

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ (MCF-7) NON-
KANONİK SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN LEPTİN'E BAĞLI
DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

BURÇİN İREM ABAS
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-
16030 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Burçin İrem ABAS tarafından hazırlanan “Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki (MCF-7) Non-Kanonik Sinyal Moleküllerinin Leptin’e Bağlı Değişimlerinin İncelenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/08/2017

Ünvan	Adı Soyadı	Kurum	İmza
Prof. Dr.	Çiğdem YENİSEY	Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof.Dr.	Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL	Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof.Dr.	Cevval ULMAN	Celal Bayar Üniversitesi.....	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın seçiminde, planlanmasında, hazırlanmasında ve yürütülmesinde bana her konuda yardımcı olan, çalışmalarım süresince benden her türlü anlayış ve ilgiyi esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım, kendisiyle çalışma fırsatına sahip olduğum için kendimi şanslı hissettiğim, bilim insanı sıfatı ve yüce gönüllü kişiliğiyle her zaman kendime örnek alacağım değerli hocam Sayın Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım süresince yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL, Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Laboratuvarda çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süre zarfında yanımda olan ve manevi desteğini her zaman hissettiren değerli arkadaşlarım, Nur Betül KARTAL, Hatice PİLEVNELİ'ye ve istatistik analiz yöntemlerinin doğru seçiminde yol gösteren değerli meslektaşım Araş. Gör. Emrah İPEK'e çok teşekkür ederim.

Tezimin başından sonuna kadar yanımda olan, istatistik sonuçlarımın hesaplanmasında ve grafiklerin çiziminde engin bilgilerinden yararlandığım sevgili hayat arkadaşım Tuna DİZDAR'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve varlıklarıyla bana daima güç veren çok sevgili anneme, babama ve kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak benim çocukluğumun mimarı, büyüyüp profesör olacağıma dair inancı ve beni her zaman gururla izleyişini fazlasıyla hissettiren ve beni göz bebeği gibi büyüten canım anneanneme duyacağım özlemin hiç bitmeyeceğini ve beni gökyüzünden gülümseyerek izlediğini düşünerek profesörlüğe giden bu uzun ve çetin yoldaki ara adımın ürünü olan bu yüksek lisans tezini ona armağan ediyorum. Bana yaşattığı bütün güzel çocukluk anılarım için ona ayrıca teşekkür ediyor ve kendisini çok seviyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Leptin	4
2.2. Leptin ve Meme Kanseri.....	4
2.2.1. Leptinin Meme Kanseri Üzerindeki Onkojenik Etkileri.....	5
2.2.2. Leptin, Obezite ve Meme Kanseri Terapileri.....	7
2.3. Leptin Sinyal Yolakları.....	9
2.3.1. JAK/STAT Sinyal Kaskadı.....	9
2.3.2. p38 MAPK Sinyal Kaskadı.....	11
2.3.3. PI3K/PDE3B/cAmP Yolağı.....	16
2.3.4. Diğer Leptin-Aktivasyonu Sinyal Yolakları.....	18
2.4. Leptin'in Anjiyogenik Rolü.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	21
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	22
3.3. Deney Düzenineğinin Hazırlanması.....	22
3.3.1. Hücre Kültürü Uygulaması.....	24

3.4. İstatistiksel Analizler.....	23
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Lep	: leptin
Ob-R	: leptin reseptörü
MCF-7	: meme kanseri hücre dizisi
BMI	: vücut kitle indeksi
ER⁺	: östrojen bağımlı
ER⁻	: östrojen bağımsız
IGF-1	: insülin benzeri büyüme faktörü-1
VEGF	: vasküler endotel büyüme faktörü
VEGFR	: vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü
PAI-1	: plazminojen aktivatör faktör
OB-Rb	: leptin reseptörünün uzun formu
OB-Ra	: leptin reseptörünün kısa formu
Tyr	: tirozin
JAK	: januz kinaz
STAT	: sinyal transkripsiyon iletim aktivatörleri
P38 MAPK	: p38 mitojen aktive protein kinaz
ob/ob	: leptin eksikliği
db/db	: fonksiyonel leptin reseptörü eksikliği
TNBC	: üçlü negatif meme kanseri hücresi
HEc	: insan endotel hücresi
HUVEC	: insan umbilikal ven endotel hücresi
COX-2	: siklooksijenaz-2
Notch	: kısa aralıklı sinyal iletimi yapan hücre yüzey reseptörü
NILCO	: Notch IL-1 ve leptin birleşimi
TAM	: Tamoksifen
HER2	: meme kanserinde rol oynayan gen
CIS	: sisplatin
BCSC	: meme kanseri kök hücreleri
NF-κB	: nükleer faktör kapa B
GP 130	: glikoprotein 130
MAPK	: mitojen ile aktive protein kinazlar

