



**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI  
BESLENME VE DİYETETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BİR KEMOTERAPİ AJANI OLAN PAKLİTAKSELİN  
KANSER KAŞEKSİSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO*  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Özlem AĞIREL**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Ceyda OKUDU**

**Şubat 2022**

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI  
BESLENME VE DİYETETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BİR KEMOTERAPİ AJANI OLAN PAKLİTAKSELİN  
KANSER KAŞEKSİSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO*  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Özlem AĞİREL**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Ceyda OKUDU**

**Şubat 2022**

## EK 4: Tez Onay (Kabul) Tutanağı

### LİSANSÜSTÜ EğİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜğÜ'NE

Beslenme ve Diyetetik Anabilim/Anasanat Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Özlem AğIREL tarafından hazırlanan "*Bir Kemoterapi Ajantı Olan Paklitakselin Kanser Kaşeksisi Üzerine Etkisinin İn Vitro Araştırılması*" konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/02/2022

Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu:

İmzası

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ceyda OKUDU  
Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Nuray Esra AKSAKAL  
Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Nihan ÇAKIR BİÇER  
İstanbul Kültür Üniversitesi

Bu tez yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hatice YORULMAZ  
Vekil Müdür

## EK 5: İntihal Raporu

### BİR KEMOTERAPİ AJANI OLAN PAKLİTAKSELİN KANSER KAŞEKSİSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>11</b>	% <b>9</b>	% <b>3</b>	% <b>5</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% <b>2</b>
<b>2</b>	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	www.doktortakvimi.com İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	ichastaliklaridergisi.org İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	www.uzmandoktor.net İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	acikerisim.baskent.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	dspace.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	9lib.net İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

Submitted to Suleyman Demirel University

02/02/2022

### **TEZ ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bir Kemoterapi Ajanı Olan Paklitakselin Kanser Kaşeksisi Üzerine Etkisinin *in vitro* Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ceyda Okudu'nun sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Özlem AĞIREL

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında maddi ve manevi tüm desteğiyle yanımda olan, kıymetli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hoşgörü ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, ufkumu genişleterek mesleğime bakış açımı değiştiren sevgili danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ceyda OKUDU'ya,

Tez çalışma dönemimde bana her türlü laboratuvar imkanını sağlayan Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ'ye,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü desteği ile yanımda olan Teknik Uzman Beyza YILMAZ'a,

Tez çalışmam sırasında pozitif enerjilerini ve yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum laboratuvar arkadaşlarım ve kıymetli meslektaşlarım Ebru DEMİR, Ömer Faruk ÇEKİLMİŞ ve Demet BALDIZ'a,

Sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, varlığıyla bana dosttan çok kardeş olan, her anımı onunla paylaşmaktan mutluluk duyduğum, canım arkadaşım Elif KELEŞ'e,

Hayatları boyunca benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, sevgileri ve destekleriyle beni bugünlere getiren annem Vildan AĞIREL ve babam Alaattin AĞIREL'e,

Varlıklarından her zaman güç aldığım canım kardeşlerim Özgür AĞIREL, Özcan AĞIREL ve Özkan AĞIREL'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2022

Özlem AĞIREL

## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ETİK BEYANI</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>SEMBOLLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1.Kaşeksi .....	<b>3</b>
2.1.1.Kaşeksinin Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2.Kaşeksinin Etiyolojisi .....	4
2.1.3.Kaşeksi Tanısı ve Sınıflandırılması .....	5
2.1.4.Kaşeksi Patogenezi .....	7
2.1.5.Kaşeksi Tedavisi .....	8
2.1.6.Kaşekside Beslenme .....	<b>9</b>
2.1.7.Antikanser Tedaviler ve Kaşeksiye Etkileri .....	11
2.1.8.Kaşekside Vücut Kompozisyonu Değişiklikleri .....	13
2.1.8.1.Kaşekside Adipoz Doku Kaybı .....	13
2.1.8.2.Kaşekside Kas Kütlesi Kaybı .....	15
2.2.Adipoz Doku .....	<b>16</b>
2.2.1.Adipoz Doku Türleri .....	17
2.2.1.1.Beyaz Adipoz Doku .....	17
2.2.1.2.Kahverengi Adipoz Doku .....	18
2.2.1.3.Bej Adipoz Doku .....	19
2.2.2.Adipogenez .....	22
2.2.2.1.Kanser Kaşeksisinde Adipogenezin Bozulması .....	24
2.3.Çinko- $\alpha$ 2-Glikoprotein (ZAG) .....	<b>25</b>
2.3.1.ZAG'ın Lipit Metabolizmasındaki Rolü .....	26
2.3.2.ZAG'ın Glukoz Metabolizmasındaki Rolü .....	27
2.3.3.ZAG'ın Kanser Kaşeksisindeki Rolü .....	28
2.4.Paklitaksel .....	<b>31</b>

<b>3.GEREC</b> .....	<b>33</b>
3.1.Kimyasallar ve Çözeltiler .....	33
3.2.Kullanılan Cihazlar.....	34
3.3.Kitler.....	35
3.4.Sarf Malzemeleri .....	35
3.5.Real Time PCR Primerleri .....	36
<b>4. YÖNTEM</b> .....	<b>38</b>
4.1.Hücre Hatlarının Belirlenmesi.....	38
4.2.Hücrelerin Çözdürülmesi .....	38
4.3.Hücrelerin Büyütülmesi .....	38
4.4.Hücrelerin Pasajlanması .....	38
4.5.Hücrelerin Sayımı.....	39
4.6.Hücrelerin Dondurulması .....	39
4.7.Paklitaksel Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	40
4.8.Hücrelerin Farklılaştırılması.....	41
4.9.Oil Red O Boyama Yöntemi .....	42
4.9.1.Oil Red O Çözeltilerin Hazırlanması.....	42
4.9.2.Oil Red O Boyama Protokolü.....	42
4.10.Gen İfade Analizi .....	43
4.10.1.Total RNA İzolasyonu.....	43
4.10.2.İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini.....	45
4.10.3.cDNA Sentezi .....	45
4.10.4.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	46
4.11.Verilerin İstatistiksel Analizi.....	48
<b>5.BULGULAR</b> .....	<b>49</b>
5.1. Öncü Adipositlerin Olgun Adipositlere Farklılaşması .....	49
5.2.Paklitakselin Adipogenez Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi .....	50
5.3.Adipogenez Sürecinde Paklitakselin Gen İfadesi Değişimlerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	53
5.3.1.Adipogenez Sürecinde Paklitakselin AZGP1 Gen İfadesi Değişimine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	54
5.3.2.Adipogenez Sürecinde Paklitakselin PPAR $\gamma$ Gen İfadesi Değişimine Olan Etkisinin Belirlenmesi .....	55
<b>6.TARTIŞMA</b> .....	<b>56</b>
<b>7.SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>60</b>
<b>8.KAYNAKLAR</b> .....	<b>62</b>
<b>9.ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>78</b>

## KISALTMALAR

<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>AZGP1</b>	: $\alpha$ -2 zinc glycoprotein 1, zinc-binding
<b>BAD</b>	: Beyaz adipoz doku
<b>BB</b>	: Büyüme Besiyeri (Growth Medium)
<b>BİA</b>	: Biyoelektrik empedans
<b>BKİ</b>	: Beden Kitle İndeksi
<b>BMP7</b>	: Kemik Morfogenetik Protein 7 (Bone morphogenetic protein 7)
<b>C/EBP</b>	: CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein ailesi (CCAAT/enhancer binding protein family)
<b>CHOP</b>	: C/EBP homolog protein
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate)
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>CREB</b>	: Siklik AMP Tepki Elemanı Bağlayıcı Protein (cAMP Response Element Binding Protein)
<b>Ct</b>	: Eşik Değeri Döngüsü (Cycle Threshold)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	: Double Distile Su
<b>DEXA</b>	: Dual Enerji X-Ray Absorpsiyometrisi
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>dNTP</b>	: Dinükleotittrifosfatlar
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>FBS</b>	: Fetal Bovin Serum
<b>FGF21</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (Fibroblast Growth Factor 21)
<b>FB</b>	: Farklılaşma Besiyeri (Differentiation Medium)
<b>Fsp27</b>	: Yağ Özgü Protein 27 (Fat-Specific Protein 27)
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
<b>GLUT</b>	: Glukoz Taşıyıcı (Glucose Transporter)
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 $\beta$ (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )
<b>hASC</b>	: İnsan Adiposit Kök Hücresi (Human Adipocyte Stem Cell)
<b>Hoxc8</b>	: Homeobox Geni

<b>HSL</b>	: Hormana Duyarlı Lipaz (Hormone Sensitive Lipase)
<b>IGF-1</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (İnsülin Like Growth Factor-1)
<b>IL-1</b>	: İnterlökin-1
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>KAD</b>	: Kahverengi Adipoz Doku
<b>KOAH</b>	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
<b>LMF</b>	: Lipit Mobilize Edici Faktör (Lipid-Mobilising Factor)
<b>LPL</b>	: Lipoprotein Lipaz
<b>LLC</b>	: Lewis Akciğer Kanseri Hücresi (Lewis Lung Carcinoma Cell)
<b>MAPK</b>	: Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
<b>MHC-I</b>	: Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi I (Major Histo-compatibility Complex)
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>NF-κB</b>	: Nükleer Faktör κB
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>μL</b>	: Mikrolitre
<b>PDRM16</b>	: PR domaini içeren protein 16 (PR domain containing 16)
<b>PGC-1α</b>	: Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör-γ Koaktivatör-1α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1-α)
<b>PIF</b>	: Proteoliz İndükleyici Faktör (Proteolysis Inducing Factor)
<b>PKA</b>	: Protein Kinaz A
<b>PPARγ</b>	: Peroksizom Proliferatörü ile Aktive Olan Reseptör γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)
<b>PTHRP</b>	: Paratiroid hormonu ile ilişkili protein (Parathyroid hormone-related protein)
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RPM</b>	: dakikadaki devir sayısı (Revolutions per Minute)
<b>RT-PCR</b>	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)
<b>SGBS</b>	: Simpson-Golabi-Behmel Sendromu
<b>TGF-β</b>	: Transforme Edici Büyüme Faktörü β (Transforming Growth Factor β)
<b>TNF-α</b>	: Tümör Nekroz Faktörü-α
<b>UCP</b>	: Ayırıcı Protein (Uncoupling Protein)
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
<b>ZAG</b>	: Çinko-α-2-Glikoprotein (Zinc-α-2-glycoprotein)

## SEMBOLLER

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°</b>	: Derece
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b><math>\gamma</math></b>	: Gamma
<b>g</b>	: Yerçekimi kuvveti



## ŞEKİLLER

### Sayfa No

<b>Şekil 2.1.</b> Kanser Kaşeksisinin Klinik Evreleri .....	7
<b>Şekil 2.2.</b> Adipoz Dokunun Vücutta Dağılımı.....	17
<b>Şekil 2.3.</b> Kahverengi Adipoz Dokuda UCP-1 Aracılığıyla Mitokonriyal Isı Üretimi .....	19
<b>Şekil 2.4.</b> Adipogenez Evreleri ve Adipogenezde Etkili Olan Transkripsiyon Faktörleri.....	22
<b>Şekil 2.5.</b> Öncü Adipositlerin Farklılaşarak Olgun Adipositlere Dönüşmesi .....	24
<b>Şekil 2.6.</b> ZAG'ın Kromozom Üzerindeki Konumu.....	25
<b>Şekil 2.7.</b> Kaşeksi Durumunda Tümör, Beyaz Adipoz Doku, Kahverengi Adipoz Doku, İskelet Kası ve Karaciğer Arasındaki Etkileşim .....	30
<b>Şekil 2.8.</b> Paklitakselin Kimyasal Yapısı.....	31
<b>Şekil 5.1.</b> Konfluente Olmuş Öncü Adipositlerin Farklılaştırma Deneyi Öncesinde Çekilmiş Görüntüleri.....	49
<b>Şekil 5.2.</b> Kontrol Grubu Öncü Adipositlerin Farklılaşma Aşamaları .....	50
<b>Şekil 5.3.</b> Paklitakselin Adipogenez Üzerindeki Etki.....	51
<b>Şekil 5.4.</b> Paklitaksel Verilen Öncü Adipositlerin Farklılaşması .....	53
<b>Şekil 5.5.</b> Öncü Adipositlerde Farklılaşma Sonucu AZGP1 Geninin İfade Seviyelerinin Analizi.....	54
<b>Şekil 5.6.</b> Öncü Adipositlerde Farklılaşma Sonucu PPAR $\gamma$ Geninin İfade Seviyelerinin Analizi.....	55

## ÇİZELGELER

### Sayfa No

Çizelge 2.1. Kanser Tipine Göre Kilo Kaybı Sıklığı.....	4
Çizelge 2.2. Açlık ve Kanser Kaşeksisinde Metabolik Etkilerin Karşılaştırılması .....	8
Çizelge 3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar .....	33
Çizelge 3.2. Kullanılan Cihazlar. Cihazlar Marka ve Modelleri .....	34
Çizelge 3.3. Kullanılan Kitler .....	35
Çizelge 3.4. Sarf Malzemeleri .....	35
Çizelge 3.5. Real Time PCR’da Kullanılan Primer ve Dizileri .....	37
Çizelge 4.1. Dondurma Besi Yerinin İçeriği .....	40
Çizelge 4.2. Paklitaksel Konsantasyonlarının Hazırlanışı ve Karışım Miktarı .....	40
Çizelge 4.3. Öncü Adiposit Farklılaştırma Deneyi Aşamaları .....	41
Çizelge 4.4. Elde Edilen RNA Konsantrasyonları.....	45
Çizelge 4.5. RNA Örneklerinin Ters Transkriptaz PCR İşlemine Hazırlanması .....	46
Çizelge 4.6. cDNA Sentezi için Uygulanan PCR Koşulları .....	46
Çizelge 4.7. AZGP1 ve PPAR $\gamma$ ’nın Gen Ekspresyon Seviyesi Ölçümü İçin Kullanılan PCR Bileşenleri .....	47
Çizelge 4.8. AZGP1 ve PPAR $\gamma$ ’nın Gen İfadesi Ölçümü için RT-PCR Koşulları....	48
Çizelge 5.1. Farklı Zaman Dilimlerinde Verilen Paklitakselin Adipogenez Üzerindeki Etkisi.....	52

## BİR KEMOTERAPİ AJANI OLAN PAKLİTAKSELİN KANSER KAŞEKSİSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

### ÖZET

Kaşeksi; geleneksel beslenme desteği ile tamamen geri döndürülemeyen, ilerleyici fonksiyonel bozukluklara yol açan, iskelet kası ve adipoz doku kaybı ile karakterize edilen çok faktörlü bir sendromdur. Kaşeksinin potansiyel biyobelirteçlerinden olan ve AZGP1 (Alpha-2-Glycoprotein 1, Zinc-Binding) geni tarafından kodlanan çinko- $\alpha$ 2-glikoprotein (ZAG), adipoz dokuda lipit sentezini düzenleyici bir faktör olarak tanımlanmıştır. Adipoz doku, öncü adipositlerin PPAR $\gamma$  ve C/EBP $\alpha$  gibi transkripsiyon faktörlerinin etkisi ile olgun adipositlere dönüştüğü adipogenez süreci sonucunda oluşmaktadır. AZGP1'in, bu transkripsiyon faktörlerini baskılayarak adipogenez ve lipit birikimini engellediği bildirilmiştir. Bununla birlikte AZGP1'in, beyaz adipositlerin kahverengi adipositlere dönüşümünü tetiklediği ve kaşekside yağ katabolizmasını artırarak adipoz doku kaybına katkı sağlayabileceği bildirilmiştir. Kemoterapi spesifik tedavi hasarı oluşturmasının yanı sıra, beslenme ve metabolik durum değişikliklerine neden olarak kaşeksiye doğrudan veya dolaylı olarak katkı sağlayabilir. Paklitaksel birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Bu çalışmada, paklitakselin kanser kaşeksi üzerindeki etkisi, lipit birikimi ve kaşeksi ilişkili AZGP1 geni ifadenmesi yoluyla araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, insan öncü adiposit hücreleri 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> şartlarında ticari olarak satın alınan öncü adiposit büyüme besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür tabaklarına 10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve farklılaşmanın tamamlanma süreci olan 15 gün boyunca 3 gün ara ile 50 nM paklitaksel + farklılaşma besiyeri uygulanmıştır. Uygulama zaman bağımlı olarak 0.gün, 3.gün, 6.gün, 9.gün ve 12.gün paklitaksel + farklılaşma besiyeri şeklinde yapılmıştır. 15. günün sonunda hücrelere lipit birikiminin tespiti için Oil Red O boyama ve gen ifade analizi için total RNA izolasyonu yapılmıştır. Adipogenez sürecinde zaman bağımlı olarak uygulanan paklitakselin AZGP1 gen ifadesine etkisi RT-PCR ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, adipogenez sürecinde verilen paklitakselin, insan öncü adipositlerinde farklılaşmayı ve lipit birikimini baskıladığı (p<0.01) tespit edilmiştir. Gen ifade analizi sonucunda AZGP1; 0.gün, 6.gün, 9.gün ve 12.gün sırasıyla 0.42, 0.44, 0.5 ve 0.36 kat daha az ifadenme göstermiş ancak 3.günde AZGP1 ifadenmesinde bir değişim olmamıştır (p>0.05). PPAR $\gamma$  gen ifadesi 0.gün, 3.gün ve 6.gün sırasıyla 0.03 (p<0.05), 0.65 ve 0.9 kat daha az ifadenme göstermiş ancak 9.gün ve 12.günde sırasıyla 2.29 (p=0.015) ve 3.99 (p=0.003) kat daha fazla ifadenme gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, paklitakselin lipit birikimi baskılayarak kanser kaşeksinde adipoz doku kaybına katkı sağlayabileceği ancak bu süreçte kaşeksi ilişkili AZGP1 ve adipogenez ilişkili PPAR $\gamma$  gen ifade düzeylerinde gösterdiği değişimin daha fazla çalışma ile analiz edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Adipogenez, AZGP1, Kaşeksi, Paklitaksel.

## ***IN VITRO* INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PACLITAXEL, A CHEMOTHERAPY AGENT, ON CANCER CACHEXIA**

### **ABSTRACT**

Cachexia, is a multifactorial syndrome characterized by loss of skeletal muscle and adipose tissue, leading to progressive functional disorders that cannot be completely reversed by conventional nutritional support. Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG), one of the potential biomarkers of cachexia and encoded by the AZGP1 (Alpha-2-Glycoprotein 1, Zinc-Binding) gene, has been identified as a lipid mobilizing factor in adipose tissue. Adipose tissue is formed as a result of the adipogenesis period in which preadipocytes transform into mature adipocytes with the effect of transcription factors such as PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . It has been reported that AZGP1 inhibits adipogenesis and lipid accumulation by suppressing these transcription factors. However, it has been reported that AZGP1 triggers the conversion of white adipocytes to brown adipocytes and may contribute to adipose tissue loss by increasing fat catabolism in cachexia. Chemotherapy may contribute directly or indirectly to cachexia by causing nutritional and metabolic status changes as well as causing specific treatment damage. Paclitaxel is a chemotherapeutic agent frequently used in the treatment of many types of cancer. In this study, it was aimed to investigate the effect of paclitaxel on cancer cachexia through lipid accumulation and cachexia-related AZGP1 gene expression. In the study, human preadipocyte cells were grown in commercially purchased preadipocyte growth medium at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Proliferating cells were seeded in 12-well cell culture dishes at 105 cells/well, and 50 nM paclitaxel + differentiation medium was applied at 3-day intervals for 15 days, which is the completion of differentiation. The application was made as paclitaxel + differentiation medium on day 0, day 3, day 6, day 9 and day 12 depending on time. At the end of the 15th day, Oil Red O staining was performed to detect lipid accumulation in the cells and total RNA was isolated for gene expression analysis. The effect of time-dependent paclitaxel on AZGP1 gene expression during adipogenesis was analyzed by RT-PCR. As a result of the study, it was determined that paclitaxel given during the adipogenesis process suppressed differentiation and lipid accumulation in human preadipocytes ( $p < 0.01$ ). As a result of gene expression analysis, AZGP1; Day 0, day 6, day 9 and day 12 showed 0.42, 0.44, 0.5 and 0.36 times less expression, respectively, but there was no change in AZGP1 expression on the 3rd day ( $p > 0.05$ ). PPAR $\gamma$  gene expression was 0.03 ( $p < 0.05$ ), 0.65, and 0.9-fold lower on day 0, day 3, and day 6, respectively, but 2.29 ( $p = 0.015$ ) and 3.99 ( $p = 0.05$ ) at day 9 and 12, respectively. It was determined that 0.003) times more expression. As a result, it was determined that paclitaxel may contribute to adipose tissue loss in cancer cachexia by suppressing lipid accumulation, but the change in cachexia-related AZGP1 and adipogenesis-related PPAR $\gamma$  gene expression levels in this process should be analyzed with further studies.

**Keywords:** *Adipogenesis, AZGP1, Cachexia, Paclitaxel.*

## 1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyada ve ülkemizde gittikçe artan bir hastalıktır (Bar-Sela et al, 2019). Kanser sıklıkla görülen komplikasyonlarından biri olan kanser kaşeksi, geleneksel beslenme desteği ile geri döndürülemeyen ve ilerleyici fonksiyonel bozukluğa yol açan çok faktörlü bir sendromdur (Fearon et al, 2011). Devam eden iskelet kası ve adipoz doku kaybı ile karakterize edilmektedir (Ni and Zhang, 2020). Kaşeksi, hastanın performans durumunu ve yaşam kalitesini bozarak antikanser tedavinin etkinliğini ve sağkalımı azaltan bir komplikasyondur (Muliawati et al, 2012). Kanser tedavisinde sıklıkla tercih edilen tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, kanser hastalarında beslenme ve metabolik durum değişikliklerine neden olarak kaşeksiye doğrudan veya dolaylı olarak katkı sağlayabilmektedir (Laviano et al, 2011). Kemoterapik ajanların doğrudan kaşeksiye neden olduğu tam olarak kesin olmamakla birlikte paklitaksel gibi taksan türevi kemoterapi ajanlarının, tümör taşıyan farelerde ise uzun süreli kilo kaybına neden olduğu ve paklitakselin mürin hücrelerinde kaşektik sitokinlerin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Tohgo et al, 2002; Fujimoto-Ouchi et al, 2007).

Kaşeksinin muhtemel biyobelirteçlerinden olduğu düşünülen ve AZGP1 (Alpha-2-Glycoprotein 1, Zinc-Binding) geni tarafından kodlanan çinko- $\alpha$ 2-glikoprotein (ZAG)'ın, adipoz dokuda lipit mobilize edici bir faktör olduğu bildirilmiştir (Porporato et al, 2016). AZGP1 geninin, adipoz dokunun oluşmasında ve öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaşma süreci olan adipogenezde yer alan PPAR $\gamma$  ve C/EBP $\alpha$  gibi transkripsiyon faktörlerini baskıladığı gösterilmiştir (Xiao et al, 2017). Ayrıca AZGP'in beyaz adipositlerin kahverengi adipositlere dönüşümünde etkili olarak yağ metabolizmasını arttırdığı ve bu sayede kaşekside adipoz doku kaybına neden olabileceği belirtilmiştir (Elattar et al, 2017). Bu durumun tümörden mi yoksa tümör-konak etkileşiminden mi kaynaklandığı tam olarak açık değildir ancak yapılan çalışmalarda, Lewis akciğer karsinomu hücrelerinin ortak kültürünün, lipit damlacık hacmi azalmasını tetikleyerek 3T3-L1 fare öncü adipositlerinde *in vitro* adipogenezini bozduğunu ve adipojenik genlerde aşağı regülasyona neden olduğu

bildirilmiştir (Lopes et al, 2018). Bu nedenle, adiposit öncesi farklılaşmada yer alan genlerin aşağı regülasyonunda yer alan faktörler, kaşektik yağ dokusunda meydana gelen metabolik ve fonksiyonel değişikliklerde anahtar rol oynayabilir (Manelli et al, 2020).

Bu çalışmada, adipogenez sürecinin farklı zaman dilimlerinde uygulanan paklitakselin kaşeksi üzerindeki etkisi, lipit birikimi ve kaşeksi ilişkili AZGP1 geni ifadenmesi yoluyla araştırılması amaçlanmıştır ve bu doğrultuda aşağıdaki hipotezler kurulmuştur.

- H1: Paklitaksel, öncü adiposit hücrelerinde lipit birikimini ve adipogenezi baskılar.
- H0: Paklitaksel, öncü adiposit hücrelerinde lipit birikimini ve adipogenezi baskılamaz.
- H1: Paklitaksel, kaşeksi ilişkili AZGP1 gen ifadesini değiştirerek kaşeksiye neden olur.
- H0: Paklitaksel, kaşeksi ilişkili AZGP1 gen ifadesini değiştirerek kaşeksiye neden olmaz.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kaşeksi**

Kaşeksi, Yunanca "kakos (kötü)" ve "hexis (durum)" sözcüklerinin birleşmesi ile oluşmuş bir terim olup "kötü fiziksel durum" anlamına gelmektedir (Ni and Zhang, 2020). Geleneksel beslenme desteği ile tamamen geri döndürülemeyen ve ilerleyici fonksiyonel bozukluğa yol açan, devam eden iskelet kası kütlesi kaybı ve yağ kütlesi kaybı ile karakterize edilen çok faktörlü bir sendromdur (Fearon et al, 2011; Bar-Sela et al, 2019). Farklı doku ve organları etkileyen karmaşık bir sistemik hastalıktır (Peixoto da Silva, 2020). İlerlemiş kanser, KOAH, AIDS ve tüberküloz dahil kronik enfeksiyon, kronik kalp yetmezliği ve romatoid artrit gibi hastalıklarda ortaya çıkmaktadır (Ohnuma et al, 2021). Kanserde kaşeksi, kilo kaybı (en az %5), kas ve yağ dokusu kaybı ve sıklıkla anoreksi ile ilişkili iltihaplanma ile karakterize bir çoklu organ sendromudur. Kanser kaşeksi performans durumunu düşürür, yaşam kalitesini bozar, antikanser tedavisinin toksisitesini artırır, tedaviye yanıtı azaltır ve sağkalımı azaltır (Muliawati et al, 2012).

#### **2.1.1. Kaşeksinin Epidemiyolojisi**

Kanser teşhisi sırasında hastaların %13-55'inde iştahsızlık saptanmıştır ve ölümcül kanser vakalarında görülme sıklığı yaklaşık %65'tir. Teşhisten sonraki kilo kaybı insidansı tümörün bölgesi, tümörün evresi, histolojik yapısı ve agresifliği ile uygulanan kanser tedavileriyle yakından ilişkidir (Muliawati et al, 2012).

Hodgkin lenfoma, akut lenfositik olmayan lösemninin daha az agresif formlarında ve meme kanserinde kilo kaybı sıklığı %30-40'tır. Non-Hodgkin lenfoma, kolon kanseri ve diğer kanserlerin daha agresif formları, %50-60 arasında bir kilo kaybı sıklığı ile ilişkilidir. Pankreas veya mide kanseri olan hastalarında ise bu oran %80'in üzerindedir (Ohnuma et al, 2021; Tuca et al, 2013) (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1:** Kansere göre kilo kaybı sıklığı (Ohnuma et al, 2021)

<b>Kanser Tipi</b>	<b>Kilo Kaybı Sıklığı (%)</b>
Pankreas	83
Mide	83
Özefagus	79
Baş ve Boyun	72
Kolorektal	55-60
Akciğer	50-66
Prostat	56
Meme	10-35
Genel Kanser Populasyonu	63

Kaşeksinin sıklığı ve yoğunluğu kanserler arasında farklılık göstermektedir. Gastrointestinal, pankreas ve akciğer kanserli hastalar kaşeksiden diğer tümörlere göre daha fazla etkilenir. Buna karşılık kaşeksi, meme, sarkom ve hematolojik maligniteleri olan hastalarda nispeten nadirdir. Kaşeksi prevalansı pankreas ve mide kanseri olan hastalarda %87, kolon, akciğer ve prostat kanseri ve non-Hodgkin lenfomalı hastalarda %61 ve meme kanseri, sarkom, lösemi ve Hodgkin lenfomada %40 kadar yüksektir. Genel olarak kaşeksi, kansere bağlı tüm ölümlerin %20'sini oluşturur ve kötü prognozun bir işaretidir (Ohnuma et al, 2021).

