyen, istem dışı gelişen ve ilerleyen bir zayıflama sendromudur (21). Kaşeksi, prelinik ve kaşeksi dönemi olmak üzere iki aşamadan oluşur, her iki dönemde gerçekleşen değişimler Tablo 2’de özetlenmiştir.

Kaşeksinin yıkıcı etkilerinden biri aşırı kilo kaybıdır. Kaşeksi durumunda adipoz doku ve iskelet kasında şiddetli doku azalması gözlenmektedir. Ancak, bu durum açlıktaki durumdan oldukça farklıdır, çünkü viseral yağ rezervleri kaşeksi durumunda korunmaktadır. Kaşekside kilo kaybı % 30’lara ulaştığı zaman, adipoz doku kaybı % 85’i ve iskelet kası kaybı ise % 75’i bulmakta ve ölüm ihtimali artmaktadır (22). İskelet kasındaki protein kaybı, yaşamın sürdürülmesini etkileyen en önemli faktörlerden biri olup, protein kaybı ile birlikte doku fizyolojik fonksiyonlarını kaybetmekte ve özellikle solunumla ilgili fonksiyonları azalmaktadır (23).

Kaşeksi, kanserli hastalarda sıklıkla ortaya çıkmakla birlikte, ölümlerin yaklaşık % 20’ sinden sorumlu tutulmaktadır (24). Ancak, kanser türleri içinde kaşeksi olma ihtimali eşit değildir. Özellikle pankreas ve mide kanserinde (% 83-87) en yüksek; non-Hodgkin lenfoma, kolon, prostat ve akciğer kanserinde (% 48-61) orta seviyede; meme, akut nonlenfotik lösemi ve sarkomada (% 31-40) ise en düşük seviyededir (25). Kaşeksinin

görülme sıklığı, kemoterapi alanlarda % 2, ileri evre kanserlerde % 51, terminal dönemde % 80 oranındadır (26).

Tablo 2. Kaşeksinin Aşamaları (Marin Cora'dan, 27)

Preklinik Dönem	Kaşeksi Dönemi
Proteoliz ve lipolizden sorumlu moleküler mekanizmalarda artmış aktivite	Gıda alımında azalma Erken doyma
Beslenme ve kilo durumu henüz bozulmamış	Kas kitlesinde azalma Yağ kitlesinde azalma Kilo Kaybı Anemi Hipoalbuminemi

4.2.1. Kanser Kaşeksisi

Kaşeksi, şiddetli adipoz doku ve iskelet kası kaybı ile karakterize bir katabolik sendromdur. Kanser kaşeksisi, ilerleyen adipoz doku ve iskelet kası kaybıyla ortaya çıkmaktadır. Bu durumda adipoz doku kütlesi % 85 azalmakta, kilo kaybı % 30'lara ulaşmakta, glukoz ve yağ asiti döngüsü de % 25 oranında artmaktadır (22). Başka bir deyişle, kanser kaşeksisi anoreksi (iştahsızlık), iskelet kası atrofisi, doku kaybı, anergi, yorgunluk, anemi ve hipoalbuminemi gibi bulguların tamamının oluşturduğu klinik tablonun adıdır. Dermansızlık (asthenia), kanser kaşeksisinde kas atrofisi ile doğrudan ilişkilidir ve kanser hastalarının hayat kalitesini azaltmaktadır. Kanser hastalarındaki performans azalması, iskelet kasında ileri derecedeki protein yıkımının bir göstergesidir (25).

Evde yaşayan ileri derecedeki pankreas kanserli kaşektik hastalarda, istirahat halindeki enerji harcama seviyesi (REE) sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında artmış ancak total enerji harcanması ve fiziksel aktivite seviyesi azalmıştır (28). Artmış REE seviyesi, akciğer kanserli hastalarda da gözlenmiş fakat mide ve kolorektal kanserli hastalarda artış olmamıştır (29). REE artışı, muhtemelen, futility (boşuna) metabolik döngülerdeki artışlardan kaynaklanan enerji harcanmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Kaşeksi indüklü tümörlerde gen ekspresyonları da değişmiş olabilir. Bunun sonucu olarak da

adipoz dokuda bulunan trigliserid depolarının ve iskelet kasında bulunan miyofibrillerdeki proteinlerin yıkım faktörleri üretilebilir.

4.2.2. Kanser Kaşeksisinde Enerji Kullanımı

Tümör varlığında ‘futile cycles’ yani boşuna devirler artmaktadır. Bu devirlerden biri, tümör varlığında artan triaçilgliserol yıkımı sonucu açığa çıkan serbest yağ asitlerinin adipoz dokudan salınır salınmaz, tekrar esterleşme reaksiyonları girmesidir. Bu durum tümör içeren farelerde 3 kat artmakta ancak kaşeksili olan ve olmayanlar arasında bir fark oluşturmamaktadır (30). Diğer bir boşuna devir ise Cori devridir. Bu devirde kanser hastalarında yaklaşık 300 kcal/gün enerji kaybı hesaplanmaktadır (31). Tümör hücreleri, yüksek oranda glukozu kullanarak ve bunu laktata dönüştürerek dolaşıma vermektedir. Glukozun piruvata değil de laktata dönüşüm nedeni, Krebs devri ve mitokondiyal oksidatif fosforilasyonu gerçekleştirebilmek için gereken oksijenin bu hücrelerde yetersiz olmasıdır. Üretilen laktat dolaşım ile karaciğere gelir ve burada yeniden glukozla dönüştürülmekte ve bu devire Cori devri denilmektedir. Cori devri, normalde glukozun dönüşümünün % 20’sinden sorumlu olmasına rağmen, kaşektik kanser hastalarında bu oran % 50’ye çıkmakta ve laktat üretimi ise % 60 seviyelerine ulaşmaktadır (32). Glukoneogenez ile laktattan glukoz üretiminde 6 adenzin trifosfat (ATP) kullanılmakta, bu durum tümörün bulunduğu konakçıyı etkilemezken, kaşektik durumlarda REE artışına katkı sağlamaktadır. Enerji harcanmasını artıran diğer bir mekanizma ise mitokondiyal “uncoupling” proteinlerinin ekspresyonlarının ve aktivitelerinin artmasıdır. Bu proteinler protonları mitokondiyal iç membrana doğru taşır, adenzin difosfat (ADP) fosforillenemez ve enerji ısı olarak açığa çıkar. *Uncoupling protein 1 (UCP1)* sadece kahverengi yağ dokusunda (KYD), *uncoupling protein 3 (UCP3)* ise KYD ve iskelet kasında bulunmaktadır. Kaşektik kanser hastalarının kahverengi yağ dokuları sağlıklı kişilerle kıyaslandığında, kaşektik kanser hastalarında periadrenal dokularındaki KYD miktarı % 80, kontrollerde ise % 13 oranında bulunmuş, yaklaşık 6 kat artış görülmüştür (33).

MAC16 tümörü enjekte edilmiş ve adekarsinom oluşturulmuş farelerin kahverengi yağ dokularında *UCP1*, iskelet kasında ise *UCP3* mRNA seviyeleri kontrollere oranla anlamlı artmıştır (34). Başka bir çalışmada *UCP3* mRNA seviyeleri, kilo kaybı olan kanser hastalarının iskelet kasında, kilo kaybı olmayan kanser hastalarına oranla yüksektir (35). Kanser hastalarında *UCP* ekspresyonundaki artış, REE artırmakta ve bu durum kilo kaybının artmasına sebep olmaktadır.

Belirli sitokinler ve tümör ürünleri de *UCP* ekspresyonlarını upregüle etmektedir. Kaşekside, tümör varlığında gerçekleşen metabolik değişimler nedeniyle genellikle REE artmakta bazı durumlarda ise normal seviyede kalmaktadır.

4.2.3. Kanser Kaşeksisinde Adipoz Doku ve İskelet Kası Değişimleri

Kilo kaybı olan kanser hastalarında, sağlıklı kişiler ve kilo kaybı olmayan kanser hastalarına kıyasla, lipoliz artışından kaynaklı gliserol ve yağ asitleri döngüsü, (36) dolayısıyla da açlık plazma gliserol konsantrasyonları yüksektir (37). Salınan yağ asitleri hızlı bir şekilde okside olur ve bunun sonucunda yağ asitleri oksidasyonunda % 20 artış gerçekleşmektedir. Kanser hastalarının adipoz dokularında lipoprotein lipaz (LPL) azalması ilgili bir kanıt yoktur ancak hormon duyarlı lipaz (HSL) seviyesinde 2 kat göreceli bir artış vardır ve triaçilgliserol hidrolizi upregüle olmuştur (38). Yağ asitlerinin salınımı ile boşuna devrin sürdürülmesi iskelet kası ve kahverengi yağ dokusunda ısı üretimi için enerji kaynağı olarak kullanılır.

Kanser hastaları ile ilgili birçok çalışma, iskelet kasında protein sentezinde azalma ve protein degradasyonunda artma olduğunu göstermektedir (39). Kilo kaybı olan kanser hastalarının iskelet kasında, ubiquitin-proteazom proteolitik yolunda yer alan genlerin ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığı yapılan araştırmalarla da gösterilmiştir (40, 41).

4.2.4. Kanser Kaşeksisinde Doku Yıkımında Yer Alan Faktörler

Tümör varlığında, konakçı ve tümör tarafından çok sayıda metabolik faktör üretilmekte ve bunlar kanser kaşeksisindeki doku (yağ ve iskelet kası) harcanmasında kritik rol oynamaktadır. Mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, kanser kaşeksisinde tümör hücrelerinden salınan proteoliz indükleyici faktör (PIF), lipid mobilize edici faktör (LMF)/ Çinko- α -2-glikoprotein (ZAG), vücut tarafından aşırı sentez edilen tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuvar sitokinlerin önemli olduğu ifade edilmiş olup, kanser kaşeksisine sebep olan faktörlerin araştırılmasına devam edilmektedir (42).

4.2.4.1. Sitokinler

Sitokinler genel olarak bağışıklık ve yangı olaylarını yani organizmanın savunma mekanizmasını düzenleyen proteinlerdir. Bunun yanında yapılan çalışmalarda birçok sitokinin tümör hücreleri üzerine olumlu veya olumsuz etkilerinin bulunması, kanserleşme

sürecinde sitokinleri önemli bir noktaya taşımıştır (43). Kanser kaşeksisi de doku hasarı, enfeksiyon ya da inflamasyon cevabı ile benzerlik göstermektedir. Kanser kaşeksisinde karaciğerde protein sentezi değişmekte ve albumin üretimi yerini akut faz protein cevabına dönüştürmekte ve C-reaktif protein (CRP), fibrinojen ve alfa-1 antitripsin gibi akut faz proteinler üretilmektedir. Akciğer ve gastrointestinal kanserli hastalarda, artmış CRP seviyesi kilo kaybı oranıyla, pankreatik kanserli hastalarda ise artmış fibrinojen seviyesi, kısa yaşam süresiyle ilişkilidir (44). Akut faz cevabı (APR)'nin sitokinler (IL-6, IL-8, TNF- α) tarafından aktive edildiği ve kanser kaşeksisinde rol alabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan hayvan deneylerinde sitokinlerin APR'ı kilo kaybını indüklemeyen uyardığı, IL-6'nın sağlıklı farelere enjekte edildiği 7 günlük periyotta, vücut ağırlığına etkisi olmadan hepatik APR'ı indüklediği gösterilmiştir (45). IL-6 ailesinin bir üyesi olan "ciliary" nörotrofik faktör (CNTF), IL-6 ile aynı seviyede farelere enjekte edildiğinde, hem kilo kaybına hem de APR'a sebep olmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda APR, kaşeksi gelişimi ile ilişkilidir ancak tek başına bu duruma sebep olamamaktadır.

Ayrıca sitokinler, tümör hücreleri ve konakçı dokular tarafından üretilmektedir. Lewis akciğer tümörüne sahip farelerde, tümör büyüdüğünde ve kaşeksi gözlemlendiğinde dalak hücreleri tarafından IL-6, IL-11, oncostatin M üretilmektedir. Pankreatik tümör hücre serisi tarafından IL-8'in üretildiği gösterilmiştir (46). Kilo kaybı olan kanser hastalarında, tümör büyüklüğü ile TNF- α seviyelerindeki artış arasındaki ilişki tam olarak kabul edilmesede, çalışmalarda serum TNF- α ölçümü tümör yükünün bir göstergesi olarak kullanılabilir (47). Pankreas kanserli 63 hastanın % 36,5'lik kısmında serum TNF- α seviyelerinin metastazik pankreas tümörüne sahip kişilerde yüksek, diğer hastalarda ise düşük seviyede olduğu gösterilmiştir (48). Benzer konuda yapılan farklı çalışmalarda ise ileri ve terminal dönemdeki kanser hastalarında, TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ seviyeleri kilo kaybı ile ilişkili bulunmamıştır (49). Buna rağmen TNF- α , IL-1, IL-6 genellikle kanser hastalarının serum ve plazmasında artarken (50), IFN- γ ise kaşeksi semptomlarının sorumlu olarak bazı tümör çeşitlerinde artış göstermektedir. Sonuç olarak yapılan çalışmalar göstermiştir ki, sitokinler çeşitli tümör tiplerinde kaşeksi indüklenmesinde yer alırken, her biri tek başına bu işi gerçekleştiremez, başka sitokin ve faktörlerle birlikte kaşeksi indüklenmesinden sorumludur.

4.2.4.2. Tümör Nekrozis Faktör – α

TNF- α , 26 kDa ağırlığında transmembran monomeri (mTNF α) olarak sentezlenen bir sitokindir. mTNF α , TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından proteolitik olarak yıkılarak, 17 kDa'luk çözülebilir TNF- α (sTNF α) molekülü oluşur (51). İnsanlarda mTNF- α , 233 amino asitten, sTNF- α ise 77. ve 233. amino asitler arasındaki 157 amino asitlik kısımdan oluşmaktadır. Farelerde ise bu sitokin 235 amino asittir (52, 53). Her iki molekül de (mTNF- α , sTNF- α) çok sayıda hücrel ve biyolojik prosesi (immün fonksiyon, hücre farklılaşması, proliferasyon, apoptoz ve enerji metabolizması vb.) düzenlemektedir. mTNF- α , parakrin ve otokrin sinyallere, sTNF- α ise endokrin sinyallere aracılık eder. sTNF- α 'nın endokrin fonksiyonunu gerçekleştirebilmesi, kandaki yüksek seviyelerinin devamlılığına bağlıdır ve bunun katabolik hastalık durumlarında (kaşektik durumlarla ilişkili sepsis, kanser vb.) meydana gelmesi daha muhtemeldir (54). TNF- α , akut inflamasyon durumunda makrofajlar ve monositler tarafından üretilen inflamatuvar bir sitokin olup, hücre içi sinyal yollarını etkileyerek apoptoz ve nekroza neden olmaktadır. Kanser ve enfeksiyona direnç gösteren önemli bir protein olmakla birlikte, birçok biyolojik fonksiyona sahiptir ancak bunların mekanizmaları karışıktır. Bu protein bazı enfeksiyonlara karşı direnmeyi sağlarken, bazı patolojik komplikasyonlara da aracılık ederek birbirine zıt roller üstlenmiştir. TNF- α geni çıkarılmış farelerde yapılan araştırmada leishmania direncinin olmadığı, dalaklarında ve dalağın germinal merkezinde fonksiyon kayıpları olduğu görülmüştür. TNF- α reseptörü çıkarılmış farelerde mikrobiyal enfeksiyonlara karşı hassasiyet artmış ve bakteriyel endotoksinlere karşı inflamatuvar cevap baskılanmıştır (55).

Kilo kaybından sorumlu temel inflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın reseptörleri kas, karaciğer ve adipoz dokularda bulunur. Kasta protein yıkımını, karaciğerde protein sentezini ve glukoz üretimini artırır. Yağ dokusunda lipoprotein lipaz (LPL) enzimini inhibe ederek kanser kaşeksininin gelişiminde rol oynar (56-58). Biyolojik olarak aktif TNF- α 'nın yarılanma ömrünün kısa olması ve çözülebilir reseptörleri ile kompleks oluşturması, tayininde belirsizliğe sebep olmaktadır. Çin hamster over hücreleri insan TNF- α geni ile birlikte nude farelere enjekte edildiğinde, bu farelerde kaşeksininin olduğu gözlemlenmiştir. Bu farelerin normalde TNF- α serum değerleri 1.0-22.8 ng/mL iken, kanser olanlarda yaklaşık 1000 kat daha yüksek bulunmuştur. İlginç olarak bu hücrelerin kilo kaybı üzerine etkilerinin transplante edilen sahayada bağımlı olduğunda ortaya

konulmuştur (59). Bu hücreler intraserebral olarak verildiğinde, iştahsızlık veya anoreksi ve kilo kaybı gözlenmiş, tüm vücut lipid seviyesi azalmış ancak protein seviyeleri korunmuştur. İntramuskular olarak verildiğinde şiddetli anoreksiya gelişmemiş, 50 gün sonra kaşeksi gelişmiş ve bununla birlikte protein ve lipid tüketimi olmuştur.

4.2.4.3. İnterlökin-1

İnterlökin-1 (IL-1), 15 kDa ağırlığında, makrofaj, endotel ve bazı epitelyal hücrelerden salgılanan prototipik proinflamatuvar bir sitokindir. IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu iki formun biyolojik aktiviteleri ayırt edilememiştir. IL-1, başka bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ile uyum içinde, hemen hemen, her hücre tipini etkilemekte ve immunoadjuvant (bağışıklığa yardımcı) olarak fonksiyon görmektedir. Özellikle IL-1 β 'nin sentezi, salgılanması ve aktivitesi sıkı bir kontrol ile düzenlenmektedir (60).

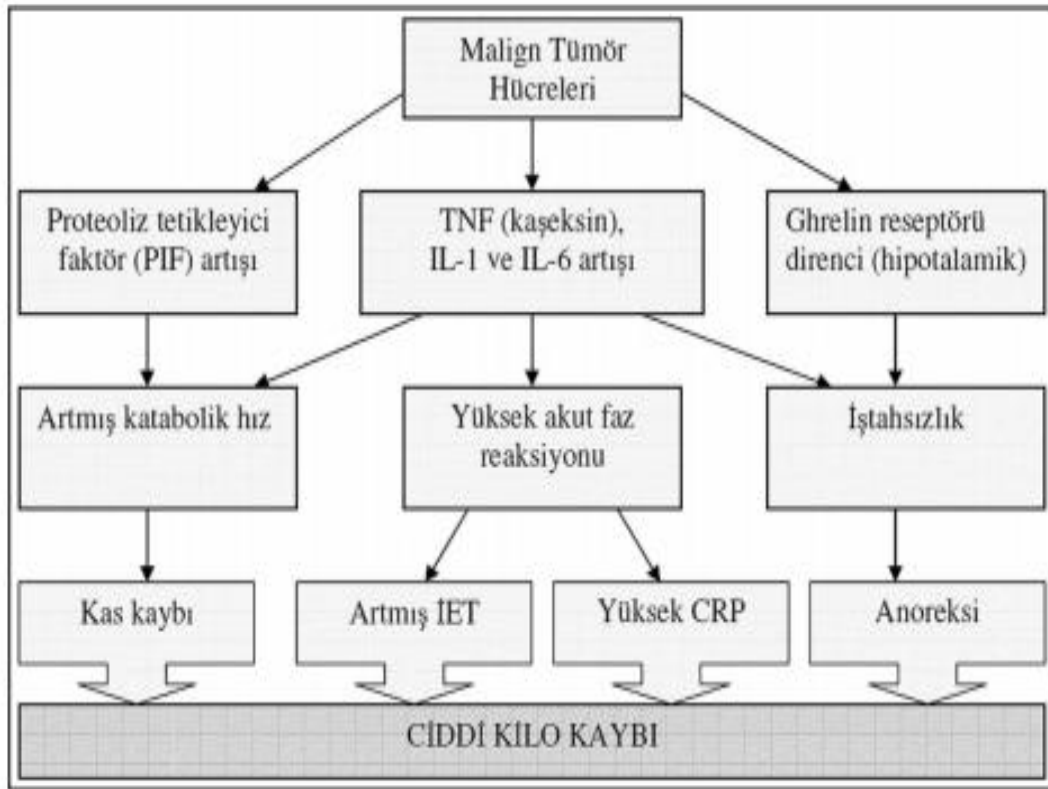
Enfeksiyon, travma ve kansere bağlı olarak IL-1 salınımı artmaktadır. Kaşektin olarak bilinen kilo kaybının ana mediatörü olan TNF- α 'nın, salınımını arttırdığı yapılan birçok araştırma ile bildirilmiştir (57, 58, 61).

4.2.4.4. İnterlökin-6

İnterlökin-6 (IL-6), insanlarda sinyal dizilişli hali 212, olgun hali 183 amino asitten oluşan bir proteindir (62). Farelerde ise sinyal dizilişli hali 211, olgun hali 187 amino asitten oluşan bir proteindir (63). Aktifleşmiş mononükleer fagositler, endotelyal hücreler ve fibroblastlar gibi birçok hücre tipinden salgılanmakta ve TNF- α tarafından salınımı indüklenmektedir. IL-6, biyolojik etkilerini IL-6 reseptörüne bağlanarak gösterir. Janus Activated Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) sinyal yolunu aktive etmektedir. Mekanizması leptin hormonu ile benzemektedir (64). Hücre savunmasında merkezi rol oynayan çok fonksiyonlu bir sitokin olup, karaciğerde akut faz proteinlerin sentezini uyarmakta ve doku katabolizmasını tetiklemektedir. Akut faz cevabını oluşturmada güçlü etkisi bulunmakla birlikte, fazla ekspresyonu multiple miyelom, romatoid artrit, psöriyazis ve menopoza sonrası oluşan osteoporoz gibi bazı hastalıkların patolojisiyle ilişkilidir (65).

Pedersen ve arkadaşları, çok sayıda biyolojik olayda önemli olan IL-6 (en iyi tanımlanan miyokin) ve diğer miyokinleri aydınlatmıştır. IL-6, fiziksel aktivitenin uzunluğu ile orantılı olarak, plazma konsantrasyonundaki artışı nedeniyle iskelet kasının

salgı ürünü olarak keşfedilmiş, akut ve yoğun egzersiz sonrası iskelet kası hücrelerinde ve plazmadaki IL-6 artışı bir sürpriz olmuş ve bir miyokin olarak kabul edilmiştir. İnsan iskelet kasında dinlenme esnasında IL-6 mRNA seviyesi ölçülmüş ve oldukça düşük bulunmuştur (66). IL-6 seviyesi, kaşeksinin erken evrelerinde yavaş artarken, yapılan çalışma sonuçlarına göre ölümden hemen önce IL-6'nın ani ve hızlı arttığı gösterilmiştir. Şekil 1'de kanser kaşeksisinde artmış sitokin sentezi ve akut faz cevabı sonucu ortaya çıkan ciddi kilo kaybı ile ilgili metabolik tablo özetlenmiştir.



Şekil 1. Kanser kaşeksisinde artmış sitokin sentezi ve akut faz cevabı (Saka'dan, 67)

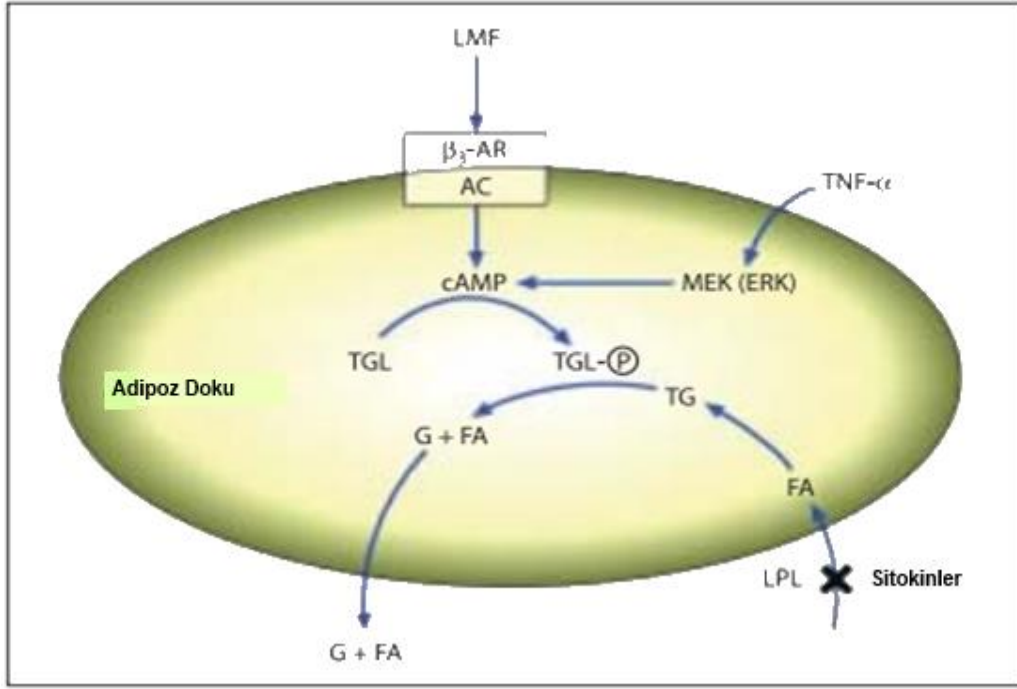
4.2.4.5. Lipid mobilize edici faktör /Çinko- α -2-glikoprotein

Tümör ve konakçı kaynaklı çok sayıda faktör kaşekside lipid yıkımına sebep olmaktadır. Bu faktörler arasında inflamatuvar sitokinler TNF, IL-1, IL-6 ve LMF/ZAG gibi lipolitik faktörler yer almaktadır. Lipid mobilize edici aktiviteye sahip olan tümör ürünü LMF, kanser kaşeksisini olan hastaların idrarından 41 kDA'luk glikoprotein olarak saflaştırılmıştır (68,69). Bu glikoprotein, plazma proteini olan çinko- α -2-glikoprotein (ZAG, AZGP1) ile aminoasit dizilişi, elektroforetik mobilite, immunoreaktivite açısından homoloji göstermektedir. ZAG, 1961 yılında insan plazmasında keşfedilmiş, 41 kDA

ağırlığında bir salgı proteindir (70). ZAG adını, çinko tuzları ile birlikte çökme eğiliminin olması ve plazma α -2 globulinleri ile elektroforetik mobilitesinin benzerlik göstermesinden almaktadır (71). Aminoasit sekansı ve yapısı, major histocompatibility kompleks-1 (MHC-1) ailesi ile yüksek oranda homoloji gösterir ve bağışıklıkta da önemli fonksiyonları üstlenmiştir. Makroglobulin ailesinin bir üyesi olup, tümör büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederken, hidrolaz enzimlerine bağlanarak apoptozu aktive etmektedir (72).

ZAG geni (*AZGP1*), 7. kromozomun 22.1'inde lokalizedir. Floresan hibridizasyon karyotiplemesine göre bu gen 4 ekzon ve 3 introndan oluşmaktadır. İnsan plazmasında keşfinin ardından birçok dokuda gösterilmiştir. İmmunohistokimyasal çalışmaların sonuçlarına göre, temel olarak meme, prostat, KC ve diğer gastrointestinal organların epitel hücrelerinde bulunmakta, meme, prostat ve akciğer kanseri gibi malign birçok tümörde yüksek derecede eksprese olmakta buna bağlı kanser biyobelirteci olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (73). Bing ve arkadaşları, farelerde yaptıkları bir araştırmada *Zag* sinyalini karaciğer (KC), kahverengi yağ dokusu (KYD) ve murin adenokarsinom 16 (MAC16) tümörünün aşılacağı farelerin beyaz yağ dokusunda (BYD) güçlü, kalp, akciğer (AC), epididimal BYD'da orta derecede alırken, böbrek, dalak, bağırsak, beyin ve hipotalamusta ise sinyal alamamışlardır (74).

Salgı epitel hücrelerinde de üretilen ZAG, çok sayıda vücut sıvısında bulunmakta ve insan vücudunda fertilizasyon, immün düzenleme ve lipid mobilizasyonu gibi birçok fonksiyonda görev almaktadır. Safılaştırılmış ZAG'ın obez ve outbred NMRI farelere uygulanması sonucunda vücut yağ kütlelerinde azalma olduğu ortaya konulmuştur. In vitro yapılan bir çalışmada, insan ve kemirgen adipositlerinden izole edilmiş ZAG'ın lipolizi indüklediği gösterilmiş ve bunu β 3 adrenerjik reseptör (β ₃-AR) aracılığıyla yaptığı ortaya konulmuştur. LMF ve ZAG'ın etki mekanizmaları da aynıdır ve Şekil 2'de özetlenmiştir. Her ikisi de β ₃-AR'ye bağlanarak, GTP bağımlı yolakla, adenilat siklazı uyarıp ATP'den siklik AMP (cAMP) üretmekte ve cAMP artışı ile kemirgenlerin epididimal adipositlerinde doğrudan lipolizi uyarmaktadır (75).



Şekil 2. Adipoz dokuda lipid sentezi ve yıkımı (Tisdale'den, 76)

KYD'da *UCP1* ekspresyonundaki artış adipoz doku kaybına eşlik etmektedir (77). ZAG, KYD'nin primer kültüründe *UCP1*'in ve kemirgen miyotüplerinde *UCP2* ile *UCP3*'ün ekspresyonlarını arttırmaktadır. *UCP1* ve *UCP2* β_3 -AR aracılığıyla, *UCP3* ise mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz aracılığıyla fonksiyon göstermektedir. Yakın zamanda yapılan araştırmalara göre, ZAG, sadece belirli tümörler tarafından değil, beyaz yağ dokusu (BYD) ve KYD tarafından da üretilmektedir. ZAG mRNA ve protein seviyesinin her iki adipoz dokuda artması kaşeksinin indüklenmesine eşlik etmektedir. Adiposit türevli ZAG, lipoliz ve *UCP* ekspresyonunu indüklemektedir (78).

4.2.4.6. Proteoliz İndükleyici Faktör

Dermisidin (DCD) proteini 19 aa'lık sinyal peptid, 30 aa proteoliz indükleyici faktör-merkez peptid (PIF-CP) (nöronal yaşam uyarıcı peptid), 13 aa propeptid, 48 aa dermicidin-1 (DCD-1) polipeptidinden oluşmaktadır (Bkz. Şekil 3). PIF-CP, nöronal yaşam faktörü (Y-P30) ile aynı aa sekansına sahiptir (79). DCD mRNA'sının translasyonu ile 110 aa'lık DCD proteini oluşmaktadır.

19 aa sinyal peptid	30 aa PIF-merkez/ Y-P30 polipeptid	13 aa propeptid	48aa dermisidin (DCD-1) polipeptid
---------------------	------------------------------------	-----------------	------------------------------------

Şekil 3. Demisidin proteininin alt birimleri (Stewart'dan, 79)

C-terminal peptid olan DCD-1, ter bezlerinde bulunur, antibakteriyal ve antifungal aktivitelere sahiptir. N-terminalde bulunan PIF-merkez peptid, difüz edilebilir peptid olup, şiddetli oksidatif stres altında nöral hücre yaşamını uyarılmaktadır. N-terminalinin glikozillenmiş formu da kaşeksi ile ilişkilidir. PIF merkez peptidin, glikozilasyonu önemlidir. Glikozillenmiş PIF-merkez peptid farelerde kas proteolizinin artmasına sebep olmaktadır. PIF merkez peptid üzerinde üç tane O-glikozilasyon ve iki tane N-glikozilasyon bölgesi vardır. PIF merkez peptidinin aksine, DCD glikozillenmemiş formdadır (21). PIF, kaşektik bir faktör olarak tanımlanmış, ilk olarak MAC16 tümörüne sahip kemirgenlerin serumundan izole edilmiştir. MAC16 tümörü implantasyonu ile farelerde kaşeksi indüklenmiş ve PIF fare serumuna ilave edilen antikora bağlanarak bu serumdan saflaştırılmıştır ancak MAC13 tümörüne (kaşeksi indüklü olmayan) sahip fare serumlarında PIF'a rastlanılmamıştır (80). Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, PIF'ın iştahı azaltmadan, protein yıkımı artışı uyararak kilo kaybına neden olduğu gösterilmiş ve kaşeksi indüklü tümöre sahip farelerin dolaşımında aydınlatılmıştır. Farelere 24 saatlik PIF enjeksiyonu, vücut ağırlığında yaklaşık % 13 azalmaya sebep olurken, yiyecek ve içecek alımında azalma olmamıştır (81).