MAPKK	: MAPK kinaz
MAPK-APK	: MAPK aktive protein kinaz
ERK	: hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz
MEK	: MAPK/ERK kinaz
JNK	: j-cun N-terminal kinaz
SAPK	: stresle aktive protein kinaz
Ras	: küçük GTP bağlayan protein
Raf	: serin/treonin spesifik protein kinaz
TNF-α	: tümör nekroz faktör alfa
IL-1	: interlökin 1
TCR	: T hücre reseptörü
IFN	: interferon gamma
HeLa	: serviks kanseri hücre dizisi
PKC	: protein kinaz C
PI3K	: fosfatidylinositol 3-kinase
IRS	: insülin reseptör substratları
NO	: nitrik oksit
HIF-1α	: hipoksi indükleyici faktör-1 alfa
AKT	: serin treonin protein kinaz 1
BCL2	: B hücreli lenfoma 2
CDK	: siklin bağımlı kinaz
EGF	: epidermal büyüme faktörü
EGFR	: epidermal büyüme faktörü reseptörü
FGF	: fibroblast büyüme faktörü
FGFR	: fibroblast büyüme faktörü reseptörü
ASK1	: apoptoz sinyal düzenleyen kinaz 1
ATF	: aktive edici transkripsiyon faktörü
GRK2	: G-proteine bağlı reseptör kinaz 2
LPS	: lipopolisakkarit
MAP2K	: MAPK kinazı
MAP3K	: MAP2K kinazı
MKK	: MAPK kinazı

MKP	: MAPK fosfataz
MLK3	: karışık soy kinaz 3
MSK	: mitojen ve stresle aktive edilen kinaz;
PKD	: protein kinaz D
TAK1	: TGF β -aktifleştirilmiş kinaz 1
TAB1	: TAK1-bağlayıcı protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Leptin reseptörünün internalizasyonu	4
Şekil 2. Leptin'in onkojenik rolü	7
Şekil 3. Leptin'in JAK/STAT sinyal yolağı mekanizması.....	11
Şekil 4. Leptin'in p38 MAPK yolağının mekanizması	14
Şekil 5. p38 MAPK sinyal kaskadı.....	15
Şekil 6. Leptin'in PI3K yolağının mekanizması.....	18
Şekil 7. Leptin'in etki ettiği sinyal mekanizmaları ve anjiyogenik rolü.....	20
Şekil 8. Leptinin indüklediği sinyal moleküllerinin miktarlarının korelasyon	
eğrilerinin gösterilmesi.....	32
Şekil 9. Leptinin sinyal moleküllerinin miktarlarının leptin'in dozlarına bağlı değişiminin	
gösterilmesi.....	34
Şekil 10. Psapk/JNK molekülünün leptin dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiğinin	
gösterilmesi	36
Şekil 11. Psapk/JNK molekülünün leptin dozlarına göre korelasyoneğrisinin	
gösterilmesi.....	37

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Kimyasal malzemelerin listesi.....	29
Tablo 2. Sinyal moleküllerinin ng/mg protein ortalamaları ve standart sapmaları.....	29
Tablo 3. p44/42 MAPK, P38 MAPK, MEK1 moleküllerinin farklılaşma gösteren dozlarının p değerleri	29
Tablo 4. pMEK1, SAPK/JNK, Psapk/JNK moleküllerinin farklılaşma gösteren dozlarının p değerleri	30

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ (MCF-7) NON-KANONİK SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN LEPTİN'E BAĞLI DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

ABAS Bİ. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017

Obezite vücut yağ kütlesi ve adipositlerden türevlenen sitokinlerin (örn: leptin) yüksek seviyeleri ile karakterize edilen küresel bir hastalıktır. Araştırmalar, vücut yağlanması ve leptin düzeyleri ile obezite ve kanser arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, meme kanseri hücreleri üzerinde leptinin farklı dozları uygulanarak pro-anjyogenik etkilerinin araştırılması ve leptinin MAPK yolağındaki kanonik ve non-kanonik sinyal moleküllerinin düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda MCF-7 hücre hatları üzerine leptinin farklı konsantrasyonları (0,10, 20, 100 ve 1000 ng/ml) uygulanarak 48 saat inkübasyonu sonucu toplanan ortam mediumlarında MAPK multi ELISA kiti ile p44/42 MAPK, p38 MAPK, MEK1, pMEK1, SAPK/JNK ve Psapk/JNK moleküllerin düzeyleri saptanmıştır. MCF-7 hücre ortam besiyerinde Smart BCA protein assay kit kullanılarak total protein bakılmıştır. Moleküllerin miktarları ng/mg protein olarak hesaplanmış olup, istatistiksel analizleri Kruskal Walls ve Tamheinn testi ile yapılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre leptinin düşük dozlarında (10 ng/ml veya 20 ng/ml) leptin verilmeyen kontrol grubuna göre çalışılan sinyal moleküllerinin tümünde artışında istatistiksel açıdan %95 güven aralığında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Obezite leptin dozunun(100 ng/ml) p38 MAPK ve pMEK1 dışındaki tüm sinyal moleküllerinde etkili olduğu gözlenirken, farmakolojik leptin dozunda (1000 ng/ml) tüm sinyal moleküllerinde düşüş gözlemlenmiştir. Çalışmamızda 20 ng/ml leptin dozunun uygulandığı tüm sinyal moleküllerinde, leptinin MAPK sinyal yolağında yer alan moleküllere indükleyici etkisinin maksimum olduğu saptanmıştır. Psapk/JNK sinyal molekülündeki artışın en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonucun leptinin indüklediği moleküller arasında Psapk/JNK molekülünün belirgin bir artış trendi gösterdiği bir ilk olarak çalışmamız ile ortaya çıkarılmıştır.