### **2.1.2. Kaşeksinin Etiyolojisi**

Kaşeksi etiyolojik olarak ikiye ayrılır. Primer kaşeksi, tümör kaynaklı metabolik değişiklikler sonucu çıkmaktadır. Tümör dokusu tarafından salınan proteoliz indükleyici faktör (proteolysis inducing factor, PIF) ve TNF- $\alpha$  (tümör nekroz faktörü- $\alpha$ ) gibi pro-inflamatuvar sitokinler protein katabolizmasını artırarak kas kitlesi yıkımına; lipit mobilize edici faktör (lipid mobilizing factor, LMF) adipoz dokuda lipolizi artırarak yağ kitlesi kaybına neden olur. Tümör dokusu, sistemik inflamasyonu tetikleyerek metabolizma hızını artırır. İştahın baskılanmasını sağlayarak erken tokluğa sebep olur ve kaşeksi gelişimine katkı sağlar (Muliawati et al, 2012).

Sekonder kaşeksi ise, kanser dışı ama kansere bağlı olarak gelişen malnütrisyon (besin yetersizliği) veya beslenme bozuklukları sonucu oluşur. Bulantı, kusma, ağız yaralarında görülen lokalize ağrı, kemoterapinin yan etkilerine bağlı

olarak gelişen tat ve koku değişimleri, diyare ve konstipasyon, yorgunluk ve tümör kitlesine bağlı mekanik obstrüksiyonlar sekonder kaşeksiye yol açan nedenler arasında yer almaktadır (Erdamar ve ark, 2014).

### 2.1.3. Kaşeksi Tanısı ve Sınıflandırılması

Kaşeksinin görülme sıklığı ve şiddeti oldukça heterojen olup tümörün tipine, konumuna ve evresine bağlıdır. Şu anda, erken evrede kaşeksi tanısı için spesifik bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Evreleme, hastanın klinik belirtilerine ve özelliklerine göre belirlenir (Ni and Zhang, 2020).

2011 yılında “The Lancet Oncology” de yayınlanan uluslararası raporda, kanser hastalarında kaşeksisinin tanımı ve tanı kriterleri belirlenmiştir. Bu raporda kanser kaşeksi, progresif fonksiyonel bozukluğa yol açan ve geleneksel nütrisyonel destek ile tamamen geri döndürülemeyen, yağ kütlesi kaybı olsun veya olmasın devam eden iskelet kası kütlesi kaybı ile karakterize multifaktöriyel bir sendrom olarak tanımlanmıştır. Patofizyolojisi ise azalan besin alımı ve anormal metabolizmanın görüldüğü, negatif protein ve enerji dengesi ile açıklanmıştır. Tanı kriterleri aşağıda listelenmiştir (Fearon, 2011):

- Beslenme yetersizliği olmaksızın son altı ay içerisinde  $>5$  kilo kaybı olması veya
- BKİ  $<20$  kg/m<sup>2</sup> ve  $>2$  kilo kaybı olması veya
- Kas kitlesi kaybı ile uyumlu ekstremite iskelet kas indeksi (erkeklerde  $<7,26$  kg/m<sup>2</sup>; kadınlarda  $<5,45$  kg/m<sup>2</sup>) ve  $>2$  kilo kaybı olması.

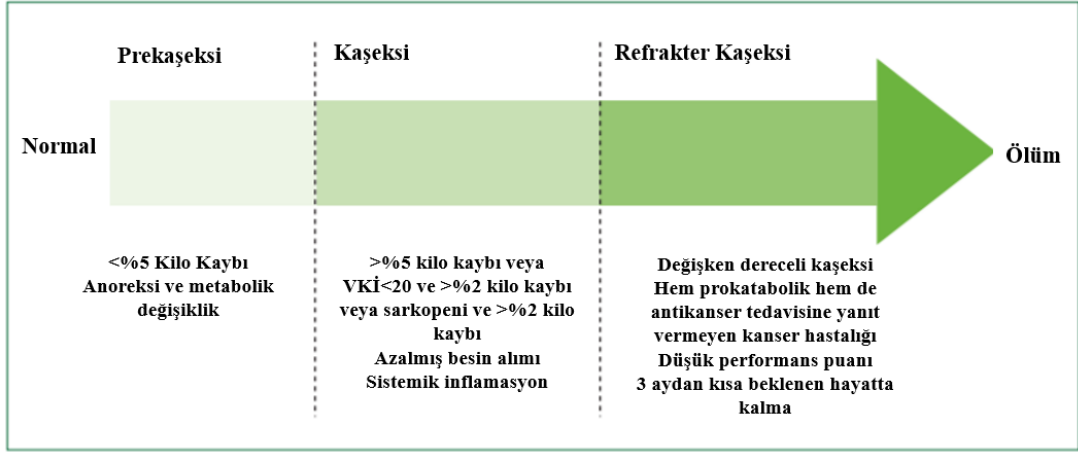
Kanser kaşeksisini tanı kriterleri belirlenirken beden kitle indeksi (BKİ), kilo kaybı ve kas kitlesi kaybı dikkate alınmıştır. Kansere özgü olan referans değerlerde eksiklikler olsa da kas kaybının değerlendirilmesinde kabul gören kural, mutlak musküleritenin 5. persentilin altında olmasıdır (Fearon et al, 2011) ve bu değerlendirme aşağıdaki kriterler dikkate alınarak yapılır:

- Antropometrik ölçümlerden üst orta kol kas alanının erkeklerde  $<32$  cm<sup>2</sup>, kadınlarda  $<18$  cm<sup>2</sup> olması,
- Dual enerji X-ray absorpsiyometrisi (DEXA) ile belirlenen ekstremite iskelet kası indeksinin erkeklerde  $<7,26$  kg/m<sup>2</sup>, kadınlarda  $<5,45$  kg/m<sup>2</sup> olması,
- Bilgisayarlı tomografik görüntüleme ile belirlenen lumbar iskelet kası indeksi erkeklerde  $<55$  cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>, kadınlar  $<39$  cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> olması,

- Biyoelektrik empedans (BİA) ile belirlenen kemiksiz tüm yağsız vücut kitle indeksi erkeklerde  $<14,6 \text{ kg/m}^2$ , kadınlar  $<11,4 \text{ kg/m}^2$  olması
- Sıvı retansiyonu, büyük bir tümör kitlesi, kilo fazlalığı veya obezite varlığında gibi durumlarda direkt muskularite ölçümü önerilmiştir (Sadeghi et al, 2018).

Kaşekside kilo kaybının net olarak belirlenebilmesi için kas kütlesi kaybının ve adipoz doku kaybından ayırt edilmesi, cinsiyete özgü referans değerlerin tanımlanması ve vücut kompozisyon ölçümlerinin standartize edilmesi gerekmektedir (Sadeghi et al, 2018).

Kanser kaşeksisi, prekaşeksi, kaşeksi ve refrakter kaşeksi olmak üzere birbirini izleyen üç klinik aşamada sınıflandırılır ancak hastalar üç aşamayı da deneyimlemeyebilir (Şekil 2.1). Prekaşeksi aşamasında anoreksi ve bozulmuş glikoz toleransı gibi erken klinik ve metabolik belirtiler ile istemsiz kilo kaybı ( $\leq\%5$ ) görülür. İlerleme riski kanser türü ve evresi, sistemik inflamasyon varlığı, besin alımında azalma ve antikanser tedavisine yanıtla göre değişkenlik gösterir. Kaşeksi aşaması ise son altı ayda mevcut vücut ağırlığının  $\%5$ 'inden fazlasını kaybeden veya BKİ'si  $20 \text{ kg/m}^2$  den az olup devam eden kilo kaybı  $\%2$ 'den fazla olan veya sarkopeni durumunda devam eden kilo kaybının  $\%2$ 'den fazla olduğu hastaları kapsar. Besin alımında azalma ve sistemik inflamasyon gözlemlenir. Refrakter kaşeksi aşamasında ise kaşeksi, ilerlemiş kanserin (preterminal) veya antikanser tedaviye yanıtız şekilde hızla ilerleyen hastalığın varlığıyla klinik olarak dirençli hale gelebilir. Bu aşamada artan katabolizma ve kilo kaybının yönetimini sağlayacak faktörlerin varlığı mümkün değildir. Düşük fiziksel performans durumu ve 3 aydan kısa yaşam beklentisi ile karakterizedir. Terapötik müdahaleler kaşeksinin sonuçlarını ve komplikasyonlarını (örneğin iştah uyarımı, mide bulantısının yönetimi veya hastanın beslenme sorunları) hafifletmeye odaklanmıştır (Baracos et al, 2018; Fearon et al, 2011):



**Şekil 2.1:** Kanser Kaşeksinin Klinik Evreleri (Fearon, 2011)

#### 2.1.4. Kaşeksi Patogenezi

Kanser hastalarında görülen kaşeksinin patogenezinde birçok faktörün rol oynadığı düşünülmekle birlikte süreç henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Karmaşık tümör-konak etkileşimi sonucunda katabolizma ve anabolizma arasında bir dengesizlik oluşur ve katabolizma artar (Çizelge 2.2). Bu süreçte anoreksi, hipermetabolizma, doku kaybı, metabolik anormallikler ve hormonal değişiklikler rol almaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinden salınan faktörlerin katabolizmayı artırarak kaşekside rol oynadığını bildirilmiştir (Laviano et al, 2011). IL-1 (interlökin-1), IL-6 (interlökin-6) ve TNF- $\alpha$  konak ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olarak salınan proinflamatuvar sitokinlerdir (Muliawati et al, 2012). Tümör büyümesi sırasında meydana gelen değişiklikler, tümör tarafından üretilen iskelet kaslarında protein yıkımını destekleyen PİF ve adipoz dokusunun serbest yağ asitlerine parçalanmasını destekleyen LMF dahil olmak üzere bir dizi faktör tarafından da tetiklenir (Laviano et al, 2005).

Kaşeksi, yağ depolarının birincil yakıt olarak glikozun yerini aldığı basit bir açlık durumu değildir. Kanser, enerji açığının aksine Çizelge 2.2’de belirtilen metabolik değişikliklere neden olur ve geleneksel beslenme desteği yeterli değildir (Ohnuma et al, 2021).

**Çizelge 2.2.:** Açlık ve Kanser Kaşeksisinde Metabolik Etkilerin Karşılaştırılması (Ohnuma et al, 2021)

	<b>Açlık</b>	<b>Kanser Kaşeksisi</b>
<b>Enerji tüketimi</b>	Azalmış	Artmış
<b>Protein Metabolizması</b>		
Protein turnover	Azalmış	Artmış
Tüm vücut sentezi	Azalmış	Artmış
Tüm vücut katabolizması	Azalmış	Artmış
İskelet kas sentezi	Azalmış	Azalmış
İskelet kas katabolizması	Azalmış	Artmış
Plazma Aminoasidogram	Değişmemiş	Değişken
Nitrojen dengesi	Azalmış	Negatif
<b>Karbonhidrat Metabolizması</b>		
Glikoz turnover	Azalmış	Artmış
Hepatik glukoneogenez	Artmış	Artmış
Cori döngüsü aktivitesi	Değişmemiş	Artmış
İnsülin direnci	Artmış	Artmış
<b>Lipit Metabolizması</b>		
Lipoliz	Artmış	Artmış
Lipogenez	Değişmemiş	Değişken
Lipoprotein lipaz aktivitesi	Değişmemiş	Azalmış
Serum serbest yağ asidi seviyesi	Değişmemiş	Artmış

### 2.1.5. Kaşeksi Tedavisi

Kanser kaşeksisini tamamen tersine çevirmek kanseri tedavi etmekle mümkündür ancak bu durum ileri evre katı tümörlerinde nadir görülen bir başarıdır (Mantovani and Madeddu, 2010). Çok faktörlü bir patogeneze sahip olan kanser kaşeksisi, anoreksi, inflamasyon, metabolik bozukluklar ve ilerlemiş kas proteolizi içerir ve bunların her biri potansiyel terapötik hedeflerdir. İlk çalışmalar, anoreksinin tedavisine odaklansa da yakın dönemdeki çalışmalarda amaç, inflamasyonu ve kas proteolizini azaltmak veya kaşeksinin çeşitli yönlerini aynı anda tedavi edebilmek için farklı ilaç kombinasyonları kullanmaktır. Farmakolojik tedavi, bu metabolik

bozuklukları tersine çevirmek için uygulanır ve yaygın olarak progesteron türevleri, kannabinoidler ve kortikosteroidler gibi iştah uyarıcılar tercih edilmektedir (Murphy and Lynch, 2012).

Kaşeksi ile ilişkili kilo kaybı tedavisinde ise, ilk olarak gıda alımının azalmasına neden olan faktörler değerlendirilir. İkinci olarak anormal karbonhidrat metabolizması, lipit mobilizasyonu ve iskelet kası proteinlerinin yıkımı tedavi edilir. Bununla birlikte beslenme tedavisi ve nütrasötiklerin bir kombinasyonu tedavinin optimizasyonuna katkı sağlayabilir (Argilés et al, 2010; 2008). Kanser hastasına modern yaklaşımda, kaşeksi sendromunun başlamasını önlemek veya geciktirmek için beslenme müdahalesi mümkün olan en kısa sürede yapılması önerilmektedir. Beslenme gereksinimlerinin hesaplanması, kesinlikle beslenme durumunun, metabolik durumun, altta yatan hastalığın ve tedavisinin belirlenmesine bağlıdır (White et al, 2012).

#### **2.1.6. Kaşekside Beslenme**

Kanser kaşeksisinde multimodal tedavinin temel taşı olarak beslenme müdahalesi önerilmektedir. Optimal beslenme bakımı, kanser kaşeksisinin tedavisinde çok önemlidir ve besinlerin etkileri, kaşeksiden etkilenen veya bozulan farklı mekanizmaları veya metabolik yolları hedefleyerek yeterli enerji alımının sağlanmasını sağlayabilir (van de Worp et al, 2020).

Kanser hastalarında toplam enerji harcamasını tahmin etmek için istirahat enerji harcaması ve fiziksel aktivite düzeyi dikkate alınmalıdır. Bireysel olarak ölçülmediği takdirde kanser hastalarının toplam enerji harcamasının sağlıklı deneklere benzerdir ve genellikle 25-30 kkal/kg/gün'dür (Arends et al, 2017).

İskelet kas kütlelerinin korunması veya kazanılması için yeterli diyet proteinini alımı elzemdir. İskelet kası kütlelerini artırmak için pozitif bir protein dengesi gereklidir ve diyet proteininden elde edilen esansiyel amino asitlerin plazma seviyelerinin yükselmesi etkili bir anabolik uyarıcı olarak kabul edilir. Kanser hastalarında beslenmeye ilişkin ESPEN kılavuzları, 1.0-1.5 g/kg/gün aralığında bir protein alımını önermektedir (Arends et al, 2017).

Glutamin vücutta en bol bulunan amino asit olmasına rağmen, kanserli birçok hastada belirgin bir glutamin tükenmesi gözlenmektedir. Ancak tümör hücreleri glutamini metabolize edebilmektedir. Glutaminin çok sayıda metabolik yola dahil

olduğu düşünülürken kanser kaşeksili hastalarda uzun süreli takviyelerinden kaçınılması önerilmektedir (Vicentini et al, 2016).

$\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilbutirat (HMB), insan vücudunda L-lösin metabolizması aracılığıyla sentezlenmektedir. Normal koşullar altında diyetle alınan lösinin yaklaşık %5'i HMB'ye dönüştürülmektedir. Bu lösin metabolitinin, öncelikle protein bozulmasını baskılayarak protein dönüşümünü düzenlediği düşünülürken (Aversa et al, 2011). Ancak yapılan çalışmalarda kullanılan HMB dozları fizyolojik düzeyinin üstünde olup ve klinik müdahale için uygun olmayabilir. Bu sebeple düşük dozdaki etkinliği hakkında daha fazla araştırma gerekmektedir (van de Worp et al, 2020).

Dalı zincirli amino asitlerin (DZAA) iskelet kası proteinlerinin temel bileşenleri oldukları ve protein sentezini uyarmadaki kritik rolleri nedeniyle, kas kaybının eşlik ettiği hastalıklarda terapötik etki gösterebileceği düşünülürken. DZAA'lar, glutamin üretimini artırarak inflamasyonu düzenleyebilir (Peters et al, 2011). Bu sayede iskelet kasında proteolizi azaltabilir ve protein sentezini artırabilir. DZAA'lerden lösinin kas protein sentezini uyarmadaki etkinliği izolösin ve valine göre fazladır (Eley et al, 2007).

Arjinin sağlıklı koşullarda vücutta yeterli miktarda sentezlenerek fizyolojik talebi karşılamaktadır. Hücre büyümesi ve protein sentezi dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer alır. Ayrıca arjinin, nitrik oksit biyosentezinin öncüsüdür. Nitrik oksit, insülin ve büyüme hormonu gibi çeşitli hormonların salınımını uyaran, kan akışını ve doku oksijenlenmesini sağlayan bağışıklık düzenleyici bir hücresel habercidir. Bu nedenle arjinin takviyesinin, anti-tümör tepkisinin düzenlenmesi aracılığıyla kanser kaşeksili hastalar için faydalı olabileceği düşünülürken (Delage et al, 2010).

Antiinflamatuvar olan omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri ( $\omega$ -3 PUFA'lar) arasında  $\alpha$ -linolenik asit (ALA), eikosapentaenoik asit (EPA), dokosapentaenoik asit (DPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) bulunmaktadır ve özellikle EPA'nın proinflamatuvar sitokin salınımını azalttığı gösterilmiştir (Vega et al, 2021).  $\omega$ -3 PUFA'ların kaşektik hastalarda metabolik anormallikleri düzenleyerek kilo alımına neden olabileceği ve EPA'nın yüksek dinlenme enerji harcamasını normalleştirebileceği belirtilmiştir (Ma et al, 2015). PUFA'ların PPAR $\gamma$  sinyalinin aktivasyonu yoluyla NF- $\kappa$ B (nükleer faktör  $\kappa$ B) aracılı inflamasyona müdahale ettiği

gösterilmiştir (Kliwer; 1997). Kemoterapi gören, kilo kaybı veya yetersiz beslenme riski olan ileri evre kanserli hastalarda, iştahı, gıda alımını, yağsız vücut kütlelerini ve vücut ağırlığını stabilize etmek veya iyileştirmek için  $\omega$ -3 yağ asitleri (1-2 g/gün) veya balık yağı (4-6 g/gün) takviyesi önerilmektedir (Arends et al, 2017).

Polifenoller, meyve, sebze, kakao, çay, çeşitli bitki ve bunların türevlerinde bulunan bir grup heterojen organik molekülden oluşmaktadır. Doğal polifenollerin, kanser kaşeksisini sınırladığını veya kısıtladığını destekleyen kanıtlar mevcuttur (Aquila et al, 2021). Flavonoid ailesine (bitki kaynaklı polifenolik sekonder metabolitlerin bir sınıfı) ait olan epigallokateşin-3-gallat (EGCG), *in vitro* ve *in vivo* anti-kaşeksi etkilerine sahiptir. Açlığa veya TNF- $\alpha$ 'ya maruz kalan farklılaştırılmış fare miyotüplerinde 10  $\mu$ M EGCG, protein sentezini arttırmış ve protein yıkım hızını azaltarak hücreleri atrofiye karşı koruduğu bildirilmiştir (Mirza et al, 2014). EGCG'a benzer şekilde anti-inflamatuvar, antioksidan ve antiaterosklerotik gösteren zerdeçal ekstraktının ana polifenol bileşeni kurkumin, tümör taşıyan farelerde kas kaybını azaltmıştır (Oelkrug et al, 2014). Üzümde bulunan polifenollerden resveratrolün, yaşlanma ve kanser kaşeksisi gibi çok sayıda katabolik durumda kas atrofisini önlediğini gösterilmiştir ancak farklı kaşeksi modellerinde kas kaybını iyileştirmediğini gösteren çalışmalarda vardır (Busquets et al, 2016). Birçok meyve, sebze ve tohumda bulunan quercetin, zenginleştirilmiş diyetle birlikte verildiğinde tümör taşıyan farelerde vücut ağırlığı ve kas ağırlığı korunmuş ve sağkalım artmıştır (Camargo et al, 2011). Çok sayıda kanıt, deneysel kaşeksi modellerinde kas kaybını durdurmak için polifenollerin kullanımını desteklemektedir (Aquila et al, 2021).

### **2.1.7. Antikanser Tedaviler ve Kaşeksiye Etkileri**

Birincil tümör tedavisi veya ameliyat, kemoterapi, radyoterapi gibi antikanser tedavileri tümör spesifik tedavi hasarının yanı sıra, beslenme ve metabolik durum değişikliklerine neden olarak kaşeksiye doğrudan veya dolaylı olarak katkı sağlayabilir. Yapılan çalışmalarda kemoterapi ve radyoterapinin besin alımını etkileyerek kaşeksi gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir. Kaşektik kanser hastaları planlanan tedavisinin kesintiye uğratan ve yaşam süresini azaltan kemoterapi ve radyoterapi kaynaklı toksisiteden iyi beslenen kanser hastalarına kıyasla daha fazla etkilenirler (Laviano et al, 2011). Malnütrisyonlu hastalarda, kemoterapi ve radyoterapiye yanıt azalırken tedavi maliyetleri ile mortalite ve morbidite oranları artmaktadır (Çehreli, 2004; Tosun ve Köksal, 2012)

Kemoterapi tedavisi tat ve koku değişikliği, yemekten tikslenme, bulantı, kusma, mukozit, ağız kuruluğu, intestinal ülserasyon, konstipasyon, diyare ve anoreksiye zemin hazırlayan erken doygunluk hissi oluşturmasına neden olabilmektedir. Bütün bu yan etkilerin insidansı, kullanılan kemoterapi yöntemi ve dozuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Çehreli, 2004; Cutsema et al, 2005). Besin öğelerinin tutulumunu da etkileyen kemoterapi tedavisi hiperglisemi, hiperkalsemi ve mikro besin ögesi yetersizliklerine neden olabilmektedir. Beslenme yetersizlikleri de immün yetmezliğe yol açmakta ve bu etki, sitotoksik ajanların etkisiyle birleştiğinde tehlike ikiye katlanmaktadır (Cutsema et al, 2005). Ayrıca biyolojik tedavilerin, düşük-orta düzeyde bulantı ve/veya kusmayı (bevacizumab, setuksimab gibi interferonlar ve monoklonal antikolar) veya diyareyi (lapatinib gibi timidin kinaz inhibitörleri) indükleyebildiği belirtilmiştir. Alkilleyici ajanlar (siklofosamid, ifosamid vb.), metotreksat, florourasil, aktinomisin-D, sisplatin, vinkristin, doksorubisin vb. gibi bazı ilaçların, doğrudan mukozal ve metabolik değişiklikleri indükleyerek malabsorpsiyona neden olabileceği de bildirilmiştir (Nicolini et al, 2013; Ferrari et al, 2010).

Antikanser ilaçların doğrudan kaşeksi gelişimi üzerindeki etkisine ilişkin veriler çelişkilidir. Beş günlük sürekli 5-florourasil infüzyonunun, protein sentezi inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Revera et al, 1986). Taksanlar, tümör taşıyan farelerde ise uzun süreli kilo kaybına neden olmuş ve paklitaksel kültürlenmiş murin hücrelerinde kaşektik sitokinlerin salınımını arttırmıştır. Klinik kullanımda ise taksanların kaşeksiye neden olduğu bildirilmemiştir. Aksine, kaşektik farelerde uygulanan 5-deoksi-5-florouridin (5-DFUR), tümörün büyümeye devam ettiği veya önemli ölçüde küçülmediği dozlarda bile kilo kaybını azaltmıştır (Tohgo et al, 2002; Tanaka et al, 1990). Ayrıca, 5-DFUR'nin bir türevi olan kapesitabin, antikaşektik etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir (Fujimoto-Ouchi et al, 2007).

Kaşeksinin klinik teşhisindeki zorluk, prekaşeksi ile refrakter kaşeksi arasındaki bir spektrum olmasından kaynaklanmaktadır. Tedaviye bağlı beslenme etkisi semptomları belirlenir ve tedavi edilirse, hasta ciddi kaşeksiye ilerlemeyebilir (Mantovani and Madeddu, 2010). Ayrıca kaşeksinin klinik değerlendirmesinde yağsız vücut kütlesi ve yağ kütlesi kaybı, toplam kilo kaybından ayırt edilmelidir (Kumar et al, 2010).

### **2.1.8. Kaşekside Vücut Kompozisyonu Değişiklikleri**

Kanser hastalarının çoğu, hastalık seyri sırasında vücut kompozisyonu değişikliği yaşar. Örneğin, kemoterapi gören meme kanseri ve prostat kanseri hastaları, artan kanser nüksü riski ve klinik komorbiditeler ile ilişkili olarak adipoz doku kazanırken ve iskelet kası kaybeder. Buna karşılık, ileri evre akciğer ve kolorektal kanser hastaları, tedavi yanıtının azalması ve daha kötü hayatta kalma oranları ile ilişkili olarak adipoz doku kaybının eşlik ettiği veya etmediği iskelet kası kaybı yaşar. Vücut kompozisyonu özelliklerinin heterojenliği ve bunların farklı kanser popülasyonları üzerindeki farklı etkileri, kas ve adipoz dokusunun doğru bir şekilde ölçülmesi ihtiyacını beraberinde getirmektedir. Böylece vücut kompozisyonu özellikleri ile klinik sonuçlar arasındaki karmaşık ilişkinin anlaşılmasını kolaylaştıracak ve kanser popülasyonlarında kas kaybı ve yağ kazanımına karşı koymayı amaçlayan gelecekteki terapötik müdahalelerin geliştirilmesini ve değerlendirilmesini destekleyecektir. Kanser hastalarında doğru vücut kompozisyonu ölçümünü bozabilecek çeşitli metabolik komplikasyonlara rağmen (dehidrasyon yağsız doku ölçümünü bozabilir), bu ölçümleri yapmak için en uygun modelleri seçmek için uygun bir kılavuz bulunmamaktadır (Di Sebastiano et al, 2012).

#### **2.1.8.1. Kaşekside Adipoz Doku Kaybı**

Kanser kaşeksisinde, iskelet kası kaybına beyaz adipoz doku kaybı eşlik etmektedir ve bu kayıp üç farklı şekilde gerçekleşmektedir. İlki hem gliserol hem de yağ asitlerinin salınımı ile sonuçlanan lipolitik aktivitede önemli bir artış olmasıdır. Artan lipoliz mekanizması, adipoz dokuda hormona duyarlı lipazın (hormone sensitive lipase, HSL) aktivasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca, kanser kaşeksisinde lipolizi uyaran katekolaminlere ve atriyal natriüretik peptidlere karşı artan yanıt sonucunda insülin, adipositler üzerinde azalmış antilipolitik etki gösterir. İkincisi, beyaz adipoz dokuda bulunan lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesinde azalış olmasıdır. Endojen ve eksojen triaçilgliserollerin gliserol ve yağ asitlerine ayrılmasında görevli olan bu enzim, yağ asitlerinin beyaz adipoz dokuya girmesini sağladığı için aktivitesindeki azalış, lipid alımını ciddi şekilde engellemektedir. Son olarak, tümör bulunduran farelerde ve insanlarda adipoz dokudaki de novo lipogenez azalır. Triaçilgliserol sentezi için gerekli olan yağ asitlerinin mevcudiyeti azaldıkça esterleşme de azalır ve sonuç olarak lipid birikimi baskılanır (Kir et al, 2014).