PIF, sağlıklı kişilerin idrarında bulunmazken, kaşektik kanser hastalarının idrarında bulunmamaktadır. Kilo kaybı ile PIF arasında pozitif korelasyon olması, bu proteinin yeni kaşektik faktör olarak aydınlatılmasına sebep olmuştur. İnsanlarda bulunan PIF, 12. kromozomda 13.1 de lokalizedir. 523 baz çiftinden oluşur ve 6 ekzonu vardır. Saflaştırılmış PIF yaklaşık 24 kDa ağırlığında olup, N-(10kDa) ve O-bağlı (6kDa) sülfatlanmış oligosakkarit kısa polipeptid zinciri içermektedir. PIF, kilo kaybı olmayan kanser hastalarında ve benign hastalığı olup kilo kaybı olan hastalarda bulunmaz (82). PIF'ın proteolitik olarak aktif olabilmesi için glikozilasyon gerekmektedir, ne PIF-CP tek başına ne de deglikozile doğal PIF'ın farelerde kilo kaybı üzerine hiçbir etkisi bulunmamaktadır.

Glikozillenmiş PIF, hepatositlerde transkripsiyon faktörleri NF-kB ve STAT3 aracılığıyla, akut faz proteini CRP ve sitokinler IL-6 ve IL-8 üretimini uyarmaktadır. Böylece PIF, kanser kaşeksisinde proteolitik fonksiyonunun yanı sıra inflamatuvar duruma da katkı sağlamaktadır (21). Bazı gastrointestinal kanserler ve kanser hücreleri, glikozillenmiş PIF proteinini üretmektedir. Glikozillenmiş PIF, tümör hücrelerinde immunohistokimya, idrarda ise western blotlama ile belirlenmiştir. Tümör hücrelerinde glikozillenmiş PIF in varlığında bu hastalar arasında kilo kaybı artmaktadır. PIF ayrıca insan melanoma (G361) ve pankreatik hücre serilerinde aydınlatılmıştır. Anlamlı derecede yüksek kilo kaybının olduğu pankreas kanserli hastaların % 80'inin idrarında bu protein belirlenmiştir.

PIF ekspresyonu prostat, kolon, karaciğer, özafagus, akciğer ve pankreas gibi kilo kaybının gerçekleştiği tümörlerde de bulunmuştur. Normal dokularda ise ekspresyonuna rastlanılmamıştır (83). Vücut ağırlığındaki azalmaya katkısı, protein sentezini % 50 azaltırken, yıkımını % 50 oranında artırmasından kaynaklanmaktadır. İskelet kası ve kemirgen miyotüplerinin *PIF* ile muamele edilmesi, ubiquitin- proteozom proteolitik yolunda yer alan anahtar moleküllerin ekspresyonunu ve aktivitesini artırmaktadır (84).

İnsanlarda *PIF*'in mRNA dizisi aydınlatılmış olmakla beraber farelere özgü olan *Pif*'in mRNA dizilişi hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, insan dermisidin proteini içinde yer alan 20 aminoasitlik *PIF* dizisi ile fare *Pif* sekansı arasında, % 90 homoloji olduğu söylenmektedir. Sonuç olarak, tümör dokusundan salgılanan LMF/ZAG'ın adipoz dokunun, *PIF*'in ise iskelet kasın atrofisine sebep olarak kanserli hastalarda kaşeksi gelişmesine yol açtığı ifade edilebilir (85).

4.3. Yağ Dokusunun Yapısı

Yağ dokusu lipit yüklü yağ hücrelerinden oluşan gevşek bağ dokusu olarak kabul edilmektedir (86). Yağ hücreleri, yetişkinlerde yağ dokusunun yaklaşık % 35-70'ini, toplam hücre popülasyonunun ise yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır. Yağ dokusu sadece yağ hücrelerinden değil, makrofajlarında dahil olduğu stromavasküler fraksiyonda bulunan diğer hücre tipleri, fibroblastlar, perisitler, kan hücreleri, endotelial hücreler, preadipositler, az farklılaşmış mezenkimal hücrelerin birleşiminden oluşmuştur. Lipit damlacıkları kolesterol, fosfolipit, yağ asitleri, trigliserid (TG) ve nötral yağların karışımını içerir. Depolanan total lipit içeriğinin % 95'i palmitik asit ve oleik asitten oluşan trigliseritlerdir.

Geriye kalan kısım ise diaçilgliserol, fosfolipit, esterleşmemiş yağ asidi ve kolesterolden oluşmaktadır. Olgun beyaz yağ hücreleri tek büyük lipit damlacığı içermekte ve uniloküler olarak tanımlanmaktadır.

4.3.1. Yağ Dokusunun Türleri, Vücuttaki Yerleşimi ve Özellikleri

Yağ dokusu anatomik yerlerine göre subkutan ve visseral yağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık % 80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusudur. Subkutan yağ dokusu boyun, sırt, bel, karın, gluteal, femoral ve meme bölgesinde bulunurken yaklaşık % 20'si ise visseral yağ olarak mide, barsak, göbek, pankreas, aort, kalp, böbrek ve iç üreme organları çevresinde bulunmaktadır. Ayrıca kas içinde ve kas çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da visseral yağ dokusuna dahil edilmektedir (86). Yağ dokusu hücre yapısı, rengi ve fonksiyon farklılıkları açısından ise iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar beyaz yağ dokusu ve kahverengi yağ dokusudur (87). Beyaz yağ dokusu yetişkinlerde deri altında, böbrek çevresinde ve visseral bölgede bol miktarda bulunurken, (88) kahverengi yağ dokusu ise insanlarda özellikle yeni doğanlarda bulunur ve zamanla miktarı azalan mitokondri yönünden zengin bir dokudur (89, 90). Beyaz yağ dokusu ve kahverengi yağ dokusu arasındaki farklılıklar Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Kemirgenlerde beyaz ve kahverengi yağ dokusu belirteç farklılıkları (Frühbeck'den, 86)

	Beyaz Yağ Dokusu	Kahverengi Yağ Dokusu
Dokunun bol bulunduğu yer	İnguinal, retroperitoneal, gonadal	İnterskapular, böbrek çevresi, koltuk altı, paravertebral
Renk	Sarı veya fildişi	Kahverengi
Damar sistemi	++	+++
Hücre şekli	Uniloküler hücre	Multiloküler hücre
Mitokondri	+	++
Uncoupling proteinler	UCP2(++)	UCP1, UCP2(+), UCP3
Adrenoreseptörler	β 3(++), α 2(+)	β 3(+++)

Beyaz yağ dokusunun fonksiyonları üç başlık altında toplanmaktadır. Serbest yağ asitlerini triaçilgliserol (TAG) olarak depolama, depolamış olduğu TAG'leri gliserol ve

serbest yağ asitlerine katabolize etme ve son olarakta, özel biyolojik fonksiyonları olan proteinleri, sitokinleri, hormonları ve adipokinleri üreterek salgılamaktadır (91). Yağ dokusu aynı zamanda yağ hücrelerinin depo ve fonksiyonel karakteristiklerinin topografik yerleşimine göre farklılıklar göstermektedir. Genel olarak subkutan ve viseral yağ dokusu olarak sınıflandırılan yağ dokularında fonksiyonel ve yapısal farklılıklar bulunmaktadır.

4.3.2. Kahverengi Yağ Dokusu ve Uncoupling Protein-1

Kahverengi yağ dokusu yeni doğanlarda, küçük omurgalılarda ve kış uykusuna yatan hayvanlarda, yağ dokusunun önemli bir kısmını oluşturur. BYD'dan farklı olarak adipositleri daha küçük (çapı 20-40 µm) ve biçimleri poligonaldır. Beyaz yağ dokusundaki adipositler de triaçilgliserollerini depolamakta ancak hücrenin ortasında tek bir büyük damlacık olarak değil de, daha küçük yağ damlacıkları şeklinde depo etmektedir. Bu hücrelerde daha fazla mitokondri ve daha zengin bir kılcal damar ağı bulunur. Dokuya kendi rengini veren de mitokondrielerde bulunan sitokromlar ve hemoglobindir. Kahverengi adipositlerin ayırt edici bir özelliğide mitokondriyal kenetlenmeyi bozan termogenin proteinini kodlayan *UCPI* geninin güçlü ifadesidir. Kemirgenlerde de soğuğa maruz kalma durumunda adaptif termogeneze sorumlu olan en önemli dokudur (92).

KYD ve iskelet kasının termogenik etkisi uncoupling proteinler varlığındadır. *UCPI* sadece KYD'da, *UCP2* birçok dokuda ve *UCP3* ise sadece KYD ve iskelet kasında bulunmaktadır (93). KYD'su bebeklerde vücut sıcaklığının düzenlenmesine katkı sağlamasına rağmen, yetişkinlerdeki fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (94).

MAC16 enjeksiyonu ile kanser kaşeksisi oluşturulmuş farelerde yapılan bir çalışmada, KYD'de *UCPI*, iskelet kasında *UCP2* ve *UCP3* ekspresyonları kontrol farelerle kıyaslandığında oldukça yüksek seviyede bulunmuştur. Kanser kaşeksili farelerin kahverengi yağ dokusu ve iskelet kasında *UCP* ekspresyonları kanser kaşeksisine bağlı olarak artmıştır (95). Sherlock ve arkadaşları, kanser kaşeksisinden ve farklı hastalıklardan ölmüş 25 kişinin periadrenal dokularından alınan biyopsi örneklerini incelemişler ve kanser kaşeksili olanlarda KYD miktarı % 80, diğerlerinde ise % 13 bulmuşlardır (96). Bu veriler ışığında kanser kaşeksisinde KYD miktarı ve *UCP* ekspresyonları artmakta, bu durum toplam vücut enerjisinin harcanmasında artışa sebep olmaktadır.

4.4. Peroksisom Proliferatörleri ile Aktive Edilen Reseptör- γ -Koaktivatör-1 (PGC-1) Ailesi

Transkripsiyonel koaktivatörler, kromatin üzerindeki transkripsiyon faktörlerine bağlanıp, onların aktivasyonuna yardım eden, kendi başlarına spesifik DNA dizilişlerini tanımayan proteinlerdir. Tüm transkripsiyon faktörleri normal fonksiyonları için koaktivatör ve korepresörlere ihtiyaç duymaktadır. PGC-1 ailesi transkripsiyonel koaktivatörler arasında en iyi bilinen ailelerden biridir. Bu ailenin bugün için bilinen 3 üyesi vardır. Bunlar PGC-1 α , PGC-1 β ve PGC-1 İlişkili Protein (PRC)'dir (97).

4.4.1. PGC-1 Ailesi Koaktivatörlerinin Yapı ve Fonksiyonu

PGC-1 geni farelerde 5. insanlarda ise 4. kromozom üzerinde yer almaktadır. İnsanlarda 794 farelerde ise 797 amino asit (aa) uzunluğundadır (98). Yapısal ve fonksiyonel çalışmalara göre PGC-1 α 'nın N-terminalinde 200 aa uzunluğunda olan ve histon asetil transferaz kompleksi, cAMP cevap elementi bağlayıcı protein (CREBP), p300 ve steroid reseptör koaktivatör-1 ile etkileşen güçlü bir aktivasyon bölgesi veya "domain"i vardır. C- terminal bölgesi tiroid reseptör bağımlı protein, vitamin D reseptör etkileşimli protein ve mediatör kompleksini aktifleştirerek transkripsiyonun başlamasına katkı sağlamaktadır (99). PGC-1 ailesi üyeleri omurgalılarda yüksek oranda korunmuştur. Drosophilalarda PGC-1 ailesinin homolog adı Spargel'dir. Yeni tanımlanmış olup, mitokondriyal aktiviteyi ve insulin sinyalinin düzenlenmektedir (100). PGC-1 α ve PGC-1 β ile büyük oranda domain benzerliği gösterir. Yapılarında çok sayıda korunmuş aa vardır. 3 aile üyesi de aktivasyon ve RNA bağlanma bölgesi içerir, ancak PRC'nin PGC-1 α ve PGC-1 β ile benzerlikleri sınırlıdır (101).

PGC-1 α ve PGC-1 β adaptif termogenezde mitokondriyal biyogenezde, glukoz ve yağ asiti metabolizmasında, reaktif oksijen türleri (ROS) detoksifikasyonunda, anjiyogenez, iskelet kası fiber tip dönüşümlerinde ve kalp gelişiminin düzenlenmesinde görev alır. Bunların çok yönlülüğü, dokulara spesifik olarak çok sayıda transkripsiyon faktörü ile etkileşim içinde olmalarından kaynaklanır. PGC1- α enerji metabolizması ile ilgili birçok biyolojik olaya aracılık eden bir transkripsiyonel koaktivatör olup, mitokondri sayısının çok ve oksidatif metabolizmanın aktif olduğu kalp, iskelet kası, kahverengi yağ dokusunda beyin ve böbrekte yüksek miktarda (102) karaciğerde az miktarda, beyaz yağ dokusunda ise oldukça az miktarlarda sentezlenir. PGC1- α çok yönlü bir koaktivatör olup

çok sayıda nükleer reseptör ailesinin (östrojen, PPAR, Retinoik asit X Reseptör (RXR) , mineralokortikoidler, glukokortikoid reseptör (GR), liver X reseptör (LXR), vitamin D, tiroid hormon reseptör) transkripsiyonel aktivitesini artırma yeteneğine sahiptir (103). PGC1- α ligandı olmayan bir takım nükleer reseptörlere bağlanarak da etki göstermektedir. PGC1- α sadece nükleer reseptör süper ailesinin değil, farklı transkripsiyonel faktörlerin de koaktivatörüdür (104).

4.4.2. PGC-1 Koaktivatörlerinin Doku Spesifik Metabolik Durumları

4.4.2.1. Beyin

PGC1- α 'sı olmayan farelerin beyinde, özellikle striatumda süngerimsi lezyonlar gözlenmiş, buna bağlı olarak bu fareler hiperaktivite ile duygusal sistemde davranışsal anormallik sergilemişlerdir (105). Farelerde nöronlara spesifik PGC1- α 'nın inaktivasyonu ile ilgili son çalışmalar, bu faktörün enerji dengesi ve nöronal fonksiyonlarda önemli rol aldığını desteklemektedir. Hungtinton hastalığında ise beyinde mutant Hungtinton proteini birikir ve bu protein PGC1- α 'nın transkripsiyonunu baskılayarak onun fonksiyonunu etkilemektedir (106).

4.4.2.2. Kalp

Kalp, ATP talebi çok olan dinamik bir organdır ve bu ihtiyacının büyük bir kısmını yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile karşılamaktadır. Bunun yanı sıra glukozu da yakıt olarak kullanabilmektedir. PGC1- α , kalpte oksidatif metabolizmanın önemli bir düzenleyicisidir (107). Kalp bozukluklarına sahip birçok hayvan modelinde PGC1- α ekspresyonunun azaldığı söylenmektedir (108). PGC1- β 'da kalpte bol miktarda eksprese edilmektedir. PGC1- α ve PGC1- β 'sı olmayan farelerde, bradikardi, küçük kalp ve kardiyak performansının azalmasından dolayı, doğumdan kısa bir süre sonra ani ölüm gerçekleşmektedir.

4.4.2.3. İskelet Kası

PGC-1 α iskelet kasında özellikle de yavaş kasılan miyofiberlerde bol miktarda eksprese edilmektedir. İnsan ve kemirgenlerde egzersiz ile hızlı indüklenmektedir. Kalsiyum sinyal yolları calcineurin, kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CaMK), CREBP ve miyosit artırıcı faktör 2 iskelet kasında PGC-1 α 'nın indüklenmesinde rol oynamaktadır (109, 110). Buna ek olarak, p38 mitojen aktiveli protein kinaz (MAPK) ve AMP aktiveli protein kinaz (AMPK) egzersiz indüklü PGC-1 α ekspresyonu için gerekmektedir (111).

İskelet kasında mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan PGC-1 α , yağ metabolizmasında yer alan yağ asidi translokaz/CD36, karnitin palmitoil transferaz-1 ve orta zincir acil-coA dehidrogenaz enzimlerinin mRNA miktarlarını artırmaktadır (112).

4.4.2.4. Kahverengi Yağ Dokusu

Kahverengi yağ dokusunda *PGC-1 α* ekspresyonu düşük sıcaklıklarda güçlü bir şekilde indüklenmektedir (98). *PGC1- α* , PPAR- α , RXR, tiroid reseptör (TR) gibi nükleer hormon reseptörleri ile etkileşerek, *UCP1* ekspresyonunu artırmaktadır. UCP1 proteini ısı üreterek mitokondriyal proton gradiyentini bozmakta ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretimini önlemektedir. PGC-1 α 'sı olmayan fareler soğuğa karşı savunmasızdır bunun nedeni ise bu farelerde meydana gelen termogenik defektlerdir. *PGC-1 β* mRNA'sı beyaz ve kahverengi adiposit farklılaşması esnasında indüklenmektedir. İlginç olarak PGC-1 β ekspresyonu soğuk ile uyarılmaktadır (113).

4.5. İskelet Kası

İnsan vücudunda 600'ün üzerinde iskelet kası bulunmakta ve iskelet kası sayısız kas lifinden oluşmaktadır. İskelet kasının hücresel ünitesi olan kas lifi, kas öncülü hücrelerin füzyonu ile oluşmuş, ileri derecede özelleşmiş, silindir şeklinde, yüzlerce çekirdeğe sahip tek bir kas hücresidir. 2003 yılında Pederson ve arkadaşları tarafından iskelet kasının da adipoz doku gibi endokrin bir organ olduğu ortaya konulmuş ve adipoz dokudaki benzetmeden yola çıkılarak miyositlerin salgılarına da miyokin adı verilmiştir. Miyokinler, lokal otokrin ve parakrin ve endokrin etkiye sahiptir (114).

İskelet kası egzersiz sırasında değişik biçimlerde kasılma modelini içermektedir. Her kasılma biçimi ile ilişkili sinyal ve stres muhtemelen spesifik olarak sinyal uyarım yolunun bir aşımını aktive etmektedir. Bu yollar; kalsineurin, CaMK, MAPK, protein kinaz C (PKC), nükleer faktör kappa B (NF- κ B), AMPK, insulin sinyal ve gelişme yollarını içermektedir. Aktive edilmiş transdüksiyon yolları değişik mekanizmalar ile transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını arttırmakta ya da aktive etmektedir (115). Egzersiz ile iskelet kasında *PGC1- α* ekspresyonu artmakta ve bu artış çok sayıda kas gen ürününün (*FNDC5*, *vasküler endotel growth faktör (VEGF- β)*, *lösin rich glikoprotein-1 (LRG-1)*, *tissue inhibitor matriks metalloproteinase-4 (TIMP-4)*, *İnterlökin 15 (IL-15)*) ekspresyonunu uyarmaktadır.

4.6. Fibronektin Tip III Domainini İçeren 5. Protein/ İrisin

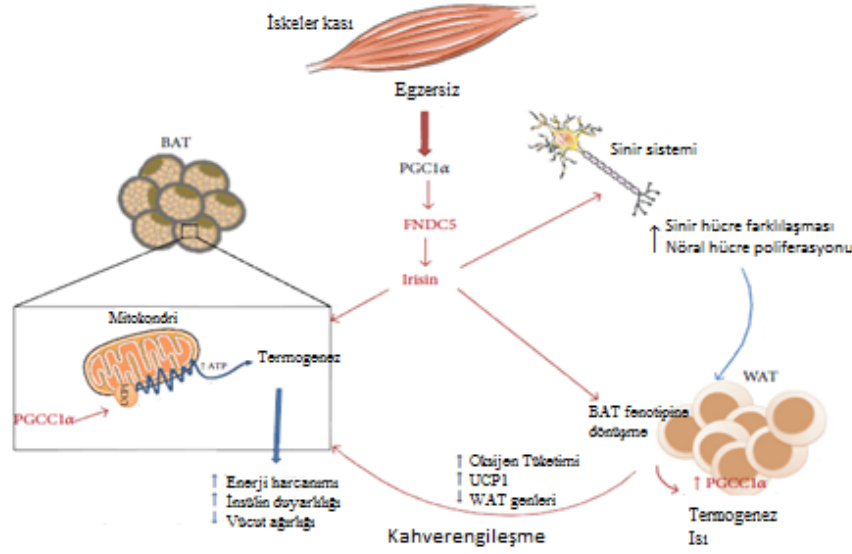
İlk defa, 2002 yılında 2 farklı grup tarafından keşfedilip, karakterize edilen FNDC5'in diğer adları fibronektin tip III domainini içeren 2. protein (FRCP2) ve peroksizomal protein (PeP)'dir (116, 117). Fare FNDC5 proteini, 29 aa'lık sinyal peptid, 94 aa'lık tek fibronektin III domaini ve C terminali olmak üzere 3 kısımdan oluşur (118). FNDC5, tip 1 membran proteini olup, eksprese edildiği kadar N-terminalinden yıkılarak (henüz tanımlanmamış bir proteaz tarafından kesilerek) yeni tanımlanmış bir miyokin olan irisin dolaşıma salınmaktadır. *FNDC5* mRNA, irisin prekürsörü olup, yüksekten düşüğe doğru kas, rektum, perikardiyum, intrakraniyal arter, kalp, dil, optik sinir, uvula, beyin, over, yumurta kanalı (tuba uterina), hipofiz bezi (pituitary), seminal keseler, adrenal bez, özofagus, vena kava, böbrek, penis, retina, testis, üretra, üriner kese, spinak kord, KC, tonsil, tiroid ve vaginada eksprese edilmektedir (3).

4.6.1. İrisin'in Yapısı, İzolasyonu ve Adlandırması

İrisin; iristen türevlenmiş olup, Yunan mitolojisine göre Thamus ve Electra'nın kız kardeşi, gökkuşağını sembolize eden, tanrılardan güzel haberleri insanlara taşıyan anlamlarına gelmektedir (119). 112 aa'lık 12 kDA ağırlığında bir protein olup, ilk defa 2012 yılında Boström ve arkadaşları tarafından kas dokusundan izole edilmiştir. Bu araştırmacılar, irisinin glikoprotein yapısında olduğunu söylemişler ve western-blot analizlerinde, çok sayıda band görmüşlerdir. Bu analizlerde, çok sayıda band görülmesi salgılanabilen ve glikozillenmiş proteinlerin genel özelliklerini yansıtmaktadır. Ancak bu proteinde glikozilasyon tam olarak aydınlatılamamıştır (1).

İnsan ve fareler kıyaslandığında irisin % 100, insülin % 85, glukagon % 90 ve leptin % 83 oranında benzemektedir. İrisinin, termogenik bir protein olup, beyaz yağ dokusunu kahverengi yağ dokusuna dönüştürerek enerji harcanmasına sebep olduğu söylenmektedir. FNDC5 proteininin yıkım ürünü olan irisin, fare ve insanlarda bilinmeyen bir proteaz tarafından kesilmektedir (3). İrisinin salgılanması ve kesilmesi, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforming büyüme faktör (TGF)'ye benzemektedir. *FNDC5* gen ekspresyonunun artması *PPAR γ* ve *PGC-1 α* aracılığıyla. *PGC-1 α* artışına bağlı olarak kas dokusunda 5 farklı proteinin ekspresyonunu artırmaktadır. Bunlar *FNDC5*, *IL-15*, *LRG1*, *TIMP4*, *VEGF*'dir. *FNDC5*, kahverengi yağ dokusu genlerinin (*Elov13*, *Cox7a* ve *Otop1*) ekspresyonlarını artırırken, beyaz yağ dokusu ürünü olan leptin sentezini ise

azaltmaktadır. Düşük miktar (yaklaşık 20nM) FNDC5'in, *UCP1* ekspresyonunu 7-1500 kat arttırdığı ve artmış *UCP1* ekspresyonunun ATP sentezini azaltarak ısı üretimini sağladığından, enerji kaynaklarının daha fazla harcanmasına yol açtığı bildirilmiştir ve irisinin etki mekanizması Şekil 4'te özetlenmiştir Tüm bu verilerin ışığında, kahverengi yağ dokusundaki termogenez aktivasyonunun FNDC5 tarafından düzenlendiği söylenebilir (1).



Şekil 4. İrisinin etki mekanizması (Novelle'den, 120)

4.6.1.1. İrisin Sentezleyen Başlıca Organlar ve İrisinin Biyokimyasal Etkileri

İrisin, iskelet kasından başka birçok dokuda sentezlenmektedir (121). Bunlar adipoz doku, kalp kası, böbrek, karaciğer, miyelin kılıfı, nöral hücreler, optik sinir, over, purkinje hücreleri, rektum, tükürük bezleri, mide, testis, dil, intrakraniyal arterlerdir. İrisinin immunoreaktifitesini göstermek için spesifik irisin antikoru kullanılmıştır (cat:H-067-17, Phoneix Pharma.). İrisinin temel sentez yeri iskelet kası olmasına rağmen, daha sonra yapılan immunhistokimyasal çalışmalarla, miyokardiyumda geniş ölçüde sentezlendiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, ratların iskelet kası ve kalp kasında mg doku başına irisin seviyeleri kıyaslanmış ve kalp kasında iskelet kasına göre daha fazla irisin olduğu ortaya konulmuştur. Üç temel salgı organı olan paratiroid, submandibular, sublingual bezlerde de irisin immunoreaktivitesi bulunmuştur. Sublingual bezlerde tükürük bezlerine oranla düşük, ayrıca böbrekler, yumurtalık, testis, rektum, perikardiyum,

intrakraniyel arterler, kalp, dil, optik sinir, mide ve derideki yağ bezlerinde irisin immunoreaktivitesi gözlenmiştir. Periferik sinir kılıfları da irisin antikoruna karşı güçlü immunoreaktivite göstermektedir (3, 122).

İrisin yağ dokusunda da sentezlenmektedir (123). Bu nedenle irisin miyokin ailesinin üyesi olmasının yanı sıra adipokin ailesinde üyesi olarak kabul edilmektedir. Roca-Rivada ve ark. *ad libitum* şartlarda adipoz dokudan salgılanan FNDC5/irisin iskelet kasından % 20 az olduğunu ve derialtı adipoz dokudan salgılandığını göstermişlerdir (124).

4.6.1.2. İrisin ve Metabolik Hastalıklarla Olan İlişkisi

Obezite, dünyada, yağ kütleindeki artış ile karakterize giderek büyüyen bir sağlık problemidir (125). İrisinin termogenik bir ajan olarak kabul edilmesinden bu yana obezlerde yağ kütleinin azalmasında rol oynadığı düşünülmektedir. İrisinle ilgili yapılan bir araştırmada, erkeklerde ve obez kişilerde irisin seviyesi daha yüksek bulunmuştur (126). Obezite cerrahisi geçirmiş kişilerde operasyondan 6 ay sonra iskelet kasında FNDC5 mRNA ve kanda irisin seviyesinde azalma görülmüştür. Enerji kısıtlaması ve cerrahi olarak indüklenmiş kilo kaybının, irisin seviyesini azalttığı sonucuna varılmıştır (3). Obez ve diyabetik hastalar arasında yapılan bir diğer çalışmada serum irisin konsantrasyonu ile vücut kitle indeksi (VKİ), yaş, diğer biyolojik parametreler arasında korelasyon olmadığını, irisin ile homosistein, HbA1c ile arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (123). Bazı araştırmacılar ise irisin ve VKİ arasında pozitif korelasyondan bahsederken, bazıları ise irisin seviyesi ile adipoz doku kütlesi arasında negatif korelasyon olduğunu öne sürmüşlerdir (3, 126-128).

Park ve arkadaşları, akdeniz diyeti ve sağlıklı yeme indekslerine göre irisin seviyelerinin nasıl değiştiğini incelemiş ve irisin seviyesinin bu diyetlerden etkilenmediğini, CRP ve bu skorlar arasında negatif ilişki olduğunu ortaya koymuşlar ve sağlıklı diyetin irisin seviyesini etkilemediği sonucuna varmışlardır (127). Yapılan başka çalışmalarda irisin seviyesi, diyabet hastalarında kontrollere kıyasla azalırken, (129) gestasyonel diyabetli annelerin sütlerinde ve kanlarında ise artış bulunmuştur (130). Sesti ve arkadaşları dolaşımdaki irisin; kardiyometabolik değişkenler; insulin duyarlılığını ve yaygın karotid intima-media kalınlığını (vasküler ateroskleroz indikatörü) belirledikleri çalışmalarında, insanlarda insulin duyarlılığı ve irisin arasında negatif, karotid intima

media kalınlığı ile irisin arasında pozitif ilişki olduğunu göstermişlerdir (131). Son yapılan araştırmaların sonuçlarına göre miyogenik farklılaşma esnasında irisin sekresyonu artmaktadır. Ayrıca adipositlere 10, 50nM irisin uygulanması, insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) seviyesini anlamlı artırırken ve östrojen ilişkili kinaz (ERK) yolu aracılığıyla miyostatin gen ekspresyonunu ise azaltmıştır. FNDC5/irisinin kaslarda pleiotropik rolü vardır (132). Araştırmacılar egzersiz yapmadan önce ve 3 haftalık aralıklı sürat koşusu idmanı sonrasında fibroblast growth factor-21 (FGF21) ve FNDC5'in plazma konsantrasyonunu ölçmüşlerdir. Sürat koşusu, FGF21 seviyesini azaltırken, FNDC5'i etkilememiş, ancak irisin erkeklerde azalırken kadınlarda artmıştır (133, 134). İrisinin farklı doz ve sürelerde uygulanması, metabolik gen ekspresyonunu (PGC-1 α , nükleer respiratory factor-1 (NRF-1), mitokondriyal transkripsiyon faktör A (TFAM), irisin, glukoz transporter 4 (GLUT4), UCP3) indüklemekte, mitokondriyal biyogenezi ve termogenezin artmasına sebep olmaktadır. Rana ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 81 sağlıklı kişide, telomer uzunluğu ve plazma irisin seviyelerini ölçmüşler ve irisinin enerji dengesi ile yaşlanma prosesinin düzenlenmesini desteklediğini göstermişlerdir (135).

4.7. N-Metil-N-Nitrozoüre

Çeşitli kimyasal ajanlar, deney hayvanlarına değişik yollarla verilerek (intraperitoneal (i.p) intravenöz (i.v), subkutan (s.k), oral, intragastrik(i.g)) birbirinden farklı özellikte tümör modelleri oluşturulabilmektedir (136). N-Metil-N-Nitrozoüre (MNU), kanser modeli oluşturmakta kullanılan kimyasal ajanlardan biridir. İlk defa 1943 yılında laboratuvar şartlarında 1.5 mol 200g % 24'lük sulu metilamin çözeltisine, konsantre 150 mL HCl ve 5 mol 300 g üre ilave edilerek yüksek sıcaklıkta kaynatılmış ve oda sıcaklığına kadar soğutulan çözeltiliye, sodyum nitrit ve sülfirik asit ilave edilerek asidik ortamda N-metil-N-nitrozoüre (MNU) sentezlenmiştir (137).