Leptin ile MAPK yolağının sinyal molekülleri arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir literatür çalıŐmasının bulunmaması bu tez çalıŐmasının  zg n olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Obezite, leptin, meme kanseri, MAPK, non- kanonik

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NON-CANONIC SIGNAL MOLECULES ALTERATION DEPENDENT ON LEPTIN IN MCF-7 BREAST CANCER CELL LINES

**ABAS Bİ. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine Faculty
Clinical Biochemistry Program Master Thesis., Aydın, 2017**

Obesity is a global disease characterized by high levels of body fat mass and cytokines (eg leptin) derived from adipocytes. Research shows that body fat and leptin levels are linked to obesity and cancer.

In this study, it was aimed to investigate the pro-angiogenic effects of different doses of leptin on breast cancer cells and to determine the levels of canonical and non-canonical signaling molecules in the MAPK pathway of leptin.

In our study, different concentrations of leptin (0, 10, 20, 100 and 1000 ng/ml) were applied on MCF-7 cell lines and MAPK multi ELISA kit was used for p44 MAPK, p38 MAPK, MEK1, pMEK1, / JNK and Psapk / JNK molecules have been determined. Total protein was determined using the Smart BCA protein assay kit on MCF-7 cell media. The quantities of the molecules were calculated as ng / mg protein and the statistical analyzes were performed with Kruskal Walls and Tamheinn test.

According to the findings obtained, it was found that, at low doses of leptin (10 ng/ml or 20 ng/ml) there was a statistically significant increase difference of all signal molecules studied compared to the control group which was not receiving leptin. In all signal molecules at the pharmacological leptin dose (1000 ng/ml) were likely to decrease, while obesity leptin dose (100 ng/ml) was found to be effective in all signaling molecules except p38 MAPK and pMEK1. In our study, leptin was found to have a maximal inducing effect on the molecules in the MAPK signaling pathway in all signal molecules where 20 ng / ml leptin dose was applied. It has been determined that the increase in the signal molecule of Psapk / JNK is the highest. This was revealed by our study as a first demonstration of a marked increase trend of the Psapk/JNK molecule among leptin-induced molecules.

The fact that there isn't any literature study that studies the relationship between leptin and the signaling pathways of the MAPK pathway suggests that this thesis study is unique.

Key words: Obesity; Leptin; breast cancer; MAPK; non-canonical

1. GİRİŞ

Obezite vücutta aşırı yağ birikimine bağlı olarak, meme kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gelişiminde ve prognozunda ciddi bir risk oluşturan küresel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Çalışmalarda, meme kanseri ile BMI (vücut kitle endeksi) arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda, post-menopozal dönemdeki obez kadınların yarısının kanser olduğu rapor edilmiştir. Yine, lenf nodüllerine metastaz yapmış ileri düzeyde invaziv meme kanseri hastalarının çoğunun obez kadınlar olduğu rapor edilmiştir. Obezite ve meme kanserinden ölüm oranları arasındaki ilişkinin araştırıldığı pek çok çalışmada BMI yüksek olan obez kadınlarda ölüm oranının, BMI'yi düşük olan kadınlara göre 2 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, Daling ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada BMI'yi yüksek olan kadınlarda tümörlerin yapısının genellikle ER⁻, S-faz fraksiyonu, morfolojik yapısı, mitotik hücre sayısı, proliferasyon belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri yüksek olup, bunların daha büyük boyutlarda tümörler olduğu gözlemlenmiştir. Yine, BMI yüksek kadınlarda ileri evrelerde ve daha büyük boyutlarda, ER⁻ meme tümörleri saptanmıştır (He ve ark., 2015).

Obezite ve meme kanseri arasındaki ilişki moleküler düzeyde test edildiğinde Creighton ve ark., (2012) primer meme tümörü gen ekspresyonuna hastanın obezite durumunun etkisi incelemek için, BMI bilinen üç hasta grubuna (normal, fazla kilolu, obez) ait 103 tümörün transkripsiyon profilini oluşturmuşlar ve obez hastaların tümörleri ile normal ve fazla kilolu hastaların tümörleri karşılaştırdıklarında, obez hastalarda 662 genin transkripsiyon düzeylerinin obezite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Obezite bağlantılı kanser gen mutasyonu olarak tanımlanan bu durum, prognozu en kötü olan hastalarda saptanmıştır (Saxena ve Sharma 2013). Sonuç olarak, obez kadınlarda menopozal durumları farketmeksizin meme kanseri vakalarının çoğunda, ilk teşhis konulduğunda hastada metastaz varlığı ve hastanın sağkalımının kötü olduğu gösterilmiştir. Bu duruma açıklama getirmeye çalışan ve son dönemlerde popüler olan birçok hipotez geliştirilmiştir. Bu hipotezlerin odak noktası ise, yağ doku androjenlerinin periferik aromatisasyonu sonucu artan östrojen üretimidir. Yüksek düzeyde östrojenin, memede post-menopozal karsinom gelişimini tetiklemesi, obezite ve yüksek östrojen düzeyleri arasındaki ilişkiyi, vücut kütlesi- meme kanseri riskini açıklamaya yetmemektedir. Çünkü, menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınların incelendiği çalışmalarda, obez kadınların bulunduğu büyük bir alt grubun tamamının ileri evrede, agresif, metastatik karakterli ER⁻ meme kanserine sahip olduğu görülmüştür. Yeni hipotezlere göre,

obezite, dolaşımdaki insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), inflammatör sitokinler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi vasküler devamlılığı sağlayan faktörler, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve adipositokinleri arttıran, endokrin bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Bu aracı moleküllerin, etkileşime girdiği moleküller ve yolaklar kompleks bir moleküler ağ oluşturmakta ve bu ağ obez durumdan etkilenmekte olup, kanser gelişiminin patolojisinde etkili olmaktadır (He ve ark., 2015).