Adipoz dokuda, adipokinler ve miyokinler arasında bir etkileşim olduğu gösterilmiştir. Bu da kanserde iskelet kası ve adipoz doku arasındaki organlar arası sinyalleşmenin önemine dikkat çekmektedir (Dalamaga, 2013; Argilés et al, 2005). Das ve arkadaşları, farelerde adipoz trigliserit lipazın genetik delesyonun (kromozom üzerindeki bir parçanın kaybı), kanserde lipoliz artışını ve beyaz adipoz doku kaybını engellediğini bulmuştur (Das et al, 2011). Bu HSL delesyonuna benzemekte ancak daha az belirgin etkiler ortaya çıkarmaktadır. İlginç bir şekilde, azalmış lipolizin iskelet kası kütlesinin korunmasıyla birlikte görüldüğünü bildirilmiştir (Argilés et al, 2007). Bu da yağın parçalanmasının iskelet kası proteinlerinden önce geldiğini ve adiposit triaçilgliserollerin parçalanması sırasında üretilen bazı sinyallerin kas proteolizinin aktivasyonundan da sorumlu olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca HSL inaktivasyonu, tümör büyümesi sırasında kas kaybında rol oynayan ana proteolitik sistem olan ubikuitin-proteazom yolunun aktivasyon eksikliği ile sonuçlanmıştır ve bu sayede adipoz dokunun iskelet kasının israfına katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir (Argilés et al, 2007). Bu nedenle, Stephens ve arkadaşları kanser hastalarının rektus abdominis kasında vücut ağırlığı kaybıyla ilişkili gibi görünen intramiyoselüler lipit damlacıklarının varlığının arttığını bildirmiştir (Das et al, 2011).

Bağışıklık hücreleri tarafından salınabilen inflamatuvar aracı IL-6 gibi tümör kaynaklı bileşiklerin ve PTHRP (paratiroid hormonu ile ilişkili protein)'in UCP-1 (uncoupling protein-1, ayırıcı protein 1) ekspresyonunu yönlendirebileceği bildirilmiştir. Lewis akciğer karsinomu taşıyan farelerde PTHRP'nin nötralizasyonu, beyaz adipositlerin esmerleşmesini bloke etmiş, kas kütlesi ve gücü kaybını azaltmıştır. Ayrıca, anti-inflamatuvar tedaviler veya  $\beta$ -adrenerjik blokaj, beyaz adiposit esmerleşmesini azaltarak kaşeksi şiddetinde bir azalmaya neden olmuştur. Bu yaklaşımlar, kanser hastalarında kaşeksiyi iyileştirmek için ilginç ve umut verici farmakolojik stratejileri temsil etmektedir (Stephens et al, 2011; Petruzzelli et al, 2014).

Tümör taşıyan hayvanlarla yapılan birkaç çalışma, kanser kaşeksisi sırasında lipoliz aracılığıyla kahverengi adipoz doku aktivasyonu olduğunu rapor etmiştir. Bu da mitokondriyal düzeyde enerji ve ısı açığa çıkmasına neden olur. Kemirgenlerde termojenez ve enerji dengesinde önemli bir role sahip olan kahverengi adipoz doku, potansiyel olarak kanser hastalarında yukarıda bahsedilen mekanizmalarla enerji israfına ve kaşeksiye katkıda bulunabilir ancak kahverengi adipoz dokunun insan

kanser kaşeksisindeki rolü hakkında yeteri kadar bilgi mevcut değildir (Kir et al, 2014; Tsoli et al, 2012; Bing et al, 2000).

### **2.1.8.2.Kaşekside Kas Kütlesi Kaybı**

Kanser kaşeksisinin kas atrofisine neden olduğu mekanizma tam olarak açık değildir. İskelet kası proteini, kanser kaşeksisinde azalan senteze ve artan bozunmaya uğrar (Fearon et al, 2011). Bu değişiklikler TNF- $\alpha$ ,ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin (Li et al, 2005; Bonetto et al, 2012; Braun et al, 2011), transkripsiyon faktörlerinin (Judge et al, 2014) ve sinyal yollarının aktivasyonuna (Schmitt et al, 2007; Silva et al 2015, Murton et al, 2017), anjiyotensin II (Siguyama et al, 2012), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) (Costelli et al, 2006), çeşitli reseptörler (Yang et al, 2019; Pin et al, 2017), proteinler ve kinazlar (Camperi et al, 2017) ve organel disfonksiyonu (Marzetti et al, 2017) ekspresyonundaki anormalliklere bağlanır. Bu karmaşık süreç sonucunda kanser kaşeksisinde kas atrofisi görülür.

Kanser kaşeksisinde iskelet kası proteinlerinin yıkımına neden olan üç ana yol tanımlanmıştır (Doyle et al, 2011; Williams et al, 1999; Furuno and Goldberg, 1986). Bu yolların ilki ekstrasellüler proteinlerin ve hücre yüzey reseptörlerinin proteolizinden sorumlu olan lizozomal sistemdir. İkincisi doku hasarı, nekrozu ve otolizde rol alan sitozolik kalsiyum sistemidir. Üçüncüsü ise ATP (Adenozin Trifosfat) bağımlı ubikuitin proteolitik sistemdir ve kanser kaşeksisinin en önemli yolu olduğu düşünülmektedir. (Sun et al, 2012; Lecker et al, 1999) Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ısıya dirençli bir protein olan ubikuitinin görevi, anormal yapıdaki ve kısa ömürlü proteinleri işaretleyip yıkım için proteozomlara iletmektir. Bu işaretleme işlemi, ubiquitin ile yıkılacak protein arasında ATP'ye bağımlı olarak gerçekleşir (Laviano, 2005) ve kanser kaşeksisinde gözlenen yüksek günlük enerji harcamasına katkıda bulunabilir (Sun et al, 2012). TNF- $\alpha$  artışı, iskelet kasında ubikuitin gen ekspresyonunda belirgin artışa neden olur. Bu süreç tüketilen protein miktarından bağımsız olarak gerçekleştiğinden kaşeksi durumundaki kas katabolizmasının geleneksel nütrisyon destek ile geri döndürülemediği şaşırtıcı değildir (Tistale, 2008).

Yukarıdaki yolların aktivasyonuna sıklıkla IL-1 $\beta$  (Braun, 2011), IL-6 (White et al, 2013) ve TNF- $\alpha$  (Li, 1998) dahil inflamatuvar mediatörlerin varlığı ve önemli moleküllerin fosforilasyonu (Silva et al, 2015) veya anormal ekspresyonu (Murton et al, 2017) eşlik eder. Anormal katabolizma genellikle endoplazmik retikulum (Bohnert,

2016) ve mitokondri (Fontes et al, 2013) gibi organellerin işlev bozukluğu ile ilgilidir. Ang II (Sugiyama et al, 2012) ve IGF-1 (Costelli, 2006) gibi proteinler de kanser kaşeksisinin neden olduğu kas atrofisinde rol oynar.

Kanser kaşeksisinin neden olduğu kas atrofisinin patogenezi karmaşıktır ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Şu anda, belirli bir etkili tedavi yöntemi mevcut değildir; En etkili tedavi, besin takviyesi ve fiziksel aktivite ile birlikte iştah uyarıcıları, kaşektik sinyal moleküllerinin inhibitörlerini içeren çok hedefli bir yaklaşımı içerir (Mondello, 2015).

## **2.2. Adipoz Doku**

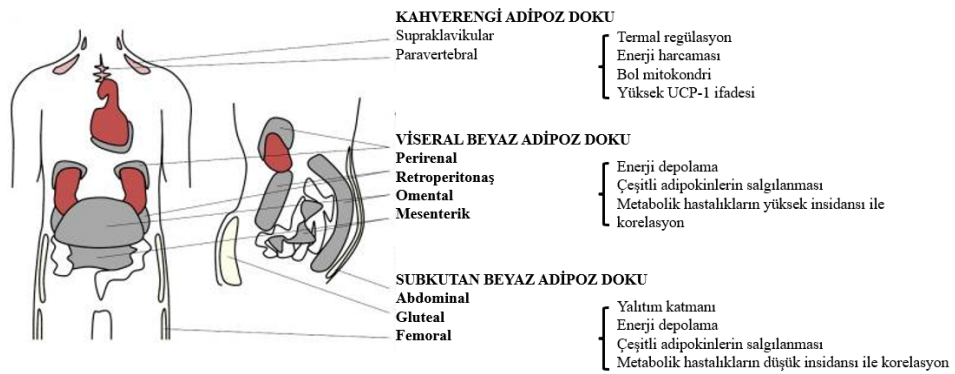
Adipoz doku mesodermal orijinli multipotent kök hücrelerinden köken almış adiposit, osteoblast, kondrosit veya miyositlere dönüşebilme kapasitesinde olan öncü adipositler, lipit ile dolu olgun adipositler, immün hücreler, fibroblastlar, kan damarları ve kollajen liflerin oluşturduğu bir matriks tarafından çevrilmiş bir gevşek bağ doku tipidir (Ahima, 2000; Gregoire and Smas, 1998). Kalori deposu görevi görür ve sistemik enerji homeostazının kritik bir düzenleyicisidir. Alınan enerjinin fazlasını trigliseritler şeklinde depolar ve gerekli durumlarda lipoliz ile trigliseritleri yağ asitlerine çevirip kana vererek enerji homeostazını düzenler. Periferik dokulardaki metabolik aktivitenin yanı sıra adipoz doku, merkezi sinir sisteminden gelen iştah açıcı sinyalleri düzenleyerek sistemik enerji dengesini kontrol eden çeşitli hormonlar, enzimler, büyüme faktörleri, sitokinler ve adipokinler salgılayan endokrin organ olarak da kabul edilmektedir (Kershaw and Flier, 2004).

Adipoz doku, hücre sayısı ve büyüklüğü yönünden enerji ihtiyacı ve tüketimine bağlı olarak sürekli hacim değişkenliği gösteren dinamik bir dokudur (Demirci ve Gün, 2017). Çocukluk ve ergenlik döneminde belirlenmekte olan yağ hücresi (adiposit) sayısının, yetişkinlerdeki yağ kütlesi miktarında önemli bir rol oynadığı bildirilmiş, bununla birlikte adiposit sayısının hem zayıf hem de obez bireylerde kilo kaybından sonra değişmediği gösterilmiştir. Bu sebeple, yetişkinlik dönemindeki adipoz doku kütlesi artışı, genellikle adiposit hipertrofisine bağlanmaktadır (Spalding et al, 2008). Ancak normal kilolu yetişkin bireylerdeki alt vücut adiposit sayısının üst vücut adiposit sayısına göre aşırı beslenme bağlı olarak hiperplazi yoluyla artabileceği de bildirilmiştir (Tchoukalova et al, 2010).

İnsanlarda farklı işlevlere sahip iki temel adipoz doku birlikte bulunur. Bunlar beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz dokudur. Beyaz adipoz dokunun işlevi enerji depolama ve lipid mobilizasyonunu sağlamaktır. Vücudun çeşitli bölgelerinde lokalize olup muazzam genişleme kapasitesi nedeniyle metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmektedir. Buna karşılık, kahverengi adipoz doku mitokondriyal ayrışma yoluyla enerjiyi ısı şeklinde dağıtma fonksiyonuna sahiptir ve termojenezde görev almaktadır (Symonds, 2012).

### 2.2.1. Adipoz Doku Türleri

Birincil özelliği lipid depolamak olan adipositler, renk tonlarına göre sınıflandırılmaktadır. Beyaz, kahverengi ve bej olarak ayrılan adipositlerin her biri farklı şekilde özelleşir (Şekil 2.2) ve hücre içi organel ve gen ifade profilleri farklılık gösterir (Hassan et al, 2012).



Şekil 2.2: Adipoz Dokunun Vücuttaki Dağılımı (Hassan et al, 2012)

#### 2.2.1.1. Beyaz Adipoz Doku

Fazla enerjinin depolandığı beyaz adipoz dokusu (BAD), metabolizmayı ve insülin direncini düzenleyen hormonların ve sitokinlerin salınmasında görevlidir. Ek olarak BAD, diğer organları olası mekanik hasarlara karşı koruyabilir ve termal yalıtkan görevi görür (Hassan et al, 2012). Beyaz adipositlerin bir araya gelmesi ile oluşan BAD fare gibi küçük memelilerde beyaz renkte, insanlarda ise sarı renktedir. Doku, vasküler hücreler (endotel, perisitler, kas hücreleri ve adventisyal hücreler) ve sinir hücreleri (Schwann hücreleri, perinöral hücreler ve nöronlar) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşur. Makrofajlar, eozinofiller, lenfositler ve mast hücreleri gibi fibroblastlar ve bağışıklık hücreleri, BAD'ta bulunan en yaygın intersitisyel

hücrelerdir. Ayrıca, perikapiller boşlukta genellikle değişken miktarda adiposit prekürsörleri (öncüleri) bulunur (Cinti, 2018; Cinti, 2011; MacDougald et al, 1995).

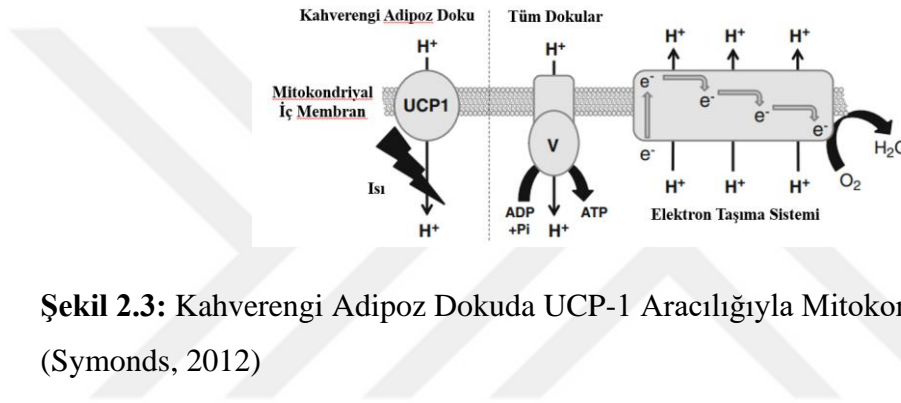
Beyaz adipositler yağ asitleri olarak bilinen yüksek enerjili molekülleri depolayabilir ve serbest bırakabilir. Morfolojileri minimum alanda maksimum molekül konsantrasyonunu depolamak için en ideal geometrik şekil olan küre şeklindedir ve %90'ı tek bir trigliserit damlacığından (lipit damlacığı) oluşur (Barneda et al, 2013). Lipit damlacığı adiposit hücresinin sitoplazmasında bulunur ancak diğer organeller gibi bir plazma zarı ile sınırlı değildir. Sitoplazma ara yüzeyi lipit damlacığı, yağ asitleri ve metabolizmasında önemli rol oynayan proteinlerin varlığından dolayı elektron mikroskopunda görülebilen yoğun bir çizgi oluşturur. Bu proteinlerin en bilineni lipit damlacıklarını lipolizden koruyan bir kaplama proteini olan perilipin 1'dir. Perilipin 1 adipositler için oldukça spesifik ve lipolitik enzimlerin trigliserit fosforilasyonu için gereklidir (Shen et al, 2009). Fsp27 (yağa özgü protein 27), lipit damlacık proteinlerinden bir diğeridir ve son yapılan çalışmalarda beyaz adipositlerin sitoplazmada ünloküler düzenlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Zhou et al, 2015).

### **2.2.1.2.Kahverengi Adipoz Doku**

Kahverengi adipoz doku (KAD), termojenezin düzenlenmesinde önemli rol oynayan özel bir adipoz türüdür. Kemirgenlerde, kış uykusuna yatan hayvanlarda ve yenidoğanların boyun ile interskapular bölgelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Yetişkinlerde ana KAD depoları paravertebral, mediastinal, para-aortik ve suprarenal alanlar, supraklaviküler bölge ve boyunda bulunur. KAD aktivitesi, sempatik sinir sistemi uyarılması ve soğuğa maruz kalma durumunda artabilir. Bu nedenle termogenezisi kontrol ederek enerji homeostazisinin düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (Choe et al, 2016). Kahverengi adipositler, tipik olarak tek bir büyük lipit damlacığına (uniloküler) sahip beyaz adipositlerin aksine, bol miktarda küçük lipit damlacıkları (multiloküler) ile karakterize edilir. Ayrıca, dokuya kahverengi rengini de veren yüksek miktarda mitokondri içerirler (Symonds, 2012).

Mitokondri, depolanan lipitlerin oksidasyonunda yer alır ancak oksidatif fosforilasyon potansiyeli az olduğu için üretilen enerji, UCP aktivitesi ile ısı şeklinde dışarı salınır ve ATP tutulmaz (Şekil 2.3). Bu nedenle KAD son derece iyi vaskülarize olur (Frühbeck and Gómez-Ambrosi, 2013). Her kahverengi adiposit, üç veya daha

fazla kılcıl damarla temas halinde olup KAT'ın kılcıl ağ yoğunluğu, BAD'ın beş ila altı katıdır (Nechad, 1986). KAD'da hem miyelinli hem de miyelinsiz sinirler mevcut olup yüksek oranda innerve edilmektedir (Cannon et al, 2010; Bartness et al, 2010; Giordano et al, 2008). Ayrıca, lipid damlacıkları antilipoliz proteini olan perilipin 1'i içeren membransız bir çizgi ile çevrelidir (Greenberg et al, 1991). Lipid ilişkili proteinlerden perilipin 5 ise, kahverengi adipositler ve yüksek oranda oksidatif olan diğer dokular için daha spesifik görünmektedir (Kimmel et al, 2014). Yapılan çalışmalar aşırı kilolu ve obez yetişkinlerde KAD aktivitesinin düşük olduğunu ancak dinlenme metabolik hız ile KAD kütesinin pozitif kolerasyon gösterdiğini bildirmektedir (van Marken et al, 2009).



**Şekil 2.3:** Kahverengi Adipoz Dokuda UCP-1 Aracılığıyla Mitokondriyal Isı Üretimi (Symonds, 2012)

Adipoz dokuda çok sayıda  $\beta$  adrenerjik reseptör bulunur.  $\beta$  adrenerjik reseptörler soğğun etkisiyle lipolizi başlatır (Choe et al, 2016). KAD'taki  $\beta$  adrenerjik sinyalizasyon yoluyla UCP-1'nin ve mitokondriyal genleri uyaran PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ )'nın ekspresyonu aktifleştirilir (Puigserver et al, 1998). UCP-1 ekspresyonuna ek olarak, soğuk tarafından uyarılan KAD ısı üretimi için lipid kullanımını artırmaktadır (Choe et al, 2016). Yapılan çalışmalarda, KAD ve subkutan BAD'ın her ikisinin termal regülasyonda katkısı olduğunu öne sürülmektedir (Choe et al, 2016).

### 2.2.1.3.Bej Adipoz Doku

Kahverengi-beyaz adiposit sınıflandırması, çevre ısısına göre beyaz veya kahverengi adipositlere benzeyen bej (brite veya brown in white) adipositlerin keşfi ile yeniden gözden geçirilmiştir (Çizelge 2.3). Soğuk ve  $\beta$  adrenerjik sinyalizasyon, kahverengi ve bej adipositler için enerji kullanımında önemli uyarıcılardır. Soğğa maruz bırakılan kemirgenlerde, bej adipositler kahverengi adipositler gibi ısı yayabilmektedirler (DiSpirito et al, 2015). Isı oluşturma fonksiyonunu paylaşmalarına

rağmen, bej ve kahverengi adipositler arasında bazı farklılıklar söz konusudur. Bej rengi adiposit farklılaşması için 2 farklı hipotez öne sürülmüştür. İlki, olgun beyaz adipositlerin transdiferasyonu ile oluştuğu, diğeri ise bej adipositlerin spesifik prekürsörlerden farklılaştığı şeklindedir (Choe et al, 2016). Soğuğa maruz kalmanın adipogenezisi tetiklemesi ile farelerde subkutan bej adiposit hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (Wang et al, 2013). Soğuğun uyarması sonucu oluşan bej adipositler, ısının oluşumuna adaptasyon sonrasında tipik beyaz adipositlere dönüşmektedir (Rosenwald et al, 2013; Tseng et al, 2008). Daha sonra oluşan soğuk uyarısı ile bu tipik beyaz adipositler tekrar bej adipositlere dönüşebilmektedir. Fare bej adipositlerinin insan subkutan hücre popülasyonu ile eşit olup olmadığı hala tartışma konusu olmasına rağmen, erişkin insan kahverengi yağ dokusunun hem klasik kahverengi adipositleri hem de bej adipositleri içerdiği bildirilmiştir (Sharp et al, 2012).

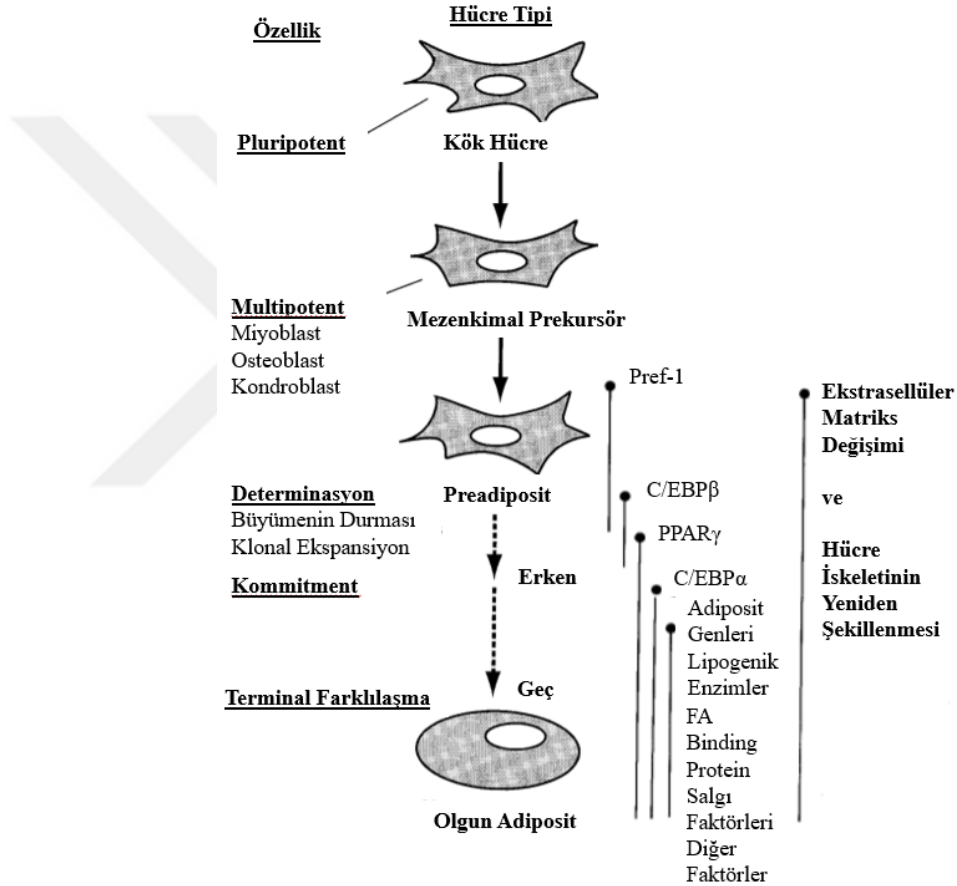
Bej adipositler, hem kahverengi hem de beyaz adipositlerin özelliklerini göstermektedir (Richard et al, 2020; Wu et al, 2012). Tipik olarak subkutan BAD içinde farklı bir öncü adiposit alt kümesinden veya mevcut beyaz adipositlerin farklılaşmasıyla gelişmektedirler (Barbatelli et al, 2010; Himms-Hagen et al, 2000). Bununla birlikte, gen ekspresyonu analizleri, bej yağ hücrelerinin farklı bir termojenik yağ hücresi tipini temsil ettiğini göstermektedir (Wu et al, 2012). Bej adipositlerin başlangıçta kemirgenlerde soğuğa maruz kalmaya tepki olarak ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Young et al, 1984; Loncar et al, 1988). Ancak yapılan birçok çalışma obezite ile ilişkili metabolik disfonksiyona karşı koruma sağlayabilen BAD kahverengileşmesinin diyet (Wang et al, 2019), egzersiz (Mika et al, 2019), pre ve post-biyotik kullanımı (Reynés et al, 2018), farmasötik ajanlar, bitki bazlı biyoaktifler ve hatta adipokinler (Kaisanlahti et al, 2019) gibi faktörler aracılığıyla indükleyebildiğini göstermiştir. BAD kahverengileşmesi hem insanlarda hem de farelerde indüklenebilen bir süreçtir (Ikeda et al, 2018). Bazı sitokinlerin de kahverengileşmenin indüklenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Örneğin; FGF21 (fibroblast büyüme faktörü 21) PGC-1 $\alpha$ 'ı aktifleştirerek kahverengi adipositlerin fonksiyonunu arttırmaktadır (Choe et al, 2016). BMP7 (bone morphogenetic protein 7) de adipositlerin kahverengileşmesi ile ilgilidir (Tseng et al, 2008) Kahverengi adipoz doku aktivasyonu ve beyaz adipoz dokunun bejleşmesi obezite ve metabolik hastalıkların tedavisinde önemli hedef konular olabilir (Choe et al, 2016).

**Çizelge 2.3: Adipoz Doku Türleri Arasındaki Farklar (Park et al, 2014)**

	<b>Kahverengi</b>	<b>Beyaz</b>	<b>Bej</b>
<b>Lokasyon</b>	İnterskapular, renal, aksiller, paravertebral	İnguinal, mezenterik retroperitoneal, perigonadal, omental	İnguinal beyaz adipoz doku içerisinde, diğer subkutan beyaz adipoz doku?
<b>Morfoloji</b>	Multiloküler/küçük lipid damlacıkları	Uniloküler büyük lipid damlacıkları	Uniloküler büyük/ Multiloküler küçük lipid damlacıkları
<b>Fonksiyon</b>	Isı üretimi	Enerjiyi trigliserit şeklinde depolama	Adaptif termogenez
<b>Mitokondri</b>	+++	+	Uyarı ile ++
<b>İnsülin direnci ile korelasyonu</b>	Negatif	Pozitif	Negatif
<b>UCP-1</b>	+++	Neredeyse tespit edilemez	Uyarı ile ++
<b>Vaskülarizasyon/ kapiller</b>	Bol miktarda	Düşük	Soğuk uyarımı ile subkutan beyaz adipoz dokuda anjiyogenez artışı
<b><math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>-adrenerjik reseptörler</b>	$\beta$ 3 (+++)	$\beta$ 3 (++), $\alpha$ 2 (+)	$\beta$ 3/ $\alpha$ 2
<b>Obezite</b>	Negatif etkili	Pozitif etkili	Negatif etkili
<b>Aktivatörler</b>	Soğuk, Thiazolidinedionlar (PPAR $\gamma$ agonistleri), tiroid hormonları, FGF21, BMP7, Bmp8b, Natriüretik peptidler	Yüksek yağlı diyet	Soğuk, Thiazolidinedionlar (PPAR $\gamma$ agonistleri), Natriüretik peptidler, FGF21, irisin, katekolaminler, $\beta$ adrenerjik reseptör agonistler

## 2.2.2. Adipogenez

Adipogenez, multipotent mezankimal kök hücreleri köken alan öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasının gerçekleştiği çok basamaklı bir süreçtir (Şekil 2.4). Adipogenik farklılaşmada kritik rolü olan transkripsiyon faktörleri kontrolünde gerçekleşen bu süreç, çeşitli negatif ve pozitif düzenleyicilerin ve çeşitli sinyal yollarının etkisiyle gerçekleşir (Lefterova et al, 2009). Adipogenik farklılaşma; büyümenin durması, mitotik klonal genişleme, erken farklılaşma ve terminal farklılaşma olarak bilinen dört ana aşamada gerçekleşir (Gregoire et al, 1998).