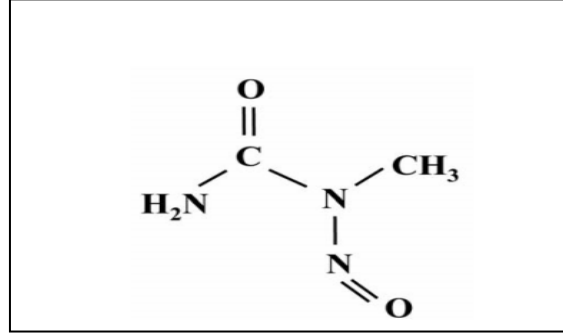
MNU, alkilleyici bir ajan olup yapısındaki alkil (metil) grubunu, DNA yapısındaki bazlara transfer ederek toksik etkisini göstermektedir. Mutasyonların oluşumu, hedef organlarda kanser riskini artırabilir, ya da, aşırı DNA hasarının tamir edilemediği durumlardan kolay etkilenen hücre ve dokularda hücre ölümüne sebep olabilmektedir. MNU indüklü karsinogenez ve hücre hasarı, çeşitli hayvan türlerinde çok sayıda organı hedef almaktadır. MNU bu hayvanlara olgunlaşmadan önce uygulanmalıdır. Yaşlılarda ise, fotoreseptör hücreler MNU'ya karşı oldukça hassastır ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne

sebepe olmaktadır. Araştırılan birçok N-nitrozo bileşiği içinde, insanların laboratuvar dışında maruz kalabileceği çok az sayıda, kararlı ve doğrudan etkili olmayan nitrozamin mevcuttur. Bu nitrozaminlerin deney hayvanlarında karaciğer, akciğer, böbrek, mesane, pankreas, yemek borusu ve dil gibi çeşitli organlarda kanser oluşumunu tetiklediği, ancak, cilt, beyin, kolon ve kemiklerde kanser oluşumuna sebep olmadığı rapor edilmiştir. Canlılarda hangi organın hangi N-nitrozo bileşiğinden etkileneceği canlının türüne ve kanserojenin kimyasal yapısına göre değişkenlik göstermektedir. Alkilnitrozoüreler veya alkilnitrozokarbamatlar gibi doğrudan etkili nitrozaminlerin ise sinir sistemi, mide, gastrointestinal sistem ve kemiklerde tümör oluşturduğu bildirilmiştir (138).

Hayvanlarda N-nitrozo bileşiklerinin neden olduğu tümörlerin birçoğunun insanlarda görülen tümörlere benzerlik göstermesi, insanlarda da bu bileşiklere maruz kalmanın tümörlerin kaynak noktasından biri olabileceğini düşündürmektedir (139). Takayama ve arkadaşları anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal bakımdan insana daha yakın olan primatların, nitrozaminlere uzun süreli maruziyetinde MNU'nun gastrointestinal sistemde skuamöz hücre kanserini indüklediğini göstermişlerdir (140). Bu kimyasal geniş ölçüde ratlarda ve farelerde kullanılmakla birlikte, diğer hayvanlarda da gastrik karsinoma modelinin oluşumunda önemlidir (141). N-metil N-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG), 7,12-dimetil-benz[a]antrasen (DMBA), cisplatin gibi kimyasallarda hayvanlarda deneysel olarak kanser oluşturmada yaygın kullanılan ajanlardır.

Kimyasal ajanlar kullanılarak kanser oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmaların genellikle antioksidan özelliği yüksek maddelerin kanser üzerindeki etkilerini araştırmaya yöneliktir. Örneğin, MNNG ile mide kanseri oluşturulmuş ve tedavi amacıyla narenciye verilmiş ratlarla yapılan bir çalışmada lipid peroksidasyonunda azalma, enzimatik ve nonenzimatik antioksidan aktivitelerinde artma belirlenmiştir (142). Nitrozaminlerin metabolizması karaciğerde gerçekleşir. Nitrozaminler toksik etkilerini, öncelikle kanda ve özellikle karaciğerde oluştururlar. Ayrıca kan akımının fazla olduğu böbrekler gibi diğer organlar da bu durumdan karaciğere göre daha düşük düzeyde etkilenirler. Çeşitli araştırmalarda deney hayvanlarına farklı nitrozaminler verildiğinde bu bileşiklerin başta karaciğer olmak üzere diğer organ ve doku tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir (143, 144). Kanserojen maddeler kanser oluşumunda organ ve hedef hücrelerde farklılık göstermektedir. Bunun sebebi çok açık değildir ancak organlar arasında hücre çoğalma hızı

fizyolojik farklılıkla ilişkilendirilmiştir. Farklı dokularda hücre çoğalması a)deri ve bağırsak epitelinde olduğu gibi hızlı çoğalma, b) ürotelyal epitelyum, akciğer, karaciğer, böbrek, prostat ve omurilikte olduğu gibi yavaş çoğalma şeklindedir. MNU'nun kimyasal yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. N-Metil-N-Nitrozoüre'nin Kimyasal Yapısı

MNU, deney hayvanlarının içme suyuna ilave edilerek verildiğinde kanser yapıcı etkisini doğrudan midede oluşturduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (145-147). MNU, geniş ölçüde ratlarda ve farelerde kullanılmakla birlikte diğer hayvanlarda da gastrik karsinoma modelinin oluşturulmasında önemlidir. Bu kimyasalla yapılan birçok çalışmada deney hayvanlarında kanser oluşturulabilmiş ve farklı maddelerle oluşturulan bu kanserin tedavisi araştırılmıştır. Akut olarak bu kimyasala maruz kalınması diğer kimyasallarda olduğu gibi deri ve gözde irritasyon, baş ağrısı, bulantı ve kusmaya sebep olabilmektedir. (141). Farelerde alkilnitrozoürelerin özellikle gebeliğin son döneminde plasenta yoluyla fare yavrulara geçerek beyin ve sinir sistemlerinde tümör oluşumunun potansiyel tetikleyicisi olduğu uzun zamandır bilinmektedir (139). Bundan dolayıdır ki, insanlarda özellikle çocuklarda görülen beyin tümörlerinin sebebi olarak besinler ile alınan alkilnitrozoüre gibi kimyasallarla ilgili yapılan araştırmalar hız kazanmıştır.

N-nitrozo bileşikleri, tek doz uygulama sonrasında tümör oluşumunu, birçok organda alkilleyerek indüklemektedir. Dimetilnitrozoamin (DMNA), kemirgenlerde nükleik asit ve proteinleri farklı derecelerde alkillemekte ve metilasyon miktarı ile tümörün oluşum derecesi arasında bir korelasyon olduğu söylenmektedir. Bir araştırmada, MNU intravenöz ve oral yolla (intragastrik entübasyonla) uygulanmış ve birçok dokuda nükleik asitleri metilleyerek tümör oluşturduğu ortaya konulmuştur. MNU, intragastrik entübasyonla mideye direkt verildiğinde hemen parçalanmaz, mide asidik ortam

olduğundan kararlı davranır ve büyük bir kısmı midede değişmeden kan dolaşımına geçmektedir. pH arttıkça MNU'nun yarılanma süresi kısalmaktadır. (pH=6'da 24 h, pH=7 de 1-2 h ve pH=8 de ise 0-1 h'dir) MNU'nun midede emilen kısmı nükleik asitlerin yapısındaki bazların metillenmesine ve midede kanser oluşumuna sebep olmaktadır.

Druckrey ve arkadaşlarının 1968 yılı raporlarına göre outbred (akraba olmayanların çiftleştirilmesi) guinea domuzlarda içme suyu içine uzun süreli MNU uygulanması sonucu pankreas ve mide adenokarsinomu oluşmuştur (148). 1992 yılında Tatematsu ve arkadaşları, *Balb/c* türü farelere haftada bir defa 0,5 mg MNU'yu 10 hafta boyunca intragastrik entübasyonla uygulamışlar, 20 ve 40 haftalık süre sonunda hayvanların dekapitasyonunu takiben glandular adenokarsinom oluşumunu, sırasıyla % 20 ve % 100 olarak bulmuşlardır (149). 1993 yılında yine aynı araştırmacılar, C3H türü farelerin içme suyu içine farklı konsantrasyonlarda MNU uygulayarak (120, 60, 30 ve 0 ppm) glandular adenokarsinom oluşumunu incelemişlerdir. Yüksek konsantrasyon uygulamalarında yüksek oranda glandular adenokarsinom oluştuğunu göstermişlerdir (147). 1998 yılında Yamachika ve arkadaşları *Balb/c* türü farelerin içme suyu içine farklı konsantrasyon ve zamanlarda MNU uygulamasının, mide kanseri oluşumu üzerine etkisini incelemişler ve kanser oluşumunda yüksek konsantrasyon, kısa süreli ve düşük konsantrasyon, uzun süreli MNU uygulanmasından daha etkili olduğunu bulmuşlardır (150). 1999 yılında Kobayashi ve arkadaşları diyetle indüklü katekol uygulamasının MNU'nun içme suyu içine ilavesi sonucu glandular midede oluşturulan neoplastik ve preneoplastik lezyonların oluşumunu, artırdığını göstermişlerdir. Düşük doz katekol uygulaması midede preneoplastik lezyon gelişimini indüklerken, neoplastik lezyon oluşumu gözlenmemiştir (151).

4.8. Tümör Belirteçleri

Mide kanseri, gastrointestinal sistemin en önemli ve en sık görülen hastalıklarından biridir. Bu hastalığın tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri de tümör belirteçlerinin kullanılmasıdır. Tümör belirteçleri birçok kanser türünde olduğu gibi mide kanserlerinde de tanı, tarama, prognoz ve tedavinin monitörizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Diğer yöntemlere göre en önemli avantajı, kan örneğinden kolayca tespit edilebilmesidir. Spesifik ve sensitif tümör belirteçlerinin geliştirilerek rutin olarak uygulanması veya diğer testleri destekleyici ve tamamlayıcı olarak kullanıma girmesi için çalışmalar devam etmektedir (152).

4.8.1. Tümör Belirteçlerinin Tanımı ve Klinik Kullanımı

Yüksek molekül ağırlıklı, glikoprotein özelliğindeki bu antijenler tanıya yardımcı oldukları gibi, tedavinin takibinde de önemli rol oynamaktadır. Tümör belirteçleri, kanser ya da konak hücreleri tarafından salındığı düşünülen, tedaviye cevabın değerlendirilmesinde, izlenmesinde ve nükslerin saptanmasında kullanılan biyolojik ajanlardır. Ölçümleri kanda, sekresyonlarda, seröz sıvılarda immünohistolojik veya immünositolojik yöntemlerle (immünofluoresans, immünoperoksidaz) yapılmaktadır (152, 153). Tümör belirteçleri genellikle kanserin tanısı, prognozunun belirlenmesi ve tedavinin incelenmesinde kullanılmaktadır. İdeal bir tümör belirteci, tümör hücreleri tarafından üretilip vücut sıvılarında saptanabilir olmalıdır. Sağlıklı kişilerde ve benign hastalıklarda negatif olmalı, aranan hastalığa yakalanan tüm olgularda pozitif olmalı, ölçülen düzeyleri tümör evresi ile orantılı olmalıdır (154).

4.8.1.1 Karsinoembriyonik Antijen (CEA)

İlk kez 1965 yılında gastrointestinal sistem adenokarsinomlu hastaların tümör dokusunda izole edilmiştir. İlk başta kolorektal kanserler için spesifik olduğu düşünülmüş, daha sonra diğer kanserlerde ve kanser dışı patolojik durumlarda da spesifikliğinin yüksek olabileceği saptanmıştır. Kanser araştırmaları ve tedavisinde en sık araştırılan ve kullanılan belirteçtir. CEA, onkofetal proteinler grubundan olan bir hücre yüzey glikoproteinidir. Molekül ağırlığı 200 kDa olan bu molekülün, başlıca aminoasit yapısı asparajin glutamin, theronin ve serin'den oluşmuştur. Yapısal olarak 3'te 2 oranında N-asetil glukozamin içermektedir (155). Elektron mikroskopu ile yapılan araştırmalarda, CEA'nın tümör hücre membranının altında yer aldığı tespit edilmiştir. Hücre yüzeyinde yer alması sebebiyle vücut sıvılarına da kolayca geçebilir. Serumda CEA miktarı, CEA üreten bir tümörün rezeksiyonu sonrasında 3 hafta içinde ölçülemeyecek kadar azalmaktadır.

CEA'nın yaygın bir klinik kullanımı vardır ve kolorektal kanser dışında, bronş, meme, pankreas, mide, mesane, prostat, over, tiroid kanserinde ve nöroblastomada da tümör belirteci olarak kullanılmaktadır. Malign durumlardaki ölçümlerde yüksek düzeyde saptanmaktadır. İlerlemiş kanserler de ise daha yüksek düzeylere ulaşmaktadır (153).

4.8.1.2. Karbohidrat Antijen 72-4 (CA 72-4)

CA 72-4, yüksek molekül ağırlıklı, musin tip glikoprotein olup, (insan tumor ilişkili glikoprotein) monoklonal antikolar CC49 ve B72.3 kullanılarak belirlenmiştir. 94'ü

malign, 100'ü ise benign gastrik kanser tanısı almış 194 hastada yapılan bir çalışmada, 3 farklı (CEA, Karsinoembriyonik antijen 19-9 (CA 19-9) ve CA 72-4) serum kanser belirteçleri ölçülmüş ve 94 malign gastrik kanserli hastada CA 72-4, CA 19-9, CEA sırasıyla % 42.6, 31.9, 20.2 pozitif bulunmuştur (156). Literatürde mide kanserinde CEA, CA 19-9, CA 72-4'ün prognostik faktör olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (157). Byrne ve arkadaşları, mide kanserinde CA 72-4'ün CEA ve CA 19-9'dan daha sensitif olduğunu hastalık evresini ve aktivitesini daha iyi yansıttığını bildirmişlerdir (158). Farklı araştırmalarda mide kanserli hastalarda, CEA'nın bulunma oranı % 28-40, CA 19-9 % 43-52 ve CA 72-4 ün ise % 42-48 arasında olduğu bildirilmiştir (154).

4.9. Real-Time PCR

Bilim ve tıp alanında yapılan çalışmalar nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin Real-time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) olduğunu ortaya koymuştur. Bu teknik, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Kary Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan geleneksel PCR'ın ileri bir versiyonudur. Geleneksel PCR ile karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz edebilmek, çok sayıda döngüsel işlemle mümkün olmakta ve bu işlemde tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte, ürün miktarının tam olarak belirlenmesi oldukça güçtür. Ayrıca bu PCR'da başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak ürün miktarı ortaya çıkmaktadır. 1992 yılında Higuchi ve arkadaşları real-time PCR'ı geliştirmişler ve bu teknik ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını gözlemek kolaylıkla mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının gözlenebilmesi real-time PCR'ı ayrıcalıklı kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili izlenebilmekte ve bu durum reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresans işaretli probalar ile sağlanmaktadır (159, 160).

Son yıllarda araştırmalar için kullanılan gen ekspresyon çalışmalarında kantitatif real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmiş ve gen ekspresyon seviyeleri hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Real-time PCR ile elde edilen veriler mutlak kantitasyon (absolute quantification) veya göreceli kantitasyon (relative quantification) analiz teknikleri ile değerlendirilmektedir. mRNA ekspresyon çalışmalarında ise sıklıkla

göreceli kantitasyon kullanılmaktadır. Bu teknikte aynı örneğe ait iki farklı hedef genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılır ve sonuç bu hedeflerin oranı olarak ifade edilir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan ikinci gen ekspresyonu "referans gen" olarak isimlendirilir ve tüm deney şartlarında değişmez miktarda eksprese olduğu kabul edilir. Bu referans gen internal kontrol olarak bilinir ve örnekten örneğe olan farklılıkların değişiminin normalizasyonu için kullanılır. İlgilenilen genin deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edilir. Böylelikle rölatif kantitasyon kullanıcılarına, bir hedef genin en az iki farklı durumdaki ekspresyon profilini kolayca karşılaştırmalarına olanak sağlar. Göreceli kantifikasyon gen ekspresyonunun belirlenmesinde en iyi teknik olarak kabul edilmektedir (161).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Fareler

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilen *Balb/c* ırkı 60 adet erkek 6-8 haftalık 20-25 g ağırlığında fareler kullanıldı.

5.1.2. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 4'de listelenmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka/Model
Santrifüj	Eppendorf 5804
Buzdolabı-Derin dondurucular(+4°C, -20 °C, -80 °C)	Altus, Thermo Electron Corporation
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Etüv (37 °C)	Heraeus
Çalkalayıcı inkübatör	ShelLab/Sheldon S14-2
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Manyetik karıştırıcı	Termal
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Mikropleyt okuyucu	SpectraMax Paradigm Multi-Mode
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 171
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R centrifuge
ELISA yıkayıcısı	Biotek
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo Nanodrop 2000
Real-Time PCR cihazı	Roche LightCycler 480 II
Çalkalayıcı ısı bloğu	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Mikrosantrifüj	Thermo IEC Micromax
PCR cihazı	Applied Biosystems GeneAmp9700
Jel görüntüleme sistemi	Gel logic 200 imaging system
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Elektroforez tankı	Thermo EC300
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
El homojenizatörü	Omni Tissue Master 125

5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve satın alındıkları firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma, Kodu ve Saflığı
Agaroz	Serva,11404, 9012-36-6
Etidyum Bromür	Sigma, E1510, 1239-45-8
Dietil Pirokarbonat (DEPC)	Sigma, D5758,1609-47-8
Asetik Asit	Merck, M8187552500
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck, M1003172500,(%37)
Tris	Merck, M1083870500
Sodyum EDTA	Merck, 324503, 6381-92-6
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck, 1064621000, (>%97)
N-Metil N-Nitrozoüre (MNU)	Sigma, N1517, 684-93-5
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma, D2650 (steril),67-68-5
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck, K393741247 844
Kloroform	Merck, K18537631
İzopropilalkol (2-propanol)	Merck, K361103495 623

5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmaları hakkında bilgi Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firmalar

Kullanılan kitler	Üretici firma, Kodu, Saflığı
IL-6 ELISA kiti	EBioscience, 99600009
TNF- α ELISA kiti	EBioscience, 99377005
IL-1 α ELISA kiti	EBioscience, 100526021
FNDC5/İrisin ELISA kiti	SunRed, DZE201022874, 201407
ZAG ELISA kiti	SunRed, DZE201022876, 201407
PIF ELISA kiti	SunRed, DZE201022877, 201409
CEA ELISA kiti	SunRed, DZE201020099, 201407
CA72-4	SunRed, DZE201020354, 201407
RNA İzolasyon Kiti	Roche, 12033674001
TRIZol RNA İzolasyon Reaktifi	Invitrogen, 15596026,12086202
TriPure İzolasyon Reaktifi	Roche, 11667165001
cDNA izolasyon kiti	Roche, 04 896 866 001
Real time ready <i>Gapdh</i> Assay	Roche, 307884
Real time ready <i>Fndc5</i> Assay	Roche, 317294
Real time ready <i>Ucp1</i> Assay	Roche, 313368
Real time ready <i>Pgc1-α</i> Assay	Roche, 313428
Real time ready <i>Azgp1</i> Assay	Roche, 317292
LightCycler 480 Sealing Foil,	Roche, 04729757001

5.2. Yöntemler

Bu tez çalışmasının hayvan uygulamaları 2013 Kasım-2014 Nisan ayları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Bu uygulamanın yürütülebilmesi için, öncelikle, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu'ndan 24.04.2012 tarihli, 2012/15 toplantı ve 3 karar no'lu onay alındı (Bkz. Etik Kurul Kararı). Çalışma, KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince (BAP-01-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri, Proje No: 9672) desteklendi.

5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Çalışma grubu, 60 adet 20-25 g ağırlığında, 6-8 haftalık *Balb/c* türü erkek fareden oluşmaktadır. Bu fareler KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilip, aynı yerde deneysel çalışma için 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp, beslendi. Hayvanların yem ve suları adaptasyon süresi boyunca *ad libitum* olarak verildi. Daha sonra, fareler 12'si kontrol, 48'i kanser yapıcı kimyasal MNU verilmek üzere rastgele ikiye ayrıldı. Kontrol farelere, standart fare yemi ve içme suyu, diğerlerine ise standart fare yemi yanında, içme sularına 60 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$) MNU ilave edilerek verildi. Bu kafeste yer alan 48 fare, her kafeste 12 fare olacak şekilde 4 farklı kafese dağıtıldı. (n=48). Böylelikle farelerin yem ve içme sularına ulaşmaları kolaylaştırıldı.

Bir farenin günlük su tüketiminin yaklaşık 3-4 mL olduğu dikkate alındığında, fareler günlük 180-240 μg MNU kimyasalını içme suyu içinde almış oldu. Farelere verilen içme suları her gün taze, koyu renkli şişelerde suların dökülme miktarları da göz önüne alınarak her kafes için günlük 50 mL olacak şekilde ayarlandı.

Fare sayısının MNU verilen kafeslerde kontrol farelerin sayısına göre fazla olmasının nedeni:

- Kanserojen bir kimyasal madde uygulaması sonunda farelerin mortalite riskinin olması (% 30) (141).
- İçme suyuna ilave edilerek verilen kimyasal maddeye bazı farelerin direnç göstermeleri, bu farelerde mide kanseri oluşumunu önleyebilecek olmasıdır.

MNU uygulamasına 20 hafta boyunca (5 ay) devam edildi (143).

Bu süreç içerisinde farelerin ağırlıkları her ay düzenli olarak tartıldı ve ağırlıklarındaki değişimler kaydedildi. Deney sürenin sonunda hayvanların dekapitasyonunun ardından tüm farelerin mide dokuları histopatolojik olarak incelendi. Histopatolojik değerlendirme sonuçları doğrultusunda farelerden 4 grup oluşturulması uygun görüldü ve bu gruplar kontrol, kimyasal verildiği halde kanser oluşmayan (mikrokist formasyonu ve minimal displazi), kanser öncesi (midelerinde glanduler/adenomatöz hiperplazi ve displazi oluşmuş fareler), kanser (intramukozal ve invaziv kanser oluşmuş fareler) grupları olarak adlandırıldı.

5.2.2. Farelere oral yolla verilen MNU'nun Hazırlanması

1g MNU (Sigma Aldrich)'nin tam olarak çözülebilmesi için şişeye yaklaşık 4 mL dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi ve iyice vortekslendi böylelikle liyofilize haldeki MNU'nun çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözelti hacmi distile su ile bir balonjoje içinde 100 mL'ye tamamlandı. Bu stoktan 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine, her tüpte 1 mL olacak şekilde pipetlendi ve -20⁰C'de saklandı. Her gün bu tüplerden bir tane alınıp, distile su ile hacim 200 mL ye tamamlanarak, her bir kafese 50 mL olacak şekilde 4 kafese koyu renkli su şişeleri içinde 150 gün boyunca taze olarak verildi. Tükettikleri yem miktarları ve belirlenen sürelerdeki ağırlıkları kaydedildi.

20 haftalık sürenin sonunda hayvanların dekapitasyonunun ardından aşağıdaki adımlar takip edildi:

- Kontrol ve MNU uygulanan farelerin öncelikle mide dokuları alınarak 4 eşit parçaya ayrıldı, çapraz kesitlerden ikisi histopatolojik inceleme için formaldehid çözeltine diğer ikisi ise deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere için 1.5 mL' lik RNaz ve DNaz'sız plastik eppendorf tüplerine koyuldu ve -80⁰C de derin dondurucularda saklandı.
- Daha sonra sırasıyla kahverengi, subkutan, inguinal yağ dokuları ve iskelet kasları alındı ve elde edilen doku örnekleri mide doku örneklerinde olduğu gibi 1.5 mL' lik RNaz ve DNaz'sız plastik eppendorf tüplere koyularak saklandı.
- Farelerin kanları, jelli biyokimya tüplerine alınarak, yaklaşık 30 dk'lık bekleme süresinin ardından 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrılıp, doku örnekleri gibi -80⁰C'de derin dondurucuya konuldu.
- Kontrol ve MNU uygulanan farelerden alınan serum örneklerinde, yaygın bir kanser belirteçi olan CEA ve mide kanserine özgü belirteç olan CA 72-4, kaşektik faktörlerden PIF ve ZAG, inflamatuvar belirteçlerden TNF- α , IL-1 ve IL-6 ve FNDC5/irisin seviyeleri üretici firmaların tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kitleri kullanılarak belirlendi.
- 5.2.1.'de açıklanan şekilde mide dokularının histopatolojik olarak değerlendirilmesi sonucunda 4 farklı grup oluşturuldu.
- 4 grubunda kahverengi, subkutan ve inguinal yağ, mide ve iskelet kasından alınan doku örneklerde TRizol (Invitrogen) ve TRipure (Roche) reaktifleri kullanılarak total RNA izolasyonları yapıldı.

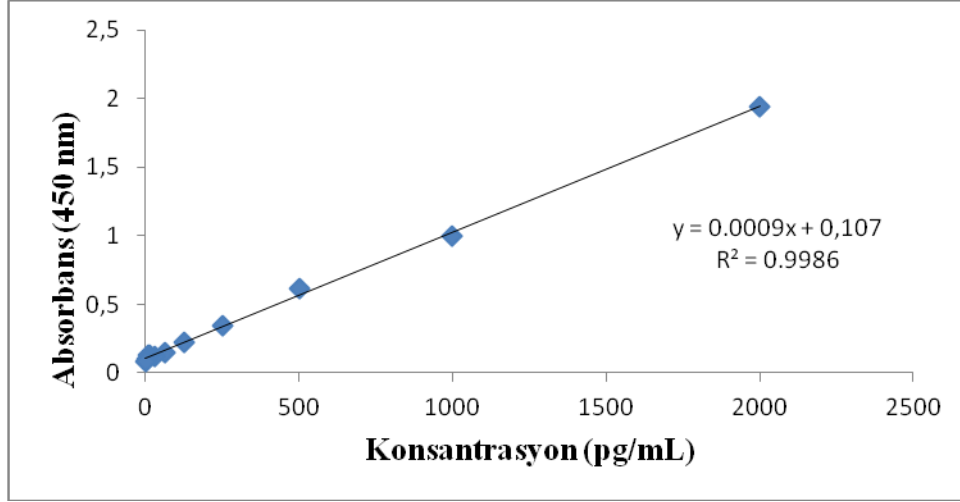
- Total RNA'lar Transcriptor First cDNA Synthesis kiti (Roche-Katalog No:04 896 866 001) kullanılarak cDNA'ya çevrildi, ekspresyonlarına bakılacak olan genler (*Pgc-1 α* , *Fndc5*, *Zag*, *Ucp1*, *Gapdh*) için uygun ready assayler kullanılarak belirlendi ve *Lightcycler 480 II* RT-PCR cihazı kullanılarak mRNA seviyeleri ölçüldü.
- Mideden alınan doku örneklerinde *Pgc-1 α* , *Fndc5* ve *Zag*, iskelet kasından alınan dokularda *Pgc-1 α* , *Fndc5*, subkutan yağ dokusu ve kahverengi yağ dokusunda ise *Fndc5*, *Pgc-1 α* , *Ucp1* ve *Zag* ekspresyonları ölçüldü. (*Pif*'ın farelerdeki mRNA dizilişi tam olarak belirlenemediği için primer dizaynı yapılamadı ve farelerde *Pif* ekspresyonu çalışılmadı).
- Referans gen olarak bu dokularda ekspresyonu yüksek olan gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (*Gapdh*) ve β -aktin kullanıldı.

5.2.3. Serum IL-6 Seviyesinin Ölçülmesi

Serum IL-6 ölçümünde e-Bioscience firmasının BMS603/2 referans ve 99600009 lot numaralı fare IL-6 ELISA kiti kullanıldı. Serum numulerindeki ölçüm, kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu ölçümün gerçekleştirilen çalışma basamakları aşağıdaki gibidir.

IL-6 Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 4000 pg/mL olan IL-6 stok standart çözeltisinden, seri dilüsyonla konsantrasyonları 2000-0 pg/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan IL-6 standart grafiği Şekil 6'da gösterildi.



Şekil 6. IL-6 standart grafiği

Örneklerin ELISA Pleytine Aktarılması ve Ölçüme Hazırlanması

- -80⁰C'deki muhafaza edilen serumlar oda sıcaklığına getirildi.
- IL-6 standartları ELISA pleyt dizaynına uygun şekilde, 100 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- Kör için ayrılan kuyucuğa sadece assay çözeltisinden 100 µL ilave edildi.
- Pleytin numuneler için ayrılan kuyucuklarına, 50 µL assay çözeltisi ve 50 µL serum ilave edildi.
- Kuyucukların hepsine 50 µL biotin konjugatı (antikor) eklendi.
- Daha sonra pleyt, folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, ELISA pleyt yıkayıcısında yıkama tamponu kullanılarak 4 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık maddeler yıkama tamponu kullanılarak uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP (enzim) çözeltisi ilave edildi.
- Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı ile 4 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artıklar yıkama tamponu ile uzaklaştırıldı.

Numunelerin Renklendirilmesi ve Ölçüm

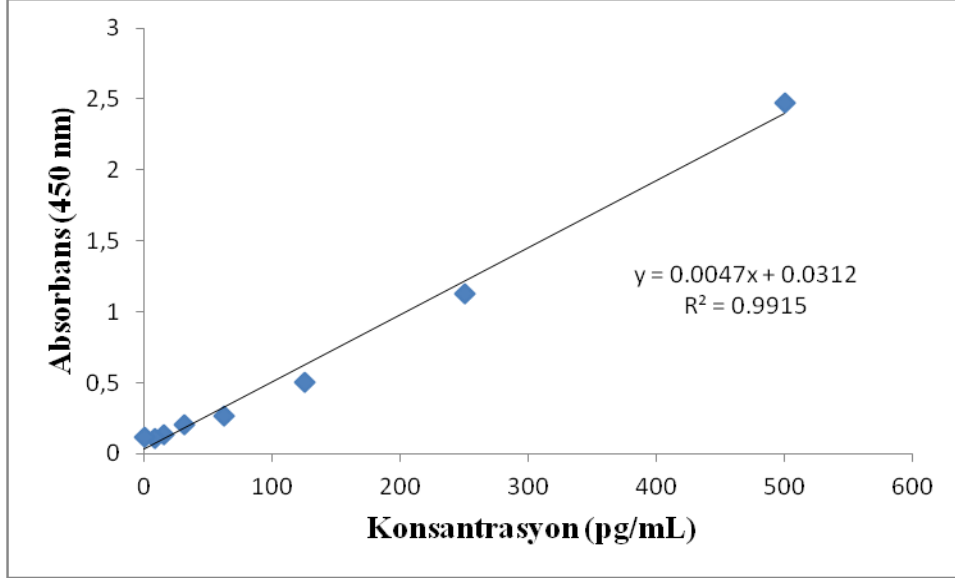
- Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 100 µL eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonuçlarına bakılarak en yüksek standardın optik yoğunluğu 0.9–0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 100 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Örneklerin absorbanları VERSA (Designed by Molecular Divices in California, USA) marka mikro pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü.
- Sonuçlar pg/mL cinsinden verildi. Bu ELISA yönteminin intra-assay dağılımının güvenilirliği, % 3.4 ve inter-assay dağılımının güvenilirliği % 5.2 olarak bulunmuştur.

5.2.4. Serum IL-1α Seviyesinin Ölçülmesi

Serum IL-1α ölçümünde e-Bioscience firmasının BMS611 referans ve 100526021 lot numaralı fare IL-1α ELISA kiti kullanılarak ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu ölçümün gerçekleştirildiği ELISA kiti, IL-6 kiti ile aynı firmaya ait olup işlem basamakları bu kit ile aynıdır. IL-6'dan farklı olarak sadece IL-1α'e spesifik standartlar hazırlandı.

IL-1α Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 500 pg/mL olan IL-1α stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 500-0 pg/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan IL-1α standart grafiği Şekil 7'de gösterildi.



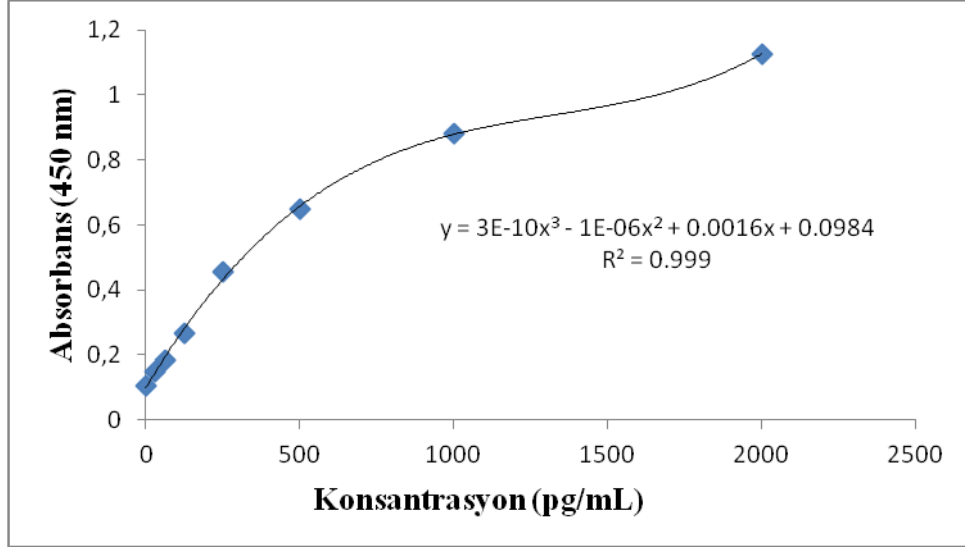
Şekil 7. IL-1 α standart grafiği

5.2.5. Serum TNF- α Seviyesinin Ölçülmesi

Serum TNF- α ölçümünde e-Bioscience firmasının BMS607/3 referans ve 99377005 lot numaralı fare TNF- α ELISA kiti kullanılarak ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu ölçümün gerçekleştirildiği ELISA kiti, IL-6 kiti ile aynı firmaya ait olup işlem basamakları bu kit ile aynıdır. Farklı olarak sadece TNF- α standartları hazırlandı.