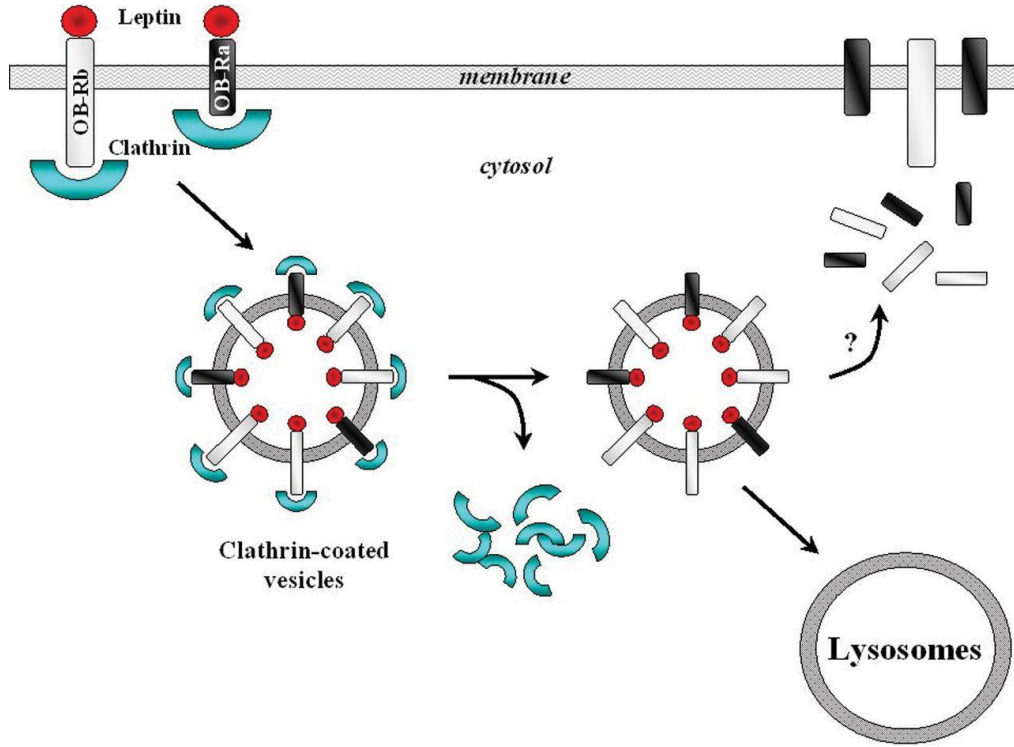
Adipositokinler, başlıca adipositlerden ve stromal hücrelerden (fibroblastlar) üretilmekte olup, bu hücreler olgun adiposit ve makrofajlara farklılaşarak adipoz dokuyu oluşturmaktadırlar (Saxena ve Sharma 2013). Adipositokinler endokrin, parakrin ve otokrin mekanizmalarda yer almaları nedeniyle, birçok biyolojik prosesi etkilemektedirler. Adipositokinler arasında bulunan leptin, kanser oluşumunda onkojenik rolü nedeniyle, obezitenin oluşumunda moleküler düzeyde katkıda bulunan, önemli bir aracı molekül olarak bilinmektedir. Çalışmada, leptinin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri incelenecek olup, non-kanonik sinyal yolağı ile ilişkisi araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leptin

Leptin 1994 yılında keşfedilmiş, LEP geni (OB geni) tarafından kodlanan 167 amino asitten oluşan 16 kDa'luk bir protein hormondur. Bu küçük protein, leptin reseptörüne (OB-R) bağlanmakta ve leptin ligand/reseptör aracılı yolların kontrolünü yönlendirmektedir. Leptin'in reseptörüne (OB-R) bağlanması oldukça spesifik bir olaydır. Leptin sadece OB-R'ye bağlanır ve aynı şekilde OB-R de yalnız leptin molekülüne spesifiktir. OB-R sınıf 1 sitokin reseptör süper ailesine dahildir ve alternatif mRNA bölünmesi ile üretilen 6 farklı izoformdan oluşmaktadır. Uzun formu, OB-RI veya OB-Rb tam sinyal kapasitesi ve leptinin primer biyolojik fonksiyonlarından sorumlu iken, kısa formu ikincil OB-R izoformları ise ikincil sinyal yollarından sorumludur (Lipsey ve ark. 2016).