**Şekil 2.4:** Adipogenez evreleri ve adipogenezde etkili olan transkripsiyon faktörleri (Hassan et al, 2012)

Kültüre edilen öncü adipositler farklılaşma öncesi proliferasyon gösterirler ve konfluent duruma geldiklerinde kompakt inhibasyon sonucu büyümelerini durdurup hücre döngüsünden çekilirler. Bu süreçte öncü adipositlerin, erken farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunun indüklenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte öncü adipositler hücre döngüsüne tekrar dönmek için bazı hormonal

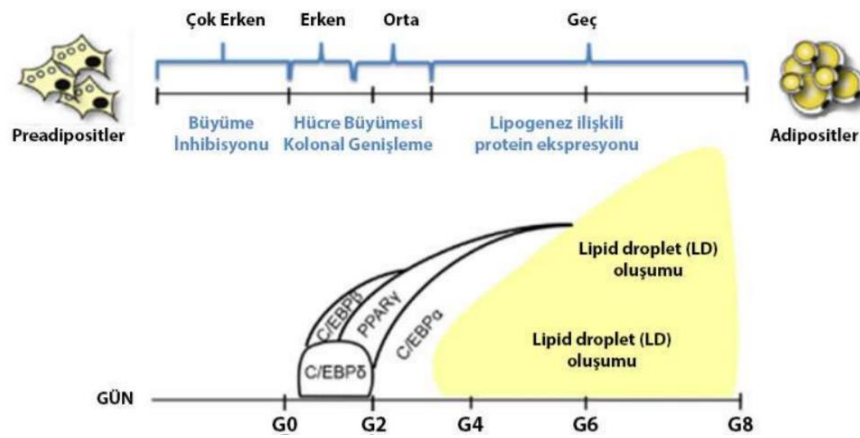
uyarıcılara ihtiyaç duyarlar (Şekil 2.5). Öncü adipositlerin hormonal uyarı ile hücre döngüsüne tekrar girmesi sağlanır. Birkaç mitoz bölünmeden sonra büyümeleri tekrar durdurulur ve terminal adiposit farklılaşması geçirirler. Öncü adipositlerin hücre döngüsüne tekrar girişi mitotik klonal genişleme fazı olarak da bilinmektedir (Dani et al, 1990; Niemelä et al, 2008). Adiposit progenitörleri (öncülleri), multipotent mezenkimal kök hücrelerden elde edilmektedir (Hassan et al, 2012). Bu öncü hücreler lipitten yoksun olup adiposit soyuna bağlı ve diğer hücre tiplerine farklılaşma kapasitesini kaybetmiş öncü adipositler (preadipositler) olarak kabul edilirler (Şekil 2.5). İkinci aşama, bu adiposit progenitörlerinin olgun, fonksiyonel adipositlere terminal farklılaşmasıyla sonuçlanır.

Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör (PPAR $\gamma$ ), adipogenezin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. PPAR $\gamma$ , nükleer reseptör üst ailesinin bir üyesidir ve yalnızca adipogenez için değil, aynı zamanda farklılaşmış durumun sürdürülmesi için de gereklidir (Rosen et al, 2000). Transkripsiyon faktörü PPAR $\gamma$ 'nın adipojenik farklılaşma için gerekli ve yeterli olduğu bildirilmiştir (Barak et al,1999). Bununla birlikte PPAR $\gamma$ 'nın adiposit farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunu ve lipid birikimini arttırdığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kanıtlanmıştır (Rosen et al, 1999;). Farelerde yapılan yakın tarihli bir çalışmada, tüm anatomik bölgelerde hem BAT hem de KAD farklılaşması için PPAR $\gamma$ 'nın önemli rolü olduğunu doğrulanmış (Wang et al, 2013). Ancak *in vivo* ve *in vitro* moleküler mekanizmalar karşılaştırıldığında *in vitro* adipogenezde farklılıklar olabileceği bildirilmiştir (Chu et al, 2014). PPAR $\gamma$ 'nın düzensiz lipid metabolizmasının görüldüğü birçok hastalığı patogenezine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Jernås et al, 2006; Okuno et al, 1998). Ayrıca beyaz adipoz dokuda PPAR $\gamma$ 'nın aktivasyonu, NF- $\kappa$ B yoluna bağlı olabileceği ve muhtemelen kanser kaşeksisinin neden olduğu beyaz adipoz doku inflamasyonunu modüle etmek için NF- $\kappa$ B ve PPAR $\gamma$  arasında bir etkileşimin olduğu düşünülmektedir (Stienstra et al, 2008, Lopes et al, 2018).

CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein (C/EBP) ailesi üyelerinden C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$  ve CHOP (C/EBP homolog protein) adipositlerde geçici olarak ifade edilir. Farklılaşmanın ilk evrelerinde C/EBP $\beta$  ve C/EBP $\delta$  transkripsiyon faktörleri birikir ve yüksek oranda ifade edilir. Hücre döngüsü G1'den S fazına geçerken C/EBP $\beta$  transkripsiyon faktörünün GSK-3 $\beta$  (glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$ ) ve MAPK (mitojenle aktive edilmiş protein kinaz) tarafından fosforilasyonu

aktivasyonu gerçekleştirilir. Aktive olmuş C/EBP $\beta$  ve C/EBP $\delta$  faktörleri doğrudan adipogenez destekleyen C/EBP $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler (Lefterova et al, 2008). Bu karmaşık ağda C/EBP $\beta$ , Hoxc8 (homeobox geni) tarafından baskılanırsa, beyaz adiposit fenotipi indüklenmiş olur (Geste et al, 2007).

C/EBP $\alpha$  öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasında etkili olduğu gibi adipositlere özgü genlerin ifadesini aktive etmekten de sorumludur. Kahverengi adipositler üzerinde adipojenik etkisi olmakla birlikte termojenik ve oksidatif mitokondriyal kapasitelerin kazanımında da etki gösterir. *In vivo* çalışmalardan elde edilen veriler, C/EBP $\alpha$  faktörünün beyaz adipositlerin farklılaşmasında gerekli bir faktör olduğunu ancak kahverengi adipositlerde bu farklılaşmadan C/EBP $\beta$  veya C/EBP $\delta$ 'nin sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (Linhart et al, 2001; Carmona et al, 2002; Jimenez-Preitner et al, 2011). PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  ve C/EBP $\delta$  ek olarak, adipositlerde 100'den fazla transkripsiyon faktörü eksprese edilmektedir (Hallenborg et al, 2012).



**Şekil 2.5:** Öncü adipositlerin farklılaşarak olgun adipositlere dönüşmesi (Tung et al, 2017).

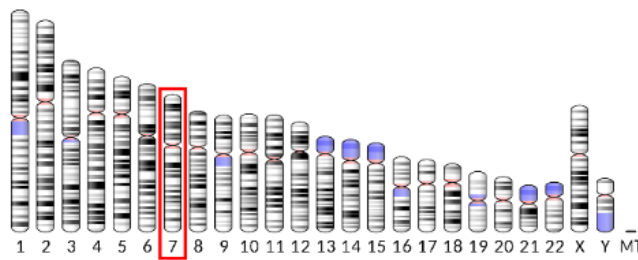
### 2.2.2.1. Kanser Kaşeksisinde Adipogenezin Bozulması

Kanser kaşeksisi sırasında adipoz dokunun yeniden şekillenmesinde çeşitli metabolik ve inflamatuvar yollar rol oynamaktadır. Kaşeksizde adipoz doku kaybının tümör kaynaklı mı yoksa konak tümör kaynaklı ürünlerden mi kaynaklandığı bilinmemektedir. Ancak bir *in vitro* çalışmada, Lewis akciğer karsinomu (LLC) hücrelerinin ortak kültürünün, lipit damlacık hacmi azalmasını teşvik ederek 3T3-L1 fare öncü adipositlerinde *in vitro* adipogenezini bozduğu belirlenmiştir. Hem tümör

hücreleri hem de adipositler tarafından artan proinflamatuvar sitokin salgılanmasının yanı sıra, adipojenik genlerin aşağı regülasyonu gözlemlenmiştir (Lopes et al, 2018). Bu nedenle tümör hücrelerinin, tümör ve adipositlerin aracılık ettiği bir inflamatuvar yanıtı tetikleyerek adiposit olgunlaşmasını bozabileceği düşünülmektedir (Batista et al, 2012). Şaşırtıcı bir şekilde, adipogenez bozukluğu, klasik kaşeksi belirteçlerinin yanı sıra doku iltihabı belirtileriyle ilerlemektedir (Argilés et al, 2011). Bu nedenle, adiposit öncesi farklılaşmada yer alan genlerin aşağı regülasyonunda yer alan faktörler, kaşektik adipoz dokuda meydana gelen metabolik ve fonksiyonel değişikliklerde anahtar rol oynayabilir (Manelli et al, 2020).

### 2.3. Çinko- $\alpha$ 2-Glikoprotein (ZAG)

ZAG (zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein), birçok hayvan türünde eksprese edilen 42 kDa'lık bir salgı proteindir ve 7q22.1 kromozomunda (Şekil 2.6) yer alan AZGP1 ( $\alpha$ 2 zinc glycoprotein 1, zinc-binding) geni tarafından kodlanır (Freije et al, 1993; Penda's et al, 1994). AZGP1 geni 9.7 kb uzunluğundadır ve organizasyonu ve nükleotid dizisi, MHC I (majör histo-uyumluluk kompleksi I) genlerinin ilk dört ekzonuna oldukça benzerdir (Freije et al, 1993). AZGP1 genine göre, ZAG proteininin yapısı da MHC I moleküllerine oldukça benzerdir (Uri'a et al, 1996). ZAG, 2 güçlü ve 15 zayıf bağlantı bölgesine sahiptir. Bu sayede çinko ve yağ asitlerine bağlanabilir ve bu durumun ZAG'ın yağ asitlerine ve  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere bağlanmasını etkilediği bildirilmiştir (Kumar et al 2013).



**Şekil 2.6:** ZAG'ın kromozom üzerindeki konumu (Kumar et al 2013).

ZAG'ın normal olarak prostat bezinin bazal ve lümen hücreleri, meme bezinin asinal ve duktal lümen epitel hücreleri, ekrin ve apokrin ter bezlerinin salgı bölümü lümen hücreleri, tükürük, trakeal ve bronş bezlerinin seröz hücreleri, yemek borusu bezlerinin asinal hücreleri, pankreasın ekzokrin asinal hücreleri, karaciğerin hepatositleri ve böbrekteki proksimal ve distal tübüllerin epitel hücrelerinden salgılanmaktadır (Tada et al, 1991).

### 2.3.1. ZAG'ın Lipit Metabolizmasındaki Rolü

ZAG'nin lipit metabolizmasını etkilediği mekanizma net olarak anlaşılamamıştır ancak artan kanıtlar lipit metabolizmasına çeşitli yollarla dahil olabileceğini göstermektedir. ZAG'ın, beyaz adipoz dokusunun esmerleşmesini teşvik ederek lipolizi arttırdığı bildirilmiştir (Elattar et al, 2017). Bu etkisinin, PPAR- $\gamma$  ve erken B hücre faktörü 2'nin ekspresyonunu uyarılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Beyaz adipoz dokusunun ZAG ile indüklenen esmerleşmesine ayrıca PKA (protein kinaz A) ve MAPK (p38 mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyali aracılık edebilir. Bu sayede ZAG, UCP-1 ve Prdm16 (PR domaini içeren protein 16) dahil olmak üzere lipoliz ile ilgili PGC-1 $\alpha$ , adipoz trigliserit lipaz ve HSL gibi birçok molekülün ekspresyonunu artırabilir (Xiao et al, 2018). ZAG'ın UCP-1 ve UCP-2 ekspresyonunu uyarılması, doz bağımlı olup  $\beta$ -3 adrenerjik reseptörler aracılığıyla gerçekleşirken UCP-3'ün uyarılması MAPK tarafından gerçekleştirilmektedir (Russel et al, 2011; Sanders et al, 2004). Bu nedenle ZAG tarafından indüklenen vücut sıcaklığı artışı, vücut ağırlığında ve yağ dokusunda azalma durumu, enerji harcaması artışına yol açan UCP ekspresyonu üzerindeki etkisine bağlanmaktadır (Russel et al, 2011; Elatter et al, 2005; Sanders et al, 2004).

ZAG, kahverengi adipoz dokuda PPAR $\gamma$  ve onun koaktivatörü olan PGC-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Böylece enerji harcamasını destekleyen UCP-1'in ekspresyonunu da artmaktadır (Elattar et al, 2017). İlginç bir şekilde, SGBS (Simpson-Golabi-Behmel sendromu) adipositlerinde ZAG ekspresyonunun, PPAR $\gamma$  agonisti rosiglitazon tarafından arttırıldığı bildirilmiştir. Bu durum, ZAG'ın PPAR $\gamma$  üzerinden lipit metabolizmasına dahil olabileceğini düşündürmüştür (Bao et al, 2005). ZAG'ın 3T3-L1 fare öncü adipositlerin proliferasyonunu desteklediği, PPAR $\gamma$  ve C/ERB $\alpha$ 'nın ekspresyonunu inhibe ederek öncü adipositlerden olgun adipositlere dönüşümünü yani farklılaşmalarını engellediği bildirilmiştir (Zhu et al, 2013; Xiao et al, 2017). ZAG'ın ayrıca lipolize katkıda bulunan adipoz trigliserit lipaz ve HSL düzeylerini arttırdığı bulunmuştur (Zhu et al, 2013). ZAG'ın hepatositlerde aşırı ekspresyonu, yağ asitlerinin lipolizini ve  $\beta$ -oksidasyonunu teşvik ederken, aynı zamanda hepatositlerde palmitik asit kaynaklı lipogenezi ve lipit birikimini de engeller (Xiao et al, 2017). Aksine, ZAG ekspresyonunun baskılanması, lipogenezi önemli ölçüde teşvik eder ve hepatositlerdeki lipit seviyesini arttırır (Xiao et al, 2017; Choi et al, 2012).

ZAG ekspresyonu, büyüme hormonu tarafından yukarı regüle edilirken, ZAG ekspresyonunun susturulması büyüme hormonunun adipositler üzerindeki lipolitik etkisini ortadan kaldırmaktadır (Balaz et al, 2015; Balaz et al, 2014). ZAG'ın aşırı ekspresyonu ayrıca yağ asidi sentaz (FAS), asetil-CoA karboksilaz ve açıl-koenzim A diaçilgliserol transferazın mRNA seviyesini azaltırken HSL mRNA seviyesini arttırır. Bu etkiler, lipogenezin inhibisyonu ve lipolizin artmasıyla sonuçlanmaktadır (Gong et al, 2009). Tüm bu çalışmalar, ZAG'ın lipolizde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir ancak lipit metabolizmasını etkileme mekanizması tartışmalıdır.

### **2.3.2. ZAG'ın Glukoz Metabolizmasındaki Rolü**

ZAG'ın glukoz metabolizması üzerindeki etkisi hakkında çok az araştırma yapılmıştır. Farelere intravenöz ZAG uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, oral glukoz uygulamasından 30 dakika sonra plazma insülin seviyesini değiştirmeden açlık kan glukozunu azalttığı ve glukoz toleransını iyileştirdiği gösterilmiştir (Wargent et al, 2013). Farelerde yapılan başka bir çalışmada, ZAG oral glukoz tolerans testlerinde idrarla glukoz atılımını artırırken maksimum plazma glukozu ve insülin seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca glukozun iskelet kası ve adipositlere transferini de teşvik ettiği bildirilmiştir (Russel et al, 2012). ZAG'ın glukoz metabolizmasındaki bu etkileri, spesifik olmayan bir  $\beta$  adrenerjik reseptör antagonisti olan propranolol ile hafifletilmiştir (Russel et al, 2012). Bu da ZAG tarafından düzenlenen glukoz metabolizmasında,  $\beta$  adrenerjik reseptörlerin önemli rolleri olduğunu göstermiştir.

ZAG,  $\beta$ -2 ve  $\beta$ -3 adrenerjik reseptörlere bağlanır ancak  $\beta$ -1'e bağlanmaz. Hem beyaz hem de kahverengi adipoz dokuda bu reseptörleri aktive ederek cAMP'in (siklik adenosin monofosfat) artmasına neden olur. Ayrıca  $\beta$ -1 adrenerjik reseptör mRNA'sının ekspresyonunu da inhibe ettiği de bildirilmiştir (Balaz e al, 2014; Wargent et al, 2013; Russel et al, 2012). Ancak ZAG'ın dolaşımdaki glikoz seviyesini düşürdüğü, adipositlere bazal glikoz alımını ve GLUT4 (glikoz taşıyıcı 4)'ün ekspresyonunu  $\beta$ -1 adrenerjik reseptörler aracılığıyla arttırdığını rapor edilirken bazı çalışmalarda ise plazma glukoz seviyesinin, plazma ZAG seviyesi ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (Zhu et al, 2013; Ceperuelo-Mallafre et al, 2015). Ayrıca adipositlerde, AZGP1 ekspresyonunun susturulması adiponektin, IRS1 (insülin reseptör substratı 1), GLUT-4 ve PGC- $\alpha$ 'nın ekspresyonunu azaltmakta olup; bu durum ZAG'ın glukoz alımı, insülin etkisi, mitokondriyal biyogenez ve lipit oksidasyonundaki rolünü göstermektedir (Balaz et al, 2014). ZAG glukoz metabolizmasında,  $\beta$  adrenerjik

reseptörler aracılığıyla glukoz kullanımının, depolanmasının ve atılımının desteklemesinde önemli rol oynayabileceği ancak etkilediği spesifik mekanizmalar hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiği belirtilmiştir.

### 2.3.3. ZAG'ın Kansere Kaşeksisindeki Rolü

Kanser kaşeksisinde iskelet kası atrofisi, gözlenen vücut kütlesi kaybının kritik bileşenini temsil etse de adipoz dokunun lipoliz teşviki yoluyla parçalanması, kanser kaşeksisinin başlangıcında önemli bir adım olduğu öne sürülmüştür. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar, yağ dokusunda artan ZAG ifadesinin, artan lipoliz ve ardından yağ ve kilo kaybı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Lipolizin kaşeksi başlangıcında anahtar bir rol oynadığı, kaşektik hastaların ZAG gibi lipit mobilizasyonunu teşvik eden faktörlerin dolaşımında yüksek seviyeler göstermesi hipotezine dayanmaktadır (Kong et al, 2010)

ZAG, trigliserit hidrolizini uyarmak için kaşektik koşullar altında tümör tarafından salgılanmaktadır. ZAG, HSL aktivasyonu ile lipolizi güçlü bir şekilde uyarır. UCP'leri yukarı regüle eder ve böylece adipositlerde yağ asidi oksidasyonunu destekler. Bu nedenle, ZAG dolaşımdaki yüksek seviyelerde serbest yağ asitlerinin oluşumunda büyük rol oynar ve kaşektik kanser hastalarında gözlenen enerji harcamasını artırır (Porporato et al, 2016).

Hem hayvan modelleri hem de kaşektik hastalar, ZAG yukarı regülasyon gösterir. İlginç bir şekilde, dolaşımdaki yüksek serbest yağ asitleri seviyeleri, kanser kaşeksisinde gözlenen kas protein yıkımının kötüleşmesi ile ilişkilendirilmiştir (Bürge and Schmid et al, 1961). Genel olarak, artan lipit mobilizasyonuna bağlı adipoz doku atrofisi, kanser kaşeksisinin başlangıcında ve gelişiminde çok önemli bir nokta olarak kabul edilir. Kaşektik hastalarda gözlenen negatif enerji dengesine ve iskelet kası israfını teşvik etmeye güçlü bir şekilde katkıda bulunur (Petruzzelli and Wagner et al, 2016).

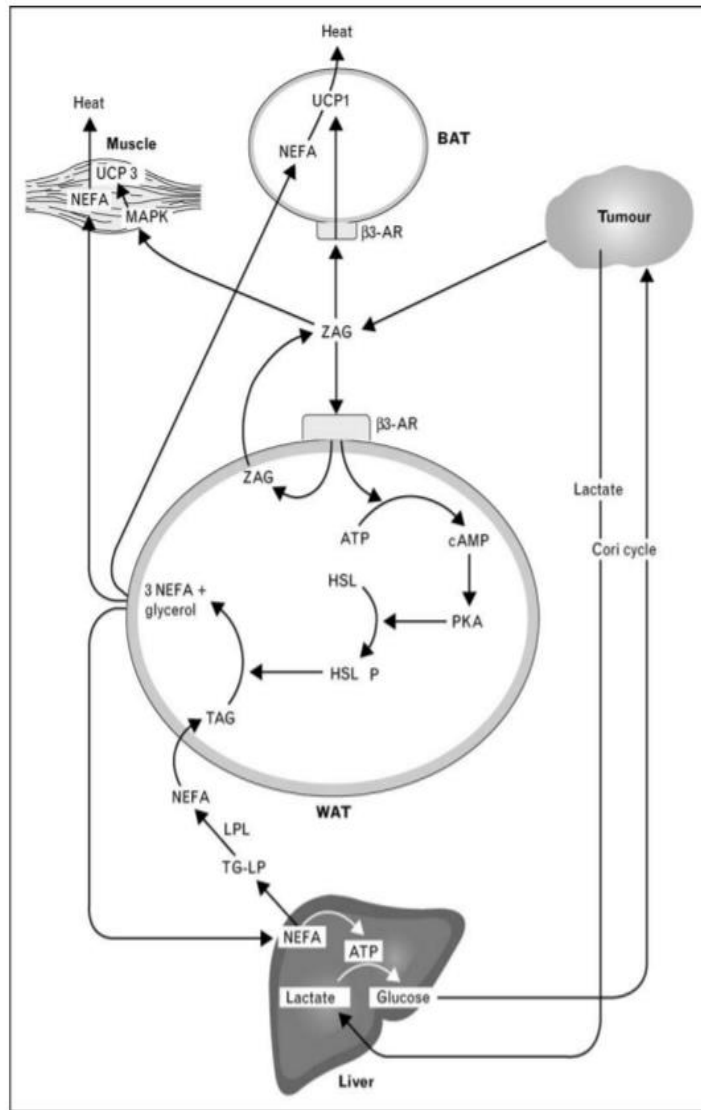
İnsan plazmasında bulunan ZAG proteini (Díez-Itza et al, 1993) meme, prostat ve akciğer gibi çeşitli karsinom türlerinin varlığıyla ilişkilendirilmiştir (Hale et al, 2001; Albertus et al, 2008; Felix et al, 2011). Rutin ve güvenilir bir ölçüm olarak yükselmiş serum ZAG proteini düzeyinin, adipoz atrofisi olan kaşektik kanser hastalarının erken teşhisi için geçerli olabileceği düşünülmektedir (Yeung et al, 2009). Ancak dolaşımdaki ZAG seviyeleri ile çeşitli koşullarda kilo veya yağ kaybı

arasındaki ilişkide tutarsızlıklar mevcuttur. Obezitede serum ZAG düzeylerine ilişkin veriler incelendiğinde, BKİ ile pozitif veya negatif korelasyon gösteren, artmış (Selva et al, 2009) veya azalmış (Cabassi et al, 2013) ZAG düzeyleri rapor edilmiştir. Ayrıca, kronik kalp yetmezliği ve hemodiyaliz hastalarında yüksek serum ZAG seviyeleri gözlenmiştir (Rydén et al, 2012). Bu da ZAG'nin yağ katabolizmasının bir belirteci olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık, kanser hastalarında yapılan iki çalışma (Mracek et al, 2011; Russell et al, 2004), plazma ZAG düzeylerinin kilo ve yağ kaybı gibi kaşeksi ile ilişkilendirilen özelliğinin iyi bir biyobelirteç olmayabileceğini öne sürmektedir. Rydén ve ark. yaptığı çalışmada küratif abdominal cerrahi geçiren yirmi beş gastrointestinal sistem kanseri hastası, 6 ay boyunca istemsiz %5'ten fazla kilo kaybı göz önüne alınarak kaşektik veya stabil kilo olarak kategorize edilmiştir. Deri altı adipoz dokusunda ZAG'ın mRNA ve protein seviyeleri, kaşektik kanser hastalarında, kilo vermeyen kanser hastalarına kıyasla daha yüksek bulunmuş ve bu, açlık serum gliserol seviyeleri ve kilo kaybı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışmada, kaşektik ve kilosu stabil kanser hastaları arasında dolaşımdaki ZAG seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Karaciğer gibi tümör veya adipoz olmayan dokular tarafından ZAG üretimi de plazma ZAG düzeylerini etkileyebileceğinden (Russell et al, 2004), dolaşımdaki ZAG seviyelerinin kaşektik kanser hastalarında yağ kaybı ile ilişkili olamayacağı belirtilmiştir. Bu doğrultuda, Rydén ve ark., ZAG'ın adipoz dokuda lokal olarak üretilen ve lipit mobilize edici bir faktör olduğu ve adipoz dokuda lipolizi destekleyerek kaşeksiye aracılık edebileceği ancak yoğun şekilde dolaşıma salgılanmayan bir faktör olduğu sonucuna varmışlardır (Mracek et al, 2011).

ZAG,  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu (Russell et al, 2002; Mracek et al, 2011) ve yüksek HSL aktivitesi yoluyla (Gong et al, 2010; Russell and Tisdale, 2005) da lipolizi indükleyebilir. Kaşektik tümör taşıyan farelerde (Russell and Tisdale, 2005) ve kanser hastalarında (Bing et al, 2010) artan plazma kortizol seviyeleri, adipoz dokuda daha yüksek ZAG ekspresyonu ve yüksek lipoliz ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum kaşekside glukokortikoidlerin ZAG ekspresyonundaki bir artış yoluyla lipolitik aktiviteyi indükleyebileceği anlamına gelmektedir (Murphy et al, 2010).

Adipoz doku kaybı, kanser hastalarında daha kısa sağkalım ve düşük yaşam kalitesi ile ilişkilidir. Kaşekside adipoz doku kaybının erken tespiti, etkili müdahalesi ve önlenmesi için bazı prognostik biyobelirteçlerin kullanılarak durumun

tanımlanmasını gerektirmektedir (Ebadi and Mazurak, 2015). Kaşeksi ile ilişkili adipoz kaybına aracılık etmede birkaç inflamatuvar sitokin yer almakla birlikte henüz adipoz doku kütleindeki değişimleri neoplastik durum ile ilişkilendirmek için uygun bir biyobelirteç tanımlanamamıştır. Kanser kaşeksisinde adipoz dokuda artan ZAG ekspresyonu, adipoz kaybının bir biyobelirteci olmaktan ziyade doku içinde lokal bir katabolik aracı olabilir (Mracek et al, 2011) (Şekil 2.7). Bu nedenle, ZAG'ın kaşeksi sendromunda lipit kullanımının bir belirteci olarak uygulanma ve dolaylı olarak adipoz doku kaybını temsil etme yeteneği sınırlıdır (Mantovani and Madeddu, 2010).