TNF- α Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 2000 pg/mL olan TNF- α stok standart çözeltisinden seri dilüsyonla konsantrasyonları 2000-0 pg/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan TNF- α standart grafiği Şekil 8'de gösterildi.



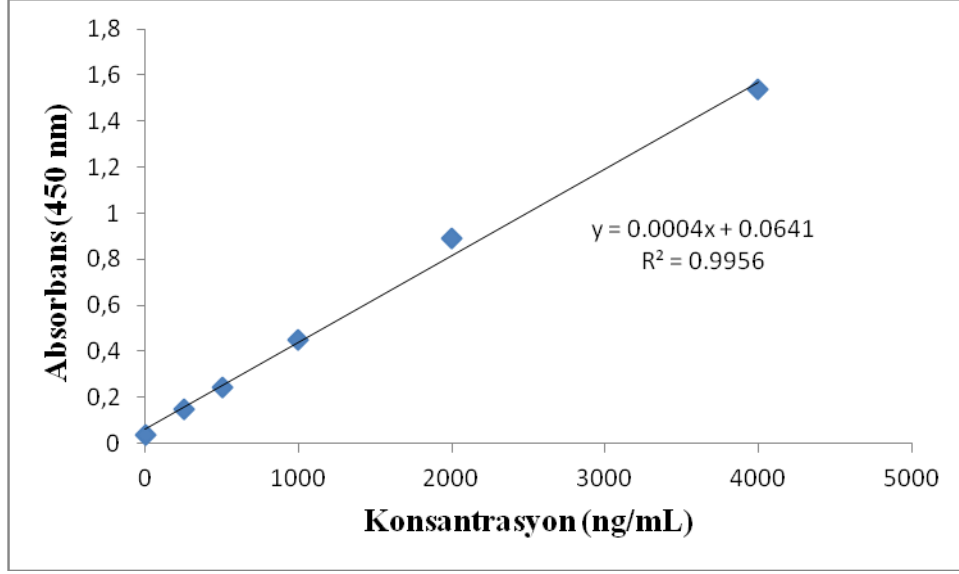
Şekil 8. TNF- α standart grafiği

5.2.6. Serum CEA Seviyesinin Ölçülmesi

Serum CEA ölçümünde Sunred firmasının DZE201020099 referans ve 201407 lot numaralı fare CEA ELISA kiti kullanılarak ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu ölçümün gerçekleştirilen çalışma basamakları aşağıdaki gibi olup farklı olarak sadece bu kite spesifik standartlar hazırlandı.

CEA Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 4000 ng/mL olan CEA stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 4000-0 pg/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan CEA standart grafiği Şekil 9'da gösterildi.



Şekil 9. CEA standart grafiği

Örneklerin ELISA Pleytine Aktarılması ve Ölçüme Hazırlanması

Numuneler aşağıda sıralanan işlemler ile ELISA pleytine aktarılarak ölçüme hazırlandı.

- -80°C'deki numuneler oda sıcaklığına getirildi.
- Standartlar sırası ile 50 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi ve içinde standart bulunan her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP(enzim) eklendi. Kör için ayrılan kuyucuğa sadece sırası geldiğinde kromojen A, kromojen B ve Streptavidin-HRP eklendi.
- Diğer kuyucuklara sırası ile 40 µL numune ve numune bulunan her kuyucuğa 10 µL irisin-antikoru ve 50 µL Streptavidin- HRP eklendi. Sonrasında pleyt folyo ile kapatılarak çalkalayıcıda 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Kitten çıkan yıkama tamponu 30 kat seyreltildi.
- İnkübasyon sonrası pleyt, pleyt yıkayıcıda yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı ve kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu kullanılarak tamamen uzaklaştırıldı.

Numunelerin Renklendirilmesi ve Ölçüm

Numuneler aşağıdaki işlem basamakları ile renklendirildi ve miktarları ölçüldü.

- Her bir kuyucuğa renklendirme için kromojen A ve B çözeltilerinden 50'şer µL eklendi. 37°C'de karanlıkta 10 dk inkübasyona bırakıldı.

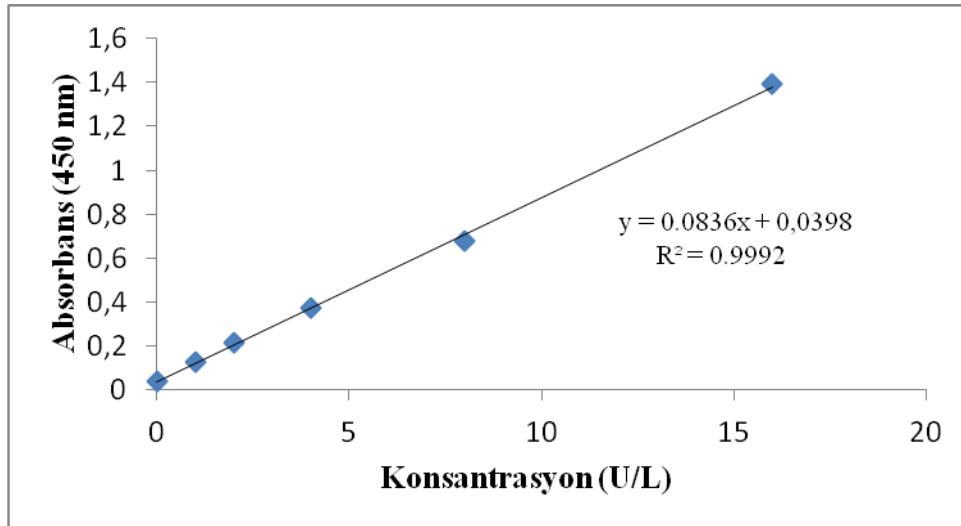
- Standartların rengi maviye döner dönmez her bir kuyucuğa 50 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- 450 nm dalga boyunda absorbanlar ölçüldü.

5.2.7. Serum CA72-4 Seviyesinin Ölçülmesi

Serum CA72-4 ölçümünde Sunred firmasının DZE201020354 referans ve 201407 lot numaralı fare ELISA kiti kullanılarak ölçümü kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu ölçüm için gerçekleştirilen çalışma basamakları CEA kiti ile aynıdır.

CA 72-4 Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 15 U/L olan CA72-4 stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 15-0 U/L arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan CA 72-4 standart grafiği Şekil 10'da gösterildi.



Şekil 10. CA72-4 standart grafiği

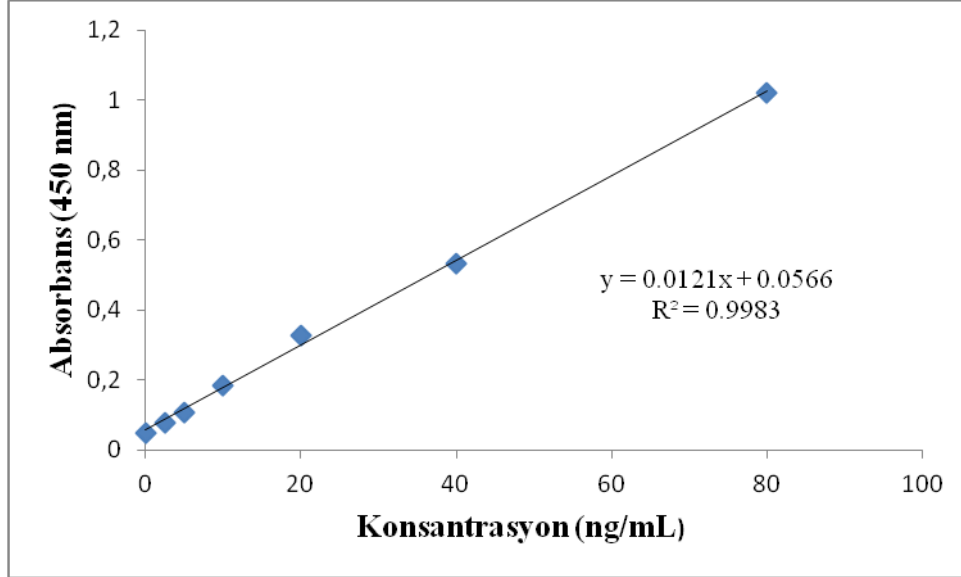
5.2.8. Serum PIF/DCD Seviyesinin Ölçülmesi

Serum PIF/DCD ölçümünde Sunred firmasının DZE201022877 referans ve 201409 lot numaralı fare PIF/DCD ELISA kiti ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu ölçümün gerçekleştirilen çalışma basamakları CEA kiti ile aynıdır.

PIF/DCD Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 100 ng/mL olan PIF/DCD stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 100-0 ng/mL arasında olacak

şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan PIF/DCD standart grafiği Şekil 11’de gösterildi.



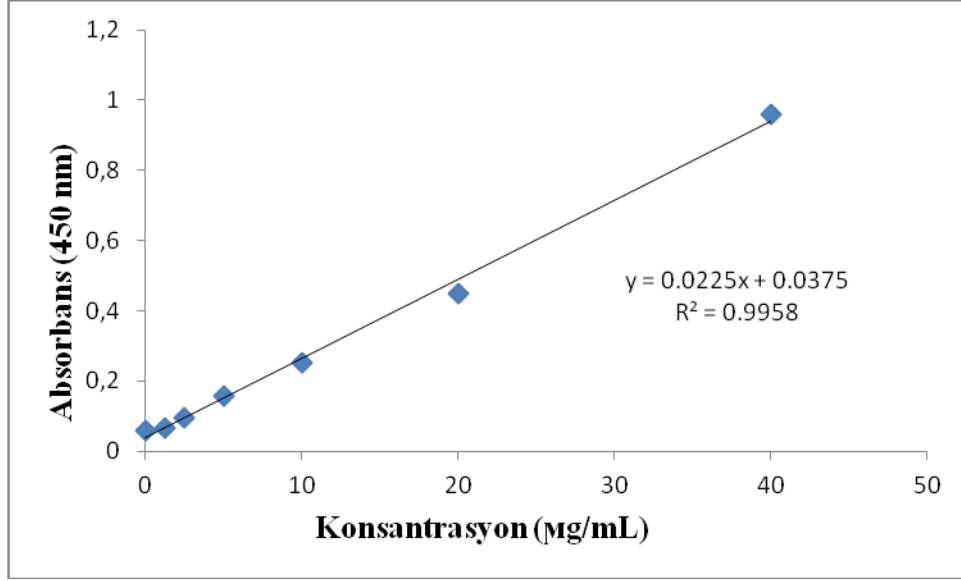
Şekil 11. PIF/DCD standart grafiği

5.2.9. Serum ZAG (AZGP1) Ölçümü

Serum ZAG ölçümünde Sunred firmasının DZE201022876 referans ve 201407 lot kiti kullanıldı. Serumda ZAG ölçümü kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu ölçümün için gerçekleştirilen çalışma basamakları CEA kiti ile aynıdır.

ZAG Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 40 µg/mL olan ZAG stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 40-0 µg/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan ZAG standart grafiği Şekil 12’de gösterildi.



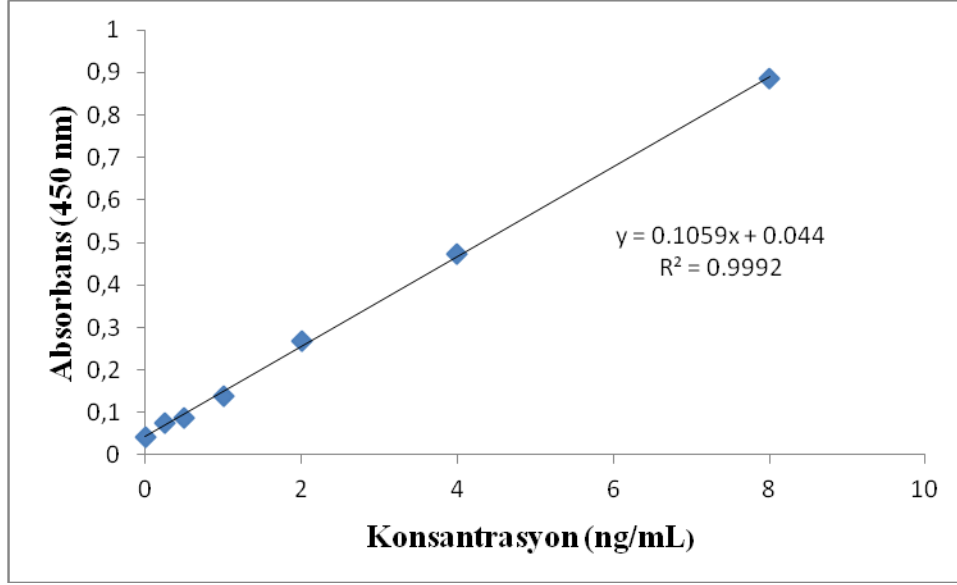
Şekil 12. ZAG standart grafiği

5.2.10. Serum FNDC5/irisin Ölçümü

Serum FNDC5/irisin ölçümünde Sunred firmasının DZE201022874 referans ve 201407 lot nolu fare FNDC5/irisin ELISA kiti kullanıldı. Bu ölçümün için gerçekleştirilen çalışma protokolü aynı firmaya ait oldukları için CEA kiti ile aynıdır.

FNDC5/irisin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kit içinde bulunan ve konsantrasyonu 8 ng/mL olan FNDC5/irisin stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla konsantrasyonları 8-0 ng/mL arasında olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan FNDC5/irisin standart grafiği Şekil 13'de gösterildi.



Şekil 13. FNDC5/irisin standart grafiği

5.3. Total RNA İzolasyonunda Kullanılan Dietilpirokarbonat (DEPC)'li Su Hazırlanışı

100mL'lik DEPC (D5758-Sigma Aldrich) çözeltisinden, % 0.1 (v/v)'lik 500 mL DEPC'li su hazırlanarak 2 saat boyunca 37⁰C inkübe edildi ve inkübasyonun ardından 15-20 dk boyunca otoklavlandı ve ışıktan etkilenmesini önlemek için koyu şişelerde saklandı. Çalışmada kullanılacak DEPC'li suyun özellikleri, suda bulunması muhtemel olan DNAaz ve RNAz enzimlerinin disülfid bağlarını kopararak bu enzimleri inaktive etmesidir. Doku kesimi işleminde kullanılan tüm plastik kaplar, bisturi ve bisturi sapları, öncelikle, distile su ile ardından DEPC'li sudan geçirilerek kullanıldı. Böylelikle DNAaz ve RNAz'lara karşı korunma sağlanmış olundu.

Total RNA izolasyonu yapılacak olan dokular prosedüre uygun olarak tartıldı. Bisturi yardımıyla, enine ve boyuna eşit miktarda parçalamalar yapılarak DNaz ve RNaz'sız eppendorflar içine alındı ve ardından total RNA izolasyonları yapıldı. Bu aşamaların hepsinde kontaminasyon olmamasına dikkat edildi.

5.3.1. İskelet Kası, Mide ve Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu

İskelet kası, mide ve yağ dokularından Total RNA izolasyonu 3 aşamada gerçekleştirilmektedir. Bu aşamalar aşağıda anlatılmaktadır.

Doku hazırlama aşaması

- 50-100 mg doku örneği buz üzerinde ve steril petri kaplarında bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı.
- Parçalanmış dokular 1.5 mL'lik polipropilen eppendorf tüplerine aktarıldı.
- 50-100 mg doku örneği üzerine 1 mL TriPure Isolation Reagent (Roche, Almanya; Kat No:11667165001) ilave edildi ve el homojenizatörü (Tissue Master 125, TM125-115, USA) yardımıyla dokular parçalandı.

Faz ayrımı aşaması

- Nükleoprotein kompleksinin ayırımından emin olmak için tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Örnekler üzerine her bir 1 mL TriPure Isolation Reagent için 200 µL kloroform eklendikten sonra tüpler 15 saniye kuvvetlice çalkalandı.
- Tüpler +4°C'de 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra üç ayrı faza ayrılan solüsyondan RNA örneği içeren üstteki renksiz sıvı faz 1.5 mL'lik RNase free steril tüplere aktarıldı.

RNA izolasyonu

- Örnekler üzerine her bir 1ml TriPure Isolation Reagent için 500 µL izopropanol eklendi.
- Tüpler sıkıca kapatılıp ve ters çevirerek birkaç defa iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi.
- Tüpler +4°C'de 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Örnekler üzerine her bir 1mL TriPure Isolation Reagent için 1 mL %75'lik etanol eklendi ve tüpler +4°C'de 7500 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra RNA pelleti 5 dakika havada kurumaya bırakıldı.
- RNA pelleti 50 µL DEPC'li su ile 60°C'de 10 dakika inkübe edilerek çözüldü.
- Elde edilen RNA örnekleri steril mikrofüj tüpünde -80°C'de saklandı.

5.3.2. RNA'nın Miktersal Ölçümü (Kantitasyonu)

Nanodrop kullanılarak RNA konsantrasyonları ve A260/280 oranı (RNA saflığı) ölçüldü. Tüm konsantrasyonlar en düşük konsantrasyondaki örneğin değerine eşit olacak şekilde DEPC'li su ile eşitlendi. Elde edilen total RNA ürün konsantrasyonlarının literatür bilgisine göre 10 ng-5 µg (5000 ng) arasında olmasına dikkat edildi

5.4. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Elde edilen total RNA'lar komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Total RNA'dan cDNA eldesinde ticari "Transcriptor First cDNA Synthesis" kiti (Roche-Katalog No:04 896 866 001) kullanıldı ve kit prosedürüne uygun olarak cDNA sentez işlemi yapıldı.

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi ticari kitin tavsiyesi doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- -80 °C' de saklanan RNA örnekleri oda sıcaklığına gelmeleri için bekletildi. RNA örneklerinin homojenliğini sağlamak için bu örnekler ısı bloğu üzerinde 65 °C' de 10 dakika ısıtıldı.
- RNA konsantrasyonları ölçülerek kaydedildi. Elde edilen en düşük RNA konsantrasyonu dikkate alınarak diğer RNA örnekleri bu konsantrasyona gelecek şekilde DEPC'li su seyreltildi.
- 1.5 mL hacimli steril tüp içerisinde, gerekli reaksiyon ortamı Tablo 7' de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı. cDNA sentezi için gerekli olan malzeme karışımı buz üzerinde hazırlandı.

Tablo 7. RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	Her bir örnek için gerekli hacim (µL)
Anchored-oligo dT primer	1
Random hexamer primer	2
Transkriptör reaksiyon tamponu	4
RNaz inhibitörü	0,5
dNTP karışımı	2
Reverse Transkriptaz	0,5

- Hazırlanan karışım cDNA elde edilecek her bir örnek için önceden hazırlanmış 250 µL hacimli tüplere her birinde 10' ar µL olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar

üzerine her bir deney grubu için 10⁷ ar µL eşitlenmiş konsantrasyondaki RNA örneklerinden ilave edildi.

- PCR cihazı; 10 dakika 25°C

60 dakika 50°C

5 dakika 85°C olacak şekilde ayarlandı ve cDNA sentezi işlemi başlatıldı.

- Süre sonunda sentezlenen cDNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak nanodrop ile ölçüldü, gruplar arası farkları ortadan kaldırmak için cDNA konsantrasyonları eşitlendi ve RT-PCR aşamasına geçildi. Reaksiyon ortamı için istenen ideal cDNA konsantrasyonunun 50 pg (0,05 ng) – 50 ng arasında olmasına dikkat edildi.

5.5. Real Time PCR Protokolü

RT-PCR cihazı kullanılarak ekspresyonu ölçülecek genlere ait primerler Tablo 8’de gösterildi.

Tablo 8. RT- PCR’da ekspresyonu ölçülmek istenen hedef genler

Primer Adı	Primer Dizisi
Roche Real time ready <i>Azgp1</i> Assay ID: 317292	İleri Primer Sekansı: 5'-GATCTCACCTGGACCGAATAGA-3' Geri Primer Sekansı: 5'-CATAGGCCAGGCATTTGAATA-3'
Roche Real time ready <i>Fndc5</i> Assay ID: 317294	İleri Primer Sekansı: 5'-TTGTGGTCCTCTTCATGTGG-3' Geri Primer Sekansı: 5'-TTATTGGGCTCGTTGTCCTT-3'
Roche Real time ready <i>Pparg1a</i> Assay ID: 313428	İleri Primer Sekansı: 5'- GAAAGGGCCAAACAGAGAGA-3' Geri Primer Sekansı: 5'-GTAAATCACACGGCGCTCTT-3
Roche Real time ready <i>Ucp1</i> Assay ID: 313368	İleri Primer Sekansı: 5'-GGCCTCTACGACTCAGTCCA-3' Geri Primer Sekansı: 5'-TAAGCCGGCTGAGATCTTGT-3'
Roche Real time ready <i>Gapdh</i> Assay ID:307884	İleri Primer Sekansı: 5'- AAGAGGGATGCTGCCCTTA-3', Geri Primer Sekansı: 5'-TTTTGTCTACGGGACGAGGA-3'
Roche Real time ready <i>β-aktin</i> Assay ID:307884	İleri Primer Sekansı: 5'- CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' Geri Primer Sekansı: 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'

Gen ekspresyon çalışmaları; ekspresyonu ölçülmek istenen hedef genler ve referans gen için spesifik olarak üretilen UPL (Universal Probe Library) problemler kullanılarak üretici

firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche Light Cyclers 480 II marka cihaz kullanılarak gerçekleştirildi. RT-PCR analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- 1.5 mL hacimli tüp içerisinde hedef gen ve referans gen için ayrı ayrı olmak üzere gerekli reaksiyon ortamı Tablo 9’ da verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 9. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenler

Reaktif	Her bir örnek için (µL)
LightCycler 480 Probes master	10
Real time ready assay (<i>Fndc5</i> , <i>Ucp1</i> , <i>Ppargc1a</i> , <i>Azgp1</i> , <i>Gapdh</i> , β - <i>aktin</i>)	1
PCR saflığında su	4

- Hazırlanan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde RT-PCR için özel olarak üretilmiş beyaz 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucukta 15’ er µL olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 5’ er µL cDNA örneği ilave edildi.
- Pleytin üzeri şeffaf folyo (LightCycler 480 Sealing Foil, Cat. no: 04 729 757 001, Lot no:13048402) ile hava almayacak şekilde kapatıldı. Sonra 1500 g’de 2 dakika santrifüj edilip cihaza verildi.
- Cihaz ayarları Tablo 10’ de verilen şablona göre düzenlendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 10. RT-PCR protokolü

Tespit formatı: Tek Renkli Hidroliz Prob/ UPL Probe			
Pleyt türü: 96 kuyucuklu			
Reaksiyon hacmi: 20 µL			
Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon	
Soğutma	1	-	
Hedef Sıcaklık	Elde etme	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
°C	Modu		
Ön inkübasyon			
95	-	10 dakika	4.4
Amplifikasyon			
95	-	10 saniye	4.4
60	-	30 saniye	2.2
72	Tek	1 saniye	4.4
Soğutma			
40	-	30 saniye	2.2

Moleküler laboratuvarımızda bulunan Roche LightCycler 480-II cihazı kullanılarak Advanced Relative Quantification programı ile sonuçlar analiz edildi. Bu program ile amplifikasyon döngüsüne karşılık floresans değişimi grafiği oluşturuldu. Hedef genlerin (*Fndc5*, *Ucp1*, *Zag*, *Pgc-1α*) floresans sinyali artışına başlaması için geçen amplifikasyon döngü sayıları referans genin (*Gapdh*) döngü sayılarına oranlandı. Göreceli kantitasyon modunda; deney gruplarının ekspresyon seviyeleri, muamelesiz (kontrol) grubunun ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edildi.

5.5.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

Real-Time PCR sonunda elde edilen PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılarak, görüntü kaydedildi ve bu şekilde reaksiyon kontrol edildi. Görüntüleme kullanılan çözeltiler aşağıda anlatılmıştır.

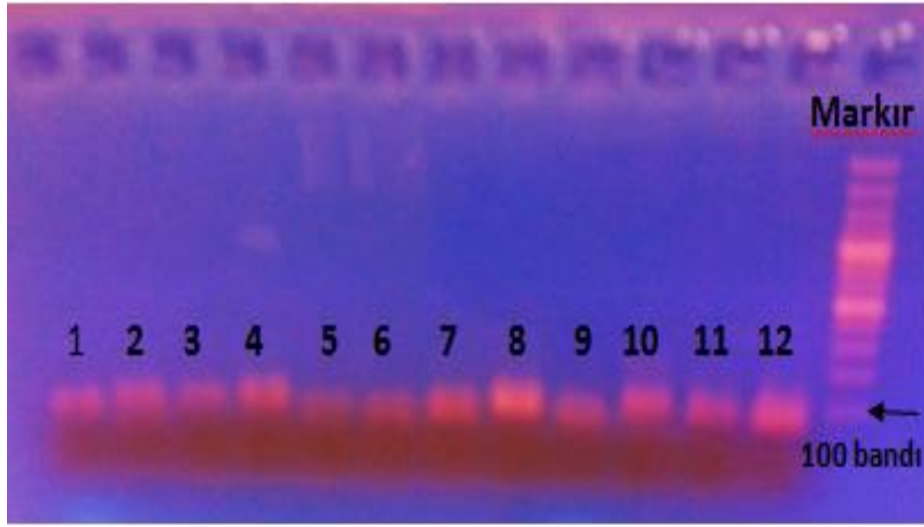
Görüntüleme Kullanılan Çözeltiler:

Tris-asetik asit-EDTA (TAE) elektroforez tamponu: 242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O bir miktar saf suda çözüldü ve üzerine 57 mL asetik asit ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 8.5'a ayarlandı ve son hacim 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan Tris-Asetikasit-EDTA (TAE) tamponunu 50 kat seyreltildi ve hem elektroforez tamponu olarak, hem de, agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü (10 mg/mL). Buzdolabında (4⁰C de) saklandı.

% 2'lik agaroz jel hazırlanması: Beher içerisine 2 g agaroz ve 100 mL TAE tamponu konuldu ve karışımın mikrodalga fırında 60 saniye çözünmesi sağlandı. Elde edilen jele 3 µL etidyum bromür eklendi ve biraz soğuduktan sonra hazırlanan agaroz jel kalıbına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi.

Ürünlerin jele yüklenmesi: Her bir örnekten 7 µL alınıp, 3 µL yükleme boyası ve 2 µL su ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki agaroz jele zarar verilmeden kuyucuklara yüklendikten sonra 80 voltta 60 dk ürünlerin göçü sağlandı. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve kaydedildi. Jel görüntülerinde yaklaşık 100 baz çifti civarında ürünlerin çoğaldığı gözlemlendi. Agaroz jeldeki ürünlerin görüntüsü Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. RT-PCR'dan sonra agaroz jelde ürünlerin görüntüsü

Görüntülemek için agaroz jele yüklenen örnekler Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 11. Agaroz jele yüklenen örnekler

Örnek No	Doku Türü	Gen Türü
1	İskelet kası	<i>Gapdh</i>
2	İskelet kası	<i>Fndc5</i>
3	İskelet kası	<i>Pgc1-α</i>
4	Beyaz yağ dokusu	<i>Fndc5</i>
5	Beyaz yağ dokusu	<i>Zag</i>
6	Beyaz yağ dokusu	<i>Ucp1</i>
7	Kahverengi yağ dokusu	<i>Gapdh</i>
8	Kahverengi yağ dokusu	<i>Ucp1</i>
9	Kahverengi yağ dokusu	<i>Zag</i>
10	Kahverengi yağ dokusu	<i>Beta aktin</i>
11	Kahverengi yağ dokusu	<i>Fndc5</i>
12	Kahverengi yağ dokusu	<i>Ucp1</i>
13	Markır (100-3000)	Markır (100-3000)

5.6. İstatistiksel Yöntemler

Çalışma sonrasında elde edilen analiz sonuçları; aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) 13.0.1 (Lisans numarası: 9069727) istatistik programına yüklenerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan; bağımsız parametrelerin ikili karşılaştırmaları için Student t testi, üçten fazla bağımsız grupların değerlendirmesinde ANOVA testi ve grup içindeki posthoc değerlendirmeler için Turkey ve Tamhane's testleri ile kullanılarak belirlendi. Parametreler arasındaki korelasyon karşılaştırmalarında; parametrik değerlerde Pearson, testleri kullanıldı. İstatistiksel testlerdeki sonuçların $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

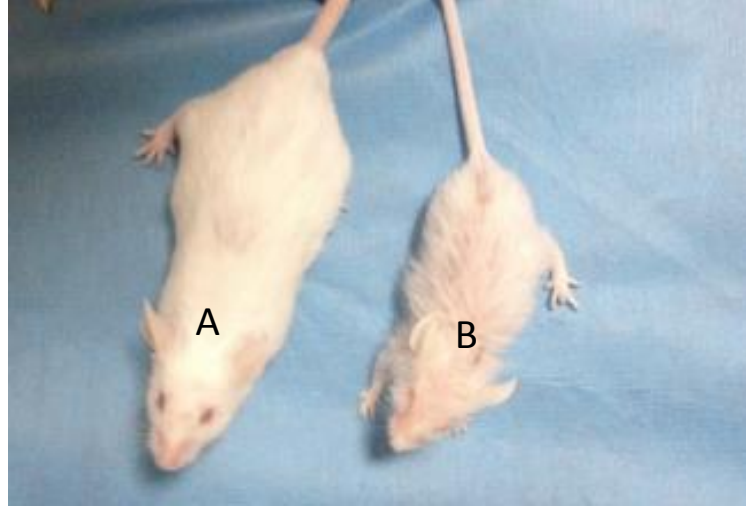
6.1. Morfolojik Bulgular

Çalışmamız için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden 6-8 haftalık, 20-25 g ağırlığında, *Balb/c* ırkı 60 adet erkek fare alındı. 12 saat aydınlık-karanlık ortam sağlandı ve toplam 150 gün (5 ay) bu merkezde barındırılıp, beslendi. Adaptasyon (ilk 15 gün) ve deney süresi boyunca hayvanların yem ve suları *ad libitum* olarak verildi. Adaptasyon sonunda fareler 12'si kontrol, 48'i kanser yapıcı kimyasal MNU verilmek üzere rastgele ikiye ayrıldı. Kontrol farelere, standart fare yemi ve içme suyu, diğerlerine ise standart fare yemi yanında, içme sularına 60ppm ($\mu\text{g/mL}$) MNU ilave edilerek verildi. 48 farenin bulunduğu kafes, farelerin yem ve sularına ulaşmasını kolaylaştırmak amacıyla her bir kafeste 12 fare olacak şekilde 4 farklı kafese yerleştirildi. Tüm farelerin içtikleri su ve yedikleri yem miktarları deney süresinin bitimine kadar kaydedildi.

MNU uygulaması öncesi ve sonunda farelerin görüntüleri Resim 3 ve Resim 4'de görülmektedir.



Resim 3. Deney başlangıcındaki farelerin görüntüsü



Resim 4. Deney süresi sonunda farelerin görüntüsü A) kontrol, B) MNU uygulanan

Deney süresi sonunda tüm gruplardaki farelerin yedikleri yem miktarları karşılaştırıldığında, MNU verilen gruplar (kafes 1, 2, 3, 4) kontrol grubuna yakın miktarda yem tüketmişlerdir (Bkz. Tablo 12).