Leptin'in kanonikal sinyal yolağında salgılanan proteinler iştah kontrolünde, enerji dengesinde ve negatif geri besleme ile glukoz homeostazında hormonal potansiyelini kontrol eder. Enerji düzeyinin yüksek olması, vücudun fazla trigliserid depolamasına ve hipotalamusun adiposit reseptörlerine sinyal yollamasına neden olur. Adipositler leptini üretir ve salgılar, daha sonra bu protein endokrin sinyal aracılığıyla beyine iletilir. Leptin, uzun formu olan OB-R'nin ekstrasellüler kısmına bağlanmakta ve JAK2 proteinini aktive etmektedir. JAK2 molekülü de, OB-R'nin hücre içinde yer alan üç tirozin ucunu (Tyr985, Tyr1077 ve Tyr1138) fosforile etmektedir. Hipotalamik hücrelerdeki bu üç bölgenin fosforilasyonu ve aktivasyonu tokluk kontrolü, enerji/glukoz dengesinin düzenlenmesi ve üremenin regülasyonundan sorumlu negatif feedback mekanizmasının düzenlenmesinde sinyal akışını başlatır. Bu mekanizma, obezite durumunda işlev dışı kaldığından endojen leptin sinyal yolları yanıt vermeyinceye kadar vücuttaki leptin artışı devam etmekte ve bu durum leptin direnci olarak tanımlanmaktadır. Obez bireylerin çoğunda leptin direnci görülmekte olup, bu direnç sırasında dolaşımda leptin düzeyleri artarken, diğer yandan tokluğu uyaran sinyal mekanizmalarında bozukluk meydana gelmektedir. Yüksek leptin düzeyleri, kanser hücrelerinin proliferasyonunu indüklemekte, obezite ve kanserin gidişatı arasında kilit rolü olabileceği düşünülmektedir (Lipsey ve ark., 2016).



Şekil 1: Leptin Reseptörünün İnternalizasyonu

Lizozomal içe alımın şematik olarak gösterilmesi ve leptin reseptörlerinin, klatriin kaplı veziküllerle parçalanması (Frühbeck 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.2. Leptin ve Meme Kanseri

Normal meme gelişiminde leptinin rolünü anlamak, leptin ve reseptörünün (OB-R) meme kanseri seyrini nasıl etkilediğini tanımlamak açısından oldukça önemlidir. İnsan memesi primer olarak adipoz dokudan oluşmakta ve bu organ leptin üretimi ve sekresyonunun başlıca bölgesi olmaktadır. Leptin sinyalinin meme bezi gelişiminde rol oynadığı gösterilmiş olup, leptin ve OB-R ekspresyonunun önemi fare modellerinde araştırılmıştır. Bir çalışmada, leptin sinyal eksikliği olan (leptin eksikliği ob/ob veya fonksiyonel leptin reseptörü eksikliği db/db) mutant farelerde normal meme bezi oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca, ob/ob ve db/db farelerde meme tümörü görülme sıklığı çok düşüktür. Bununla birlikte, normal insan meme bezi dokusunda düşük OB-R ekspresyonu görülmektedir. Diğer yandan, meme bezindeki kanser hücrelerinde OB-R'nin aşırı ekspresyonu ve leptinin bu uyarana yanıt olarak anjiyogenik faktörlerin (VEGF, VEGFR-2) üretimini arttırdığı görülmüştür (Lipsey ve ark., 2016).

2.2.1. Leptinin Meme Kanseri Üzerindeki Onkojenik Etkileri

Leptin'in *in vitro* ortamda ER⁺ (östrojen bağımlı) ve ER (östrojen bağımsız) meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı saptanmış olup, leptin sinyalinin inhibisyonu ile ER⁺ ve ER⁻ meme kanseri gelişiminin durdurulduğu gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarda, meme kanseri doku örneklerinin immunohistokimyasal analizlerinden elde edilen verilere göre, örneklerin %61'inde leptin ve OB-R pozitif saptanmış olup, leptin ekspresyonu ile meme kanseri progresyonu arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, siklin D1 ve Cdk2'nin leptin aracılı indüksiyonu *in vitro* yöntemlerle meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Zheng ve ark. (2012) MMTV-Wnt-1 (Wnt-1 protoonkogeni içeren transkripsiyonel olarak Mouse Mammary Tumor Virus ile hiperplazi ve adenokarsinom geliştirilmiş int-1 fareleri) aktif olan transgenik farelerde, siklin D1 ekspresyonunun regülasyonunun, leptin sinyali ile aktive olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmalar, TNBC (Triple Negative Breast Cancer Cells, üçlü negatif meme kanseri hücreleri) hücrelerinde ION-LPrA2 (innovative leptin antagonist bound to nanoparticles, inovatif leptin antagonisti bağlı nanopartiküller) kullanılarak leptin sinyalinin inhibisyonunun, meme kanserinde hücre döngüsünün S fazının işleyişini durdurduğunu gösterilmiştir (Miller-Kleinhenz ve ark., 2015).

(Ren ve ark., 2010).