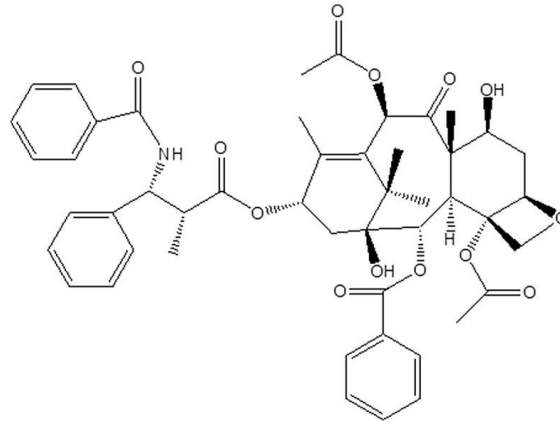


**Şekil 2.7:** Kaşeksi durumunda tümör, beyaz adipoz doku, kahverengi adipoz doku, iskelet kası ve karaciğer arasındaki etkileşim (Tisdale, 2009)

## 2.4. Paklitaksel

Paklitaksel (Taxol®), *Taxus brevifolia*'nın kabuğunda ve iğnelerinde doğal olarak üretilen bir trisiklik diterpenoid bileşiğidir. Moleküler formülü  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 'tür ve kimyasal yapısı Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Antikanser mekanizması nedeniyle, halihazırda en başarılı ve yaygın olarak kullanılan doğal antikanser ilaçlarından biridir (Chen and Shi, 2016). Paklitaksel, 1992'de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilk olarak ileri evre yumurtalık kanseri tedavisi için onaylanmış ancak daha sonra meme kanseri, kolorektal kanser ve mesanenin skuamöz hücreli karsinomunun tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca baş ve boyun kanserleri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ve AIDS gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır (Zhu and Chen, 2019).

*Taxus brevifolia*'dan izole edilen paklitaksel, bitkide bulunan düşük konsantrasyonu nedeniyle son derece pahalıdır. Bu nedenle, *T. brevifolia*'nın yapay olarak yetiştirilmesi, ilacın kimyasal sentezi veya yarı sentezi ve biyoteknolojik sentez dahil olmak üzere paklitaksel elde etmenin birkaç başka yolu geliştirilmiştir. Özellikle genetiği değiştirilmiş endofitik mantarlardan paklitaksel ekstraksiyonunun, ilacı elde etmenin etkili bir yolu olduğu kanıtlanmıştır (Weaver, 2014).



Şekil 2.8: Paklitakselin kimyasal yapısı (Weaver, 2014)

1979'da paklitakselin,  $\alpha/\beta$ -tübülün heterodimerlerinden oluşan tekrarlayan alt birimlerden oluşan yapılar olan mikrotübüllerin birleşmesini desteklediği bildirilmiştir. Tübülün mikrotübüller halinde birleşmesini önleyen diğer tübüline bağlanan antikanser ilaçların aksine, paklitaksel tübülün mikrotübüllere birleşmesini teşvik eder ve mikrotübüllerin ayrışmasını önleyerek hücre döngüsü ilerlemesini bloke

eder (Foley and Kapoor, 2013). Profaz sırasında, mikrotübüller kromozomları kutuplara doğru çekmek için bir iğ oluşturur. Daha sonraki aşamalarda depolimerize olurlar ve iğ yapısı çözülür. Hem soğuk sıcaklıklara maruz kalma hem de kalsiyum iyonlarına maruz kalma, mikrotübüllerin depolimerizasyonunu tetikler. Paklitaksel, mikrotübüllere bağlanır ve bunları stabilize eder ve paklitakसेle bağlı mikrotübüller, soğuk sıcaklıklar veya kalsiyum iyonları ile muamele edildiğinde bile depolimerizasyona direnir. Bu nedenle paklitaksel tedavisi tübülün polimerizasyonunu destekler, mitozun ilerlemesini engeller ve kanser hücrelerinin büyümesini engeller (Foley and Kapoor, 2014; Ojedalopez et al, 2014; Hawkins et al, 1996). Ayrıca paklitakselin çeşitli gen ekspresyonlarını değiştirdiğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Toillon et al, 2000; Olar et al, 1996). Paklitakselin antikanser etkinliği ile ilgili yapılmış pek çok çalışma vardır ancak bu çalışmalarda genellikle kanser hücre hatları kullanılmıştır. MCF-7 meme kanseri hücre hattında yapılan bir *in vitro* çalışmada paklitakselin 2-100 nM konsantrasyonlarında hücrelerin büyümesini inhibe ettiği ve antiproliferatif etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Okuna et al, 1998).

### 3. GEREÇ

#### 3.1. Kimyasallar ve Çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve solüsyonlar ile bunların temin edildikleri firmaların isimleri, menşei ve kullanım alanları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar

<b>Kimyasallar ve Çözeltiler</b>	<b>Firma (Menşei)</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
Paklitaksel	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
Penisilin/Streptomisin	Thermo Fisher Scientific, Amerika	Hücre Kültürü
Fetal Sığır Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Amerika	Hücre Kültürü
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
Tripsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific, Amerika	Hücre Kültürü
Trypan Blue	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Amerika	Lipit Tayini
Formalin	Sigma-Aldrich, Almanya	Lipit Tayini
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Almanya	Lipit Tayini
2-Propanol $\geq$ 99,5%	Sigma-Aldrich, Almanya	Lipit Tayini
Etanol $\geq$ 99,8%	Sigma-Aldrich, Almanya	RNA İzolasyonu
2- Merkaptetanol	Merck, Almanya	RNA İzolasyonu
Saf Etanol	Alkomed, Türkiye	Genel

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazların marka ve modelleri hakkındaki bilgiler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Kullanılan Cihazlar

<b>Cihazlar</b>	<b>Marka ve Modeli</b>
Otomatik Pipet Seti	Thermo Fisher Scientific Finnpiquette F2 Variable Volume Single-Channel Pipettes, Amerika
Elektrikli Pipet Pompası	Thermo Fisher Scientific S1 Pipet Filler, Amerika
Laminar Akış Kabini	Faster SafeFAST Classic-Class-II, İtalya
Su Banyosu	Memmert Waterbath, WNB 14, Almanya
Karbondioksit İnkübatörü	Memmert, INCO2, Almanya
Hassas terazi	Isolab, 60231002, İtalya
Distile Su Cihazı	Thermo Fisher Scientific, Barnstead Smart2Pure, Amerika
Mikrosantrifüj	Eppendorf, MiniSpin Plus Microcentrifuge, Almanya
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Cihazı	Bio-Rad, T100 PCR Thermal Cycler, Almanya
Gerçek Zamanlı-PCR (RT-PCR) Cihazı	Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Almanya
Spektrofotometre Cihazı	Thermo Scientific, Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Amerika
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific, µDrop Plate, Amerika
Vorteks	Heidolph, Reax Top Vortexer, Almanya
Otoklav	BES, Almanya
Santrifüj Cihazı	Hettich Universal 320/320R Centrifuge, Amerika
İnvert Mikroskop	Zeiss, Axio Vert.A1 Inverted Microscope, Almanya
Işık Mikroskobu	Olympus CK40, Amerika
Aspirasyon Cihazı	Scilogex SafeVac Vacuum Aspirator, Amerika
-80 Buzdolabı	Haier Biomedical, Çin
-20 Buzdolabı	Beko, Türkiye

### 3.3. Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kitlere ait genel bilgiler ile kullanım alanları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Kullanılan Kitler

<b>Kitler</b>	<b>Firma ve Menşei</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
GeneJET RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Amerika	RNA İzolasyonu
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Amerika	cDNA Sentezi
RealQ Plus 2x Master Mix Green	Ampliçon PCR Enzymes and Reagents, Danimarka	RT-PCR Reaksiyonu

### 3.4. Sarf Malzemeleri

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeleri, temin edildikleri firmalar ve kullanım alanları hakkındaki genel bilgiler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Sarf Malzemeleri

<b>Sarf Malzemeler</b>	<b>Firma ve Menşei</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Steril Filtreli Pipet ucu	Corning, Axygen, Amerika	Hücre Kültürü ve RNA İzolasyonu
Serolojik Pipet	Corning, Axygen, Amerika	Hücre Kültürü
Pipet Ucu	Corning, Axygen, Amerika	Hücre Kültürü, cDNA Sentezi ve PCR Reaksiyonları
Eppendorf Tüp	Corning, Axygen, Amerika	Hücre Kültürü, cDNA Sentezi ve PCR Reaksiyonları
Falkon Tüp	Thermo Fisher Scientific, Amerika	Hücre Kültürü
T25 ve T75 Flask	Corning, Amerika	Hücre Kültürü

**Çizelge 3.4.** Sarf Malzemeleri (*devam*)

<b>Sarf Malzemeler</b>	<b>Firma ve Menşei</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Çok-Kuyucuklu Kültür Plakları	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
Cam Pastör Pipet	Marienfeld, Almanya	Hücre Kültürü
Kriyovial Tüp	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
RT-PCR Plakası	Corning, Axygen, Amerika	RT-PCR Reaksiyonları
PCR Plak Yapıştırma Filmi	Corning, Axygen, Amerika	RT-PCR Reaksiyonları
Steril Plastik Vakum Filtrasyon Sistemi	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü
Steril Pipetleme Rezervuarı	Isolab, İtalya	Hücre Kültürü
Thoma Lamı	Marienfeld, Almanya	Hücre Kültürü
Soğutucu Kutu	Sigma-Aldrich, Almanya	RT-PCR Reaksiyonları
Steril Şırınga Filtresi	Sigma-Aldrich, Almanya	Hücre Kültürü, Lipit Birikimi
Şırınga	Becton Dickinson, Amerika	Hücre Kültürü, Lipit Birikimi
Mezür	Isolab, İtalya	Genel
Parafilm	Bemis, Almanya	Genel

### **3.5. RT-PCR Primerleri**

Çalışmada kullanılan AZGP1, PPAR $\gamma$  genleri ve hücre içi referans geni olan GAPDH'in ileri ve geri primer dizilimleri, bağlanma sıcaklıkları ve %GC oranları Çizelge 3.5'te verilmiştir. Oligonükleotitlerin sentezi ise Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. tarafından gerçekleştirilmiştir (You et al, 2014; Yu et al, 2020).

**Çizelge 3.5.** Real Time PCR’da Kullanılan Primer ve Dizileri

<b>Gen İsimleri</b>		<b>Primer Dizileri (5’-3’)</b>	<b>Bağlanma Sıcaklığı (°C)</b>	<b>GC İçeriği (%)</b>
AZGP1	İleri (F)	TACAACGACAGTAACGGGTCT	58	48
	Geri (R)	TATTTCCAGAATGCTCCGCTG	58	48
PPAR $\gamma$	İleri (F)	TCGGTTTCAGAAATGCCTTG	55	45
	Geri (R)	AGGTCAGCGGACTCTGGATT	59	55
GAPDH	İleri (F)	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	55	45
	Geri (R)	TTCACACCCATGACGAACAT	55	45

## 4. YÖNTEM

### 4.1. Hücre Hatlarının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında insan kalp dokusundan izole edilen insan öncü adiposit hücreleri hattı kullanılmıştır.

### 4.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

-196°C sıvı nitrojen tankında kriyo tüplerde muhafaza edilen 3. pasajdaki insan öncü adiposit hücreleri 37°C su banyosunda içerisinde bir miktar buz parçası kalıncaya kadar çözdürülmüştür. %70 alkol ile sterilize edilerek kabin içerisine alınmıştır. 15 mL'lik falkon tüpüne 4 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri eklenmiş ve hücreler besiyeri içerisinde pipetaj yapılarak çözdürülmüştür. Daha sonra 5 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri eklenmiş 25cm<sup>2</sup> flaska ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde %80-90 konfluent olana kadar bekletilmiştir.

### 4.3. Hücrelerin Büyütülmesi

İnsan Öncü Adiposit hücre hattı kendisine özgü besi yeri olan İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri'nde büyütülmüştür. Besi yeri kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. Besiyeri 37°C'lik su banyosunda uygun sıcaklığa getirildikten sonra hücrelere verilmiştir. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübasyona bırakılan hücrelerin besi yeri 2-3 gün ara ile değiştirilmiştir.

### 4.4. Hücrelerin Pasajlanması

37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde büyütülen hücrelerin invert mikroskop altında %80-90 konfluent olduğu gözlemlendiğinde hücrelere pasaj işlemi yapılmıştır. -20°C'de muhafaza edilen %0.05'lik tripsin/EDTA 37°C su banyosunda çözdürülmüştür. Besi yeri cam pastör pipet ile aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 2.5 mL tripsin/EDTA eklenerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 5 dk bekletilmiştir. İvert mikroskop altında incelenen hücrelerin tamamen kalktığından emin olunduktan sonra tripsin/EDTA'nın 2 katı olarak şekilde 5 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri eklenerek enziminin inaktive olması sağlanmıştır. Serolojik pipet ile yıkama işlemiyle toplanan hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 4°C

soğutmalı santrifüj yardımıyla 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant cam pipet yardımıyla aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüpe 1 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri ilave edilmiştir. Bol pipetaj yapılarak peletlenmiş hücrelerin çözelti içerisine dağılması sağlanmıştır. Hücreler 12 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri içeren 75 cm<sup>2</sup> flaklara aktarılmış ve 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

#### **4.5.Hücrelerin Sayımı**

Farklılaştırma deneyinde kullanılmak üzere 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 75cm<sup>2</sup> flaskta büyütülen ve %80-90 konflüente olduğu gözlemlenen hücrelerin Tryphan Blue boyası ile sayımı yapılmıştır. Öncelikle besi yeri cam pastör pipet ile aspire edilmiş ve hücreler 5 mL %0.05 tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 5 dk bekletilen hücrelerin tamamen kalktığını invert mikroskop altında gözlemlendikten sonra ve 10 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri ilave edilerek enzimin aktivitesi inhibe edilmiştir. Serolojik pipet ile yıkama işlemiyle toplanan hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 4°C soğutmalı santrifüj yardımıyla 3600 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant cam pastör pipet yardımıyla aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüpe 2 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri ilave edilmiştir. Bu çözülden 10 µL alınarak 10 µL Tryphan Blue boyası ile pipetaj yardımıyla karıştırıldı ve karışımın 10 µL'si Thoma lamına aktarılmıştır. İvert mikroskopta 10X büyütme yapılarak 16 kareden oluşan Thoma lamının 4 alanından 1 tanesi sayılmış ve karedeki (toplam hücre sayısı x2) x 10<sup>4</sup> formülü kullanılarak hücre sayısı hesaplanmıştır.

#### **4.6.Hücrelerin Dondurulması**

Dondurma işlemi için kullanılacak hücrelerin %80-90 konfluent olduğu gözlemlendikten sonra ortamdaki besi yeri cam pastör pipet ile aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 2.5 mL tripsin/EDTA eklenerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 5 dk bekletilmiştir. İvert mikroskop altında incelenen hücrelerin tamamen kalktığından emin olunduktan sonra tripsin/EDTA'nın 2 katı olarak şekilde 5 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri eklenerek enziminin inaktive olması sağlanmıştır. Serolojik pipet ile yıkama işlemiyle toplanan hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 4°C soğutmalı santrifüj yardımıyla 3600 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant cam pipet yardımıyla aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler kendisine özgü dondurma mediumdan 5 mL kullanılarak

falkon tüp içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra falkondaki hücreler 2 mL’lik kriyo tüplere 1 mL’er olacak şekilde aktarılmıştır. Kademeli dondurma işlemi yapılmış ve içerisinde izopropil alkol bulunan -20°C’deki hücre dondurma kabında 3-4 saat bekletilmiştir. Hücreler daha sonrasında -80°C dondurucuda aktarılarak depolanmıştır. Hücrelerin dondurulmasında kullanılan besiyeri Çizelge 4.1’de belirtilen malzemeler kullanılarak hazırlanmıştır.

**Çizelge 4.1.** Dondurma Besiyeri İçeriği

	Oran (%)
İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri	50
FBS	40
DMSO	10

#### 4.7. Paklitaksel Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Çalışmada Sigma Aldrich firmasından T1912 katalog numarası ile temin edilen 1 mg paklitaksel (Taxol®) kullanılmış olup bileşik *Taxus yunnanensis* bitkisinden izole edilmiştir. Bileşiğin molekül ağırlığı 853.91 g/mol’dür. İnsan Öncü Adiposit hücrelerine verilecek paklitaksel konsantrasyonu hazırlanırken aşağıda belirtilen Çizelge 4.2’deki ana ve ara stoklar hazırlanmıştır. İnsan Öncü Adiposit hücrelerini farklılaştırma aşamasında ara stoktan 1 µL alınarak 1 mL İnsan Öncü Adiposit Farklılaşma Besiyeri ile birlikte kontrol kuyucukları dışındaki tüm kuyucuklardaki hücrelere uygulanmıştır. Hücrelere verilen paklitakselin final konsantrasyonu 50 nM olarak belirlenmiştir. Her kuyucuğa uygulanan DMSO miktarı %0.05’i geçmemiştir (Choron et al, 2015; Merchan et al, 2005).

**Çizelge 4.2.** Paklitaksel Konsantrasyonlarının Hazırlanışı ve Karışım Miktarı

Stok Adı	Karışım Miktarları	Konsantrasyon
Ana Stok	1 mg Paklitaksel + 937.8 µL DMSO	1.25 mM
Ara Stok	10 µL Ara Stok + 90 µL DMSO	5 µM

#### 4.8.Hücrelerin Farklılaştırılması

Hücre sayımı yapıldıktan sonra  $10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu pleyte 1 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri ile ekimi yapılmıştır. Hücreler  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  inkübatörde bekletilerek %100 oranında konflent olmaları sağlanmış ve bu süreç yaklaşık 24 saat sürmüştür. Daha sonra kuyucuklardan İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri aspire edilerek yerine hücrelerinin farklılaştırılmasında kullanılan özel bir besi yeri olan İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri'nden 1 mL eklenmiştir.  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  inkübatördeki hücrelere 15 gün boyunca 3 gün ara ile eski besiyeri çekilip 1 mL İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri ve 50 nM paklitaksel verilmiştir. Farklılaştırma deneyi Çizelge 4.3'te verilen çalışma planına göre Oil Red O boyama ve gen ifade analizi için 2 kopya olarak 2 biyolojik tekrarlı şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.3. Öncü Adiposit Farklılaştırma Deneyi Aşamaları

Farklılaştırılan Hücre Grupları	Konfluent	1. Uygulama	2. Uygulama	3. Uygulama	4. Uygulama	5. Uygulama
0.GÜN	BB	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel
3.GÜN	BB	FB	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel
6.GÜN	BB	FB	FB	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel
9.GÜN	BB	FB	FB	FB	FB + 50 nM Paklitaksel	FB + 50 nM Paklitaksel
12.GÜN	BB	FB	FB	FB	FB	FB + 50 nM Paklitaksel
DMSO	BB	FB + DMSO	FB + DMSO	FB + DMSO	FB + DMSO	FB + DMSO
KONTROL (-)	BB	FB	FB	FB	FB	FB

## **4.9.Oil Red O Boyama Yöntemi**

### **4.9.1. Oil Red O Çözeltilerin Hazırlanması**

Oil Red O boyama yöntemi, lipit damlacıklarını güçlü şekilde boyayan bir boyadır. Ucuz ve güvenli olup boyama işlemi birkaç saat içinde gerçekleştirilebilmektedir. Oil Red O boyası, öncü adipositleri adipositlerden ayırt etmek için 40 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Bununla birlikte son zamanlarda, Oil Red O boyama yöntemi adiposit farklılaşmasının kantitatif analizi için de kullanılmaktadır. Kantitatif ölçümde genellikle boya isopropanol kullanılarak hücrelerden ayrıştırılır ve absorbans ölçümü 518 nm veya yakınındaki bir değerde spektrofotometrik olarak belirlenir. (Kraus et al, 2016) Oil Red O çalışma solüsyonu çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. 6 ml Oil Red O stok solüsyonu 4 mL ddH<sub>2</sub>O ile karıştırılmıştır. 20 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra 0.22 µM'lik filtreden geçirilerek hücrelere uygulanmıştır.

### **4.9.2. Oil Red O Boyama Protokolü**

Farklılaştırma deneyinin 15. gününde 12 kuyucuklu pleytlerdeki hücrelerde lipit birikiminin nitel analizi için Oil Red O boyama yöntemi kullanılmıştır. Oil Red O boyama için hazırlanan pleyteki tüm kuyucuklardan İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1 mL PBS ile 1 kez yıkanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL %10 formalin ekleerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Formalin cam pastör pipet yardımıyla aspire edilmiştir. Hücreler 2 kez 1.5 mL ddH<sub>2</sub>O ile yıkanmıştır. Ardından hücreler 1 mL %60 isopropanol ile yıkanarak 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Pleytin tamamen kurduğundan emin olunduktan sonra kuyucuklara 1 mL yeni hazırlanmış olan Oil Red O Working Solution eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonrasında Oil Red O boyasının fazlası ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 kez 1,5 mL ddH<sub>2</sub>O ile yıkanmıştır. Yıkanan solüsyon aspire edildikten sonra 1 mL PBS eklenmiştir. Pleyt tamamen kurduktan sonra Oil Red O boyası ile kaplanmış lipit damlacıklarının morfolojik görüntüleri invert mikroskop ile incelenerek fotoğrafları çekilmiştir. Hücrelerde biriken Oil Red O miktarı ile lipit damlacığı birikimi doğru orantılı olduğu için adiposit hücrelerinin farklılaşması hakkında doğrudan bilgi vermektedir. Nicel analiz için Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazı yardımıyla 500 nm'de absorbans ölçümü yapıldı (You et al, 2014).

## 4.10. Gen İfade Analizi

### 4.10.1. Total RNA İzolasyonu

50 nM paklitaksel verilerek öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaştırılması sağlandıktan sonra paklitakselin kanser kaşeksi ile ilişkili gen olan AZGP1 üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 15. gün sonunda toplanan hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için hücre sayımı yapıldıktan sonra  $10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu pleyte 1 mL İnsan Pradiposit Büyüme Besiyeri ile ekimi yapılan hücreler kullanılmıştır. Hücreler  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  inkübatörde bekletilerek %100 oranında konflent olmaları sağlanmış ve bu süreç yaklaşık 24 saat sürmüştür. Daha sonra kuyucuklardan İnsan Pradiposit Büyüme Besiyeri aspire edilerek yerine hücrelerinin farklılaştırılmasında kullanılan özel bir besi yeri olan İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri'nden 1 mL eklenmiştir.  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  inkübatördeki hücelere 15 gün boyunca 3 gün ara ile eski besi yeri çekilip 1mL İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri ve 50 nM paklitaksel verilmiştir. Farklılaştırmanın 15. gününde total RNA izolasyonunda kullanılacak hücrelerin bulunduğu kuyucuklardan İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 300  $\mu\text{L}$  %0.05 tripsin/EDTA eklenerek hücreler  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  inkübatörde 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda invert mikroskop altında incelenen hücrelerim pleyt yüzeyinden kalktığı gözlemlendikten sonra 600  $\mu\text{L}$  besi yeri eklenmiştir. Daha sonra hücreler 1.5 mL eppendorf tüplere aktarılmış ve 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilmiştir. Hücre peletlerinden total RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0731) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonunda kullanılan hücreler aşağıda belirtilmiştir.

- Farklılaştırmanın ilk gününden itibaren 3 gün ara ile 5 kez DM + 50 nM paklitaksel verilmiş 0.gün öncü adipositleri
- Farklılaştırmanın 3. gününden itibaren 3 gün ara ile 4 kez DM + 50 nM paklitaksel verilmiş 3.gün öncü adipositleri
- Farklılaştırmanın 6. gününden itibaren 3 gün ara ile 3 kez DM + 50 nM paklitaksel verilmiş 6.gün öncü adipositleri
- Farklılaştırmanın 9. Gününden itibaren 3 gün ara ile 2 kez DM + 50 nM paklitaksel verilmiş 9.gün öncü adipositleri

- Farklılaştırmanın 12. gününden itibaren 3 gün ara ile 1 kez DM + 50 nM paklitaksel verilmiş 12.gün öncü adipositleri
- Farklılaştırmanın ilk gününden itibaren 3 gün ara ile 5 kez DM + DMSO verilmiş (+) Kontrol öncü adipositleri
- Farklılaştırmanın ilk gününden itibaren 3 gün ara ile 5 kez DM verilmiş (-) Kontrol Öncü Adipositleri

Total RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit prokolüne uygun şekilde aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Çalışmaya başlamadan önce 40 mL Yıkama Tamponu 1'e 10 mL etanol (%96-100) ve 23 mL Yıkama Tamponu 2'ye 39 mL etanol (%96-100) eklenerek tamponlar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Total RNA izolasyonunda kullanılacak her 1 mL Lizis Tamponu için 20 µL 14.3 M β-merkaptotanol eklenerek karıştırılmıştır. 1 örnekten RNA izolasyonu yapmak için 600 µL Lizis tamponu kullanılması gerektiğinden 14 örnek için 6.4 mL Lizis Tamponu'na 128 µL 14.3 M β-merkaptotanol eklenerek tampon kullanıma hazır hale getirilmiştir.
2. RNA izole edilecek hücre peletlerinin her birine 600 µL Lizis Tamponu eklenerek pipetaj ile tekrar süspansiyon olmaları sağlanmış ve çözünen hücre peleti 10 sn boyunca vorteklenmiştir.
3. Vortekslenen hücre süspansiyonlarına 360 µL %96-100 etanol eklendi ve pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir.
4. 700 µL lizat toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş GeneJet RNA kolonuna eklenmiş ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan akan kısım boşaltılarak GeneJet RNA kolonu aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kalan hücre lizatı da GeneJet RNA toplama kolonuna eklenerek 12000 g'de 1 dk daha santrifüj edilmiştir. Daha sonra toplama tüpleri atılarak GeneJet RNA toplama kolonları 2 mL'lik yeni toplama tüplerine aktarılmıştır.
5. GeneJet RNA toplama kolonlarına 700 µL Yıkama Tamponu 1 eklenmiş ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan akan kısım dökülerek ortamdan uzaklaştırılmış ve kolon toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
6. GeneJet RNA toplama kolonlarına 600 µL Yıkama Tamponu 2 eklenmiş ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan akan kısım dökülerek ortamdan uzaklaştırılmış ve kolon toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.

7. GeneJet RNA toplama kolonlarına 250 µL Yıkama Tamponu 2 eklenmiş ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan akan kısım dökülerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kolon toplama tüpüne geri yerleştirilmiş ve üreticinin talimatları doğrultusunda kolonlara hiçbir şey eklenmeden maksimum hız 14000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan akan kısım dökülerek ortamdan uzaklaştırılmış ve GeneJet RNA toplama kolonları 1.5 mL'lik RNaz içermeyen mikro santrifüj tüplerine yerleştirilmiştir.
8. GeneJet RNA toplama kolonlarının tam merkezine pipet ucu değdirilmeden 100 µL nükleaz içermeyen su eklenmiş ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edilerek RNA'nın kolondan ayrışması sağlanmıştır.