Tablo 12. Farelerin 5 aylık deney süresi boyunca yedikleri toplam ve bir günde tüketilen yaklaşık yem miktarları

Gruplar	Başlangıç fare sayısı	Deney sonu fare sayısı	150 gün boyunca tüketilen toplam yem (g)	1 günde tüketilen yaklaşık yem miktarı (g)
Kontrol	12	11	6826	45.5
Kafes 1	12	9	6960	46.4
Kafes 2	12	9	6770	45.1
Kafes 3	12	9	6546	43.6
Kafes 4	12	7	6684	44.5

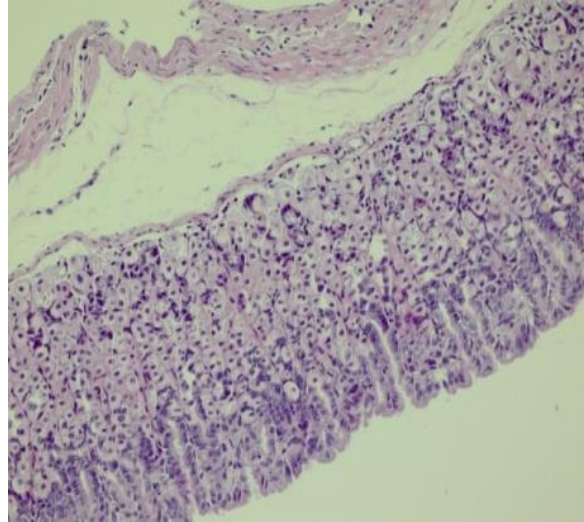
MNU uygulamasına başlamadan önce tüm fareler tartıldı. Farelerin başlangıç ağırlıkları ve sayısı Tablo 13’ de görülmektedir. Deney süresi sonunda kontrol farelerin ağırlıkları artarken, diğer kafesteki MNU verilen farelerde zayıflama görüldü (Resim 4), bu farelerin bir kısmı enfeksiyon, kanser ve diğer nedenlerden dolayı öldüğünden deney kontrol 11, Kafes 1, 2, 3 9 ve kafes 4 ise 7 fare ile tamamlandı.

Tablo 13. 5 aylık süre sonunda farelerin ortalama ağırlıkları ve standart sapma değerleri

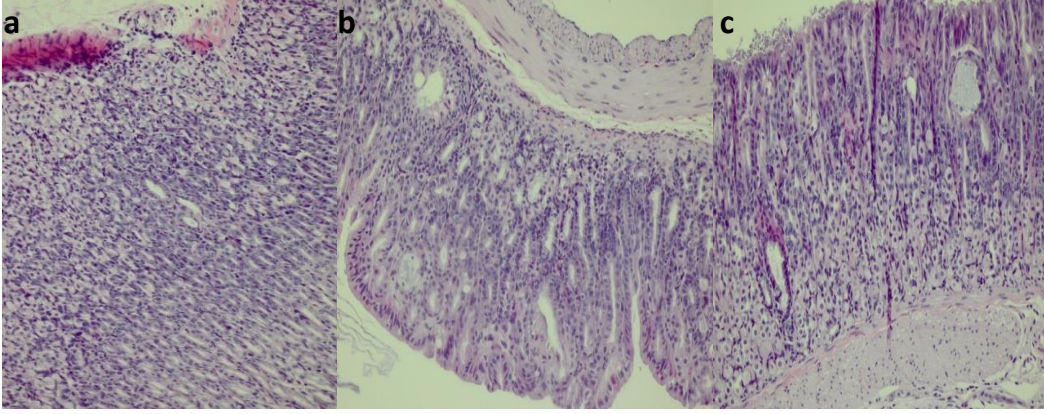
Gruplar	Başlangıç fare sayısı	Deney sonu fare sayısı	Başlangıç (g)	1.5 ay (g)	3.ay (g)	4.ay (g)	5.ay(g)	X±SD
Kontrol	12	11	25.1	40.6	40.8	43.6	45.1	42.5 ± 1.89
Kafes 1	12	9	25.1	33.6	29.5	30.9	31.7	31.4 ± 1.48
Kafes 2	12	9	25	31.3	31.7	30.7	31.5	31.3 ± 0.38
Kafes 3	12	9	23.5	31.2	29	29.6	31.3	30.3 ± 0.98
Kafes 4	12	7	23.3	32.3	31.2	29.7	29.5	30.7 ± 1.13

X±SD: 1.5. , 3. , 4. , 5.ay ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerleri

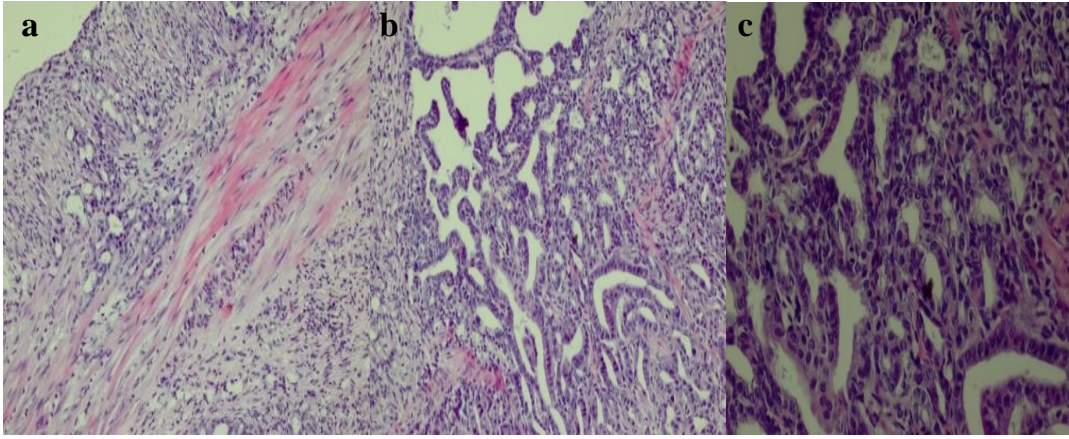
Farelerin dekapitasyonunun ardından, çıkarılan mide dokuları 4 eşit parçaya ayrıldı ve çapraz kesitlerden ikisi histopatolojik inceleme için diğer kısmı ise deneysel aşamada kullanılmak üzere ikiye ayrıldı. Histopatolojik inceleme sonucunda; midelerin patolojik olarak değişim seviyelerine göre 5.2.1’de anlatıldığı gibi 4 grup oluşturuldu. Buna göre kontrol 6, MNU verilip kanser oluşmayan 8, kanser öncesi 8 ve kanser grubunda 6 fare olmak üzere 28 fare ile çalışmaya devam edildi) Bu gruplara ait elektron mikroskop görüntüleri aşağıda verilmiştir. (Resim 5 kontrol, Resim 6 kimyasal verildiği halde kanser oluşmayan, Resim 7 kanser öncesi, Resim 8 ve 9’da kanserli gruplara ait mide doku örneklerinin elektron mikroskopik görüntüleridir)



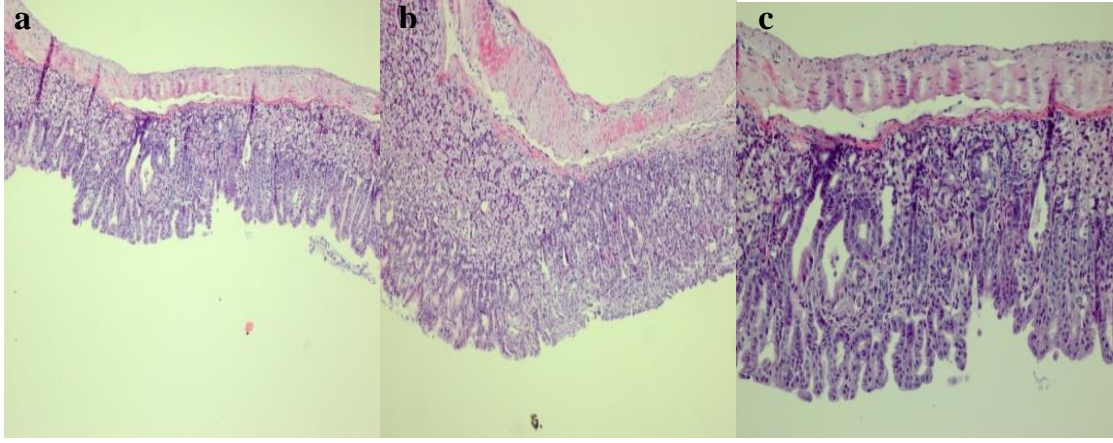
Resim 5. Normal mide mukozası (Mide korpus mukozası) (10x)



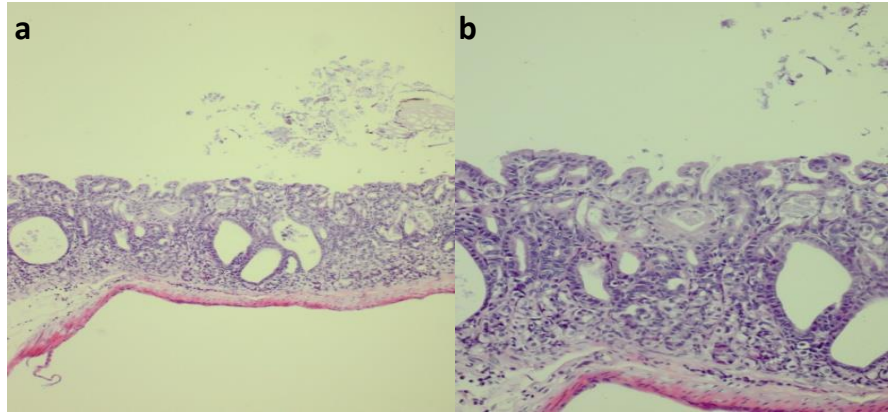
Resim 6. MNU verildiği halde kanser oluşmayan gruptaki farelerin midelerinde meydana gelen patolojik değişimler. (a) Glanduler hiperplazi, minimal displastik değişiklikler (20x), (b) Glanduler mukozada hiperplazi, displastik değişiklikler, minimal arşitektürel bozulma (20x), (c) Glanduler mukozada hiperplazi, displastik değişiklikler, mikrokist formasyonu (20x)



Resim 7. Kanser öncesi (preneo) grubundaki fareler midelerinde meydana gelen patolojik değişimler. (a) Adeno karsinoma, lamina muskularis ve subserozal invazyon (10x), (b) Adeno karsinoma, lamina muskularis invazyonu (20x), (c) Adeno karsinoma (40x)



Resim 8. Kanser (neo) grubundaki fareler midelerinde meydana gelen patolojik değişimler (1). (a) İntramukozal karsinoma (tam kat mukozayı içeren, sitolojik atipi bulguları gösteren gland proliferasyonu, arşitektürel yapıda bozulma) (10x), (b) İntramukozal karsinoma) (20x), (c) İntramukozal karsinoma (30x)



Resim 9. Kanser (neo) grubundaki fareler midelerinde meydana gelen patolojik değişimler (2). (a) İntramukozal karsinoma (Glanduler mukozada displastik değişiklikler, mikrokist formasyonu ve minimal arşitektürel bozulma) (10x) (b) İntramukozal karsinoma (20x)

Tablo 14. Patoloji sonuçlarına göre oluşturulan grupların deney sonundaki ağırlıkları

Parametreler	Kontrol grubu (n=6)	Kanser oluşmayan grup (n=8)	Kanser öncesi grup (n=8)	Kanser grup (n=6)	P
5 ay sonunda ağırlık (g)	46.2 ± 1.87	32.5 ± 1.91	31.1 ± 2.34 ^a	25.6 ± 2.36 ^{a,b,c}	0.000

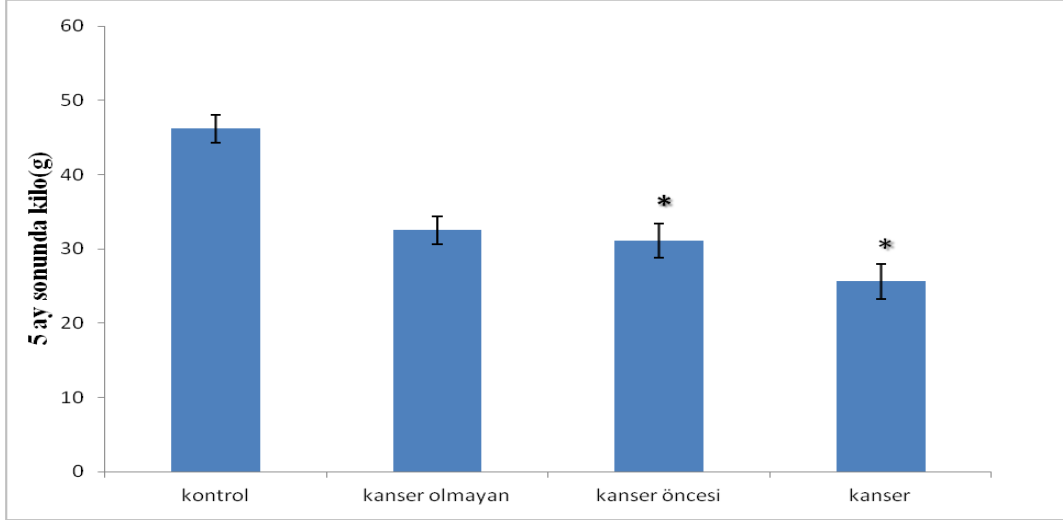
p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı,

b: Kanser oluşmayan gruptan anlamlı farklı,

c: Kanser grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 15. Gruplar arasında 5 aylık deney süresi sonundaki kilo değişimleri ([*Kontrol, kanserleşme olmayan ve kanser öncesi gruplarına göre, kanser öncesi grubu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p < 0.05$)]

Histopatolojik incelenme sonuçlarına göre oluşturulan grupların 5 aylık deney süresi sonundaki, ortalama ağırlıkları ile ilgili elde edilen sonuçlar yukarıda Tablo 14 ve Şekil 15'te verildi.

6.2. Serum Örneklerinde Ölçülen Parametrelerle İlgili Bulgular

6.2.1. Kanser Belirteçleriyle İlgili Bulgular

5.2.1.'de açıklanan şekilde oluşturulan gruplara ait CEA ve CA72-4 seviyeleri serum örneklerinde ELISA kitleri kullanılarak belirlendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 15, Şekil 16 ve Şekil 17' de verildi.

Tablo 15. Serum örneklerinde ölçülen CEA ve CA 72-4 düzeyleri

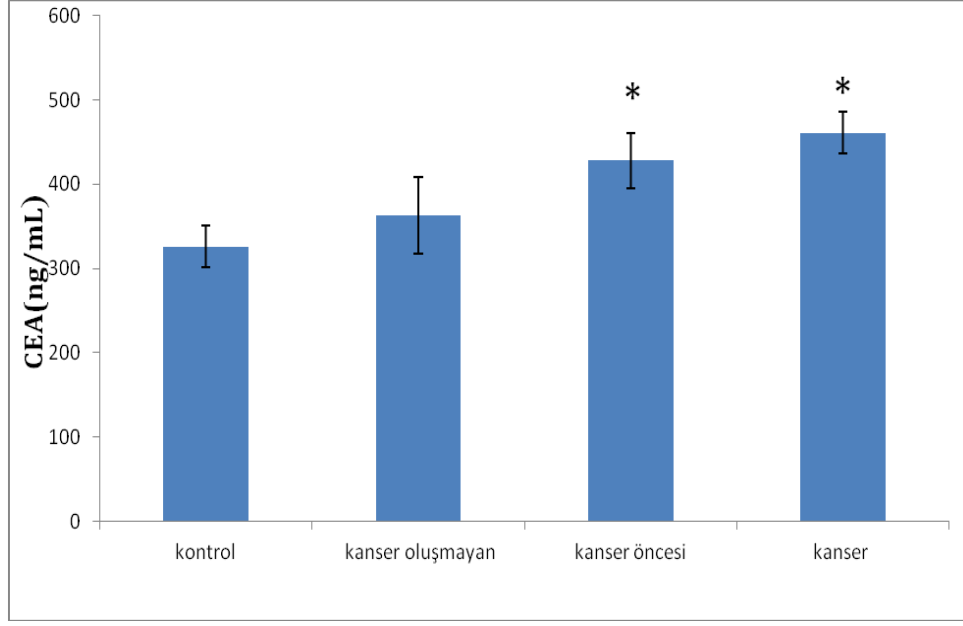
Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Oluşmayan grup n:8	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	P
CEA (ng/mL)	326 ± 24.3	363 ± 45.8	428 ± 32.8 ^{a,b}	461 ± 25.2 ^{a,b}	0.000
CA72-4 (U/L)	1.8 ± 0.13	1.9 ± 0.18	2.3 ± 0.37 ^a	2.3 ± 0.16 ^{a,b}	0.001

p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

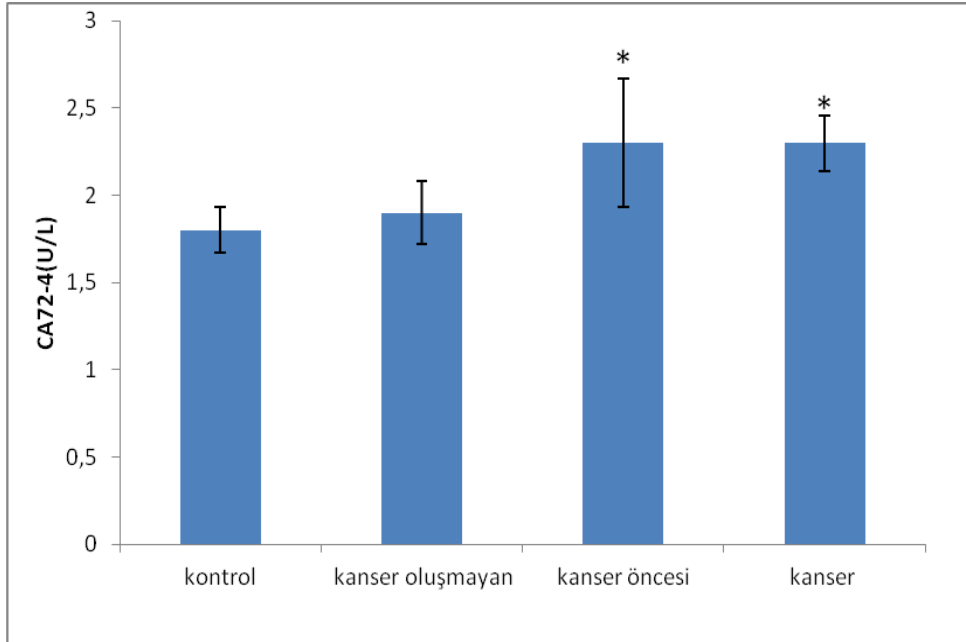
Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı,

b: Kanser oluşmayan gruptan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 16. Gruplar arasında CEA konsantrasyonları [*Kontrol ve kanserleşme olmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0.05$)]



Şekil 17. Gruplar arasında CA 72-4 konsantrasyonları [*Kontrol ve kanserleşme olmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0.05$)]

Elde edilen sonuçlara göre; kanser ve kanser öncesi gruplar kontrol (muamele görmemiş) ve kanserleşme olmayan gruplarla kıyaslandığında CEA ve CA 72-4 seviyeleri açısından anlamlı artış gözlemlendi.

6.2.2. Kaşektik Faktörlerle İlgili Bulgular

Serum örneklerinde kaşektik faktörlerden ZAG ve PIF düzeyleri ELISA kitleri kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait ZAG ve PIF düzeyleri Tablo 16, Şekil 18 ve Şekil 19’da verildi.

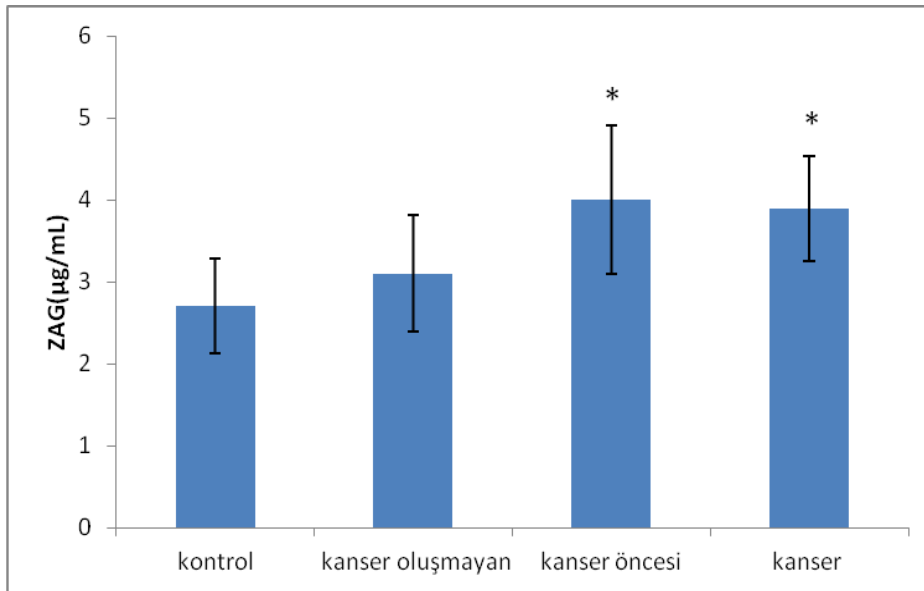
Tablo 16. Serum örneklerinde ölçülen ZAG ve PIF düzeyleri

Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Oluşmayan grup n:8	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	p
ZAG (µg/mL)	2.7 ± 0.58	3.1 ± 0.71	4.0 ± 0.91 ^a	3.9 ± 0.64 ^a	0.008
PIF (ng/mL)	5.1 ± 0.97	6.5 ± 0.89 ^a	6.2 ± 0.70	6.7 ± 0.50 ^a	0.009

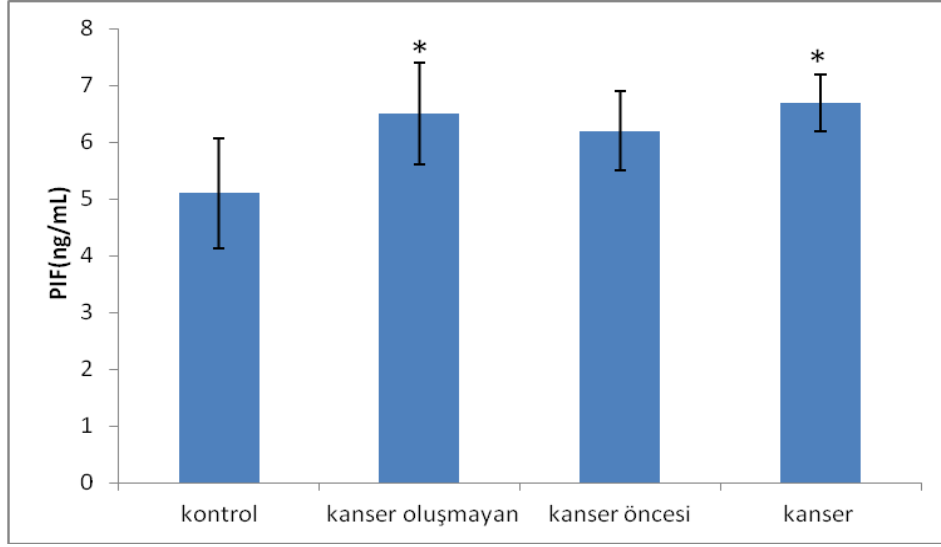
p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 18. Gruplar arasında ZAG konsantrasyonları [*Kontrol ve kanserleşme olmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü (p<0.05)]



Şekil 19. Gruplar arasında PIF konsantrasyonları [*Kontrol ve kanser öncesi gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p < 0.05$)]

ZAG seviyesi kanser ve kanser öncesi gruplarda, PIF ise kanser ve kanser oluşmayan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu.

6.2.3. İrisinle İlgili Bulgular

Serum örneklerinde irisin düzeyi diğer parametrelerde olduğu gibi ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Çalışma gruplarına ait irisin düzeyleri Tablo 17 ve Şekil 20’de verildi.

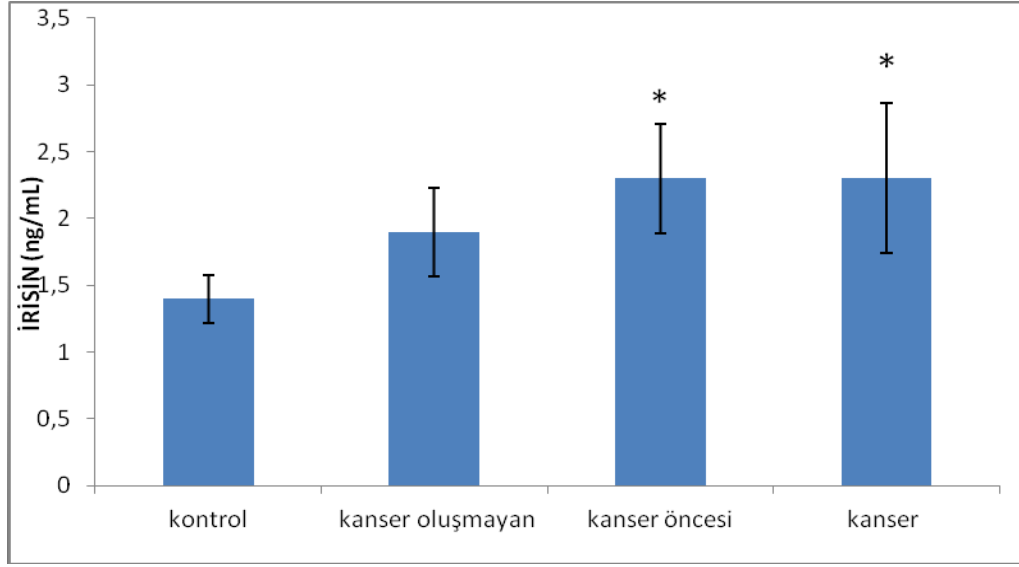
Tablo 17. Serum örneklerinde ölçülen irisin düzeyleri

Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Oluşmayan grup n:8	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	P
İrisin (ng/mL)	1.4 ± 0.18	1.9 ± 0.33	2.3 ± 0.41 ^a	2.3 ± 0.56 ^a	0.001

p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 20. Gruplar arasında irisin konsantrasyonları [*Kontrol ve kanserleşme olmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p < 0.05$)]

Serum irisin seviyesi, kanser ve kanser öncesi gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Kanser oluşmayan grupta, kontrol grubuna göre fark vardır ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı teşkil etmemektedir.

6.2.4. İnflamatuar Belirteçlerle İlgili Bulgular

Serum örneklerinde inflamatuvar belirteçlerden olan TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Çalışma gruplarına ait TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri Tablo 18, Şekil 21 ve Şekil 22’de verildi.

Tablo 18. Serum Örneklerinde Ölçülen TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri

Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Oluşmayan grup n:8	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	P
TNF- α (pg/mL)	20.4 \pm 2.8	27.4 \pm 4.5	27.9 \pm 4.8	33.8 \pm 2.8 ^{a,b,c}	0.000
IL-1 (pg/mL)	90.4 \pm 4.4	97.4 \pm 25.3	107 \pm 19.7	104 \pm 15.6	0.398
IL-6 (pg/mL)	36.1 \pm 10.5	38.2 \pm 13.5	38.7 \pm 15.4	63.7 \pm 15.4 ^{a,b,c}	0.017

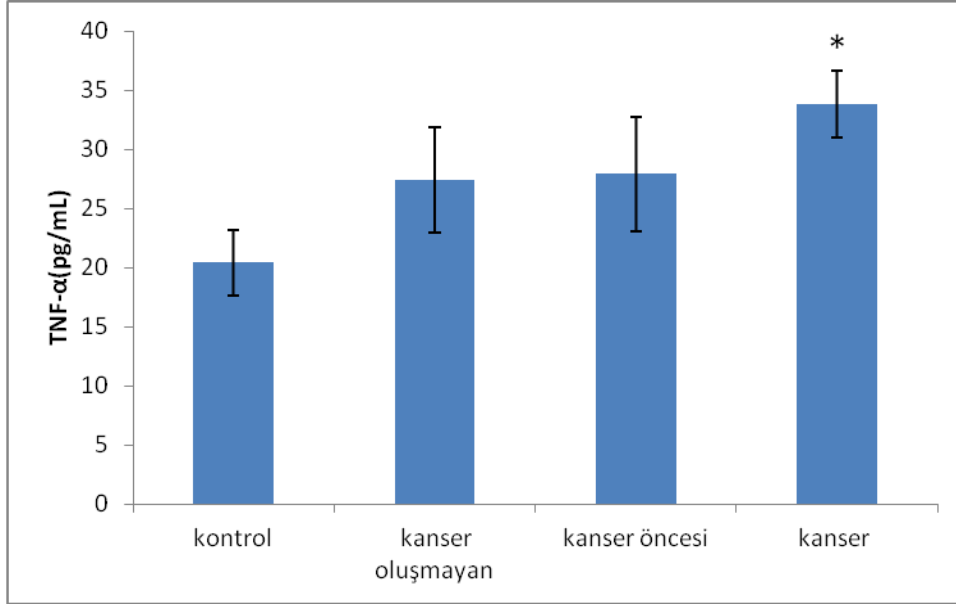
p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

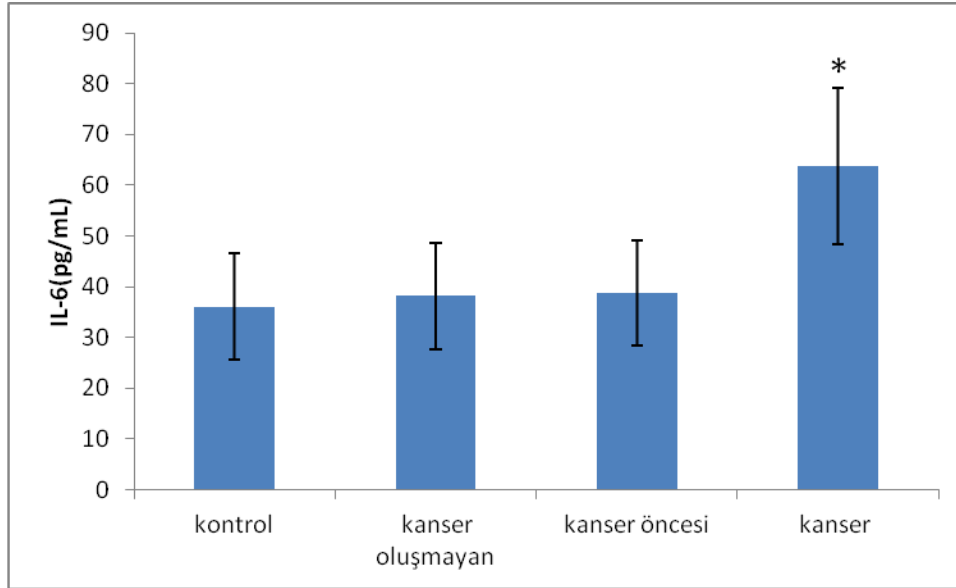
a: Kontrol grubundan anlamlı farklı,

b: Kanser oluşmayan gruptan anlamlı farklı,

c: Kanser grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 21. Gruplar arasında TNF- α konsantrasyonları [*Kontrol, kanserleşme olmayan ve kanser öncesi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0.05$)]



Şekil 22. Gruplar arasında IL-6 konsantrasyonları [*Kontrol, kanserleşme olmayan ve kanser öncesi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0.05$)]

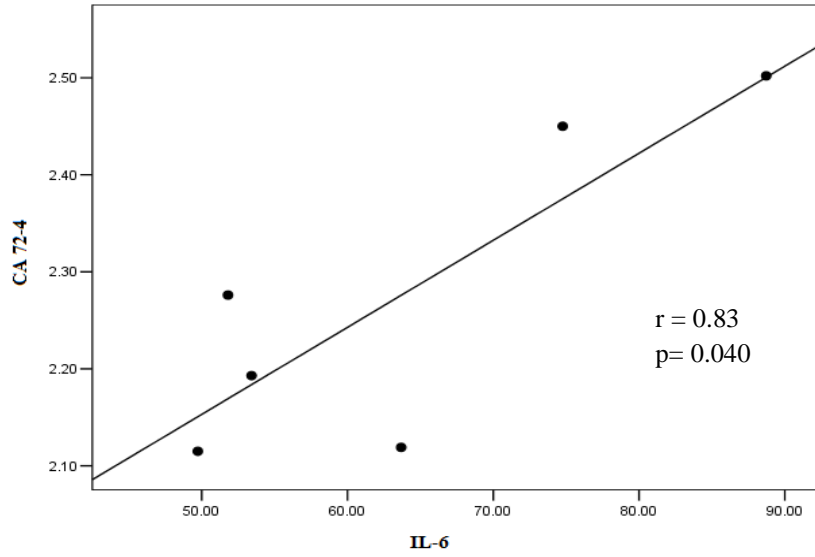
Elde edilen sonuçlara göre; kanserli grupta kontrol, kanser oluşmayan ve kanser öncesi gruplarına göre TNF- α , IL-6 seviyeleri yüksek bulundu. Gruplar arasında diğer inflamasyon belirteç olan IL-1 seviyesi açısından bir fark bulunamadı.