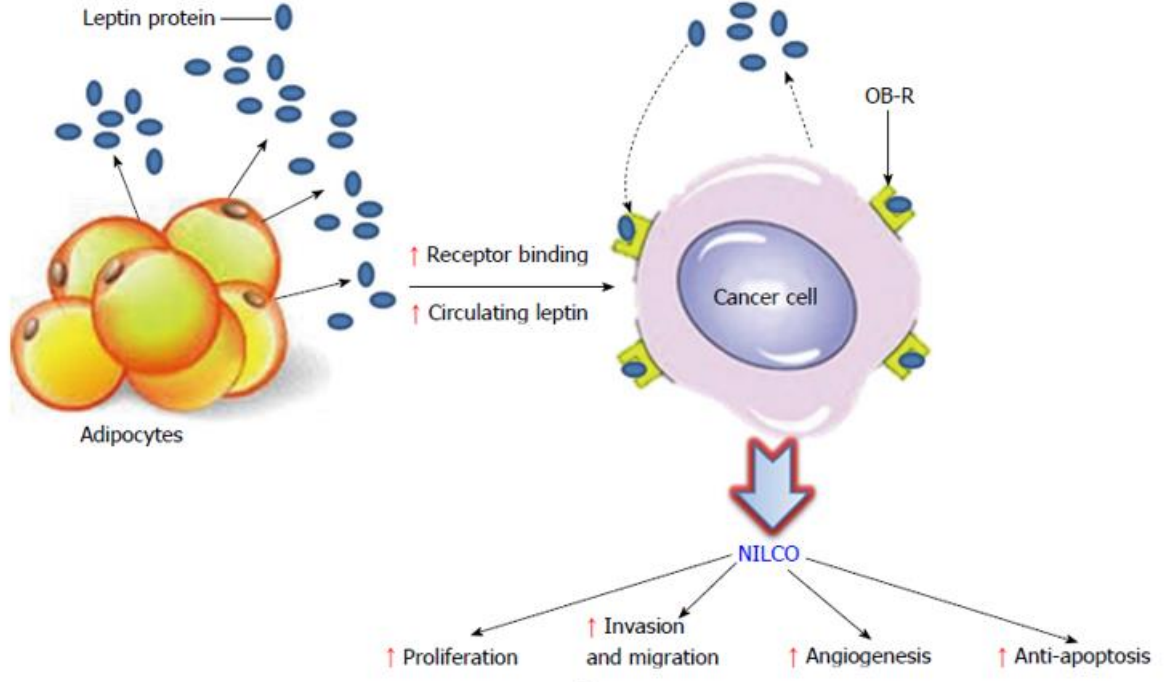
LeptinLeptin'in proliferatif yolaktaki sinyal etkisi, telomeraz aktivitesine de bağlıdır ve leptin'in MCF-7 hücrelerinde doza bağlı olarak telomeraz aktivitesini indüklediği gösterilmiştir. Leptinin hTERT (telomerazın revers transkriptazından sorumlu bir enzim) transkripsiyonunu aktive ettiği rapor edilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalar leptin sinyalinin meme kanseri hücre proliferasyonunu telomeraz aktivitesi aracılığıyla arttırdığını göstermektedir, meme kanseri hücrelerinin canlılığı üzerine farklı mekanizmalar aracılığıyla da etki etmektedir. Apoptozdan kaçınma mekanizmaları, insan meme kanserinde solid tümörlerin gelişimine yol açmaktadır. Ray ve ark., (2007) tarafından TNBC canlılığının leptin sinyali etkisiyle arttırıldığına dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, TNBC'nin yapısında bulunan apoptotik bir proteinin ekspresyonu ile leptin arasında zıt bir ilişki olduğu saptanmıştır. Leptinin, Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large transmembrane molecule) ve Bcl-2 proteinlerini indüklediği ve TNBC canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. Bu hayatta kalma mekanizması, leptinin meme kanseri hücrelerindeki Bcl-2 proteinini regüle etme yeteneği ile apoptozdan kaçınması yoluyla sağlanmaktadır (Ray ve ark., 2007). VEGF ve reseptörü VEGFR-2 ekspresyonu dokulardaki damarlanma oluşumunun bir göstergesi olup, VEGF'nin

VEGFR-2'ye bağlanması neovaskülarizasyon ile sonuçlanan bir kaskad sinyal mekanizmasını başlatmaktadır. Ayrıca, VEGF/VEGFR-2 oranı, otokrin ve parakrin olarak meme kanseri hücrelerinin hayatta kalması üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Gonzalez-Perez ve ark., 2013).

Leptin, tümör anjiyogenezinde esansiyel bir rol oynayan pro-anjiyogenik bir faktör olup, meme kanseri gelişimini indüklemekte ve VEGF ile reseptörü olan VEGFR-2 üretimini belirgin bir biçimde arttırmaktadır. IL-1 sitokin ailesi de anjiyogenez ile ilişkili olup, leptinin VEGF/VEGFR-2 regülasyonuna olan etkisi bilinmektedir. IL-1'in leptin tarafından direkt indüksiyonu ile dolaylı olarak VEGF/VEGFR-2 oranını artırıcı yönde regülasyonu rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2011).

Obezitenin meme kanserinde leptin-Notch sinyal eksenini oluşturup oluşturmadığını araştırmak için, insan MCF-7, MDA-MB231, fare E0771 hücrelerinde, biri zayıf diğeri diyete bağlı obezite geliştirilmiş ve aynı genetiğe sahip C57BL/6J ırkı dişi farelerde oluşturulan E0771 tümörlerinde Notch saptanmıştır.