#### 4.10.2. İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini

Hücre peletinden izole edilen total RNA'nın kalite ve miktar analizi µDrop Plate okuyucu yardımıyla "Multiskan™ GO Microplate Spektrophotometer" cihazında absorbans değerleri ölçülerek belirlenmiştir. RNA'ların konsantrasyon miktarları Çizelge 4.4'te verilmiş olup tüm RNA'ların konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

**Çizelge 4.4.** Elde Edilen RNA Konsantrasyonları

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/µL)
0.Gün	68,92
3.Gün	65,31
6.Gün	38,31
9.Gün	24,92
12.Gün	27,00
Kontrol	25,38
DMSO	30,54

#### 4.10.3. cDNA Sentezi

İzolasyonu yapılan total RNA'lardan cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, #K1622) protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** RNA Örneklerinin Ters Transkriptaz PCR İşlemine Hazırlanması

<b>Bileşen</b>	<b>Konsantrasyon (ng/µL)</b>	<b>Final Konsantrasyon</b>
Kalıp RNA	4 µl	1 µg
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	1 µl	
Nükleaz içermeyen su	7 µl	-
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl	1X
Ribolock RNaz İnhibitörü (20 U/µL)	1 µl	
10nM dNTP Karışımı	2 µl	1X
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl	
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>	

cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler hazırlandıktan sonra Bio-Rad, T100 PCR Thermal Cycler cihazı kullanılarak total RNA karışımından cDNA örnekleri elde edilmiştir. Termal döngü için Çizelge 4.6’da verilen koşullar uygulanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri buz üzerine alınmış ve Real Time-PCR yapılana kadar -80°’de saklanmıştır.

**Çizelge 4.6.** cDNA Sentezi için Uygulanan PCR Koşulları

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (dk)</b>
42	60
25	5
70	5

#### **4.10.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)**

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), belirli bir nükleik asit segmentinin amplifikasyonu için kullanılan bir yöntemdir. Amplifikasyon işlemi denatürasyon, primer bağlanması ve uzama adı verilen üç aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon adımında, şablon nükleik asit 92-98°C’de yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak tek iplikli hale getirilir. Daha sonra reaksiyon sıcaklığı 65-72°C arasına düşürülerek ileri ve geri primerlerin denatüre edilmiş şablona bağlanması sağlanır. Uzama aşamasında ise primer bağlanmış şablonuna dNTP’ler eklenerek zincir

replikasyonu gerçekleştirilir. Bu aşamalar bir döngü şeklinde gerçekleştirilerek 25-40 kez tekrarlanır (Adams, 2020).

Amplifikasyon işlemi ile elde edilen ürünlerin tespiti için sıklıkla çift zincirli DNA boyaları kullanılmaktadır. SYBR Green I sadece çift iplikli DNA'ların boyanmasında kullanılan bir boyadır. Primerlerin bağlanması ile gerçekleştirilen replikasyon aşamasında hedef şablonun çift iplik şeklinde gelmesi ile şablona bağlanan boya ışığa verir ve bu ışımının sınır değerini aştığı nokta "Ct değeri" olarak adlandırılır (Adams, 2020).

Paklitaksel uygulanan öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaştırılması sağlandıktan sonra bu hücrelerden elde edilen cDNA'lar ile AZGP1 ve PPAR $\gamma$ 'nın ekspresyon seviyeleri Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR Detection System cihazı aracılığıyla tespit edilmiştir. Gen ekspresyon analizinde RealQ Plus 2x Master Mix Green Without ROX™ Kit'i kullanılmıştır. Analiz üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda Çizelge 4.7'de verilen RT-PCR bileşenleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.7.** AZGP1 ve PPAR $\gamma$ 'nın Gen Ekspresyon Seviyesi Ölçümü İçin Kullanılan PCR Bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon (ng/ $\mu$ L)	Final Konsantrasyon
RealQ Plus 2x Master Mix	12.5 $\mu$ L	1X
10nM İleri Primer	0.5 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
10nM Geri Primer	0.5 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Nükleaz İçermeyen Su	9.5 $\mu$ L	-
cDNA	2 $\mu$ L	20 ng
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>	

- Tabloda verilen miktarlar kullanılarak GAPDH ve AZGP1 geni için ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlanmıştır.
- Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR Detection System cihazına özgü pleyte her bir örnek için reaksiyon karışımı koyulmuştur.

- Her bir örnek için cDNA ilave edilerek toplam hacim 25 µL'ye tamamlanmıştır. 96 kuyucuklu pleytin üstü PCR kapatıcı film ile kaplanmıştır.
- Pleyt kısa süre santrifüjlenmiş ve RT-PCR cihazına yerleştirilmiştir. Analiz üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda Çizelge 4.8'de belirtilen RT-PCR koşullarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.8.** AZGP1 ve PPAR $\gamma$ 'nın Gen İfadesi Ölçümü için RT-PCR Koşulları

Program	Döngü	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	95°C	15 dk
Denatürasyonu			
Denatürasyonu		95°C	30 sn
Bağlanma	40	59°C	30 sn
Uzama		72°C	30 sn

Bu çalışmada RT-PCR reaksiyonları 2 teknik tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Gerçekleştirilen reaksiyonlarda referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Çalışmada incelenen her bir örneğe ait olan AZGP1 ve PPAR $\gamma$  geninin siklus eşik değeri (threshold cycle/Ct), referans gen olarak kullanılan o örneğe ait GAPDH Ct değerlerinden çıkarılarak normalize edilmiş ve delta siklus eşik ( $\Delta$ Ct) değerleri hesaplanmıştır. Her bir örneğin  $\Delta$ Ct değeri, kontrol grubunun Ct değerlerinden çıkarılarak  $\Delta\Delta$ Ct değerleri hesaplanmıştır. AZGP1 geninin ekspresyon değişimi kontrol grubu hücreleri ile kıyaslanmış ve  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü kullanılarak incelenmiştir.

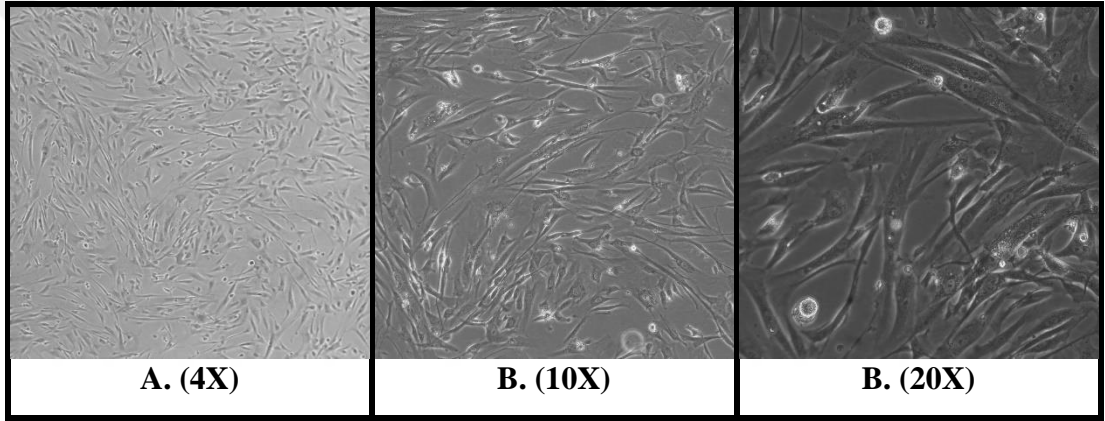
#### 4.11. Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin analizinde SPSS 22.0 ve Excel 2019 paket programları kullanılmıştır. Çift kuyruklu dağılım ve iki örnekli eşit varyasyon (homoskedastik) T-test analizinin kullanıldığı çalışmada  $p \leq 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 5. BULGULAR

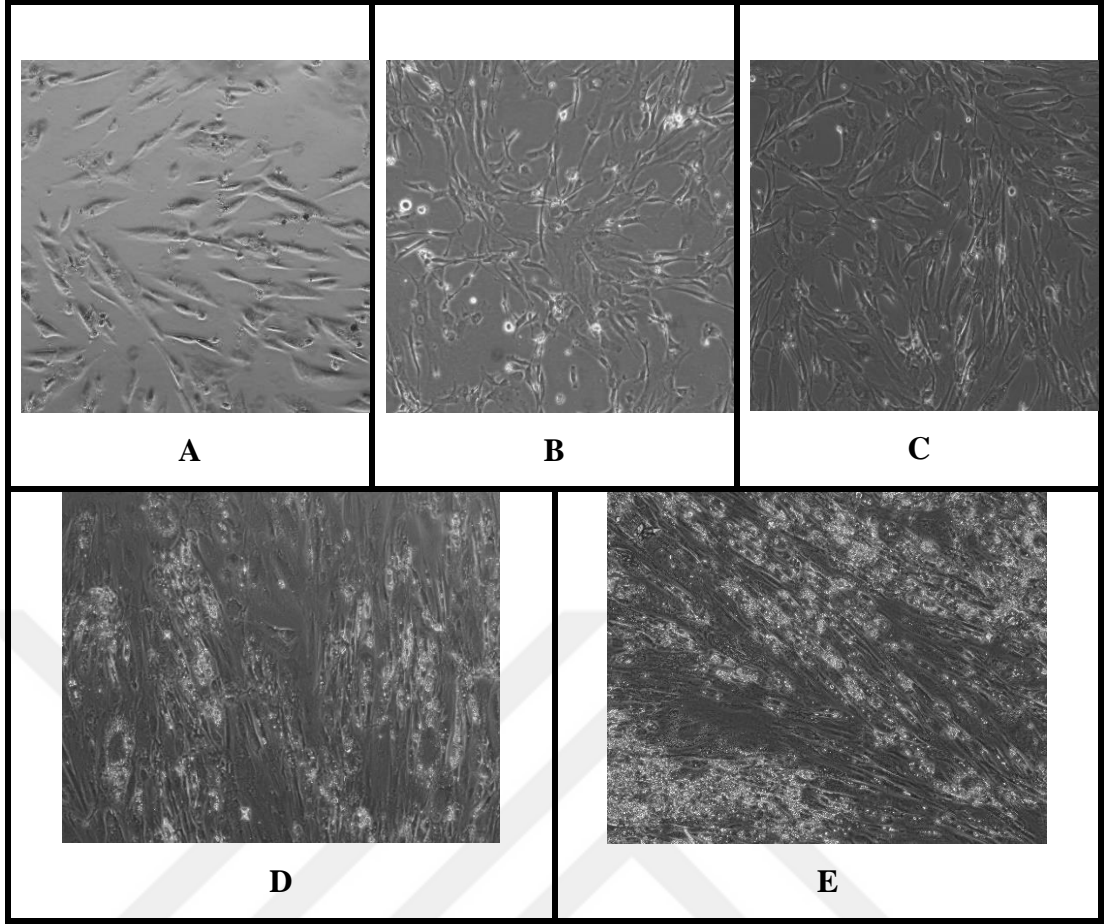
### 5.1. Öncü Adipositlerin Olgun Adipositlere Farklılaşması

Farklılaşma deneyi öncesinde 12 kuyucuklu pleytlere 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 1 mL İnsan Öncü Adiposit Büyüme Besiyeri ile ekimi yapılan öncü adipositlerin %100 konfluent olduğunu invert mikroskop altında gözlemlendi. Şekil 5.1’de farklılaştırma deneyi öncesinde konflüente olmuş ve öncü adiposit karakteri kazanmış hücrelerin 4X, 10X ve 20X’deki görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 5.1.** Konflüente Olmuş Öncü Adipositlerin Farklılaştırma Deneyi Öncesinde Çekilmiş Görüntüleri (Zeiss, Axio Vert.A1 Inverted Microscope)

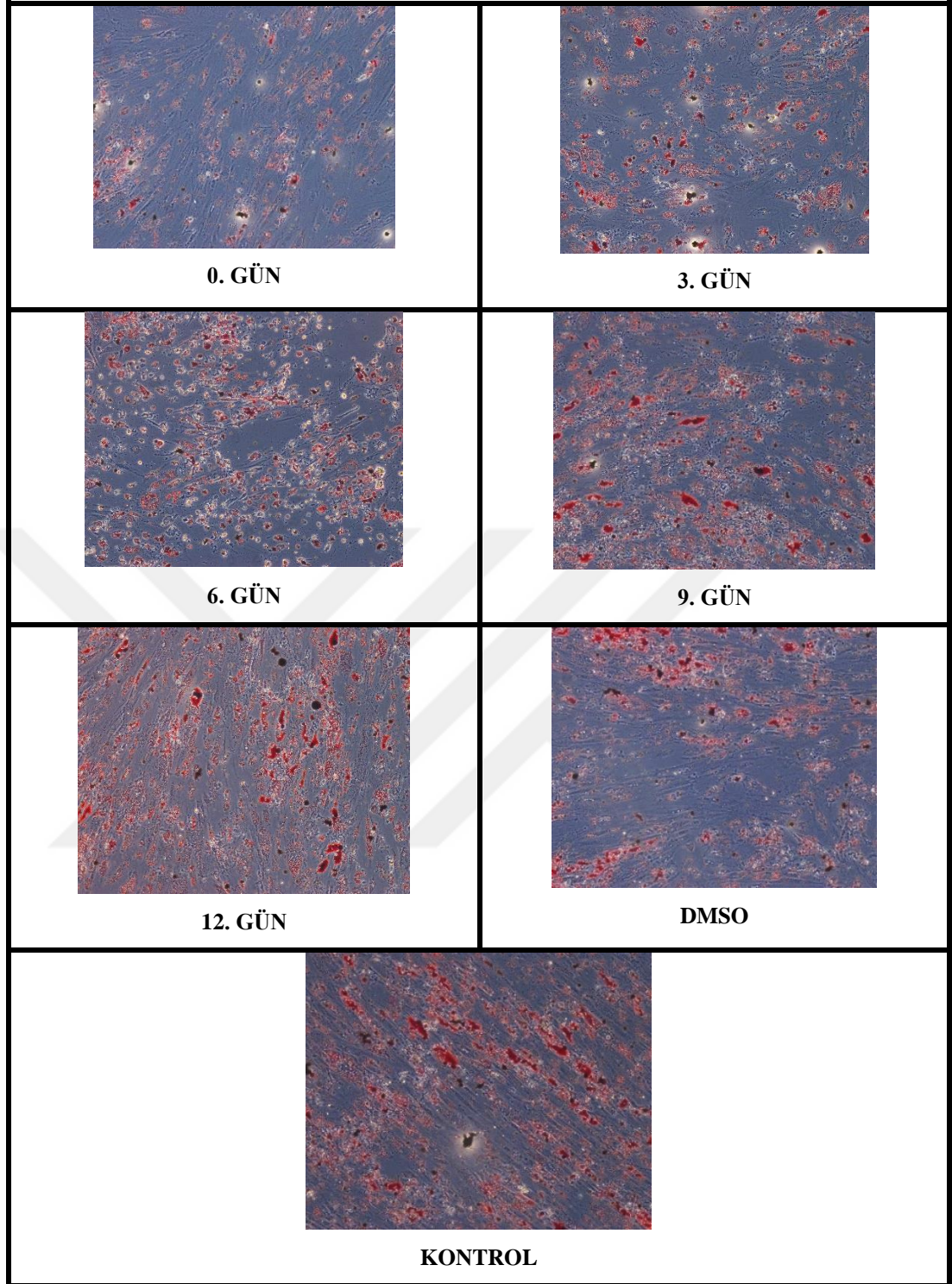
Şekil 5.2’de yeni ekilmiş ve pleyt yüzeyine tutunmuş kontrol grubu hücreler (A), çoğalmış ve öncü adiposit görünümü kazanmış kontrol grubu hücreler (B), konflüente olmuş hücreler kontrol grubu hücreleri (C) ile İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri etkisiyle farklılaşmış kontrol grubu hücreleri (D) ve lipid damlacıkları oluşturmuş kontrol grubu adiposit hücrelerinin (E) Oil Red O boyama yapılmadan önce mikroskop altında çekilmiş görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 5.2.** Kontrol Grubu Öncü Adipositlerin Farklılaşma Aşamaları (Zeiss, Axio Vert.A1 Inverted Microscope, 10X) A: Yeni ekilmiş ve plete tutunmuş kontrol grubu hücreleri, B: Çoğalmış ve öncü adiposit karakteri kazanmış kontrol grubu hücreleri, C: Konflüente olmuş kontrol grubu hücreleri, D: Farklılaşmaya başlamış kontrol grubu hücreleri, E: Farklılaşma deneyi sonucunda olgun adipositlere farklılaşan kontrol grubu hücreleri

## **5.2. Paklitakselin Adipogenez Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi**

İnsan öncü adiposit hücrelerinin olgun adipositlere farklılaşmasının incelendiği bu çalışmada Çizelge 4.3'te belirtilen kültür koşulları altındaki 12 kuyucuklu pleytlerdeki hücrelere, 3 gün ara ile 15 gün boyunca İnsan Adiposit Farklılaşma Besiyeri ve 50 nM paklitaksel uygulandı. Çalışma sonucunda öncü adipositlerde oluşan lipit birikimi, Oil Red O boyama yöntemi kullanılarak incelendi. Paklitakselin farklılaştırılan hücre gruplarında lipit birikimine olan etkisi Şekil 5.3'te verilmiştir.



**Şekil 5.3.** Paklitakselin Adipogenez Üzerindeki Etkisi (Zeiss, Axio Vert.A1 Invert Microscope, 10X)

Şekil 5.3'te görüldüğü gibi farklı zaman dilimlerinde 50 nM paklitaksel verilerek farklılaştırılan öncü adipositlerdeki lipit damlacığı miktarı, kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında en az lipit birikiminin 0. gün grubundaki hücrelerde olduğu gözlemlenmiştir. 0. gün grubundaki hücrelerdeki lipit birikimini

sırası ile 3. gün, 6. gün 9. gün ve 12. gün grubundaki hücreler izlemiştir. En fazla lipit birikiminin ise 12. Gün grubundaki hücrelerde olduğu gözlemlenmiştir. 0. gün grubundaki hücelere tüm farklılaşma süresi boyunca paklitaksel uygulandığı göz önüne alındığında, paklitakselin lipit birikimini ve adipogenezi negatif yönde etkilediği belirlenmiştir.

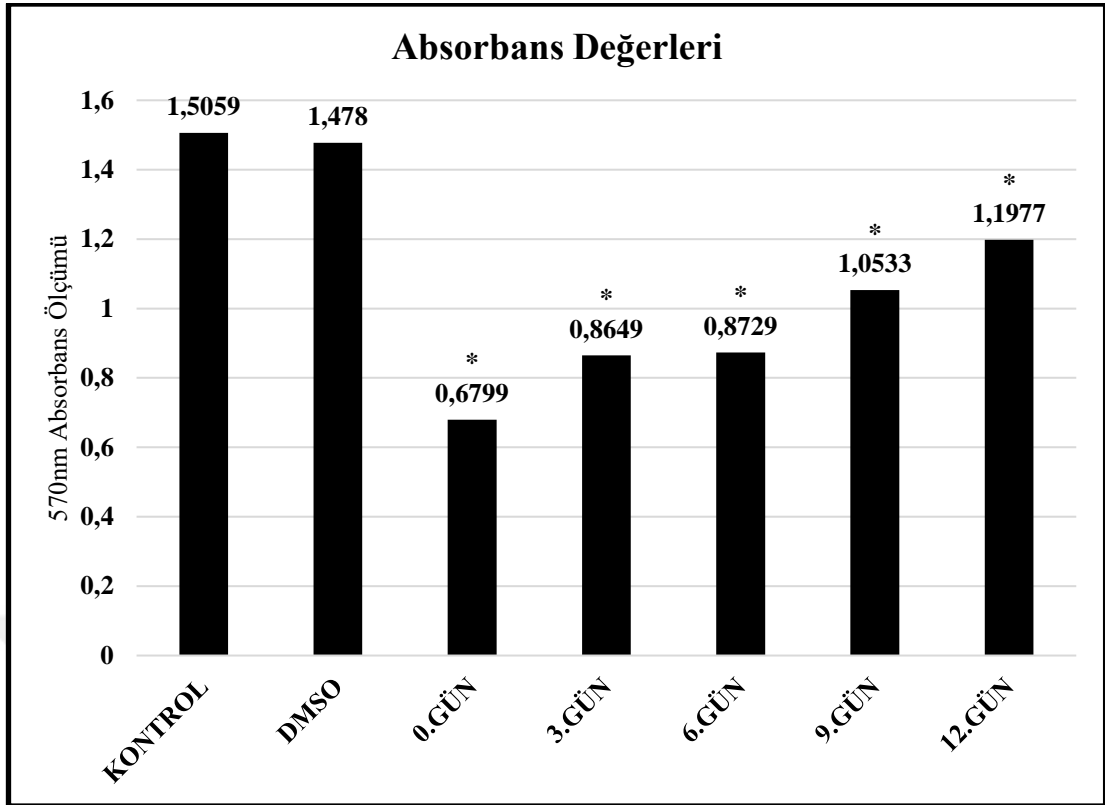
Oil Red O boyama yapılan olgun adiposit hücrelerindeki lipit birikiminin niceliksel olarak belirlenebilmesi için spektrofotometre cihazı kullanılarak 570 nm’de absorbans değeri ölçüldü. Absorbans değerleri Çizelge 5.2’de verildiği gibi kontrol ve DMSO kuyucuklarına göre karşılaştırıldı. Elde edilen absorbans değerleri Çizelge 5.1’de Ort  $\pm$  SD şeklinde tabloda verildi.

**Çizelge 5.1.** Farklı Zaman Dilimlerinde Verilen Paklitakselin Lipit Birikimi Üzerindeki Etkisi

	KONTROL	DMSO	0.GÜN	3.GÜN	6.GÜN	9.GÜN	12.GÜN
<b>Fark. Besiyeri</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Paklitaksel</b>	-	-	5 kez	4 kez	3 kez	2 kez	1 kez
<b>Absorbans (570 nm)</b>	1,50 $\pm$ 0,83	1,47 $\pm$ 0,37	0,67 $\pm$ 0,22 *	0,86 $\pm$ 0,07 *	0,87 $\pm$ 0,13 *	1,05 $\pm$ 0,03 *	1,19 $\pm$ 0,08 *

(\*p<0.05, Kontrol grubundaki hücreler ile kıyaslandığında)

Oil Red O boyama işlemi yapıldıktan sonra absorbans değerleri incelenerek olgun adiposit hücrelerine farklılaşmış kontrol grubu hücreleri ile farklı zaman dilimlerinde paklitaksel verilen hücreler karşılaştırıldı (Şekil 5.4) ve elde edilen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0.05).



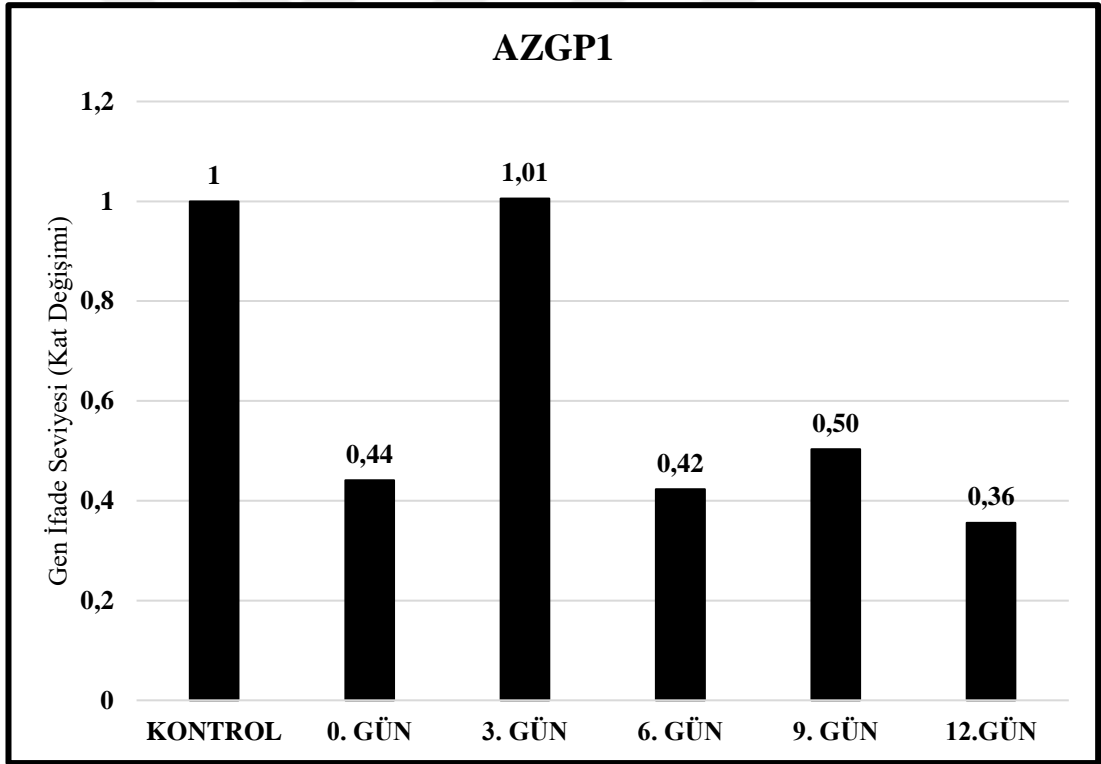
Şekil 5.4. Paklitaksel Verilen Öncü Adipositlerin Farklılaşması (\*p<0.05)

### 5.3. Adipogenez Sürecinde Paklitakselin Gen İfadesi Değişimlerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Öncü adipositlerin 3 ara ile 15 gün boyunca Farklılaşma Besiyeri ve 50nM paklitaksel verilerek farklılaştırılması sağlandıktan sonra hücreler toplandı ve paklitakselin gen ifadesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 15. gün sonunda toplanan hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonundan sonra örnekler ters transkriptaz PCR kullanılarak cDNA'ya çevrildi. AZGP1 ve PPAR $\gamma$  geninin ekspresyon seviyesinin belirlenebilmesi için RT-PCR reaksiyonu Çizelge 4.6'daki koşullarda gerçekleştirildi. Gen ifade değişimi hesaplanırken göreceli miktar belirleme (relative quantitation) yöntemi kullanıldı. Gen ifade seviyesinin ölçümünde normalizasyon için referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Kontrol grubundaki farklılaşmış adiposit hücrelerinin ifade değeri 1 kabul edildi ve adiposit farklılaşması sürecinde farklı zamanlarda paklitaksel verilerek farklılaştırılan hücrelerin ifadesindeki değişim kat olarak ifade edildi.