6.2.5. Serum Örneklerinde Ölçülen Parametrelerle İlgili Korelasyon Analizleri

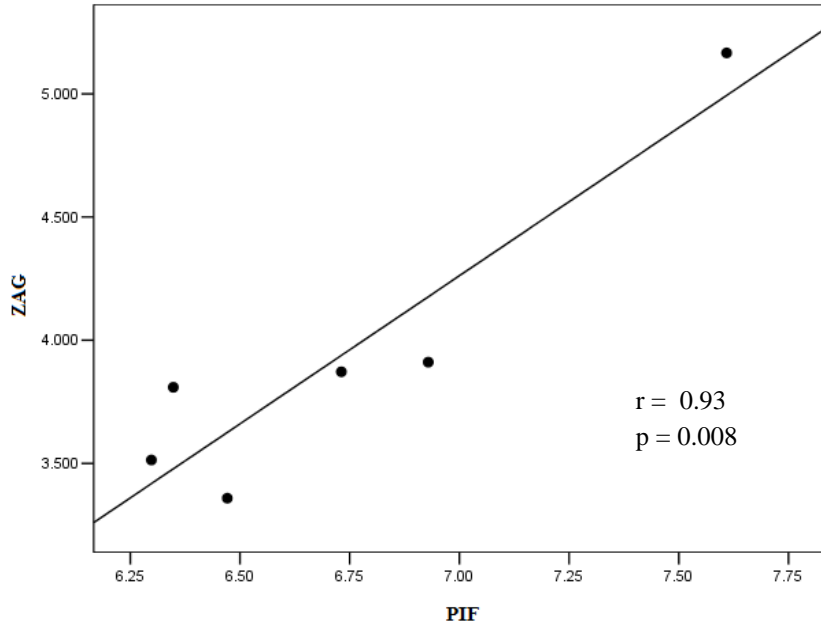
Tüm gruplar arasında korelasyonlar yapılmış ve sadece kanser grubunda yer alan parametrelerle ilgili korelasyonlar anlamlı görülmüş olup bu analizlerin grafikleri Şekil 23, Şekil 24 ve Şekil 25’de gösterilmiştir.

6.2.5.1. Kanser Grubundaki Parametreler Arasındaki Korelasyonlar

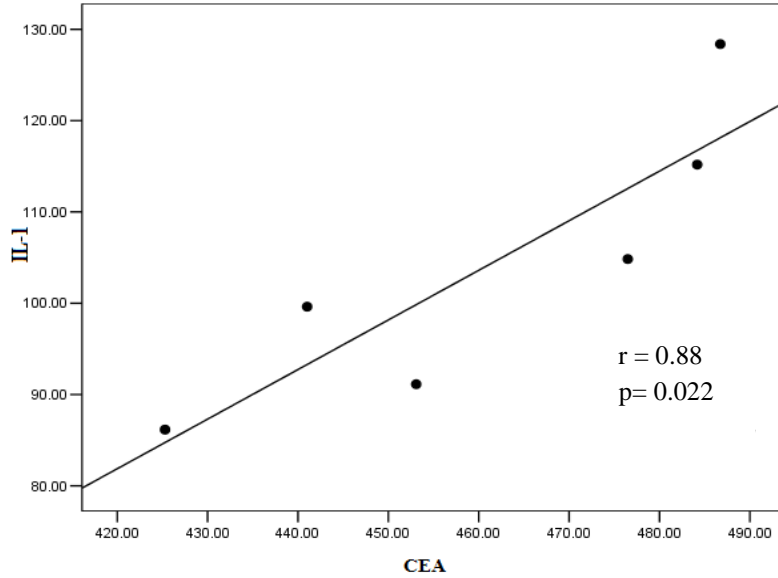
Bu grupta CA72-4 ile IL-6 arasında pozitif korelasyon görüldü ($r=0.83$, $p=0.040$). ZAG ile PIF arasında kuvvetli pozitif korelasyon bulundu ($r=0.93$, $p=0.008$). CEA ile IL-1 arasında ($r=0.88$, $p=0.022$) pozitif korelasyon görüldü.



Şekil 23. Kanser grubunda CA72-4 ile IL-6 korelasyon grafiği



Şekil 24. Kanser grubunda ZAG ile PIF korelasyon grafiği



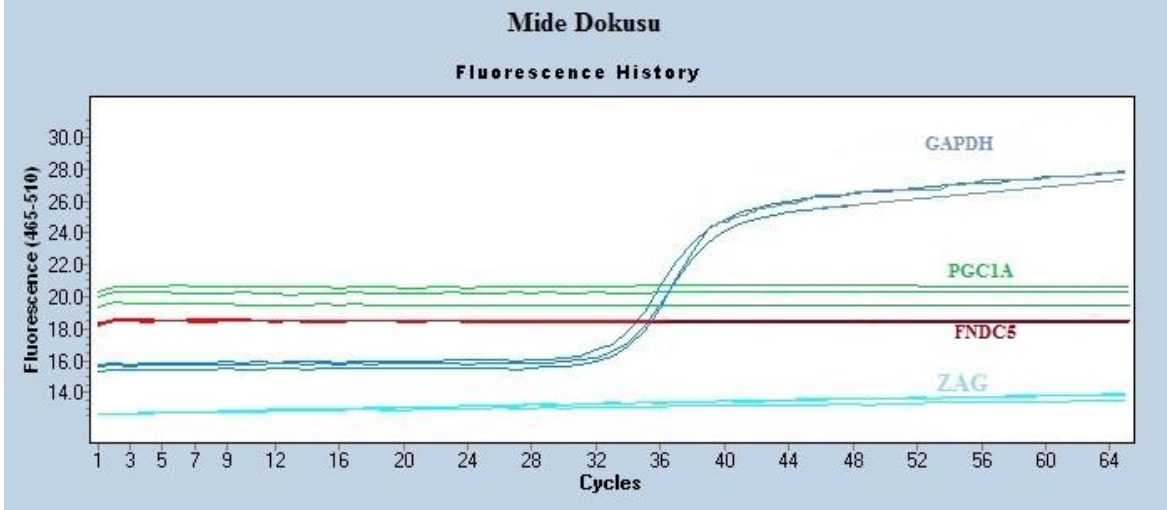
Şekil 25. Kanser grubunda IL-1 ile CEA korelasyon grafiği

6.3. Doku Örneklerinde Ölçülen Parametrelerin Ekspresyonu İle İlgili Bulgular

6.3.1. Mide Dokusunda Ölçülen Genlerin Ekspresyonları İle İlgili Bulgular

5.2.1’de anlatılan 4 gruba ait 28 mide doku örneğinin her biri için üç tekrar yapılmış olup, tüm mide doku örneklerinde (kontrol, MNU verilmiş kanser oluşmuş ve oluşmamış) *Gapdh* için döngü sayısı (Cp) tespit edilirken; hiçbir mide doku örneğinde *Pgc1-α*, *Fndc5*

ve *Zag* için döngü sayısı değeri elde edilemedi. Bu sonuçlardan hareketle, bu proteinlerin mide dokusunda eksprese olmadığı ve bu durumun karsinogenez sürecinde de değişmediği sonucuna varıldı. Mide dokularından elde edilen *Pgc1- α* , *Fndc5*, *Zag* ve *Gapdh* genlerine ait amplifikasyon eğrileri Resim 10’da verilmiştir.



Resim 10. Mide dokusunda *Pgc1 α* , *Zag*, *Fndc5* mRNA ekspresyonlarının analizinden elde edilen amplifikasyon eğrileri

6.3.2. Beyaz Yağ Dokusunda Ölçülen Genlerin Ekspresyonu İle İlgili Bulgular

Kontrol ve diğer 3 gruba ait toplam 28 beyaz yağ dokusunda, her bir numune için üç tekrar yapılmış olup, bu dokularda *Gapdh*, *Fndc5*, *Ucp1* ve *Zag* ekspresyonu ve döngü sayısı (Cp) değerleri elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre; kanser grubunda kontrol grubuna göre *Fndc5* ekspresyonunda anlamlı artış görüldü. Kanser oluşmayan ve kanser öncesi gruplarda da kontrol grubuna göre *Fndc5* ekspresyonunda artış olsa da bu durum istatistiksel olarak anlamlılık teşkil etmemektedir. Benzer şekilde *Pgc-1 α* ekspresyonu da kanser ve kanser öncesi gruplarda kontrole göre anlamlı artmıştır. Kanser oluşmayan sadece MNU’ya maruz kalan grupta ise sonuçlar kontrole benzer çıkmıştır.

Kanser ve kanser öncesi grubunda *Zag* ekspresyonu, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kanser oluşmayan grupta, *Zag* ekspresyonunun kontrolden farksız olması, *Zag* ekspresyon değişiminin MNU kaynaklı değilde kanser oluşum sürecinden kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Resim 11’de görüldüğü gibi *Ucp1*’in beyaz yağ dokusunda ekspresyonu yoktur. Beyaz yağ

dokusuna ait *Fndc5*, *Zag*, *Pgc1- α* ve *Ucp1* genlerinin ekspresyon sonuçları Tablo 19 ve Şekil 26’da , amplifikasyon eğrileri Resim 11’de verilmiştir.

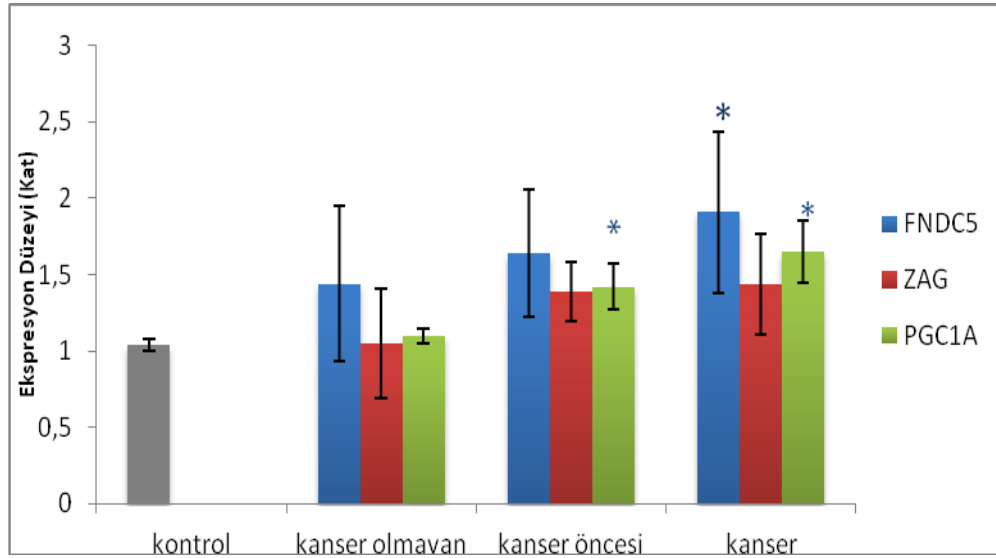
Tablo 19. Beyaz Yağ Dokusuna ait *Fndc5*, *Zag*, *Pgc-1 α* ekspresyon sonuçları

Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Oluşmayan grup n:8	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	P
FNDC5	1.04±0.04	1.34±0.51	1.64±0.42	1.91±0.53 ^a	0.014
ZAG	1.04±0.04	1.05±0.36	1.39±0.19	1.44±0.33	0.508
PGC-1α	1.04±0.04	1.10±0.05	1.42±0.15 ^a	1.65±0.20 ^a	0.003

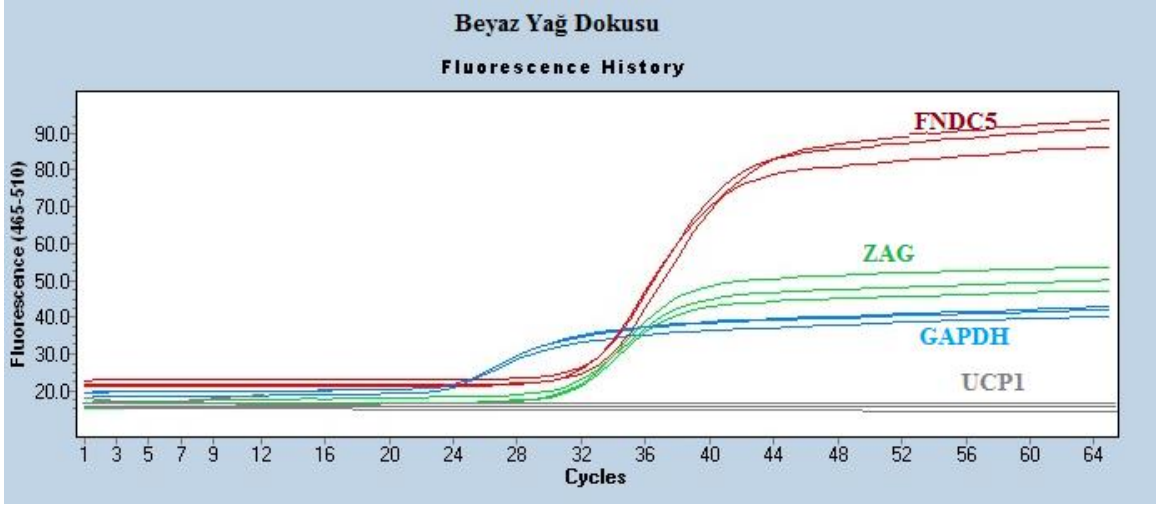
p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 26. Beyaz Yağ Dokusuna ait *Fndc5*, *Zag*, *Pgc-1 α* mRNA ekspresyon analizis sonuçları (n=3) [*Negatif kontrole göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]



Resim 11. Beyaz yağ dokusunda *Zag*, *Fndc5*, *Ucp1* mRNA ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri

6.3.3. Kahverengi Yağ Dokusu *Zag*, *Ucp1* Ekspresyonu İle İlgili Bulgular

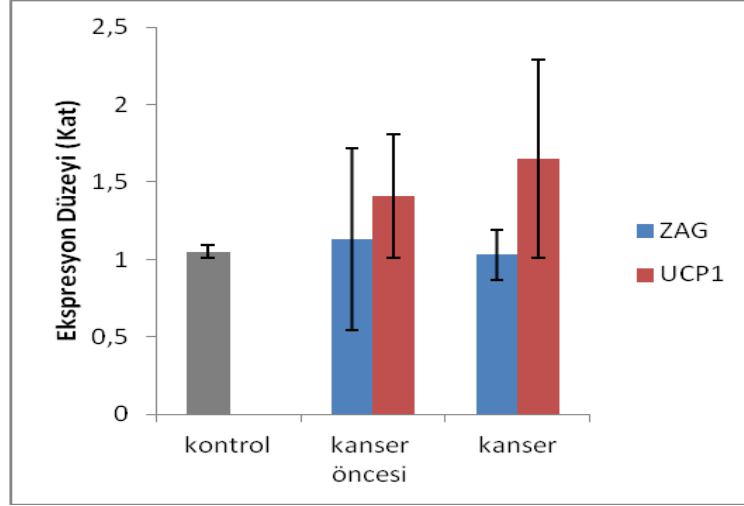
Kahverengi yağ dokusunda, diğer dokulardan farklı olarak 3 gruba (kontrol, kanser ve kanser öncesi gruplara) ait örneklerde her bir numune için üç tekrar yapılmış olup, *Gapdh*, *Ucp1* ve *Zag* ekspresyonu ve döngü sayısı (Cp) değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Zag* ve *Ucp1* ekspresyonları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. *Ucp1* ekspresyonunda, kanser ve kanser öncesi gruplarda kontrol grubuna göre artış görülmekte ancak anlamlılık teşkil etmemektedir. Kahverengi yağ dokusuna ait ekspresyon sonuçları Tablo 20 ve Şekil 27’de amplifikasyon eğrileri Resim 12’de verilmiştir.

Tablo 20. Kahverengi Yağ Dokusuna ait *Zag*, *Ucp1* ekspresyon sonuçları

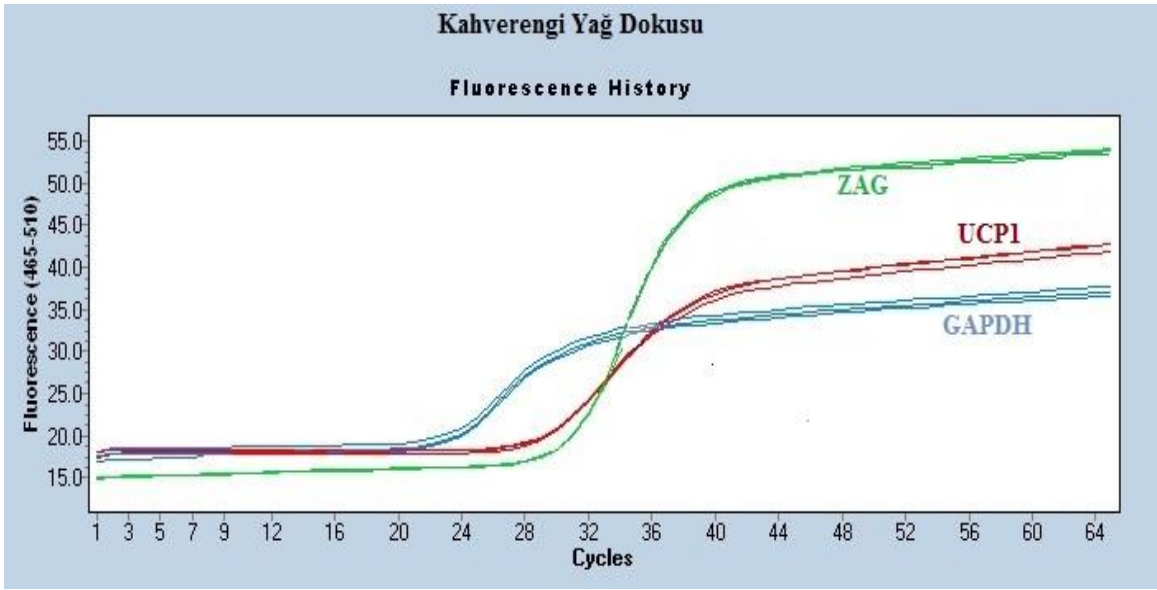
Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	p
ZAG	1.05±0.04	1.13±0.59	1.03±0.16	0.907
UCP1	1.05±0.04	1.41±0.4	1.65±0.64	0.142

p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.



Şekil 27. Kahverengi Yağ Dokusuna ait *Zag*, *Ucp1* mRNA ekspresyon analizi sonuçları (n=3)



Resim 12. Kahverengi yağ dokusunda *Zag* ve *Ucp1* ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri

6.6.3.1. Kahverengi Yağ Dokusu *Fndc5*, *Pgc1-α* Ekspresyonu İle İlgili Bulgular

3 gruba (kontrol, kanser ve kanser öncesi gruplara) ait örneklerde her bir numune için 2 tekrar yapılmış olup, *Fndc5* ve *Pgc1-α* ekspresyonu ve döngü sayısı (Cp) değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Fndc5* ve *Pgc1-α* ekspresyonları kanser ve kanser öncesi gruplarda anlamlı yüksek bulundu. Kahverengi yağ dokusuna ait ekspresyon sonuçları Tablo 21, Şekil 28 ve amplifikasyon eğrileri Resim 13’de verilmiştir.

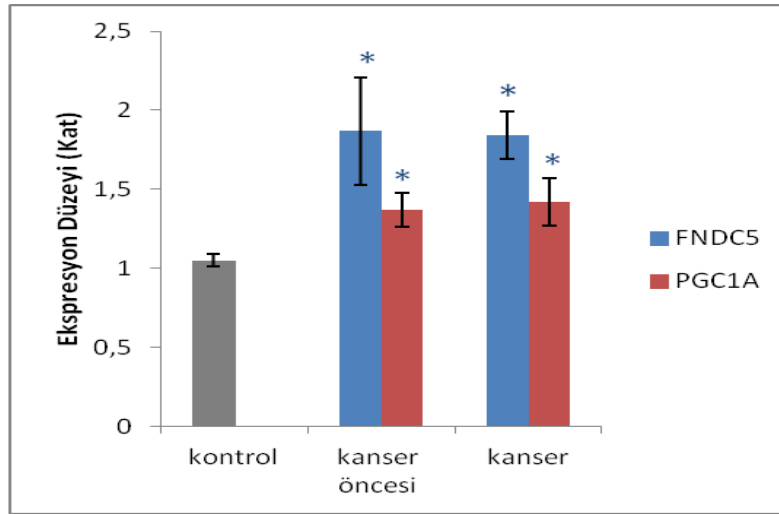
Tablo 21. Kahverengi Yağ Dokusuna ait *Fndc5*, *Pgc1-α* ekspresyon sonuçları

Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	P
FNDC5	1.05 ± 0.04	1.87 ± 0.34 ^a	1.84 ± 0.15 ^a	0.000
PGC1-α	1.05 ± 0.04	1.37 ± 0.11 ^a	1.42 ± 0.15 ^a	0.001

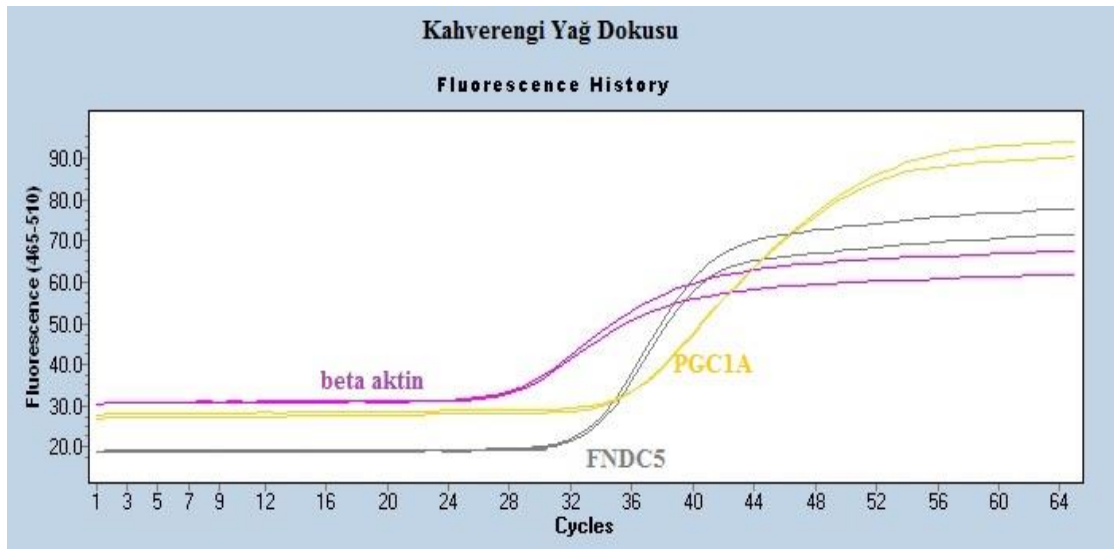
p: "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır.

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 28. Kahverengi Yağ Dokusuna ait *Fndc5*, *Pgc1a* mRNA ekspresyon analizi sonuçları (n=3) [*Negatif kontrole göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]



Resim 13. Kahverengi yağ dokusunda *Fndc5*, *Pgc1α* ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrisi

6.6.4. İskelet Kasında Ölçülen Genlerin Ekspresyonu İle İlgili Bulgular

İskelet kasında, 4 gruba ait örneklerde her bir numune için üç tekrar yapılmış olup, *Gapdh*, *Fndc5* ve *Pgc1-α* ekspresyonu ve döngü sayısı (Cp) değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Fndc5* ekspresyonları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. *Pgc1-α* ekspresyonunda, kanser grubunda kontrol ve kanser oluşmayan gruplarla kıyaslandığında azaldığı gözlenmiştir (p=0.004). İskelet kasına ait gen ekspresyon sonuçları Tablo 22, Şekil 29 ve amplifikasyon eğrileri Resim 14’da verildi.

Tablo 22. İskelet kasına ait *Fndc5* ve *Pgc1-α* ekspresyon sonuçları

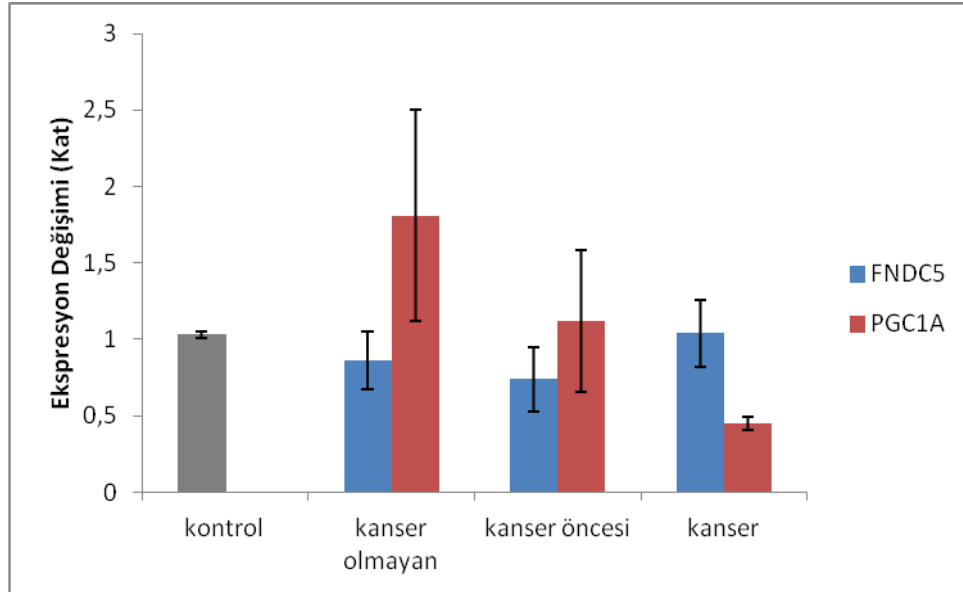
Parametreler	Kontrol grubu n:6	Kanser Oluşmayan grup n:8	Kanser Öncesi grup n:8	Kanser grubu n:6	P
FNDC5	1.03 ± 0.02	0.86 ± 0.19	0.74 ± 0.21	1.04 ± 0.22	0.701
PGC1-α	1.08 ± 0.08	1.81 ± 0.69	1.12 ± 0.46	0.45 ± 0.04 ^{a,b}	0.004

p; "One way ANOVA testi" ne göre verilmiştir.

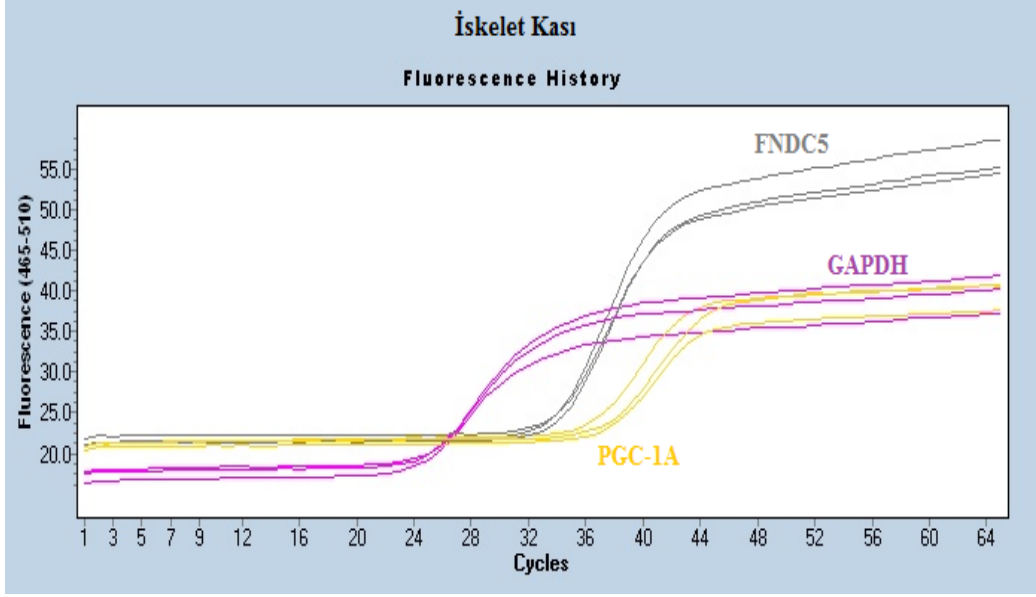
Grup içindeki posthoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapılmıştır. α

a: Kontrol grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.

b: Kanser öncesi grubundan anlamlı farklı olarak değerler verilmiştir.



Şekil 29. İskelet kasına ait *Fndc5*, *Pgc1a* mRNA ekspresyon analizi sonuçları (n=3)



Resim 14. İskelet kasında *Fndc5*, *Pgc1-a* ekspresyonlarının analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İrisin, ekspresyonu *PGC1-α* tarafından düzenlenen ve bir membran proteini olan *FNDC5*'in ekstraselüler kısmının proteoliziyle iskelet kasından kana salınan ve adipoz dokuda yağ oksidasyonunu artırarak kilo kaybına sebep olan yeni tanımlanmış bir miyokindir (1). Bu protein kanda bazal seviyede bulunmakta olup, akut ve yoğun egzersizle iskelet kasından kana salınımı artmakta ve subkutan (derialtı) adipoz dokuda henüz tanımlanmamış reseptörüne bağlanarak, peroksizom proliferatörleri ile aktiveleştirilen reseptör alfa (*PPARα*) aracılıklı *UCPI* ekspresyonunu uyararak, toplam vücut enerjisinin harcanmasında önemli bir artışa ve zayıflamaya sebep olduğu bildirilmiştir (2, 3).

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelen ve gelişmiş ülkelerdeki istatistiklere göre, ölüme yol açan nedenler arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan bir hastalıktır (6, 7). Kanserli vakaların % 30-80'inde hastalık seyri içinde kilo kaybı ortaya çıkmaktadır (4). Kilo kaybının miktarı ve gelişim süresi; etkilenen dokuya, tümör tipine, büyüklüğüne, çoğalma hızına ve evresine göre değişiklik göstermektedir. Özellikle, mide ve pankreas tümörlerinde kilo kaybı çok hızlı gerçekleşmektedir.

Kaşeksi, Yunanca “kakos hexis” kelimelerinden türevlenmiş “kötü durum” anlamına gelen, kanser hastaları arasında morbidite ve mortalitenin temel sebebi olmasına rağmen, mekanizması halen tam olarak bilinmeyen, istem dışı gelişen ve ilerleyen bir zayıflama sendromudur (21). Kaşeksinin yıkıcı etkilerinden biri aşırı kilo kaybıdır. Adipoz doku ve iskelet kasında şiddetli doku azalması gözlenmektedir. Kaşekside kilo kaybı % 30'lara ulaştığı zaman, adipoz doku kaybı % 85'i ve iskelet kası kaybı ise % 75'i bulmaktadır (22).

Kanserli hastalarda kilo kaybı ve kaşeksinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bu süreç içinde tümör hücrelerinden salınan PIF, ZAG ve vücut tarafından aşırı sentez edilen TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin kanser kaşeksisinde ve kanser oluşum sürecinde önemli olduğu ortaya konulmuş olup, kanser kaşeksisine sebep olan faktörlerin ve kanserle meydana gelen aşırı zayıflamanın mekanizmasının araştırılmasına halen devam edilmektedir.