Meme kanserinde yüksek insidans, agresiflik ve kötü prognoz rapor edilen obez hastalarda leptin kaynaklı Notch'un ilgili olduğunu düşündürmektedir. (Guo ve Gonzalez-Perez 2011; Battle ve ark. 2014). ER⁺ ER⁻ ve TNBC dokularında NILCO (Notch, Interleukin - 1, Leptin Crosstalk Outcome) biyobelirtecini farklı oranlarda ifade edildiği bulunmuştur. Ren ve ark., (2003) çalışmalarında, leptin molekülünün indüklediği, Notch ve IL-1 enflamatuvar sistemlerinin, meme kanseri hücrelerinin hayatta kalımı ve proliferasyonunun regülasyonunda önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Dirençli DMBA [7, 12-dimetilbenz (a) antrasene]-kaynaklı kanser olan obez farelerde, spontan meme tümörü oluşumu sırasında meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında NILCO-leptin sinyalizasyonunun eşzamanlı aktivasyonunun aracı olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmaların birlikte işleyerek anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve meme kanseri hücrelerinin sağkalımını arttırmasının obez hastalarda daha fazla görülebileceğini düşündürmektedir (Şekil 2). NILCO'nun hedef alınması meme kanseri büyümesini ve anjiyogenezini kontrol etmeye yönelik yeni farmakolojik stratejiler tasarlamaya yardımcı olabilir (Guo ve ark. 2012).



Şekil 2. Leptin'in onkojenik rolü

Kanser hücrelerinde görülen obezite, Notch, IL-1 ve leptinin birlikte hareketinin (NILCO) şematik olarak gösterilişi. Adipositler veya kanser hücreleri tarafından salgılanan leptin, kanser hücrelerinde OB-R reseptörüne bağlanır. Kanser hücrelerinde hayatta kalma, proliferasyon, invazyon, migrasyon, anjiyojenez ve anti-apoptozu indüklemek için Notch ve IL-1 sistemleri ile leptin sinyalleri eş zamanlı devreye girmektedir. Bu leptin hareketlerinin meme, endometriyal ve pankreatik kanserlerin ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir (Lipsey ve ark., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.2.2. Leptin, Obezite ve Meme Kanseri Terapileri

Gıda ve İlaç İdaresi, 1998 yılında meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere seçici östrojen reseptör modülatörü olan TAM (Tamoksifen) kullanımına izin vermiştir. TAM, meme riski yüksek menopoz öncesi / menopoz sonrası kadınlarda koruma amaçlı kemoterapi amacıyla ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. TAM, ER⁺ ve PR⁺ (progesterona duyarlı) meme kanserlerini hedeflemekte olup, kontra lateral mem kanseri riskinin azaltılması için kullanılmaktadır. Bu nedenle, Ulusal Kanser Enstitüsü, uzun süreli TAM kimyasal

önleyicisini önermekte ve bugüne kadar yılda 7 milyondan fazla hasta TAM kullanmaktadır (National Cancer Institute, 2015).

Geleneksel terapötik meme kanseri tedavileri yorgunluk, ağrı, iştahsızlık, mide bulantısı, kusma gibi çeşitli yan etkiler nedeniyle genellikle hastalar üzerinde ağır bir etki gösterebilir. Ek olarak, kanser hücre popülasyonları sıklıkla tedaviye direnç kazanmaktadır (Kieran ve ark., 2012; Qian ve ark., 2015). TAM ile tedavi edilen meme kanseri hastaları sıklıkla ilaç direnci gösterirler, bunun nedenleri tamamen bilinmemekte olup, obezite sinyallerine (örn; leptin) bağlı olabileceği öne sürülmüştür. TAM, leptin ekspresyonunda bir artışa neden olmakta, buna karşılık leptin, östrojen reseptörünü aktive edebilmekte ve aromataz aktivitesini artırabilmekte olup, bu da östrojen sentezinin indüksiyonuna neden olmaktadır (Catalano ve ark., 2003). Leptinin meme kanseri hücrelerindeki TAM'ın kemoterapötik etkilerine karşı koyduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca, TAM'e dirençli meme kanseri hücrelerinin OB-R gen ifadesi azaltıldığında *in vitro* olarak daha az proliferatif özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, leptin sinyali kemoterapötik tedaviler sırasında adjuvan olarak kullanılacak yeni inhibitörlerin geliştirilmesi için hedeflenmiş bir çalışma alanı haline gelmiştir (Gonzalez ve Leavis 2003).

Elde edilen son verilere göre, meme kanseri hücrelerinde TAM direncinin aracı molekülü olarak leptin ve STAT3 (sinyal iletim ve transkripsiyon aktivatörü-3) fosforilasyonu arasındaki sinerjistik ilişki rapor edilmiştir. 72 saat süreyle 2 µmol/L TAM ile *in vitro* muamele edildiğinde, MCF-7 ve MCF-7 / HER2 hücre hatlarında, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olmuştur. Buna karşılık, 2 µmol/L TAM + 200 ng / mL leptin kombinasyonu ile 72 saatlik muamele sonucunda MCF-7 ve MCF-7/HER2 hücre hatlarının canlılığı üzerine hücre canlılığının düşüşünü engelleyici yönde bir etki sağladığı görülmüştür. TAM + leptin ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde STAT3 fosforilasyonunun (aktivasyon) arttığı, buna karşın tek başına TAM ile tedavi edilen MCF-7/HER2 hücrelerinde, fosforile STAT3'ün azaldığı gözlemlenmiştir (Papanikolaou ve ark., 2015). Bununla birlikte, TAM tedavisinin obez ve obez olmayan ER⁺ meme kanseri hastaları üzerindeki etkilerinin araştırılması sonucundaki veriler, TAM'ın meme kanseri olan obez hastalar için etkili bir tedavi olmaya devam edebileceğini göstermektedir. TAM ile tedavi edilen hem obez hem de obez olmayan kadınlarda genel mortalitenin azaldığını, benzer bir BMI'ye sahip olan ve plasebo alan kadınlara kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir (Dignam ve ark., 2003).