### 5.3.1. Adipogenez Sürecinde Paklitakselin AZGP1 Gen İfadesi Değişimine Olan Etkisinin Belirlenmesi

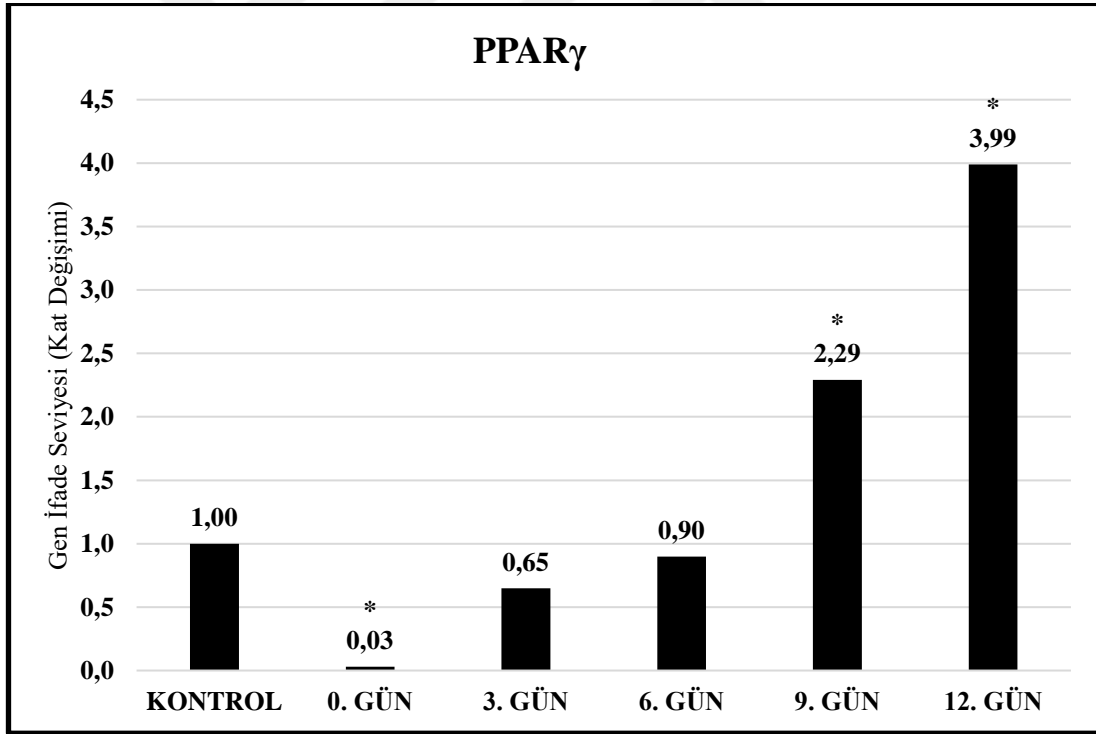
Farklılaştırmanın ilk gününden itibaren 50 nM paklitaksel verilmiş 0.gün öncü adipositler ile kontrol grubu öncü adipositler kıyaslandığında kaşeksi ile ilişkili AZGP1 geninin, Şekil 5.5'teki gibi, 0,44 kat daha az ifadelenme gösterdiği tespit edildi. Bununla birlikte, farklılaştırmanın 3. gününden itibaren paklitaksel verilmiş 3. gün öncü adipositler ile kontrol grubuyla kıyaslandığında AZGP1 geninin ifade seviyesinde değişme olmadığı gözlemlendi. 6. gün, 9. gün ve 12. gün öncü adipositler ile kontrol grubu kıyaslandığında AZGP1 sırasıyla yaklaşık 0,42 kat, 0,5 kat ve 0,36 kat daha az ifadelenme gösterdi. Ayrıca gen ifade seviyesindeki değişim oranları istatistiksel açıdan değerlendirildi. Kontrol grubu öncü adipositler 0.gün, 3. gün, 6. gün, 9. gün ve 12. gün öncü adipositler ile kıyaslandığında p değerleri sırasıyla 0,121, 0,777, 0,703, 0,177 ve 0,068 olarak bulundu.



Şekil 5.5. Öncü Adipositlerde Farklılaşma Sonucu AZGP1 Geninin İfade Seviyelerinin Analizi

### 5.3.2. Adipogenez Sürecinde Paklitakselin PPAR $\gamma$ Gen İfadesi Değişimine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Farklılaştırmanın ilk gününden itibaren 50 nM paklitaksel verilmiş 0. gün öncü adipositler ile kontrol grubu öncü adiposit hücreleri kıyaslandığında, Şekil 5.6'daki gibi, adipogenez ile ilişkili PPAR $\gamma$  geni ifadesinin baskılandığı tespit edildi. Bununla birlikte, farklılaştırmanın 3. gününden itibaren paklitaksel verilmiş 3. gün öncü adipositleri ile kontrol grubu ile kıyaslandığında PPAR $\gamma$ 'nın 0.65 kat daha az ifadelenme gösterdiği belirlendi. 6. gün öncü adipositleri ile kontrol grubuyla kıyaslandığında PPAR $\gamma$ 'nın 0.9 kat daha az ifadelenme gösterdiği tespit edildi. Ancak 9. gün ve 12. gün hücrelerinde bu oranın kontrol grubu öncü adipositlere kıyasla sırasıyla 2.29 ve 3.99 kat daha fazla ifadelenme gösterdi. Ayrıca gen ifade seviyesindeki değişim oranları istatistiksel açıdan değerlendirildi. Kontrol grubu öncü adipositleri 0. gün, 3. gün, 6. gün, 9. gün ve 12. gün öncü adipositler ile kıyaslandığında p değerleri sırasıyla 0.000, 0.100, 0.604, 0.015 ve 0.003 olarak bulundu.



Şekil 5.6. Öncü Adipositlerde Farklılaşma Sonucu PPAR $\gamma$  Geninin İfade Seviyelerinin Analizi (\*p<0.05)

## 6. TARTIŞMA

Kanser kaşeksisi, sadece iskelet kaslarını etkilemekle kalmayan aynı zamanda adipoz doku kaybına da yol açan istemsiz kilo kaybı ile karakterize bir sendromdur (Fearon et al, 2011). Kaşeksi pek çok doku ve organı etkilediğinden performansı ve sağ kalımı düşürür, yaşam kalitesini bozar, antikanser tedavilerin toksik etkisini artırır (van de Worp et al, 2020). Kanser sırasında vücut ağırlığı kaybı, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Kansere bağlı kaşeksinin yanı sıra, kemoterapi de vücut ağırlığı kaybına neden olabilir. Yapılan çalışmalarda çeşitli kemoterapik ajanların vücut ağırlığı kaybına (Hajjaji et al, 2012) ve kaşeksiye neden oldukları bildirilmiştir (Huang et al, 2019). ZAG, kaşektik hastalarda yüksek oranda ifade edilen ve AZGP1 geni tarafından kodlanan bir yağ katabolizmasının ve kaşeksinin bir belirtecidir (Mracek et al, 2011). Hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalarda adipoz dokuda artan ZAG ifadesi, lipoliz, yağ ve kilo kaybı ile ilişkilendirilmiştir (Kong et al, 2010). Kaşektik hastalarda dolaşımında yüksek oranda bulunurken obez bireylerde serum ZAG düzeylerinin arttığı ve azaldığı bildirilmiştir. Adipositlerin kahverengileşmesini UCP'lerin yukarı regülasyonu yoluyla destekleyen ZAG, adipositlerde yağ oksidasyonunu tetikler ve enerji harcamasını artırır (Russel et al, 2011). ZAG, öncü adipositlerde PPAR $\gamma$  C/ERB $\alpha$ 'nın ekspresyonunu inhibe ederek adiposit farklılaşmasını inhibe etmektedir (Zhu et al, 2013; Xiao et al, 2017).

Bu tez çalışmasında, kemoterapi ile kanser kaşeksisinde adipoz doku kaybı arasındaki ilişkinin altında yatan olası moleküler mekanizmayı değerlendirmek için, kemoterapik ajanların adipogenezi nasıl etkilediği, kaşeksi yolağı olan AZGP1 ifadenmesi yoluyla incelenmiştir.

Adipojenik faktörlerin aşağı regülasyonu ve kanser kaşekşinin varlığına yanıt olarak adipogenezin olası bozulması yakın zamanda bildirilmiştir (Batista et al, 2013; Bing et al, 2006). Bu bağlamda, adiposit atrofisi ve adipoz doku yeniden şekillenmesi kaşekside iyi karakterize edilmesine rağmen, kaşeksi tarafından indüklenen bu tür etkilerin doğrudan tümör ve tümör konak ilişkisi tarafından salgılanan ürünlerin bir sonucu olup olmayacağı konusunda bir fikir birliği yoktur (Bing et al, 2006; Batista et

al, 2016). Kanser kaşeksisinin adipositler üzerindeki etkilerini taklit etmek için bir ortak kültür sisteminde *in vitro* adipogenezin analiz edildiği bir çalışmada, LLC akciğer karsinomu hücreleri ile fare öncü adiposit 3T3-L1 hücre hattı birlikte kültüre edilmiştir. LLC ortak kültürü, 3T3-L1 fare öncü adiposit hücrelerinde lipit birikiminin ve hacminin azalmasını destekleyerek *in vitro* adipogenezi olumsuz etkilemiştir. Bunun sonucunda adipojenik ve lipolitik gen ifadelerinde aşağı regülasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca hem tümör hücreleri hem de adipositler tarafından proinflamatuvar sitokin salgılanması yoluyla adiposit olgunlaşması inhibe edilebilmektedir (Lopes et al, 2018). FABP3, perilipin, HSL ve ATGL gibi sadece olgun adipositlerin ifade ettiği belirteçler, farklılaşma sürecinde azalmış protein ekspresyonu göstermiştir (Lopes et al, 2018). Bu sebeple, adipositlerde gözlenen lipit birikimi azalışının, adipoz dokunun azalmasından sorumlu ana faktörlerden biri olarak kabul edilen artan lipoliz sürecinden değil, adipositlerin olgunlaşmamasından kaynaklandığını belirtilmiştir (Ryden et al, 2008; Tsoli et al, 2016).

Çalışmamızda insan öncü adiposit hücrelerinde farklılaşmanın gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için Oil Red O boyama yöntemini kullanılmıştır ancak farklılaşmanın tespiti için gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesini ölçmek ve insülin bağlama metodu gibi çeşitli yöntemler de mevcuttur (Gamou and Shimizu, 1990). Literatürde en fazla kullanılan yöntem Oil Red O boyama yöntemi olduğu için bu yöntem tercih edilmiştir. Ayrıca Oil Red O boyası güvenilir, ucuz, kolay uygulanabilir bir yöntem olup mikroskop altında lipit damlacıklarını kolayca görülebildiğinden bu yöntemin tercih sebeplerindedir.

Kanser ilerledikçe hastalarının çoğu, artan lipoliz ve yağ oksidasyonu, azalmış lipogenez, bozulmuş lipit birikimi ve adipogenezden kaynaklanabilecek vücut ağırlığı ve adipoz doku yaşar. Kemoterapötik ilaçlar, insan adiposit kök hücrelerinin adipojenik farklılaşmasını inhibe ederek adipoz dokuda adipogenezini bozabilmektedir (Ebadi and Mazurak, 2014). Çalışmamızda, Oil Red O boyama yöntemi kullanılarak insan öncü adiposit hücrelerine verilen paklitakselin, lipit birikimini ve adipogenezi baskıladığı tespit ettik. Bulgularımız ile paralel şekilde Choron ve arkadaşlarının hASC üzerinde yaptığı çalışmada, 1  $\mu$ M paklitakselin adipogenezi baskıladığını gösterilmiştir (Choron et al, 2015). Ayrıca üç gün boyunca 2  $\mu$ M sisplatin uygulanan adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerde (ADSC) adipositlere, asteroitlere ve kondrositlere farklılaşma yeteneklerini korunsa

da sisplatin tedavisinden sonra adipojenik farklılaşma yeteneğinin önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir (Chang et al, 2017). Kemoterapinin ADSC'lerin farklılaşma yetenekleri üzerindeki etkisini *in vivo* araştırmak için Chang ve arkadaşları sisplatin bazlı kemoterapi almış bir donörün ADSC hücrelerini incelemiştir. Kemoterapi alan donörün ADSC'leri adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma yeteneği, kemoterapi almayan donörle kıyaslandığında adipojenik farklılaşma yeteneğinin önemli ölçüde azalttığı ancak osteojenik farklılaşma yeteneğinin arttığı gösterilmiştir (Chang et al, 2017). Bununla birlikte, kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi müdahale kombinasyonları birlikte kullanıldığı bilinmektedir. Kemoterapi rejimleri farklı yolları hedefleyen çeşitli kemoterapi ajanların bir bileşimi olup aylar ve yıllar içerisinde hastalara defalarca kez verilebilmektedir (Dasari and Tchounwou, 2014). Bu nedenle *in vitro* kemoterapik ajan tedavileri kaşektik hastaların klinik durumunu tam olarak temsil etmeyebilir (Chang et al, 2017).

Çalışmamızda, farklılaşmanın 3. gününden itibaren verilen paklitakselin insan öncü adiposit hücrelerinde kontrol hücreler ile kıyasla AZGP1 ifadenmesinin değişmediğini ancak 0. gün, 6. gün, 9. gün ve 12. günden itibaren verilen paklitakselin AZGP1 ifadenmesini azalttığını tespit ettik ancak sonuçlarımızın istatistiksel değerlendirmesi anlamlı değildi. Bao ve arkadaşlarının insan adipositlerinde ZAG ifadenmesi incelemek için SGBS (Simpson-Golabi-Behmel sendromu) adipositlerini kullanarak yaptığı çalışmada, farklılaşmanın indüksiyonu öncesinde ZAG mRNA sinyali saptanmazken indüksiyon sonrası 1. günde ve sonrasında ZAG mRNA sinyali ters transkripsiyon PCR ile tespit edilmiştir. Bu sayede, ZAG mRNA'nın yalnızca olgun adiposit hücrelerde meydana geldiğini doğrulamışlardır. Ayrıca, ZAG gen ifadenmesindeki kantitatif değişiklikleri değerlendirmek için RT-PCR yöntemi kullanılarak ZAG mRNA seviyeleri indüksiyon sonrası kademeli olarak arttığı ve 8. günde pik (2. güne kıyasla 100 kattan fazla) yaptığı saptamışlardır. Aynı çalışmada ZAG ifadenmesinin özellikle TNF- $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  reseptörü aracılığıyla düzenlendiği belirtilmiştir (Bao et al, 2005). Zhu ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise, 3T3-L1 fare öncü adipositlerine ZAG ekspresyon plazmidi transfeksiyonu sonrasında, lipid birikiminin azaldığı, farklılaşmanın inhibe olduğu ve bununla birlikte, ZAG'ın orta ve geç farklılaşma fazında PPAR $\gamma$  ve C/EBP $\alpha$  mRNA seviyelerini aşağı regüle ettiği bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, ZAG'ın adiposit farklılaşmasının orta ve geç

aşamalarında PPAR $\gamma$  ve C/EBP $\alpha$  ekspresyonunu inhibe ederek adiposit farklılaşmasını baskıladığını belirtmişlerdir (Zhu et al, 2013). İnsan öncü adiposit hücrelerine uygulanan paklitaksel, adipogenezin erken evresinde AZGP1 ifadenmesini değiştirmemiş ancak geç evresinde AZGP1 gen ifadenmesi azaltarak farklı moleküler yolları tetiklemiş ve kaşeksiye potansiyel olarak katkı sağlamış olabilir. AZGP1'in hangi moleküler yollar ile kanser kaşeksisinde rol aldığını belirlemek için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca gen düzeyindeki bu bulguların, ZAG protein seviyesindeki değişim ve muhtemel kaşeksi yolları saptanarak paklitaksel etkisinin daha iyi analiz edilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda, farklılaşmanın 0. gününden itibaren verilen paklitakselin insan öncü adiposit hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla, PPAR $\gamma$  ifadenmesini anlamlı şekilde azalttığını ancak farklılaşmanın 9. ve 12. gününden itibaren verilen paklitakselin insan öncü adipositlerinde kontrol hücrelerine kıyasla, PPAR $\gamma$  ifadenmesini anlamlı şekilde arttırdığını tespit ettik. Adiposit farklılaşmasında yer alan genlerin aşağı regülasyonunda yer alan faktörlerin, kaşektik adipoz dokuda meydana gelen metabolik ve fonksiyonel değişikliklerde anahtar rol oynayabileceği göz önüne alındığında (Batista et al, 2012), paklitakselin adipogenezin erken evresinde PPAR $\gamma$  ifadenmesini azaltması, kanser kaşeksisinde gelişiminde kemoterapik ajanların etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte PPAR $\gamma$ , yalnızca adipogenez için değil, aynı zamanda farklılaşmış durumun sürdürülmesi için de gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (Rosen et al, 2000). Ayrıca adiposit farklılaşmasının geç safhasında, farklılaşmanın tamamlanması için gerekli olan PPAR $\gamma$  ve CEBP $\alpha$ 'nın ifadelerinde artış gerçekleştiği bildirilmiştir (Chu et al, 2014). PPAR $\gamma$ , yağ asit esterizasyonu ve trigliserit sentezi için gerekli olan enzimleri kodlayan genleri de kontrol etmektedir (Rosen et al, 2000). Bu sebeple PPAR $\gamma$ 'nın baskılanması adipositlerde trigliserit birikimini azaltmaktadır. Gen ifadesi analizinde ise paklitakselin farklılaşmanın geç safhasında, kontrol grubuna kıyasla PPAR $\gamma$  ifadesini anlamlı olarak arttırdığını belirledik. Bunun artışın sebebi PPAR $\gamma$ 'nın adipogenezin geç safhasında etkin olması olabileceği gibi paklitaksel uygulaması kaynaklı da olabilir. Paklitaksel ve diğer kemoterapik ajanların kaşeksi durumunda, adipogenez üzerindeki olası etkilerini belirleyebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Adipogenez sürecinin farklı zaman dilimlerinde uygulanan paklitakselin kaşeksi üzerindeki etkisi, lipit birikimi ve kaşeksi ilişkili AZGP1 geni ifadenmesi yoluyla araştırılması amaçlanan bu çalışmada, zaman bağımlı uygulanan paklitakselin, insan öncü adiposit hücrelerinde adipogenezi ve lipit birikimini baskıladığı ( $p<0.05$ ) tespit edilmiştir. Zaman bağımlı olarak paklitaksel uygulaması sonucunda, insan öncü adipositlerde AZGP1 gen ifadesi; 0.gün, 6.gün, 9.gün ve 12.gün sırasıyla 0.42, 0.44, 0.5 ve 0.36 kat daha az ifadenme göstermiş ancak 3.günde AZGP1 ifadenmesinde bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ ). Zaman bağımlı olarak paklitaksel uygulaması sonucunda, insan öncü adipositlerinde PPAR $\gamma$  gen ifadesi; 0.gün, 3.gün ve 6.gün sırasıyla 0.03 ( $p<0.05$ ), 0.65 ve 0.9 kat daha az ifadenme göstermiş ancak 9.gün ve 12.günde sırasıyla 2.29 ( $p=0.015$ ) ve 3.99 ( $p=0.003$ ) kat daha fazla ifadenme gösterdiği belirlenmiştir.

Paklitakselin lipit birikimi ve adipogenezi baskılayıcı etkisi, kanser tedavisinde kullanılan diğer kemoterapi ajanlar ile yapılacak çalışmalar ile desteklenmelidir.

Paklitakselin lipit birikimini baskılayıcı etkisi, kaşeksi ilişkili AZGP1 ve adipogenez ilişkili PPAR $\gamma$  geni ifadesindeki değişim aracılığıyla farklı moleküler yolları tetiklemiş ve kaşeksiye potansiyel olarak katkı sağlamış olabilir. Bu sebeple paklitakselin kaşeksi üzerindeki etkisi muhtemel kaşeksi yolları tespit edilerek daha detaylı incelenmelidir.

Kanser tedavisinde farklı yolları hedefleyen kemoterapi ajanları radyoterapi, immünoterapi gibi antikanser tedaviler ve diğer kemoterapi rejimleriyle kombinasyon şeklinde uygulanabilir ve hastanın klinik durumunun seyrine göre farklı aralıklarla defalarca kez verilebilir. Bu gibi durumda *in vitro* kemoterapik ajan tedavilerinin kaşeksi üzerindeki etkisi, hastanın klinik durumu tam olarak temsil etmeyebilir. Bu sebeple, *in vitro* çalışma sonuçlarının, hayvan ve insan araştırma modellerinden elde edilecek veriler ile karşılaştırılması ve paklitaksel ile diğer kemoterapik ajanların kaşeksi üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı analiz edilmesi gerekmektedir.

Gen düzeyinde yapılan bu çalışmanın sonraki aşamalarında paklitakselin kaşeksi üzerindeki etkisi, kaşeksi biyobelirteçlerinden olan ZAG proteini düzeyinde incelenmeli ve adipogenezde rol alan diğer transkripsiyon faktörlerinden C/EBP $\alpha$  ve C/EBP $\beta$ 'nın gen ifadesindeki değişim tespit edilmelidir.



## 8. KAYNAKLAR

- Adams G.** (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3): 48-53.
- Ahima RS, Flier JS** (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 11: 327-332
- Albertus DL., Seder CW., Chen G., Wang X., Hartojo W., Lin L., ..., Beer DG.** (2008). AZGP1 autoantibody predicts survival and histone deacetylase inhibitors increase expression in lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*, 3(11): 1236-1244.
- Arends J., Bachmann P., Baracos V., Barthelemy N., Bertz H., Bozzetti F., ..., Preiser JC.** (2017). ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical nutrition*, 36(1): 11-48.
- Argilés JM., Busquets S., López-Soriano FJ.** (2011). Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *Eur. J Pharmacol*, 668: 81-86.
- Argilés JM., López-Soriano J., Almendro V., Busquets S., López-Soriano FJ.** (2005). Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med. Res. Rev.* 25: 49-65.
- Argilés JM., López-Soriano FJ., Busquets S.** (2007). Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia. *Curr. Opin. Support. Pal. Care*, 1: 293-298.
- Argilés, J. M., López-Soriano, F. J., & Busquets, S.** (2008). Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug discovery today*, 13(1-2): 73-78.
- Argilés, J. M., Olivan, M., Busquets, S., & López-Soriano, F. J.** (2010). Optimal management of cancer anorexia–cachexia syndrome. *Cancer management and research*, 2: 27.
- Aversa Z, Bonetto A, Costelli P, Minero VG, Penna F, Baccino FM, Lucia S, Rossi Fanelli F, Muscaritoli M.** (2011).  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. *Int J Oncol*, 38(3):713-20.
- Balaz M, Ukropcova B, Kurdiova T, Gajdosechova L, Vlcek M, Janakova Z.** (2015). Adipokine zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein regulated by growth hormone and linked to insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)*, 23: 322-328.
- Balaz M, Vician M, Janakova Z, Kurdiova T, Surova M, Imrich R.** (2014). Subcutaneous adipose tissue zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein is associated with adipose tissue and whole-body insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)*, 22: 1821-1829.

- Balaz̃ M, Ukropcova B, Kurdiová T, Vlcek M, Surova M, Krumpolec P.** (2014). Improved adipose tissue metabolism after 5-year growth hormone replacement therapy in growth hormone deficient adults: the role of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein. *Adipocyte*, 4: 113-122.
- Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, Trayhurn P.** (2005). Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Lett*, 579: 41-47.
- Baracos VE., Martin L., Korc M., Guttridge DC., Fearon KC.** (2018). Cancer-associated cachexia. *Nature reviews Disease primers*, 4(1): 1-18.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM.** (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*. 4(4):585-595
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S.** (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Metab.*, 298(6): E1244-E1253.
- Barneda D., Frontini A., Cinti S., Christian M.** (2013). Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the “browning” of white adipose tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(5): 924-933.
- Bar-Sela G., Zalman D., Semenysty V., & Ballan E.** (2019). The Effects of Dosage-Controlled Cannabis Capsules on Cancer-Related Cachexia and Anorexia Syndrome in Advanced Cancer Patients: Pilot Study. *Integrative cancer therapies*, 18: 1534735419881498.
- Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK.** (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 34(Suppl 1): S36- S42.
- Batista Jr ML., Henriques FS., Neves RX., Oliván MR., Matos-Neto EM., Alcantara PS., Maximiano LF., Otoch JP., Alves MJ., Seelaender M.** (2016) Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 7(1):37-47.
- Batista Jr ML., Oliván M., Alcantara PS., Sandoval R., Peres SB., Neves RX., Silverio R., Maximiano LF., Otoch JP., Seelaender M.** (2013). Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine*, 61(2):532-539.
- Batista Jr, ML., Peres SB., McDonald ME., Alcântara, PSMD., Oliván M., Otoch JP., ..., Seelaender M.** (2012). Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: possible role of nuclear transcription factors. *Cytokine*, 57(1): 9-16.
- Bing C, Bao Y, Jenkins J.** (2004). Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(8): 2500-2505.

- Bing C., Mracek T., Gao D., Trayhurn P.** (2010). Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein: an adipokine modulator of body fat mass? *International journal of obesity*, 34(11): 1559-1565.
- Bing C., Russell S., Becket E., Pope M., Tisdale M.J., Trayhurn P., Jenkins J.R.** (2006). Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br. J. Cancer*, 95(8):1028-1037.
- Bing C.** (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.
- Bohnert KR, Gallot YS, Sato S, Xiong G, Hindi SM, Kumar A.** (2016). Inhibition of ER stress and unfolding protein response pathways causes skeletal muscle wasting during cancer cachexia. *FASEB J.*, 30:3053-3068.
- Bonetto A, Aydogdu T, Jin X, Zhang Z, Zhan R, Puzis L, Koniaris LG, Zimmers TA.** (2012). JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303: E410-421.
- Braun TP, Zhu X, Szumowski M, Scott GD, Grossberg AJ, Levasseur PR, Graham K, Khan S, Damaraju S, Colmers WF.** (2011). Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Exp Med*, 208:2449-2463.
- Bürgi W., Schmid K.** (1961). Preparation and properties of Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein of normal human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 236(4): 1066-1074.
- Cabassi A., Tedeschi S.** (2013). Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein as a marker of fat catabolism in humans. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16(3): 267-271.
- Camperi A, Pin F, Costamagna D, Penna F, Menduina ML, Aversa Z, Zimmers T, Verzaro R, Fittipaldi R, Caretti G.** (2017). Vitamin D and VDR in cancer cachexia and muscle regeneration. *Oncotarget*, 8: 21778-21793.
- Cannon B, Nedergaard J, Lundberg JM, Hokfelt T, Terenius L, Goldstein M.** (2010). 'Neuropeptide tyrosine' (NPY) is co-stored with noradrenaline in vascular but not in parenchymal sympathetic nerves of brown adipose tissue. *Exp Cell Res* 164: 546-550.
- Carmona MC, Iglesias R, Obregón MJ, Darlington GJ, Villarroya F, Giralt M.** (2002). Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *The Journal of Biological Chemistry.* 277(24): 21489-21498.
- Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Duran X, Pacho'n G, Va'zquez Carballo A, Roche K** (2015). Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein modulates AKT-dependent insulin signaling in human adipocytes by activation of the PP2A phosphatase. *PLoS One*, 10: e0129644.

- Chang YH., Liu HW., Chu TY., Wen YT., Tsai RK., Ding DC.** (2017). Cisplatin-Impaired Adipogenic Differentiation of Adipose Mesenchymal Stem Cells. *Cell transplantation*, 26(6):1077-1087.
- Chen K., Shi W.** (2016). Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biology*, 37(8): 10539-10544.
- Choe SS., Huh JY., Hwang IJ., Kim JI., Kim JB.** (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*, 7:30.
- Choron RL., Chang S., Khan S., Villalobos MA., Zhang P., Carpenter JP., Liu Y.** (2015). Paclitaxel impairs adipose stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Surgical Research*, 196(2): 404-415.
- Chu DT, Malinowska E, Gawronska-Kozak B, Kozak LP.** (2014). Expression of adipocyte biomarkers in a primary cell culture models reflects preweaning adipobiology. *J Biol Chem* 289: 18478-18488.
- Cinti S.** (2011). Adipose organ development and remodeling. *Comprehensive Physiology*, 8(4): 1357-1431.
- Cinti S.** (2018). Gross Anatomy. In *Obesity, Type 2 Diabetes and the Adipose Organ*, Springe, 1-11.
- Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Penna F, Reffo P, Bonetto A, Busquets S, Bonelli G, Lopez-Soriano FJ, Doglietto GB.** (2006). IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 291: R674-683.
- Cutsema EV, Arends J.** (2005). The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. *Eur J Oncol Nurs*, 9:51-63.
- Çehreli R.** (2004). Kanserli Hastalarda Beslenme. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı, 1:179-181.
- Dalamaga M.** (2013). Interplay of adipokines and myokines in cancer pathophysiology: Emerging therapeutic implications. *World J. Exp. Med.* 3: 26-33.
- Dani C, Amri EZ, Bertrand B, Enerback S, Bjursell G, Grimaldi P, Ailhaud G.** (1990). Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. *The Journal of Cell Biology.* 43(2):103-110.
- Das SK.** (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science.* 333: 233-238.
- Dasari S., Tchounwou PB.** (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740: 364-378.
- De Matteis R, Ricquier D, Cinti S.** (1998) TH-, NPY-, SP-, and CGRP-immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study. *J Neurocytol* 27: 877-886.