Bu çalışmada, irisinin kilo kaybı oluşturan özelliği dikkate alınarak, deneysel olarak mide kanseri oluşturulmuş olan farelerin iskelet kası, KYD, BYD ve tümör dokularıyla serumlarında bazı kaşektik faktörler (ZAG ve PIF), bazı inflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-

6 ve IL-1) beraberliğinde *Fndc5* ekspresyonu ve irisin seviyeleri ilk kez belirlenerek, bu miyokininin tümör dokusundan salgılanıp salgılanmadığı ve kaşeksi etkeni olup olmadığının araştırılması planlandı. Yeni keşfedilen bir protein olmasından dolayı, irisin ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olup, literatürde bu miyokininin *in vivo* kanserle ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çeşitli kimyasal ajanlar, deney hayvanlarına değişik yollarla verilerek (intraperitoneal, intravenöz, subkutan, oral, intragastrik vb.) birbirinden farklı türde tümörler oluşturulmaktadır (136). MNU, bu kimyasal ajanlardan biridir ve yapısındaki alkil (metil) grubunu, DNA yapısındaki bazlara transfer ederek toksik etkisini göstermektedir. Mutasyonların oluşumu, hedef organlarda kanser riskini artırmakta ve aşırı DNA hasarının tamir edilememesi hücre ölümüne sebep olmaktadır. MNU indüklü karsinogenez ve hücre hasarı çeşitli hayvan türlerinde çok sayıda organı hedef almakta ve yapılan araştırmaların sonuçlarına göre, yeni doğan hayvanlarda kimyasalla karsinogenez oluşumu, olgun olanlara oranla daha kolay gerçekleşmektedir.

MNU kullanılarak *in vivo* mide kanseri oluşturmaya yönelik çok sayıda çalışma vardır ve bu çalışmada da MNU kullanılarak farelerde mide kanseri oluşturulmuştur. Maekava ve arkadaşları, *F344* ratlara 100 ppm (100 mg/L) MNU'yu içme suyuna ilave ederek vermişler ve 42. hafta sonunda ratların % 18'inde adenokarsinom oluşumunu gözlemişlerdir (162). Tatematsu ve arkadaşları, *Balb/c* türü farelere intragastrik entübasyonla MNU uygulamış ve midelerinde adenokarsinom oluşumunu göstermişlerdir. Yine aynı araştırmacılar *C3H* farelere 120 ppm (120 mg/L) MNU'yu içme suyu içinde 30 hafta boyunca vermiş ve 54. hafta sonunda hayvanların dekapitasyonunun ardından % 40'ının midelerinde adenokarsinom oluşumunu bildirmişlerdir (147, 149). Yapılan başka bir çalışmada, MNU'nun tek başına uygulamasında % 12 olan gastrik adenokarsinom oluşum oranını dimetilitokonat (DMI)'nin ilave edilmesinin % 95'e çıkardığı bildirilmiştir. (163). Tello ve arkadaşları, ratlara intraperitoneal (i.p) olarak MNU (50 mg/kg) uygulamışlar, meme kanseri oluşturarak ve ısırgan otu ile tedavi etmeye çalışmışlardır (164).

Bu çalışmalardan hareketle KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilen farelerin içme sularına her gün taze hazırlanmış olarak 60 µg/mL eklenmiş MNU (60 ppm) verilmiş ve bu uygulamaya 150 gün boyunca devam edilmiştir (147). Bu

süre içinde içme sularının fareler tarafından eşit miktarda alınmadığı gözlenmiş olup bazı farelerde kanser oluşmamış olması bu duruma dayandırılmıştır. MNU verilen farelerden bazıları enfeksiyon gelişimi, kanser oluşumu, kaşeksi ve diğer nedenlerden dolayı deney süresi tamamlanmadan ölmüştür. Öleceği fark edilen bazı farelerin mide dokuları otoliz olmadan hemen çıkartılarak histopatolojik olarak incelenmiş, bazılarında kanser oluşumu gözlenmiş ve bu da MNU uygulama süresinin belirlenmesine yardımcı olmuştur. 150 gün sonunda fareler dekapitasyonla öldürülmüş tüm mide dokularında histopatolojik analiz yapılmıştır. Bu inceleme sonuçlarına göre bölüm 5.2.1 de açıklandığı şekilde 4 grup oluşturulmuştur. Histopatolojik incelemenin yanı sıra fare serumlarında mide kanseri belirteçi olan CA72-4 ile kanser araştırmaları ve tedavisinde en sık kullanılan belirteç olan CEA seviyeleri ölçülmüş, kanser ve kanser öncesi gruplar, kontrol ve kanser oluşmayan gruplarla kıyaslandığında, beklenildiği gibi, CEA ve CA72-4 seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Bkz. Tablo 15, Şekil 16, 17). Farelerin serumlarında CA72-4 belirteçinin pozitif bulunması ve histopatolojik incelemelerle de bu durumun teyid edilmesi mide kanseri oluşumunun başarı ölçütü olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, deney süresi sonunda tüm gruplardaki farelerin yedikleri yem miktarları karşılaştırıldığında (Bkz. Tablo 12), oral yolla MNU verilen fareler kontrol grubuna yakın miktarda yem tüketmelerine rağmen, bu gruplarda zayıflama görülmüş ve bu durumun iştah baskılanmasından değil de, sindirim ve emilim sisteminin MNU'dan etkilenmesine bağlı bir durum olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu konu ile ilgili bir bilgiye rastlanılmadığından deney farelerinin dışkı ve idrarlarının incelenmesi planlanmamıştır. Ancak bu husus yapılan çalışmayı etkilememekle birlikte, MNU indüklü zayıflamanın sebeplerini araştıran çalışmalarda dışkı ve idrarların toplanarak analiz edilmesi önerilir. Bir diğer husus da farelerin yemlerini yemeden kemirdikten sonra kafes içine atmış olabileceklerini düşündürmektedir. Maddi imkanlar dahilinde bu tür çalışmalar için metabolik kafes kullanılması yenilen yem, içilen su, dışkı ve idrar miktarlarını tayin etmek açısından önerilebilir.

Araştırmamızın deneysel kısmı temelde iki yöneme dayanmaktadır. Bunlar; serumdaki araştırma konusu olan proteinlerin kantitatif analizinde kullanılan ELISA ve dokularda eksprese edilen proteinlerin mRNA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan RT-PCR metodlarıdır. Bu çalışmada önce mide, iskelet kası, beyaz ve kahverengi yağ dokularında belirlediğimiz genlerin ekspresyonlarını ortaya koymak için, dokudan yüksek

saflıkta RNA izolasyon kiti (Roche-Ürün no: 12033674001) kullanarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Ancak kit prosedürünün incelenmesi ile yukarıda adı geçen dokularla ilgili bir izolasyon bilgisine rastlanılmamıştır. Kasla ilgili olarak da, total RNA'nın spektrofotometrik olarak belirlenmemesine rağmen, RT-PCR da sinyal alındığı ifade edilmiştir. Ancak yaptığımız çalışmada iskelet kasında saf RNA elde edilememesinin yanı sıra RT-PCR'da da sinyal alınmamıştır.

Kit prospektüsünde kalp, karaciğer, böbrek, dalak ve akciğer dokuları için elde edilen total RNA ürün miktarları verilmiştir. Çalışmada bu kit kullanarak gerçekleştirilen total RNA izolasyonu sonucunda ideal total RNA miktarından (10 ng-5 µg) daha düşük seviyelerde sonuçlar bulunmuştur. Bundan dolayı bu kitin yağ dokusu, iskelet kası ve mide dokuları için uygun olmadığı kanaatine varılmış ve bu sebeple Trizol ve Tripure total RNA izolasyon reaktifleri kullanılarak deneylerimiz tekrarlanmış ve istenilen konsantrasyon aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Bu RNA'lardan cDNA sentezi aynı firmanın (Roche) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit) seçilirken, kit prospektüsünün dikkatli okunması önerilir. Çünkü rastgele (random) hegzamer primer ve dizilişe (sequence) spesifik primer içeren 2 farklı cDNA sentez kiti bulunmaktadır. Eğer incelenecek genin ilgili dokulardaki ekspresyonu hakkında yeterli bilgi yoksa dizilişe spesifik primerlerin kullanılması önerilir. Böylelikle, bu primerlerin doğrudan total RNA üzerinde kendilerine komplementer bölgelere bağlanmalarının sağlanıp, RT-PCR'ın özgülüğü artırılmış olunur. Bu çalışmaya başlamadan önce, bu bilgiye sahip olunmadığından random hegzamer primer içeren cDNA sentez kiti firmadan istenilmiş ve kullanılmıştır. İskelet kası ve yağ dokusunda, ilgili hedef ve referans genlerin ekspresyonları hakkında daha önce yapılan çalışmalardan bilimiz olduğundan RT-PCR sinyalleri sıkıntısız olarak elde edilirken, mide dokusunda ya çok düşük ya da ekspresyonları bulunmadığından ilgilenilen genlerin sinyalleri belirlenememiştir. Çalışmadan kaynaklanabilecek sebepleri bertaraf etmek için reaksiyon ortamına ideal cDNA konsantrasyonunun (25 ng) dışında daha yüksek miktarlarda cDNA ilave edilmesine rağmen sonuçların değişmediği gözlenmiştir.

Bu çalışmada irisin, bazı kaşektik faktörler, bazı tümör ve inflamatuvar belirteçler gibi parametrelerin serumdaki miktarları ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bunlardan irisin dışındaki parametrelerin tayini ile ilgili ELISA kitleri uzun süreden beri piyasada bulunan, performansları güven veren ve hastalıkların takip ve teşhisinde de kullanılabilen

tain yöntemleridir. Ancak irisin ile ilgili benzer şeyleri ifade etmek mümkün değildir. Farklı firmalar tarafından üretilen ELISA kitlerinde kullanılan monoklonal antikorların bağlandıkları epitoplari, büyük ihtimalle farklı olduğundan bu kitlerin her birinin performanslarının, ölçüm limit ve şartlarının farklı olacağı aşikârdır. Bundan dolayı değişik araştırmalarda irisin tayininde kullanılan ELISA kitlerinin sonuçları arasında çelişkilerin olmasının sebebi yukarıda ifade edilen husustur. Yapılan bu çalışmalarda irisin seviyeleri şaşırtıcı bir şekilde farklıdır. İrisin seviyeleri bu kitlerde 24 pg/mL ile 2 µg/mL arasında değişmektedir. Yıllar içinde çalışmalarla ilgili ortaya çıkan geri dönüşümler neticesinde en uygun kitin ve çalışma şeklinin ortaya çıkacağı şüphesizdir. Bu çalışmada kullanılan kit daha önce yapılan araştırmaların sonuçlarına ve araştırmacıların izlenimlerine dayanarak tercih edilmiştir. Performansla ilgili olarak irisin örneğinde ifade edilen nispeten yeni kitlerin kullanımında, daha güvenilir sonuçlar elde etmek için her örneğin en az 3 kez tekrarlanarak çalışılması bu sahada edindiğimiz tecrübelerle uygun görülmüştür.

Kanserli hastaların % 30-80'inde kilo kaybı ortaya çıkmaktadır. Özellikle, pankreas ve mide kanserinde (% 83-87) en yüksek, non-Hodgkin lenfoma, kolon, prostat ve akciğer kanserinde (% 48-61) orta seviyede, meme, akut nonlenfotik lösemi ve sarkomada (% 31-40) ise kilo kaybı en düşük seviyededir (25). Kanserde kilo kaybı ve kaşeksinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, bu süreç içinde tümör hücrelerinden salınan kaşektik faktörler ve vücut tarafından aşırı sentez edilen inflamatuvar sitokinlerin salınımı önemlidir ve kanser kaşeksisine sebep olan diğer faktörlerin de araştırılmasına devam edilmektedir. Bu çalışmada, yukarıda sözü edilen kaşektik faktörlerden *Zag* ve *Pif* 'ün incelenen dokulardaki ekspresyonlarının yanı sıra serumdaki seviyelerinin de ölçülmesi planlanmıştır.

Kaslarda atropiyi indükleyen kaşektik faktörlerden *PIF*, ilk olarak kanser hastalarının idrarında keşfedilmiştir. İnsanlarda *PIF*'in mRNA dizisi aydınlatılmış olmakla beraber farelere özgü olan *Pif*' in mRNA dizilişi hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, insan dermisidin proteini içinde yer alan 20 aminoasitlik *PIF* dizisi ile fare *Pif* sekansı arasında, % 90 homoloji olduğu bildirilmektedir. (165). Ancak, bu homolojiye dayanarak fare *Pif*'i için bir primer oluşturmak ve buna bağlı RT-PCR çalışması ile *Pif* mRNA miktarını belirlemenin güvenilir olmayacağı kanaati ile *PIF* ölçümlerini yalnız serumda gerçekleştirip, doku ekspresyonlarının çalışılmaması uygun görülmüştür.

DCD/PIF düzeyi fare serumunda ölçülmüş olup, kanser grubunda, kontrol ve kanser oluşmayan gruplara göre yüksek bulunmuştur (Bkz. Tablo 16, Şekil 19).

ZAG, 43 kDA ağırlığında glikoprotein yapısında olup, meme, prostat, AC, kalp, KYD ve BYD'nun tüm tiplerinde eksprese edilmektedir. Kötü huylu ve kaşeksinin görüldüğü tümörlerde aşırı miktarda sentezlendiği gösterilmiştir. Farelerde MAC16 tümör implantasyonu ile oluşturulan kanserde en yüksek *Zag* ekspresyonunun KC ve KYD'unda görülüp, AC, kalp, epididimal beyaz yağ dokuları orta derecede; böbrek, dalak, bağırsak, beyin ve hipotalamusta ise hiç bulunmadığı ifade edilmiştir (74). Meme kanserinin histolojik sınıflandırması ile ilgili yapılan bir çalışmada, çok farklılaşmış meme tümörlerinde yüksek miktarda, zayıf ve orta derecede farklılaşmış olanlarda ise düşük ZAG ekspresyonu gözlenmiştir. Birçok çalışmanın sonucuna göre ZAG'nin prostat kanseri için potansiyel bir serum belirteci de olabileceği ifade edilmiştir (71). Daniel ve arkadaşları, akciğer adenokarsinomunda ZAG ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca ZAG 'ın tümör baskılayıcı özelliğine sahip olduğu meme, prostat, pankreas ve diğer malign tümörlerle ilgili yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (72). ZAG tümör baskılayıcı özelliğini siklin bağımlı kinazın (cdc2) etkisini azaltıp, hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak göstermektedir. Ayrıca TGF- β bağımlı epitel-mezenşimal farklılaşmasını (EMT) inhibe ederek, tümör invazyonun azalmasına da sebep olmaktadır. ZAG'in mide kanserindeki rolü ile ilgili insan çalışmasında, ZAG gen ekspresyonu ve protein seviyesi tümörlü mide dokularında, normal mide dokularına kıyasla % 80 oranında azalma gözlenmiştir (72). ZAG ekspresyonu, meme, prostat ve akciğer adenokarsinomada artarken, pankreatik, oral, mide adenokarsinomlarda azalmaktadır.

Bu çalışmada tüm gruplardan alınan mide, BYD ve KYD örneklerinin her biri üçer defa çalışılarak bu dokulardaki *Zag* ekspresyonları belirlenmiştir. Tüm farelerin mide dokularında referans geni olan *Gapdh* için sinyali alınmış olup, *Zag* için herhangi bir sinyal alınamamıştır (Bkz. Resim 10). Buradan *Zag* geninin farelerin normal ya da tümörlü mide dokularında sentezlenmediği ortaya çıkmaktadır. Yukarıda anlatıldığı gibi mide kanserli hastalarda *Zag* ekspresyonunun gözlenmiş olması, insan ve fareler arasında önemli bir farklılığı da ortaya koymaktadır.

Farelerin subkutan yağ dokularında *Zag* ekspresyonunun incelenmesi sonucunda Tablo 19 ve Şekil 26'da görüldüğü gibi, kanser ve kanser öncesi gruplarıyla kontrol ve

kanserleşme olmayan gruplar arasında artış gözlenmesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.508$). Bu farelerin serumlarında ZAG seviyeleri belirlenmiş olup, Tablo 16 ve Şekil 18’de görüldüğü gibi kanser ve kanser öncesi gruplarda, kontrol ve kanser oluşmayan gruplara göre ZAG seviyesinde artış gözlenmiş ve bu sonuçtan yola çıkılarak kanser oluşumu ile ZAG seviyesi arasında pozitif bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. Mracek ve arkadaşları çalışmalarında, ZAG ekspresyonunu, tümör derecesinden (I,II,III,IV) bağımsız olarak kaşektik kanser hastalarında kaşektik olmayan kanser hastalarına oranla subkutan adipoz dokuda 2.7 kat anlamlı olarak arttığını göstermişler ($p=0.028$) ve adipoz doku türevli ZAG ekspresyon artışını kaşektik şiddeti ile ilişkilendirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, subkutan adipoz dokuda ZAG proteinini ve dolaşımdaki serum ZAG seviyesini incelediklerinde ve kaşektik kanser hastalarını, kaşektik olmayan kanser hastaları ile kıyasladıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır ($p=0.076$, $p=0.45$) (73). Literatürde kanserli kişilerle sağlıklı kişileri subkutan yağ dokusunda ZAG ekspresyonunu açısından değerlendiren bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

KYD’da kontrol, kanser öncesi ve kanser grupları *Zag* ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Bkz. Tablo 20 ve Şekil 27). Bing ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelerde tümör implantasyonu ile oluşturulan kanserde en yüksek *Zag* miktarının KC ve KYD’da görülüp, AC, kalp ve epididimal beyaz yağ dokusunda orta derecede; böbrek, dalak, bağırsak, beyin ve hipotalamusta ise hiç bulunmadığı ifade edilmektedir (74). Bu çalışmada ise KYD’da *Zag* ekspresyonu gözlenmiş ancak kanser ve sağlıklı gruplar arasında fark görülmemiştir.

TNF- α , IL-6 ve IL-1 kanser sürecinde vücut tarafından aşırı sentez edilen inflamatuvar sitokinlerdendir. Bu sitokinlerden TNF- α , IL-6 seviyelerinin kanserli grupta diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış sergilediği, diğer bir inflamasyon belirteci olan IL-1 seviyesinde artış görülmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (Bkz. Tablo 18, Şekil 21-22).

FNDC5/irisinin termogenik bir ajan olarak kabul edilmesinden sonra çağımızın büyük bir problemi olan obezitenin tedavisinde yararlanılması amacıyla FNDC5/irisinle ilgili birçok çalışma yapılmıştır (1, 125). Diyet kısıtlaması beraberliğinde obezite cerrahisi geçirmiş kişilerle ilgili yapılan bir araştırmada, operasyondan 6 ay sonra, iskelet kası ve

kan örneklerinde *FNDC5* mRNA ve dolaşımdaki irisin seviyelerinin düştüğü ve bu sonuca göre enerji kısıtlaması ve cerrahi olarak indüklenmiş kilo kaybının irisin seviyesini azalttığı görülmüştür (3). Aydın ve arkadaşları gestasyonel diyabetli annelerin süt ve kanlarında irisin seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir (122). Fakat günümüze kadar yapılan çalışmalarda, insulin ile irisin arasında bir ilişkinin varlığı belirlenememiştir. Sesti ve arkadaşları, 192 Kazak yetişkinde irisin seviyesi ve insulin duyarlılığı arasında negatif, karotid intima media kalınlığı (vasküler ateroskleroz indikatörü) ile pozitif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (131). Farelerde artan irisin ekspresyonunun kilo kaybı ve insulin direncinde azalmaya sebep olduğunu gösteren Zhang ve arkadaşları aynı zamanda *Ucp1* gibi termogenik etkileri olan *Elov13*, *Cox7a*, *Otop1* genlerinin ekspresyonlarını da artırdığını göstermişlerdir. Bu şekilde farelerdeki zayıflama ve beraberinde gelişen insulin direncindeki azalmanın tamamen irisinin termogenik etkilerine atfedilebileceğini ortaya koymuşlardır (166). Böylece irisin termogenik ajan olup, hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla antiobezite ve antidiyabetik fonksiyonlara hizmet etmektedir (123, 124). Ayrıca, tip II diyabet hastalarında, HbA1c ve irisin seviyesi arasında negatif bir ilişki gösterilirken, irisin miktarlarında da anlamlı bir azalma bildirilmiştir (167, 129). Stengel ve arkadaşlarının vücut kitle indeksi (VKİ), yağ kütlesi, insulin ve plazma irisin seviyeleri arasında pozitif ilişki bildirilmiş (128) ve dolaşımdaki irisin seviyesinin, vücut yağ kütlesinin indikatörü olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bazı çalışmalar, insanda irisin seviyesi ve VKİ arasındaki pozitif ilişkiden bahsederken, (3, 126-128) bu bilgiye zıt olarak irisin ile vücut kitle indeksi arasında negatif bir ilişki olduğunu ve obez kişilerde zayıflara göre irisin seviyesinin düşük olduğunda bahsetmektedir (168, 169). Yeni keşfedilen bir protein olmasından dolayı, irisin ile ilgili çalışmalar sınırlıdır ve yapılan araştırmalar da yukarıda anlatıldığı gibi genellikle obezite ve T2DM'la ilişkili olup literatürde bu miyokinin *in vivo* kanser ve kanser kaşeksisi ile ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada sağlıklı ve mide kanseri oluşturan farelerden alınan dokuların tümünde her bir doku üçer kez tekrarlanacak şekilde *Fndc5* ekspresyonu ölçülürken, fare serumlarında da ELISA yöntemi ile irisin seviyeleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda normal ve kanserli mide dokularında *Fndc5* ekspresyonu tespit edilememiştir. *FNDC5* ekspresyonunun iskelet kasında % 100 kabul edildiği bir insan çalışmasına göre rektum, perikardiyum ve kalpte oldukça yüksek, önemli organlar olan karaciğer, akciğer, böbrek ve

yağ dokularında oldukça düşük, mide, kolon, lenf nodları, dalak, timus ve trekeada da belirlenemeyecek düzeyde olduğu bildirilmiştir (3). Bu çalışmada *Fndc5* ekspresyonunun hiçbir fare mide dokusu örneğinde bulunamamış olması, Huh ve arkadaşlarının insanlarda yaptığı araştırma sonuçlarına benzemektedir. Mide dokusunda kanserleşme ile de *Fndc5* ekspresyonunun bulunmaması, ektopik olarak da etkilenmediğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma farelerde kanserli ve normal mide dokusunu *Fndc5* ekspresyonları açısından inceleyen ilk araştırmadır.

İskelet kasında *Fndc5* ekspresyonunun belirlenmesi sonucunda tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiş olup ($p=0.701$), iskelet kasında kanserleşme öncesinde ve süresince, kontrol grubuna göre *Fndc5* ekspresyonu değişmemiştir (Bkz. Tablo 22, Şekil 29). Buradan hareketle kanserleşme ile kasta *Fndc5* ekspresyonu ve dolayısıyla irisin salınımı arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varılabilir.

FNDC5 ile ilgili yapılan son araştırmalar, FNDC5 proteininin bir adipokin olarak kabul edilmesine yol açmıştır (124). Bu durumdan yola çıkılarak, beyaz ve kahverengi yağ dokularındaki *FNDC5* ekspresyonunun, kanserleşme ile ilişkisinin de incelenmesinin önemli olduğu düşünülerek, tüm gruplarda ölçülmüştür. Sonuç olarak kanser grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüş (Bkz. Tablo 19, Şekil 26) ve kanserleşmeyle, subkutan yağ dokusunda *Fndc5* ekspresyonunun arttığı ortaya konulmuştur. Ayrıca kontrol grubu ile MNU uygulandığı halde kanserleşmenin görülmediği grup arasında *Fndc5* ekspresyonu açısından anlamlı fark gözlenmemiştir. Ortaya çıkan bu durumdan MNU uygulanmasının, BYD'da *Fndc5* ekspresyonunda ve dolayısıyla irisin salgılamasında bir artışa sebep olmadığı anlaşılmaktadır. Kahverengi yağ dokusu *Fndc5* ekspresyonu açısından incelendiğinde kanser ve kanser öncesi gruplarda kontrol gruplarına oranla anlamlı yüksek bulunmuştur (Bkz. Tablo 21, Şekil 28). BYD ve KYD'da, *Fndc5* ekspresyonundaki artış, dolaşımda da irisin seviyesindeki artışı desteklemektedir. Nitekim serumda ölçülen irisin miktarları bunu doğrulamaktadır; ELISA ile ölçülen dolaşımdaki irisin miktarı, kanser grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (Bkz Tablo 17, Şekil 20). Yapılan bu çalışma kanser ile FNDC5/irisin arasındaki ilişkinin aydınlatılmaya çalışıldığı, ilk araştırma olduğundan elde edilen sonuçlar bu açıdan önem taşımaktadır.

FNDC5 proteininin düzenleyicisi olan *PGC-1 α* , mitokondrilerin bol ve oksidatif metabolizmanın aktif olduğu kalp, iskelet kası beyin ve böbrek gibi dokularda yüksek oranda sentezlenirken, KC de nispeten az, beyaz yağ dokusunda oldukça az ekspresyonu vardır. Bu çalışmada kanserleşme olayı ile birlikte iskelet kasındaki *Pgc-1 α* ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (p=0.004). Burada kanser ve kanser öncesi grubunda kanser olmayan gruba göre anlamlı azalma olduğu görülmektedir (Bkz. Tablo 22, Şekil 29). Ancak kanser sürecinde bu azalışın sebebini açıklayacak bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Mide dokusunda ise *Fndc5*'e benzer şekilde *Pgc-1 α* ekspresyonu tespit edilememiştir (Resim 10). Bu durum mide de *Fndc5* analizinden sonra beklenen bir sonuçtur. Kahverengi ve beyaz yağ dokularında da *Pgc-1 α* ekspresyonunun, hem kanser, hem de, kanser öncesi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı miktarda arttığı gözlenmektedir (Bkz. Tablo 19, 21 ve Şekil 26, 28). Bu artışlar *Fndc5* biyosentezindeki artışı da açıklamaktadır.

KYD ve BYD'da *Ucp1* ekspresyonları da araştırılmıştır. BYD da ölçülecek seviyede *Ucp1* ekspresyonu gözlenmezken, Tablo 20, Şekil 27 ve Resim 13'te gösterilen sonuçlara göre KYD da kanserleşme ile artan *Ucp1* ekspresyonu bulunmuş, ancak bu artışın önemli olmadığı anlaşılmıştır. Beyaz yağ dokusunda büyük oranda kahverengileşme artışı olmadıkça, mitokondri sayılarının azlığından dolayı, *Ucp1* mRNA'sının ölçülememesi olağandır. Akut egzersiz ile kastan salınan irisin miktarının dolaşımında oluşturduğu yüksek konsantrasyonuyla beyaz yağ dokusunda *Ucp1* biyosentezi artarken, bu çalışmada kanserleşme ile yağ dokularından kana salınan irisin artışının, yeterli *Ucp1* ekspresyonu oluşturmadığı da söylenebilir. Bundan dolayı akut egzersizin sonrasında irisin artışı kaynaklı zayıflamanın, kanserli farelerdeki irisin artışı kaynaklı zayıflamadan farklı olabileceği düşünülmektedir. Kanserli farelerdeki zayıflamanın, yağ dokularında artan irisin sentezinin otokrin bir etki ile henüz tanımlanmamış bir yolağı aktifleştirerek, triaçilgliserollerin hidroliziyle yağ asitlerinin ortaya çıkışını sağlayarak zayıflamayı gerçekleştirebileceği düşünülebilir. Bu şekilde dolaşıma geçen yağ asitleri, özellikle, MNU uygulamasıyla emilim kaynaklı besin eksikliğine maruz kalan dokular tarafından hızlı bir şekilde kullanılabilir.

Bu çalışmada, sağlam ve tümörlü mide dokularında *Fndc5* ve düzenleyicisi olan *Pgc-1 α* 'nin sentezlenmediği bulunmuş, BYD ve KYD'da *Fndc5* ekspresyonu kanserli

gruplarda, kontrol ve MNU verildiği halde kanser oluşmayan gruplara göre artmıştır. MNU verildiği halde kanserleşmenin olmadığı, sadece MNU kaynaklı zayıflamanın olduğu grupta, *Fndc5* ekspresyonu kontrol grubuna göre biraz artmıştır ancak bu farkın anlamlılık teşkil etmemesi, BYD ve KYD da kanser grubunda *Fndc5* ekspresyonundaki anlamlı artışın sadece kanser kaynaklı olabileceğini ortaya koymuştur. İskelet kasında kontrol ve kanserli gruplar arasında *Fndc5* ve *Pgc1-α* ekspresyonları açısından fark bulunamamıştır. Mide dokusundaki kanserleşme beraberliğinde iskelet kasında *Fndc5* ekspresyonunda herhangi bir değişiklik ortaya çıkmamıştır. İskelet kasında akut (yoğun, kısa süreli) egzersizle *Pgc1-α* aktifleşmekte ve *Fndc5* ekspresyonunu artmakta ve bu şekilde dolaşımdaki konsantrasyonu artan irisin çeşitli sinyal yollarını etkileyerek zayıflamaya sebep olmaktadır. Yukarıda ifade edilen sonuçlar bu yolağın sadece egzersizle aktive olduğunu ve kanser oluşumu ve kaşeksi ile hiçbir ilişkisi olmadığını göstermektedir.

Sonuçta, deneysel olarak mide kanseri oluşturulan farelerin mide tümör dokusundan salınan bir takım faktörlerin bilinmeyen bir takım sinyal yollarını aktive ederek, BYD ve KYD’da, *Fndc5* ve onun koaktivatörü *Pgc1-α*’yı, dolayısıyla, dolaşımda irisin artışını uyardığı, irisinin de otokrin etkiyle (kaşektik faktörlerden *Zag* gibi) BYD’da TAG yıkımını artırarak zayıflamaya sebep olduğu düşünülmektedir. Ancak kanser oluşumu ile beyaz ve kahverengi yağ dokularında *Fndc5*’in ve dolaşımdaki irisinin artışına neyin sebep olduğu ortaya konulamamıştır. Bu husus başka araştırmalarla aydınlatılmalıdır.