- Delage B., Fennell DA., Nicholson L, McNeish I, Lemoine NR., Crook T.** (2010). Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer.*, 126:2762-72.
- Demirci Ş, Gün C.** (2017). Adipoz Doku ve Adipoz Dokudan Salınan Bazı Proteinler. *MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg.*, 5(2): 155-179.
- Di Sebastiano KM.; Mourtzakis M.** (2012). A critical evaluation of body composition modalities used to assess adipose and skeletal muscle tissue in cancer. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 37(5): 811-821.
- Díez-Itza I, Sánchez LM., Allende MT., Vizoso F., Ruibal A., López-Otín C.** (1993). Zn-alpha 2-glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters. *European Journal of Cancer*, 29(9):1256–1260.
- DiSpirito JR., Mathis D.** (2015). Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin. Immunol.* 27, 315-321.
- Doyle A, Zhang G, Abdel Fattah EA, Eissa NT, Li YP.** (2011). Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. *FASEB J.*, 25:99-110.
- Ebadi M., Mazurak VC.** (2014). Evidence and mechanisms of fat depletion in cancer. *Nutrients*, 6(11): 5280-5297.
- Ebadi M., Mazurak VC.** (2015). Potential Biomarkers of Fat Loss as a Feature of Cancer Cachexia. *Mediators of inflammation*, 820934.
- Elattar S, Dimri M, Satyanarayana A.** (2018) The tumor secretory factor ZAG promotes white adipose tissue browning and energy wasting. *FASEB J*, 32: 4727-4743.
- Eley HL., Russell ST., Tisdale MJ.** (2007). Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochemical Journal*, 407(1):113-120.
- Erdamar H., Kazanci FH., Gok S.** (2014). Biochemical changes in cancer. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5: 430-438.
- Fearon K., Strasser F., Anker SD., Bosaeus I., Bruera E., Fainsinger RL., ..., Baracos VE.** (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The lancet oncology*, 12(5): 489-495.
- Fearon KC., Preston T.** (1990). Body composition in cancer cachexia. *Infusionstherapie (Basel, Switzerland)*, 17 Suppl 3: 63-66.
- Felix K., Fakelman F., Hartmann D., Giese NA., Gaida MM., Schnölzer M., ..., Werner J.** (2011). Identification of serum proteins involved in pancreatic cancer cachexia. *Life sciences*, 88(5-6): 218-225.
- Ferrari, S., Palmerini, E., Alberghini, M., Staals, E., Mercuri, M., Barbieri, E., ... & Bacci, G.** (2010). Vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, actinomycin D, ifosfamide, and etoposide in adult and pediatric patients with nonmetastatic Ewing sarcoma. Final results of a monoinstitutional study. *Tumori Journal*, 96(2): 213-218.

- Foley EA, Kapoor TM.** (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 14: 25-37.
- Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Toledo M, Penna F, Paz Aylwin M, Sirisi S, Silva AP, Orpí M, García A, Sette A.** (2013). Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: Altered energetic efficiency? *Biochim Biophys Acta.*, 1830:2770-2778.
- Freije JP, Fueyo A, Uri'a JA, Velasco G, Sa'nchez LM, Lo'pezBoado YS.** (1993). Human Zn-alpha 2-glycoprotein: complete genomic sequence, identification of a related pseudogene and relationship to class I major histocompatibility complex genes. *Genomics*, 18: 575-587.
- Frühbeck G., Gómez-Ambrosi J.** (2013). Adipose Tissue: Structure, Function and Metabolism. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 1-13.
- Fujimoto-Ouchi K., Onuma E., Shirane, M. Mori K., Tanaka Y.** (2007). Capecitabine improves cancer cachexia and normalizes IL-6 and PTHrP levels in mouse cancer cachexia models. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 59(6), 807-815.
- Furuno K, Goldberg AL.** (1986). The activation of protein degradation in muscle by Ca<sup>2+</sup> or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *Biochem J.*, 237:859-864.
- Gamou S, Shimizu Y.** (1990). Adipocytes. *Method Mol Biol.*, 5: 197-207.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR.** (2007). Developmental origin of fat: Tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
- Giordano A, Frontini A, Cinti S.** (2008). Adipose organ nerves revealed by immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 456: 83-95.
- Gong FY, Zhang SJ, Deng JY, Zhu HJ, Pan H, Li NS.** (2009). Zinc alpha 2 glycoprotein is involved in regulation of body weight through inhibition of lipogenic enzymes in adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*, 33: 1023-103
- Gong FY., Deng JY., Zhu HJ., Pan H., Wang LJ., Yang HB.** (2010). Fatty acid synthase and hormone-sensitive lipase expression in liver are involved in zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein-induced body fat loss in obese mice. *Chinese Medical Sciences Journal*, 25(3): 169-175.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C.** (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266: 11341-11346.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.*, 78, 783-809
- Hajjaji N, Couet C, Besson P, Bougnoux P.** (2012). DHA effect on chemotherapy-induced body weight loss: an exploratory study in a rodent model of mammary tumors. *Nutr Cancer*, 64(7):1000-7.
- Hale LP., Price DT., Sanchez LM., Demark-Wahnefried W., Madden JF.** (2001). Zinc  $\alpha$ -2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may

serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(4): 846–853.

**Hallenborg P, Feddersen S, Francoz S, Murano I, Sundekilde U, Petersen RK, Akimov V, Olson MV, Lozano G, Cinti S, Gjertsen BT, Madsen L, Marine JC, Blagoev B, Kristiansen K.** (2012). Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation. *Cell Death Differ* 19: 1381-1389.

**Hassan M, Latif N, Yacoub M.** (2012). Adipose tissue: friend or foe? *Nature Reviews Cardiology*, 9(12): 689-702.

**Hawkins DS., Demers GW., Galloway DA.** (1996) Inactivation Of P53 Enhances Sensitivity 126 To Multiple Chemotherapeutic Agents. *Cancer Research* 56: 892-8.

**Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S.** (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Physiol*, 279(3):C670-C681.

**Huang TH, Wu TH, Guo YH, Li TL, Chan YL, Wu CJ.** (2019). The concurrent treatment of *Scutellaria baicalensis* Georgi enhances the therapeutic efficacy of cisplatin but also attenuates chemotherapy-induced cachexia and acute kidney injury. *J Ethnopharmacol.*, 243:112075.

**Ikeda K, Maretich P, Kajimura S.** (2018). The common and distinct features of brown and beige adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.*, 29(3):191-200.

**Jernås M., Palming J., Sjöholm K., Jennische E., Svensson PA., Gabrielsson BG., Lonn M.** (2006). Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *The FASEB journal*, 20(9): 1540-1542.

**Jimenez-Preitner M, Berney X, Uldry M, Vitali A, Cinti S, Ledford JG, Thorens B.** (2011). Plac8 is an inducer of C/EBP $\beta$  required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight. *Cell Metabolism*. 14(5): 658-670

**Judge SM, Wu CL, Beharry AW, Roberts BM, Ferreira LF, Kandarian SC, Judge AR.** (2014). Genome-wide identification of FoxO-dependent gene networks in skeletal muscle during C26 cancer cachexia. *BMC Cancer*, 14:997.

**Kaisanlahti A, Glumoff T.** (2019). Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J. Physiol. Biochem*. 75(1):1-10.

**Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM** (2010). Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metabolism*. 11(4): 257-262.

**Kershaw, E. E., & Flier, J. S.** (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548-2556.

**Kimmel AR, Sztalryd C.** (2014). Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization. *Curr Opin Lipidol* 25: 110-117.

**Kir S.** (2014). Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature*. 513: 100-104.

- Kliwer SA., Sundseth SS., Jones SA., Brown PJ., Wisely GB., Koble CS., Devchand P., Wahli W., Willson TM., Lenhard JM., Lehmann JM.** (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(9): 4318-23
- Kong B., Michalski CW., Hong X., Valkovskaya N., Rieder S., Abiatari I., Streit S., Erkan M., Esposito I., Friess H.** (2010). AZGP1 is a tumor suppressor in pancreatic cancer inducing mesenchymal-to-epithelial transdifferentiation by inhibiting TGF- $\beta$ -mediated ERK signaling. *Oncogene*, 29: 5146-5158.
- Kraus NA., Ehebauer F., Zapp B., Rudolphi B., Kraus BJ., Kraus D.** (2016). Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*, 5(4): 351-358.
- Kumar AA, Hati D, Thaker TM, Miah L, Cunningham P, Domene C.** (2013). Strong and weak zinc binding sites in human zinc-a2-glycoprotein. *FEBS Lett*, 587: 3949-3954
- Kumar, N. B., Kazi, A., Smith, T., Crocker, T., Yu, D., Reich, R. R., ... & Bepler, G.** (2010). Cancer cachexia: traditional therapies and novel molecular mechanism-based approaches to treatment. *Current treatment options in oncology*, 11(3), 107-117.
- Laviano A, Meguid MM, Inui A, Muscaritoli M, Rossi-Fanelli F.** (2005). Therapy insight: cancer anorexia-cachexia syndrome – when all you can eat is yourself. *Nat Clin Pract Oncol* 2(3):158-65.
- Laviano A, Seelaender M, Sanchez K, Gioulbasanis I, Molfino A, Fanelli FR.** (2011). Beyond anorexia-cachexia. nutrition and modulation of cancer patients' metabolism: Supplementary, complementary or alternative anti-neoplastic therapy. *Eur J Pharmacol*, 668:87-90.
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL.** (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr.*, 129(Suppl 1): 227-237.
- Lefterova MI ve Lazar MA** (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20(3):107-114.
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ, Jr., Liu XS, Lazar MA.** (2008). PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22: 2941-2952.
- Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB.** (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*, 19:362-370.
- Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB.** (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J.*,12: 871-880.
- Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ.** (2001). C/EBPalpha is required for differentiation of

white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(22): 12532-12537.

**Loncar D, Afzelius BA, Cannon B.** (1988). Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. I. Nonmitochondrial changes. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, 101(2–3):109-122.

**Lopes MA., Franco FO., Henriques F., Peres SB., Batista Jr, ML.** (2018). LLC tumor cells-derived factors reduces adipogenesis in co-culture system. *Heliyon*, 4(7): e00708.

**Ma YJ, Yu J, Xiao J, Cao BW.** (2015). The Consumption of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Improves Clinical Outcomes and Prognosis in Pancreatic Cancer Patients: A Systematic Evaluation. *Nutrition and Cancer*, 67(1): 112-118.

**MacDougald OA., Lane MD.** (1995). Adipocyte differentiation: When precursors are also regulators. *Current Biology*, 5(6): 618-621.

**Mannelli M, Gamberi T, Magherini F, Fiaschi T.** (2020). The Adipokines in Cancer Cachexia. *Int J Mol Sci*, 21(14): 4860.

**Mantovani, G., & Madeddu, C.** (2010). Cancer cachexia: medical management. *Supportive care in cancer*, 18(1), 1-9.

**Marzetti E, Lorenzi M, Landi F, Picca A, Rosa F, Tanganelli F, Galli M, Doglietto GB, Pacelli F, Cesari M.** (2017). Altered mitochondrial quality control signaling in muscle of old gastric cancer patients with cachexia. *Exp Gerontol*, 87:92–99.

**Merchan JR., Jayaram DR., Supko JG., He X., Bublely GJ., Sukhatme VP.** (2005). Increased endothelial uptake of paclitaxel as a potential mechanism for its antiangiogenic effects: potentiation by Cox-2 inhibition. *International Journal of Cancer*, 113(3): 490-498.

**Mika A, Macaluso F, Barone R, Di Felice V, Sledzinski T.** (2019). Effect of exercise on fatty acid metabolism and adipokine secretion in adipose tissue. *Front. Physiol*, 10(26):1-7.

**Mondello P, Mian M, Aloisi C, Fama F, Mondello S, Pitini V.** (2015) Cancer cachexia syndrome: Pathogenesis, diagnosis, and new therapeutic options. *Nutr Cancer.*, 67:12-26.

**Mracek T., Stephens NA., Gao D., Bao Y., Ross JA., Ryden M., ..., Bing C.** (2011). Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. *British journal of cancer*, 104(3): 441-447.

**Mracek T., Stephens, NA., Gao D., Bao Y., Ros, JA., Ryden M., ..., Bing C.** (2011). Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. *British journal of cancer*, 104(3): 441-447.

**Muliawati Y., Haroen H., Rotty LW.** (2012). Cancer anorexia - cachexia syndrome. *Acta medica Indonesiana*, 44(2): 154–162.

- Murphy RA., Wilke MS., Perrine M., Pawlowicz M., Mourtzakis M., Lieffers JR., ..., Mazurak VC.** (2010). Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. *Clinical nutrition*, 29(4): 482-487.
- Murphy KT., Lynch GS.** (2012). Editorial update on emerging drugs for cancer cachexia. *Expert opinion on emerging drugs*, 17(1), 5-9.
- Murton AJ, Maddocks M, Stephens FB, Marimuthu K, England R, Wilcock A.** (2017) Consequences of late-stage non-small-cell lung cancer cachexia on muscle metabolic processes. *Clin Lung Cancer*, 18:e1-e11.
- Nechad M.** (1986). Structure and development of brown adipose tissue. In: Trayhurn P, Nicholls D, editors. *Brown Adipose Tissue*. London: Edward Arnold.
- Ni J., Zhang L.** (2020). Cancer cachexia: Definition, staging, and emerging treatments. *Cancer Management and Research*, 12: 5597.
- Nicolini, A., Ferrari, P., Masoni, M. C., Fini, M., Pagani, S., Giampietro, O., & Carpi, A.** (2013). Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: a mini-review on pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67(8): 807-817.
- Niemelä S., Miettinen S., Sarkanen JR., Ashammakhi N.** (2008). Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. *Topics in Tissue Engineering*, 4(1): 26.
- Ohnuma T., Ali MA., & Adigun R.** (2021). Anorexia and Cachexia. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Ojedalopez MA., Needleman DJ., Song C., Ginsburg A., Kohl PA., Li Y.** (2014). Transformation of taxol-stabilized microtubules into inverted tubulin tubules triggered by a tubulin conformation switch. *Nat Mater*. 13(2):195-203.
- Okuno A., Tamemoto H., Tobe K., Ueki K., Mori Y., Iwamoto K., Kadowaki T.** (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *The Journal of clinical investigation*, 101(6): 1354-1361.
- Olah E., Csokay B., Prajda N., Kote-Jarai Z., Yeh YA., Weber G.** (1996). Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer research*, 16(5A): 2469-2477.
- Park A., Kim WK., Bae KH.** (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, 6(1): 33.
- Peixoto da Silva S., Santos J., Costa E Silva MP., Gil da Costa RM., Medeiros R.** (2020). Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 11(3): 619-635.
- Penda's AM, Matilla T, Uri'a JA, Freije JP, Fueyo A, Estivill X.** (1994). Mapping of the human Zn-alpha-2-glycoprotein gene (AZGP1) to chromosome 7q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 66: 263-266.

- Peters SJ, van Helvoort A, Kegler D, Argilès JM, Luiking YC, Laviano A, Deutz NE, Haagsman HP, Gorselink M, van Norren K.** (2011). Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice. *Oncol Rep.*, 26(1):247-54.
- Petruzzelli M., Wagner EF.** (2016). Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes & development*, 30(5): 489-501.
- Petruzzelli M.** (2014). A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell. Metab.* 20: 433-447.
- Pin F, Minero VG, Penna F, Muscaritoli M, De Tullio R, Baccino FM, Costelli P.** (2017). Interference with Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis does not alter the course of muscle wasting in experimental cancer cachexia. *Front Physiol*, 8:213.
- Porporato P.E.** (2016). Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*, 5: 200.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW.** (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92: 829- 839.
- Ravera, E., Radaelli, G., Migliavacca, S., & Bozzetti, F.** (1986). Effects of enteral nutrition on the nutritional status of patients with cancer cachexia. *Riv Ital Nutr Parent Enter*, 4: 43-50.
- Reynés B, Palou M, Rodríguez AM, Palou A.** (2018) Regulation of adaptive thermogenesis and browning by prebiotics and postbiotics. *Front. Physiol*, 9:1-15.
- Richard AJ., White U., Elks CM., Stephens JM.** (2020). Adipose tissue: physiology to metabolic dysfunction. *Endotext*.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM.** (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell.* 4(4):611-617.
- Rosen ED., Walkey CJ., Puigserver P., Spiegelman BM.** (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-1307.
- Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T.** (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* 15: 659-667.
- Russell ST, Tisdale MJ.** (2011). Studies on the anti-obesity activity of zinc- $\alpha$ -glycoprotein in the rat. *Int J Obes (Lond)*, 35: 658-665.
- Russell ST, Tisdale MJ.** (2012). Role of b-adrenergic receptors in the anti-obesity and anti-diabetic effects of zinc- $\alpha$ -glycoprotein (ZAG). *Biochim Biophys Acta*, 1821: 590-599.
- Russell ST., Hirai K., Tisdale MJ.** (2002). Role of  $\beta$ 3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor. *British journal of cancer*, 86(3): 424-428.
- Russell ST., Tisdale MJ.** (2005). The role of glucocorticoids in the induction of zinc- $\alpha$  2-glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia. *British journal of cancer*, 92(5): 876-881.

- Russell ST., Zimmerman TP., Domin BA., Tisdale MJ.** (2004). Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1636(1): 59-68.
- Rydén M., Agustsson T., Andersson J., Bolinder J., Toft E., Arner P.** (2012). Adipose zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein is a catabolic marker in cancer and noncancerous states. *Journal of internal medicine*, 271(4): 414-420.
- Ryden M., Agustsson T., Laurencikiene J., Britton T., Sjolín E., Isaksson B., Permert J., Arner P.** (2008). Lipolysis-not inflammation, cell death, or lipogenesis—is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer*, 113(7):1695-1704.
- Sadeghi M., Keshavarz-Fathi M., Baracos V., Arends J., Mahmoudi M., Rezaei N.** (2018). Cancer cachexia: diagnosis, assessment, and treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*, 127: 91-104.
- Sanders PM, Tisdale MJ.** (2004). Effect of zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue. *Cancer Lett*, 212: 71-81.
- Schmitt TL, Martignoni ME, Bachmann J, Fechtner K, Friess H, Kinscherf R, Hildebrandt W** (2007). Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. *J Mol Med (Berl)*, 85:647-654.
- Selva DM., Lecube A., Hernandez C., Baena JA., Fort JM., Simo R.** (2009). Lower zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(11): 4499-4507.
- Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H.** (2012). Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS One*.7: e49452.
- Shen WJ., Patel S., Miyoshi H., Greenberg AS., Kraemer FB.** (2009). Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *Journal of lipid research*, 50(11): 2306-2313.
- Silva KA, Dong J, Dong Y, Dong Y, Schor N, Tweardy DJ, Zhang L, Mitch WE.** (2015). Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia. *J Biol Chem.*, 290:11177-11187.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P.** (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans, *Nature*, 453: 783-787.
- Stephens NA.** (2011). Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, 2: 111-117.
- Stienstra R., Duval C., Keshtkar S., van der Laak J., Kersten S., Muller M.** (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation promotes infiltration of

alternatively activated macrophages into adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33): 22620-22627.

- Sugiyama M, Yamaki A, Furuya M, Inomata N, Minamitake Y, Ohsuye K, Kangawa K.** (2012). Ghrelin improves body weight loss and skeletal muscle catabolism associated with angiotensin II-induced cachexia in mice. *Regul Pept*, 178:21-28.
- Sun YS., Ye ZY., Qian ZY., Xu XD., Hu JF.** (2012). Expression of TRAF6 and ubiquitin mRNA in skeletal muscle of gastric cancer patients. *Journal of experimental & clinical cancer research CR*, 31(1): 81.
- Symonds ME.** (2012). *Adipose tissue biology*, New York, NY, USA:Springer, 413.
- Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, Eimoto T.** (1991). Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 39(9):1221-1226.
- Tanaka, Y., Eda, H., Fujimoto, K., Tanaka, T., Ishikawa, T., Ishitsuka, H.** (1990). Anticachectic activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine in a murine tumor cachexia model, colon 26 adenocarcinoma. *Cancer research*, 50(15): 4528-4532.
- Tchoukalova YD., Votruba SB., Tchkonina T., Giorgadze N., Kirkland JL., Jensen MD.** (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(42): 18226-18231.
- Tisdale MJ.** (2008). Catabolic mediators of cancer cachexia. *Current opinion in supportive and palliative care*, 2(4): 256-261.
- Tisdale MJ.** (2009). Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein in cachexia and obesity. *Current opinion in supportive and palliative care*, 3(4): 288-293.
- Tohgo, A., Kumazawa, E., Akahane, K., Asakawa, A., & Inui, A.** (2002). Anticancer drugs that induce cancer-associated cachectic syndromes. *Expert review of anticancer therapy*, 2(1): 121-129.
- Toillon RA., Adriaenssens E., Wouters D., Lottin S., Boilly B., Hondermarck H., Bourhis XL.** (2000) Normal Breast Epithelial Cells Induce Apoptosis Of MCF-7 Breast Cancer Cells Through A P53-Mediated Pathway. *Molecular Cell Biology Research Communication* 3: 338-44.
- Tosun, H. D., & Köksal, G.** (2012). Kanserde kaşeksi ve beslenme. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40(1): 59-68.
- Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ.** (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. 454:1000-1004.
- Tsoli M., Swarbrick M.M., Robertson G.R.** (2016). Lipolytic and thermogenic depletion of adipose tissue in cancer cachexia. *Semin. Cell Dev. Biol*, 54:68-81.
- Tsoli M.** (2012). Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res*. 72, 4372-4382.

- Tuca A., Jimenez-Fonseca P., Gascón P.** (2013). Clinical evaluation and optimal management of cancer cachexia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 88(3): 625-636.
- Tung Y, Hsieh PH, Pan MH, Ho T.** (2017). Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1):100-110.
- Tzanavari T, Bing C, Trayhurn P.** (2007). Postnatal expression of zinc-alpha2-glycoprotein in rat white and brown adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 279: 26-33.
- Uri'a JA, Fueyo A, Balbín M, Velasco G, Penda's AM, Lo'pez-Oti'n C.** (1996). Alternative splicing gives rise to two novel long isoforms of Zn-alpha 2-glycoprotein, a member of the immunoglobulin superfamily. *Gene*, 169: 233–236
- van de Worp WRPH, Schols AMWJ, Theys J, van Helvoort A, Langen RCJ.** (2020). Nutritional Interventions in Cancer Cachexia: Evidence and Perspectives From Experimental Models. *Front Nutr.*, 7:601329.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ.** (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 360: 1500-1508.
- Vega OM., Abkenari S., Tong Z., Tedman A., Huerta-Yepez S.** (2021). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and lung cancer: nutrition or pharmacology?. *Nutrition and cancer*, 73(4): 541-561.
- Vicentini GE., Fracaro L., de Souza SR., Martin HA., Guarnier FA., Zanoni JN.** (2016). Experimental Cancer Cachexia Changes Neuron Numbers and Peptide Levels in the Intestine: Partial Protective Effects after Dietary Supplementation with L-Glutamine. *PloS one*, 11(9): e0162998.
- Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA.** (2013). Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 18656-18661.
- Wang QA, Tao C, Gupta RK.** (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 19: 1338-1344.
- Wang S, Pan MH, Hung WL, Tung YC, Ho CT.** (2019). From white to beige adipocytes: therapeutic potential of dietary molecules against obesity and their molecular mechanisms. *Food Funct*, 10:1263-1279.
- Wargent ET, O'Dowd JF, Zaibi MS, Gao D, Bing C, Trayhurn P.** (2013). Contrasts between the effects of zinc-alpha2-glycoprotein, a putative b3/2-adrenoceptor agonist and the b3/2-adrenoceptor agonist BRL35135 in C57Bl/6 (ob/ob) mice. *J Endocrinol*, 216: 157-168.
- Weaver BA.** (2014) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*, 25(18): 2677-2681.
- White JP, Puppa MJ, Gao S, Sato S, Welle SL, Carson JA.** (2013). Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: A role for AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304: E1042-E1052.

- White, JV., Guenter P., Jense G., Malone A., Schofield M., Group AMW.** (2012). Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(5): 730-738.
- Williams A, Sun X, Fischer JE, Hasselgren PO.** (1999). The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery*, 126:744-750.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM.** (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.*, 150(2):366-376.
- Xiao X, Li H, Qi X, Wang Y, Xu C, Liu G.** (2017). Zinc alpha2 glycoprotein alleviates palmitic acid-induced intracellular lipid accumulation in hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 439: 155-164.
- Xiao XH, Qi XY, Wang YD, Ran L, Yang J, Zhang HL.** (2018). Zinc alpha2 glycoprotein promotes browning in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 496: 287-293.
- Yang J, Zhang Z, Zhang Y, Ni X, Zhang G, Cui X, Liu M, Xu C, Zhang Q, Zhu H.** (2019). ZIP4 promotes muscle wasting and cachexia in mice with orthotopic pancreatic tumors by stimulating RAB27B-regulated release of extracellular vesicles from cancer cells. *Gastroenterology*, 156:722-734.
- Yeung DC, Lam KS, Wang Y, Tso AW, Xu A.** (2009). Serum zinc-alpha2-glycoprotein correlates with adiposity, triglycerides, and the key components of the metabolic syndrome in Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 2531-2536.
- You JS., Lee YJ., Kim KS., Kim SH., Chang KJ.** (2014). Anti-obesity and hypolipidaemic effects of *Nelumbo nucifera* seed ethanol extract in human pre-adipocytes and rats fed a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3): 568-575.
- Yu W., Ling J., Yu H., Du J., Liu T.** (2020). AZGP1 suppresses the process of colorectal cancer after upregulating FASN expression via mTOR signal pathway. *General Physiology and Biophysics*, 39(3): 239-248.
- Young P, Arch JRS, Ashwell M.** (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.*, 167(1):10-14.
- Zhou L., Park SY., Xu L., Xia X., Ye J., Su L., Li P.** (2015). Insulin resistance and white adipose tissue inflammation are uncoupled in energetically challenged *Fsp27*-deficient mice. *Nature communications*, 6(1): 1-14.
- Zhu HJ, Ding HH, Deng JY, Pan H, Wang LJ, Li NS.** (2013). Inhibition of preadipocyte differentiation and adipogenesis by zinc-alpha2-glycoprotein treatment in 3T3-L1 cells. *J Diabetes Investig*, 4: 252-260

**Zhu L., Chen L.** (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. Cellular & molecular biology letters, 24(1): 1-11.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

1. **Ad Soyad:** Özlem AĞİREL

2. **Unvan:** Diyetisyen

3. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2015-2019
Yüksek Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Haliç Üniversitesi	2019-2022
Doktora	-	-	-

4. **Mesleki Deneyim ve Ödüller:**

5. **Tezden Türetilen Yayınlar, Sunumlar ve Patentler:**

Özlem Ağirel, Ceyda Okudu (2021). Kemoterapötik Ajan Paklitakselin Adipoz Doku Kaşeksisi Üzerine Etkisinin Araştırılması, 6. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, 04-05 Aralık 2021, İstanbul. E-ISBN: 978-625-7367-23-3 (Sözel Bildiri)

6. **Diğer Yayınlar, Sunumlar ve Patentler:**