8. KAYNAKLAR

1. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481(7382): 463-8.
2. Castillo-Quan JI (2012). From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. *Dis Model Mec* 5: 293-295.
3. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, Mantzoros SM (2012). FNDC5 and irisin in humans. I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism* 61:1725–38
4. Inui A (2002). Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome. *Current Issues in Research and Management. CA Cancer J Clin* 52: 72-91.
5. K Yarış N, Büyükpamukçu M (1996). Tümörlü hastalarda beslenme. *Katkı dergisi* 419-431.
6. Aslan Ö, Vural H, Kömürcü Ş, Özet A (2006). Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi. *C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi* 10(1): 15-28.
7. Pınar R (2003). Assesment of Quality of life in Turkish patients with cancer. *Turk J Cancer* 33(2): 96-101.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancerstatistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69–90.
9. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of world wide burden of cancer in 2008. *Int J Cancer* 127: 2893–2917.
10. Chan AO, Wong BC, Lam SK (2001). Gastric cancer: Past, present, future. *Can J Gastroenterol* 15: 469-74.
11. Ye X, Fu J, Yang Y, Gao Y, Liu L, Chen S (2013). Frequency-Risk and Duration-Risk Relationships between Aspirin Use and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 30:8(7): e71522.
12. Huang C, Zhao JJ, Lv L, Chen Y, Li Y, Jiang S, Wang W, Pan K, Zheng Y, Zhao B, Wang D, Chen Y, Yang L, Zhou Z, Xia J (2013). Decreased expression of AZGP1 is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. *Plos One* 8:7 e69155

13. Dinççelik M (2011). Mide kanserinde glipikan 5 ve glipikan 6'nın ekspresyon seviyelerinin tanısai ve prognostik önemi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
14. Nagini S (2012). Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 4(7): 156-169.
15. Başkol M, Başkol G, Koçer D, Artış T, Yılmaz Z (2007). Mide Kanserli Hastalarda Oksidan ve Antioksidan Parametreler ve Birbirleriyle ilişkileri. *Türk Biyokimya Derg* 5(3): 83-89.
16. Ma Y, Zhang L, Rong S, Qu H, Zhang Y, Chang D, Pan H, Wang W (2013). Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage, and lipid peroxidation. *Oxid Med Cell Longev* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/543760>.
17. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, Sasoko M, Welvaart K, Plukker JT, van Elk P, Obertop H, Gauma DJ, Taat CV (1995). Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 diissection for gastric kanser in 996 Dutch patients. *Lancet* 345:745-48.
18. Takahashi T, Saikawa Y, Kitagawa Y (2013). Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment. *Cancers* 5: 48-63.
19. Tsukamoto T, Mizoshita T, Tatematsu M (2007). Animal models of stomach carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 35(5): 636-48.
20. Electronic resources [online]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Mide_kanseri [Accessed 7 December 2014].
21. Deans D, Wigmore SJ, Gilmour H, Tisdale MJ, Fearon KCH, Ross JA (2006). Expression of the proteolysis-inducing factor core peptide mRNA is upregulated in both tumour and adjacent normal tissue in gastro-oesophageal malignancy. *Br J Cancer* 94: 731–736.
22. Fearon KCH (1992). The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. *Proc Nutr Soc* 51: 251–265.
23. Windsor JA, Hill GL (1988). Risk factors for postoperative pneumonia. The importance of proteindepletion. *Ann Surg* 208: 209–217.
24. Inagaki J, Rodriguez V, Bodey GP (1974). Causes of death in cancer patients. *Cancer* 33: 568–571.
25. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO, Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken

- MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW, Tormey DC (1980). Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am J Med* 69: 491–497.
26. Tisdale MJ (2002). Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2: 862-871.
 27. Marin Caro MM, Laviano A, Pichard C (2007). Nutritional intervention and quality of life in adult oncology patients. *Clin Nutr* 26: 289-301.
 28. Moses AGW, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KCH (2004). Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer* 90: 991–1002.
 29. Fredrix EN, Soeters PB, Wouters EF, Durenberg IM, von Meyenfeldt MF, Saris WH (1991). Effect of different tumor types on resting energy expenditure. *Cancer Res* 51: 6138–6141.
 30. Mulligan HD, Beck SA, Tisdale MJ (1992). Lipid metabolism in cancer cachexia. *Br J Cancer* 66: 57-61.
 31. Eden E, Edstrom S, Bennegard K, Scherstin T, Lundholm K (1984). Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished cancer patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. *Cancer Res* 44: 1718–1724.
 32. Holroyde CP, Gabuzda TG, Putnam RC, Paul P, Reichard GA (1975). Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. *Cancer Res* 35: 3710–3714.
 33. Shellock FG, Riedinger MS, and Fishbein MC (1986). Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol* 111: 82–85.
 34. Bing C, Brown M, King P, Collins P, Tisdale MJ, Williams G (2000). Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16- induced cancer cachexia. *Cancer Res* 60: 2405–2410.
 35. Collins P, Bing C, McCulloch P, Williams G (2002). Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans. *Br J Cancer* 86: 372–375.
 36. Shaw JH, Wolfe RR (1987). Fatty acid and glycerol kinetics in septic patients and in patients with gastrointestinal cancer. *Ann Surg* 205: 368–375.

37. Drott C, Persson H, Lundholm K (1989). Cardiovascular and metabolic response to adrenaline infusion in weight-losing patients with and without cancer. *Clin Physiol* 9: 427–439.
38. Thompson MP, Cooper ST, Parry BR, Tuckey JA (1993). Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1180: 236–242.
39. Emery PW, Edwards RH, Rennie MJ, Souhami RLI, Halliday D (1984). Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)* 289: 584–586.
40. Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Grieco G, Bonelli G, Pacelli F, Fanelli FR, Doglietto GB, Baccino FM (2003). Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann Surg* 237: 384–389.
41. Khal J, Hine AV, Fearon KCH, Dejong CHC, Tisdale MJ (2005). Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 2196-206.
42. Yıldırım T (2004). *Kanserli Çocuklarda Beslenme Durumunun Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, 2. Çocuk Kliniği, İstanbul.*
43. Işık G, Demirezen S, Beksac MS (2008). Tumor Nekroz Faktör ve Servikal Kanser Bağlantısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 1 (2): 55-61.
44. Falconer JS, Fearon KCH, Ross JA, Elton RE, Wigmore SJ, Garden OJ, Carter DC (1995). The acute phase response, weight loss and survival in pancreatic cancer. *Cancer* 75: 2077–2082.
45. Espat NJ, Aufferberg T, Rosenberg JJ, Rogy M, Martin RD, Fang CH, Hasselgren PO, Copeland EM, Moldawer LL (1996). Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: 185–190.
46. Barton BE, Murphy TF (2001). Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine* 16: 251–257.
47. Scagliotti GV, Gatti E, Ferrare G, Mutti L, Pozzi E (1995). TNF- α determination in serum and pleural effusion in patients with lung cancer. *Int J Oncol* 6: 147–151.

48. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitakoudis M, Bounovas A, Simppoulos K (2001). Serum levels of tumour necrosis factor- α and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 21: 1355–1358.
49. Maltoni M, Fabbri L, Nanni O, Scarpi E, Pezzi L, Flamini E, Rittobon A, Derni S, Pallotti G, Amadori D (1997). Serum levels of tumour necrosis factor and other cytokines do not correlate with weight loss and anorexia in cancer patients. *Support Care Cancer* 5: 130–135.
50. Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ, Fearon KCH (2000). Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br J Surg* 87: 53–58.
51. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfon MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivason S, Nelson N, Bolani N, Schooley KA, Gerthart M, Dais R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor- α from cells. *Nature* 385: 729-733.
52. Uniprot Consortium/License & Disclaimer (2002-2015). Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01375>. [Accessed 10 December 2012].
53. Uniprot Consortium/License & Disclaimer (2002-2015). Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06804>. [Accessed 10 December 2012].
54. Cawthorn WP, Sethi JK (2008). TNF α and adipocyte biology. *FEBS Letters* 582: 117-131.
55. Idriss HT, Naismith JH (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 50:184-195.
56. Camps C, Iranzo V, Bremnes RM, Sirera R (2006). Anorexia–Cachexia syndrome in cancer: Implications of the ubiquitin–proteasome pathway. *Support Care Cancer* 14: 1173–1183.
57. Tisdale MJ (2009) Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiol Rev* 89: 381–410.
58. Tisdale MJ (2005) Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. *Physiology* 20: 340-348.

59. Tracey KJ, Morgello S, Koplin B, Fahey FJ, Fox J, Aledo A, Manogue KR, Cerami A (1990). Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. *J. Clin Invest* 86:2014–2024.
60. Dinarello CA (1997). Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(4): 253 – 26.
61. Price SR, Olivecrona T, Pekala PH (1986). Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by cachectin. Further proof for identity with tumor necrosis factor. *Biochem J* 240: 601-604.
62. Uniprot Consortium/License & Disclaimer (2002-2015). Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05231>. [Accessed 10 December 2012].
63. Uniprot Consortium/License & Disclaimer (2002-2015). Electronic resources [online]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08505>. [Accessed 10 December 2012].
64. Ernst M, Jenkins BJ (2004). Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 20(1): 23-32.
65. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD (1997). Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6: 929-955.
66. Pederson BK, Febbraio MA (2008). Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379–1406.
67. Saka B (2011). Beslenme ve Kanser. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Dahiliye Bilim Dalı, İstanbul XXXVII. Ulusal Hematoloji Kongresi, 19-22 Ekim 2011.
68. Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ (1998). Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Res* 58: 2353–2355.
69. Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M (1996) Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* 379: 739–742.
70. Burgi W, Schmid K (1961). Preparation and Properties of Zinc-alpha-2 glycoprotein of normal human plasma. *J Biol C* 236 (4): 1066-1074.
71. Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden J (2001). Zinc alpha-2-Glycoprotein is Expressed by Malignant Prostatic Epithelium and May Serve as a Potential Serum Marker for Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 7: 846–853.

72. Huang C, Zhao JJ, Lv L, Chen Y, Li Y, Jiang S, Wang W, Pan K, Zheng Y, Zhao B, Wang D, Chen Y, Yang L, Zhou Z, Xia J (2013). Decreased Expression of AZGP1 Is Associated with Poor Prognosis in Primary Gastric Cancer. *Plos One* 8: 7 e69155
73. Mracek T, Stephens NA, Gao D, Bao Y, Ross JA, Ryden M, Arner P, Trayhurn P, Fearon KCH (2011). Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is Linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. *Br J Cancer* 104: 441–447.
74. Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ, Trayhurn P (2004). Zinc- α -2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor is expressed in adipocytes and is upregulated in mice with cancer cachexia. *PNAS* 101 (8): 2500-2505.
75. Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ (1998). Biological Evaluation of a Lipid-mobilizing Factor Isolated from the Urine of Cancer Patients. *Cancer Res* 58: 2359-2365.
76. Tisdale MJ (2003). Pathogenesis of Cancer Cachexia. *J Support Oncol* 1(3): 159-167.
77. Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisdale MJ (2004). Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1636: 59–68.
78. Sanders PM, Tisdale MJ (2004). Effect of zinc-2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue. *Cancer Lett* 212: 71–81.
79. Stewart GD, Lowrie AG, Riddick PA, Fearon KCH, Habib FK, Ross JA (2007). Dermcidin Expression Confers a Survival Advantage in Prostate Cancer Cells Subjected to Oxidative Stress or Hypoxia. *Prostate* 67: 1308-1317.
80. Cariuk P, Lorite MJ, Todorov PT, Field WN, Wigmore SJ, Tisdale MJ (1997). Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients. *Br J Cancer* 76(5): 606-613.
81. Lorite MJ, Cariuk P, and Tisdale MJ (1997). Induction of muscle protein degradation by a tumour factor. *Br J Cancer* 76: 1035–1040.
82. Wieland BM, Stewart GD, Skipworth RJE, Sangster K, Fearon KCH, Ross JA, Reiman TJ, Easaw J, Mourtzakis M, Kumar V, Pak BJ, Calder K, Filippatos G, Kremastinos DT, Palcic M, Baracos VE (2007). Is There a Human Homologue to the Murine Proteolysis- Inducing Factor? *Clin Cancer Res* 13(17): 4984-4992.

83. Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ (2004). Mechanism of the Attenuation of Proteolysis-Inducing Factor Stimulated Protein Degradation in Muscle by Hydroxy Methyl butyrate. *Cancer Res* 64: 8731–8735.
84. Lorite MJ, Smith HJ, Arnold JA, Morris A, Thompson MG, and Tisdale MJ (2001). Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). *Br J Cancer* 85: 297–302.
85. Le J, Vikeek J (1987). Tumor necrosis factor and interleukin1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56(3): 234-248.
86. Gema Frühbeck (2001). *Adipose Tissue Protocols. Overview of Adipose Tissue and Its Role in Obesity and Metabolic Disorders.* (Ed: Kaiping Yang). New Jersey, 1-22.
87. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arch Med Res* 39: 715-728.
88. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
89. Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11: 11-18.
90. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? *Dig Dis Sci* 54: 1847-1856.
91. Morrison RF, Farmer SR (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116-3121.
92. Nelson DL, Cox MM (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri.* 5th ed Çeviren:Elcin YM, Palme Yayıncılık., Ankara, 917.
93. Sell H, Deshaies Y, Richard D (2004). The Brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2098–2104.
94. Aydın S (2014). Three new players in enerji regulation: Preptin, adropin and irisin. *Peptides* 56: 94-110.
95. Bing C, Brown M, King P, Bing C, Brown M, King P, Collins P, Tisdale MJ, Williams G (2000). MAC16-induced Cancer Cachexia UCP1 and Skeletal Muscle UCP2 and UCP3 in Increased Gene Expression of Brown Fat Uncoupling Protein. *Cancer Res.* 60: 2405-2410.

96. Shellock GF, Riedinger SM, Fisbein CM (1986). Brown adipose tissue in cancer patients: Possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol* 111: 82-85
97. Liu C, Lin DC (2011). PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys* 43(4): 248-257.
98. Puigserver P, Wu Z, Won Park C, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92: 829–839.
99. Wallberg A, Yamamura S, Malik S, Spiegelman BM, Roeder RG (2003). Coordination of p300-Mediated Chromatin Remodeling and TRAP/Mediator Function Through Coactivator PGC-1. *Mol Cell* 12: 1137–1149.
100. Tiefenbo SK, Baltzer C, Egli AN, Frei C (2010). The Drosophila PGC-1 homologue Spargel coordinates mitochondrial activity to insulin Signalling. *EMBO J* 29: 171–183.
101. Andersson U, Scarpulla R (2001). PGC-1-Related Coactivator a Novel, Serum-Inducible Coactivator of Nuclear Respiratory Factor1-Dependent Transcription in Mammalian Cells. *Mol Cell Bio* 21(11): 3738–3749.
102. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A Cinti S, Lowell B, Scarpulla CR, Spiegelman BM (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115–124.
103. Knutti D, Kaul A, Krallia A (2000). Tissue-Specific Coactivator of Steroid Receptors, Identified in a Functional Genetic Screen. *Mol Cell Bio* 20(7): 2411–2422.
104. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Met* 1: 361-370.
105. Lin J, Wu P, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang C, Mootha V, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan M, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Lindsay MR, Zavacki AM, Cinti S, Shulman G, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM (2004). Defects in Adaptive Energy Metabolism with CNS-Linked Hyperactivity in PGC-1 Null Mice. *Cell* 119: 121–135.
106. Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, Gilbert ML, Morton GJ, Bammler TK, Strand AD, Cui L, Beyer RP, Easley CN, Smith AC,

- Krainc D, Luquet S, Sweet IR, Schwartz MW, LaSpada AR (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's Disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 4: 349–362.
107. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106(7): 847-856.
108. Huss JM, Kelly DP (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 115(3): 547-555.
109. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z (2005). Exercise stimulates PGC-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38MAPK pathway. *J Biol Chem* 280: 19587–19593.
110. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296: 349–352.
111. Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci* 99: 15983–15987.
112. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF (2002). Transcriptional coactivator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797–801.
113. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and Brown fat differentiation. *Cell Metab* 3: 333–341.
114. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J (2011). Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle—adipokines, myokines and adipose/ muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem* 117(2) 7: 47-56.
115. Wackerhage H, Niall MW (2002). Exercise-Induced Signal Transduction and Gene Regulation in skeletal muscle. *J Sports Sci Med* 1: 103-114.
116. Ferrer-Martínez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR (2002). Mouse PeP: a novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. *Dev Dyn* 224: 154–67.

117. Teufel A, Malik N, Mukhopadhyay M, Westphal H (2002). *Frcp1 and Frcp2, two novelfibronectin type III repeat containing genes. Gene* 297: 79–83.
118. Erickson HP (2013). *Irisin and FNDC5 in retrospect: an exercise hormone or a transmembrane receptor? Adipocyte* 2: 289–93.
119. Grimal P (1996). *The dictionary of classical mythology. Wiley-Blackwell, ISBN 978-0-631-20102-1*
120. Novelle MG, Contreras C, Romero-Pico A, Lopez M, Dieguez C (2013). *Irisin, Two Years Later. Int J Endocrinol Article ID 746281 Doi: 10.1155/746281.*
121. Vamvini MT, Aronis KN, Panagiotou G, Huh JY, Chamberland JP, Brinkoetter MT, Petrou M, Christophi CA, Kales SN, Christiani DV, Mantzoros CS (2013). *Irisin mRNA and circulating levels in relation to other myokines in healthy and morbidly obese humans. Eur J Endocrinol* 169: 829–34.
122. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Celik A, Yilmaz M, Kalaycı M, Sahin I, Gungor O, Gurel A, Ogeturk M, Dabak O (2013). *Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. Peptides* 52: 68–73.
123. Sanchis-Gomar F, Alis R, Pareja-Galeano H, Romagnoli M, Perez-Quilis C (2014). *Inconsistency in circulating irisin levels: what is really happening? Horm Metab Res* <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1363283> [in press].
124. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, Seoane LM, Casanueva FF, Pardo M (2013). *FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. Plos One* 8: e60563.
125. Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F (2012). *Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008–2010: the ENRICA study. Obes Rev* 13: 388–92.
126. Crujeiras AB, Pardo M, Arturo RR, Santiago NC, Zulet MA, Martínez JA, Casanueva FF (2014). *Longitudinal variation of circulating irisin after an energy restriction-induced weight loss and following weight regain in obese men and women. Am J Hum Biol* <http://dx.doi.org/10.1002/ajhb.22493> [in pres].
127. Park KH, Zaichenko L, Peter P, Davis CR, Crowell JA, Mantzoros CS (2014). *Diet quality is associated with circulating C-reactive protein but not irisin levels in humans. Metabolism* 63: 233–41.

128. Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Elbelt U, Kobelt P, Klapp BF (2013). Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity – correlation with body mass index. *Peptides* 39: 125–30.
129. Choi YK, Kim MK, Bae KH, Seo HA, Jeong JY, Lee WK, Kim JG, Lee IK, Park KG (2013). Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 100: 96-101.
130. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S (2013). Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus. *Peptides* 47: 66–70.
131. Sesti G, Andreozzi F, Fiorentino TV, Mannino GC, Sciacqua A, Marini MA, Perticone F (2014). High circulating irisin levels are associated with insulin resistance and vascular atherosclerosis in a cohort of nondiabetic adult subjects. *Acta Diabetol* 51(5): 705-13.
132. Huh JY, Dincer F, Mesfum E, Mantzoros CS (2014). Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans. *Int J Obes* 38(12): 1538-44.
133. Scalzo RL, Peltonen GL, Giordano GR, Binns SE, Klochak AL, Paris HL, Schweder MM, Szallar SE, Wood LM, Larson DG, Luckasen GJ, Hickey MS, Bell C (2014). Regulators of human white adipose browning: evidence for sympathetic control and sexual dimorphic responses to sprint interval training. *Plos One* 6: 9(6): e90696.
134. Komolka K, Albrecht E, Schering L, Brenmoehl J, Hoefflich A, Maak S (2014). Locus characterization and gene expression of bovine FNDC5: is the myokine irisin relevant in cattle? *Plos One* 9(1): e88060.
135. Rana KS, Arif M, Hill EJ, Aldred S, Nagel DA, Nevill A, Randeve HS, Bailey CJ, Belary S, Brown JE (2014). Plasma irisin levels predict telomere length in healthy adults. *Age (Dordr)* 36(2): 995-1001.
136. Tsubura A, Lai YC, Miki H, Sasaki T, Uehara N, Yuri T, Yoshizawa K (2011). Animal models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. *In vivo* 25(1): 11-22.
137. Arndt F (1943). Nitrosomethylurea, *Organic Syntheses, Coll. Vol. 2*, p.461

138. Çakmak O, Isleyen A, Usca A (2009). N-Nitrozo Bileşikleri ve Halk Sağlığına Etkileri. *TAF Prev Med Bull* 8(6): 521-526.
139. Kleihues P, Hodgson RM, Veit C, Schweinsberg F, Wiessler M (1983) DNA modification and repair in vivo: towards a biochemical basis of organ-specific carcinogenesis by methylating agents. *Organ and Species Specificity in Chemical Carcinogenesis*, New York, p. 509-529
140. Takayama S, Thorgeirsson UP, Adamson RH (2008). Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. *Proc Jpn Acad Ser* 84: 176-188.
141. Prater MR, Zimmerman KL, Ward DL, Holladay SD (2004). Reduced Birth Defects Caused by Maternal Immune Stimulation in Methyl nitrosourea-Exposed Mice: Association with Placental Improvement. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70: 862–869.
142. Ekambaram G, Rajendran P, Magesh V, Sakthisekaran D (2008). Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutr Res* 28(2): 106-12.
143. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E (2001). Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 175(2): 130-139.
144. Thirunavukkarasu C, Sakthisekaran D (2001). Effect of selenium on N-nitrosodiethylamine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants. *Cell Biochem Funct* 19(1): 27-35.
145. Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Shimizu N, Kobayashi K, Fukushima S, Tatematsu M (1998). N-Methyl-N-nitrosourea Concentration-dependent, Rather than Total Intake-dependent, Induction of Adenocarcinomas in the Glandular Stomach of BALB/c Mice. *Jpn J Cancer Res* 89: 385-391.
146. Yoshizawa N, Yamaguchi H, Yamamoto M, Shimizu N, Furihata C, Tatematsu M, Seto Y, Kaminishi M (2009). Gastric carcinogenesis by N-Methyl-N-Nitrosourea is enhanced in db/db diabetic mice. *Cancer Sci* 100: 1180-1185.
147. Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, Fukami H, Yuasa H, Tezuka N, Masui T and Nakanishi H (1993). Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-Methyl-N –Nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res* 84: 1258-1264.

148. Leaver DD, Swann PF, Magee PN (1968). The Induction of Tumours in the rat by a single oral dose of N-Nitrosomethylurea. *British Journal of Cancer* 23(1): 177-187.
149. Tatematsu M, Ogawa K, Hoshiya T, Shichino Y, Kato T, Imaida K, Nobuyuki T (1992). Induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice treated with N-Methyl-N-Nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 83: 915-918.
150. Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Shimizu N, Kobayashi K, Fukushima S, Tatematsu M (1998). N-Methyl-N-nitrosourea Concentration-dependent, Rather than Total Intake-dependent, Induction of Adenocarcinomas in the Glandular Stomach of BALB/c Mice. *Jpn J Cancer Res* 89: 385-391.
151. Kobayashi K, Inada K, Furihata C, Tsukamoto T, Ikehara Y, Yamamoto M, Tatematsu M (1999). Effects of low dose catechol on glandular stomach carcinogenesis in BALB/c mice initiated with N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett* 139: 167-172.
152. Butch AW, Pappas AA (1994). Tümör markers. *Tietz Textbook of Clinical Biochemistry* 2.Edition. Eds. Burtis CA & Ashwood ER, Saunders Company, USA; 483-500.
153. Chon DW, Sell S (1994). Tümör markers. *Tietz Textbook of Clinical Biochemistry* 2. Edition. Eds: Burtis CA & Ashwood ER. Saunders Company, USA; 483-500.
154. Göral V, Yeşilbağdan H, Kaplan A, Şit D, Çelik M (2006). Mide kanserinde yeni bir tümör markeri olan CA 72-4 ün yeri Türkiye Klinikleri. *J Med Sci* 26: 3-8.
155. Gold P, Shuter D, Freedman SO (1978). Carcinoembryonic antigen in clinical medicine. *Cancer* 42: 1399-1405.
156. Guadagni F, Roseli M, Amato T, Cosimeli M, Ferri P, Casale V, Carlini M, Santoro E, Cavaliere R, Greiner JW, Schlom J (1992). CA72-4 Measurement of Tumor-associated Glycoprotein 72 (TAG-72) as a Serum Marker in the Management of Gastric Carcinoma. *Cancer Res* 52: 1222-1227.
157. Marrelli D, Roviello F, DeStefano A, Farnetani M, Garosi L, Messano A, Pinto E (1999). Prognostic Significance of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 Preoperative Serum Levels in Gastric Carcinoma. *Oncology* 57(1): 55-62.
158. Byrne DJ, Browning MC, Cuschieri A (1990). CA 72-4: A new tumour marker for gastric cancer. *Br J Surg* 77: 1010-3.

159. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27 (2-3): 95-125.
160. Wilhelm J, Pingoud A (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 4(11): 1120-1128.
161. Telmann G, Geulen O (2006). Light cycler 480 real-time PCR system: Innovative solutions for relative quantification. *Biochem* 4: 16-18.
162. Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Ogiu T, Mitsumori K, Hayashi Y (1985). Organ-specific carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F344 and ACI/N rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 109: 178-182.
163. Lee YS, Jang J (1994). Potent promoting activity of dimethylitaconate on gastric carcinogenesis induced by N-methylnitrosourea. *Cancer Lett* 85(2): 177-184.
164. Tello S, Halifeoğlu İ, Bozkurt M, Bulmuş Ö (2008). Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda Isırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg* 22(4): 179 – 183
165. Kim K, Ka S, Moon W, Yi H, Lee Y, Kwon K, Park J, Park B (2008). Effect of dermcidin, an antimicrobial peptide, on body fat mobilization in normal mice. *J Endocrinol* 198: 111–118.
166. Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, Donelan W, Zhao Y, Yang LJ, Tang D (2014). Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* 63: 514–25.
167. Liu JJ Wong MD, Toy WC, Tan CS, Liu S, Ng XW, Tavintharan S, Sum CF, Lim SC (2013). Lower circulating irisin is associated with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 27: 365–369.
168. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F, Ricart W Manuel-Fernandez-Real J (2013). Irisin Is Expressed and Produced by Human Muscle and Adipose Tissue in Association With Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 98(4): E769-E778.
169. Polyzos SA, Kountouras J, Anastasilakis AD, Geladari EV, Mantzoros CS (2013). Irisin in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 63(2): 207

9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmanın Adı : "Deneysel Olarak Mide Kanseri Oluşturulan Farelerde *Irisin* Hormonu ve Bazı Kaşektik Faktörlerin Ekspresyonlarının İncelenmesi"
Çalışmacılar : Prof.Dr.E.Edip KEHA, Arş.Gör.Diler US, Doç.Dr.Ahmet ALVER, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Prof.Dr.Ümit ÇOBANOĞLU
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul Dosya No	Etik Kurul Toplantı Tarihi	Etik Kurul Toplantı No	Etik Kurul Karar No
2012/19	24.04.2012	2012/15	3

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında "Deneysel Olarak Mide Kanseri Oluşturulan Farelerde *Irisin* Hormonu ve Bazı Kaşektik Faktörlerin Ekspresyonlarının İncelenmesi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (24.04.2012)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Diler US ALTAY
Doğum Tarihi	24. 02.1983
Telefon	0 462 377 78 89-82
Medeni Hali	Evli
E-posta	surelid@hotmail.com
Adres	KTU SABE, Tıbbi Biyokimya AD, Trabzon

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2000-2005
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2007-2009
Doktora	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2009- 2015

Görev, Unvan	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	KTU, SABE, Tıbbi Biyokimya AD	2009-2015

Yabancı Dil: İngilizce

Uzmanlık Alanı: Real Time PCR, Hayvan Çalışmaları, Mide Kanseri, Oksidan-Antioksidan Sistemler

YAYINLAR

1. Mentese A, Fidan E, Sumer AU, Karahan SC, Sonmez M, **Altay DU**, Kavgaci H, Alver A (2012). Is SCUBE 1 a new biomarker for gastric cancer? *Cancer Biomark* 11(5): 191-5.
2. Karaguzel E, Sivrikaya A, Mentese A, Yulug E, Turkmen S, Kutlu O, Gule Y, **Us D**, Turedi S, Alver A, Kazaz IO (2014). Investigation of tyrphostin AG556 for testicular torsion-induced ischemia reperfusion injury in rat. *Journal of Pediatric Urology* 10(2): 223-229.
3. Alver A, Mentese A, Mentese U, Sumer A, Ucar F, **Us Altay D** (2014). A Study of Anti-Carbonic Anhydrase Antibodies and Ghrelin in End Stage Renal Disease Patients. *Medical Principles and Practice* 23(4): 331-5.
4. Mentese A, Erkut N, Sumer A, **Us Altay D**, Alver A, Sonmez M (2014). Anti-carbonic anhydrase antibodies in iron deficiency anemia. *Hematology* doi.org/10.1179/1607845414Y.0000000204
5. Kertmen H, Güner B, Hasanbasoglu A, Mentese A, Yilmaz ER, Uzun O, **Us Altay D**, Arikok AT, Sekerci Z, Turedi S (2014). Ischemia Modified Albumin Levels in Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury: an Experimental Study. *Journal of Neurological Science [Turk]* 31(1): 115-125.
6. Vanizor Kural B, Alver A, Canpolat S, Kahraman C, **Us Altay D**, Kara H, Akcan B (2014). The Effects of high fat diets with and without N-Acetylcysteine supplementation on the lipin-1 levels of serum and various tissues in rats. *Turk J Biochem* 39(1): 19-24
7. **Us Altay D**, Keha EE, Alver A (2015). *In vitro* Effect of Ciprofibrate on Human Carbonic Anhydrase II and Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase Activities. *Turk J Biochem* 40(2): 111-115.
8. Ozkan G, Ulusoy S, Mentese A, Guvercin B, Karahan SC, Yavuz A, **Us Altay D**, Ocal M (2015). Can Galectin-3 be a novel marker in determining cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.003>
9. Turedi S, Tatli O, Alver A, Karaguzel E, Karaca Y, Yulug E, Sumer A, **Us Altay D**, Mentese A (2015). "The diagnostic value of plasma SCUBE1, a novel biomarker of platelet activation, in testicular torsion: A randomized, controlled, experimental study 10.1016/j.urology.2015.05.014

10. Ozturk Topcu T, Kavgaci H, Canyilmaz E, Orem A, Yaman H, **Us D**, Ozdemir F, Aydin F (2015) "The effect of adjuvant chemotherapy on plasma TAT and F 1+2 levels in patients with breast cancer" Biomed Pharmacother, doi: 10.1016/j.biopha.2015.05.003. Epub 2015 May 28. 2015 Jul;73:19-23.

11. Ulusoy S, Ozkan G, Mentese A, Guvercin B, Karahan S.C, Yavuz A, **Us Altay D** "A new predictor of mortality in hemodialysis patients; Tenascin-C" Life Sci, 2015 Sep 18. pii: S0024-3205(15)30014-X. doi: 10.1016/j.lfs.2015.09.011. [Epub ahead of print]

12. Erem C, Civan N, Coskun H, Mentese A, Karacin Suleyman A, **Us Altay D**, Akgul Z, Deger O Signal Peptide-CUB-EGF domain-containing protein 1 (SCUBE1) levels in patients with subclinical and overt hypothyroidism: effects of treatment. Clin Endocrinol (Oxf) 2015 Sep 28. doi: 10.1111/cen.12955. [Epub ahead of print]

BİLDİRİLER

1. **Us D**, Topal M, Keha E.E, Alver A "Siprofibratın İnsan Karbonik Anhidraz II Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin *In Vitro* İncelenmesi" P040, pp:167, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 29 Kasım- 2 Aralık 2011.

2. Mentese A, Fidan E, Uzun Sümer A, Karahan S.C, Sönmez M, **Us Altay D**, Kavgacı H, Alver A "SCUBE-1 Mide Kanserinde Yeni Bir Biyomarker Mı?", P122, pp:262, 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, Eylül (2012).

3. **Us Altay D**, Topal M, Keha E.E, Alver A "Siprofibratın İnsan Glukoz-6 Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin *In Vitro* İncelenmesi", P230, 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, Eylül (2012).

4. Özbaş H.M, Mentese A, **Us Altay D**, Sönmez M "Hemofilide Sekonder Profilaksi İskemi Nedeni Olabilir Mi?" Abstract:0324, pp:64, 39. Ulusal Hematoloji Kongresi & 8. Balkan Day of Hematology, Antalya, Ekim (2013).

5. Sonmez M, Ozbas H.M, Mentese A, **Us Altay D** "Can Secondary Prophylaxis in Haemophilia be a cause of Ischemia?" 19th Congress of European Hematology, 31. Bleeding disorders P617, 12-15 June 2014, Milan, Italy

- 6. Us Altay D**, Keha E.E, Alver A, Karaguzel E, Mentese A, Fidan E ‘The Diagnostic Value of FNDC5/Irisin in renal and gastric cancer’ Clin Chem Lab Med, Cancer and Tumor markers, S-477 pp:287, IFCC World Lab, 22-26 June 2014, Istanbul, Turkey.
- 7.** Turkmen, O. Fazlı, Y. Karaca, A. MenteSe, S. Demir, E.Yulug, **D. Us Altay**, G.D. Reis Kose, A. Gunduz, S. Turedi “Elektrik yanıkları sonucu oluşan hasarın derecesinin belirlenmesinde Signal Peptid CUB-EGF Domain Containing Protein-1 (SCUBE1) serum duzeylerinin incelenmesi” SS-101, 11. Ulusal Acil Tıp Kongresi & 2. International Critical Care and Emergency Medicine Congress, Antalya, Nisan (2015).
- 8.** Ulusoy, G. Ozkan, A.Mentese, B. Guvercin, C.S. Karahan, A. Yavuz, **D.Us Altay** ‘A New Predictor of Mortality in Hemodialysis Patients; Tenascin C’ Nephrology Dialysis Transplantation 30 (Supplement 3):iii276-iii291, 52nd ERA-EDTA Congress, London 28-31 May 2015.