Leptin seviyeleri ve kemoterapötik direnç mekanizmaları arasındaki bağlantı *in vitro* ortamda MCF-7 meme kanseri hücre dizisinde gösterilmiştir. MCF-7 hücreleri 10 gün boyunca 100 ng/mL leptin, 9. günde ise 10 µmol/L CIS (sisplatin) ile muamele edilmiş ve tedavi boyunca kronik leptin muamelesinin hücrelerde CIS sitotoksitesini engellediği ve meme kanseri hücrelerinin sağ kalımını desteklediği gösterilmiştir (Nadal-Serrano ve ark., 2015).

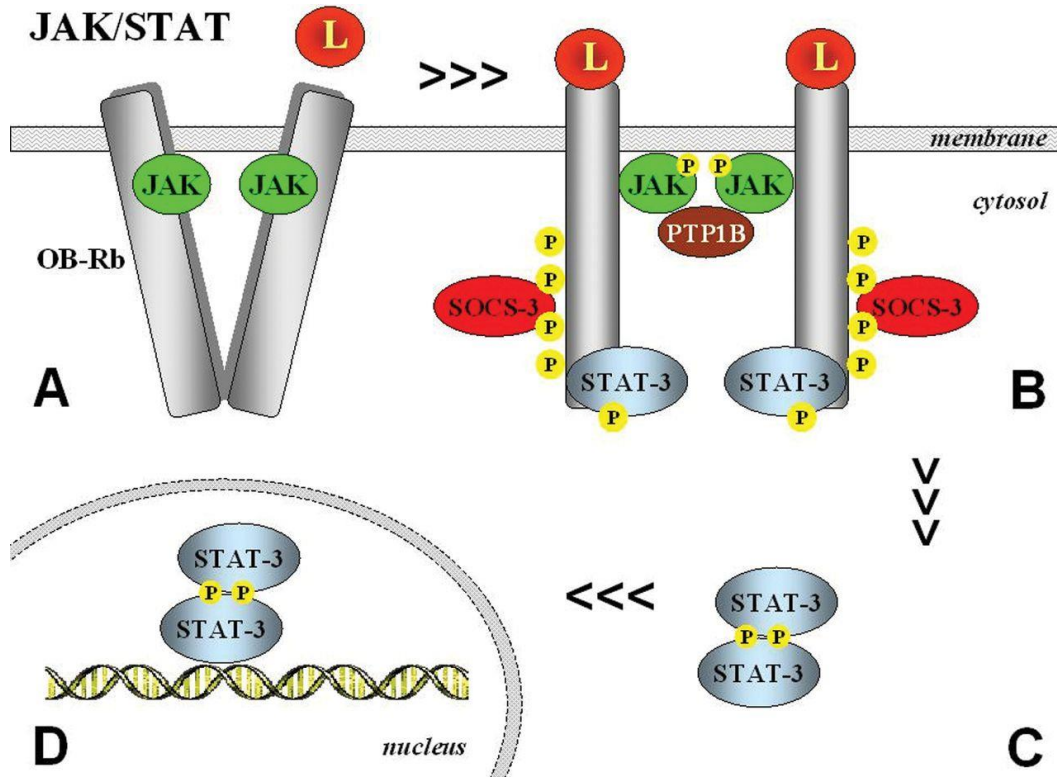
2.3. Leptin Sinyal Yolakları

Son birkaç yılda, leptinin reseptörüne bağlanmasından kaynaklanan sinyal olaylarının incelenmesi, leptinin fonksiyonunun biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. IL-6 reseptör ailesinin GP 130 (glikoprotein 130) alt birimi gibi diğer sınıf I sitokin reseptörleri ile OB-R'nin homolojisi, leptin bağlanmasının JAK (Janus kinazlar) ve STAT'ların aktivasyonu da dahil olmak üzere sitokin reseptör benzeri sinyallere aracılık edebileceğini göstermektedir (Baumann ve ark.,1996). Leptin ve reseptörleri nispeten yakın bir geçmişte keşfedilmesine rağmen, sınıf I sitokin reseptör aracılı sinyalizasyon ve fizyolojik düzenlemenin moleküler ayrıntıları hakkında önceden beri çok şey bilinmektedir. Bu nedenle, bu sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesi olarak OB-R'nin erken tanınması, leptin tarafından aktive edilen ana sinyal basamaklarından birisi olan JAK/STAT yolağının çabuk tanımlanmasına neden olmuştur (Hegyı ve ark., 2004).

2.3.1. JAK/STAT Sinyal Kaskadı

JAK/STAT (Janus kinaz sinyal iletim ve transkripsiyon aktivatörü sinyal yolağı) sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin önemli bir regülatör merkezidir. Adipoz dokudan salgılanan ana adiponektinlerden biri olan leptinin çeşitli kanser tiplerinin görülme sıklığı, ilerleme, nüks etme ve kanser hücrelerinin kimyasallara karşı direnç kazanmasında önemli bir rol üstlendiği öne sürülmektedir (Mullen ve Gonzalez-Perez 2016). Leptinin, OB-R'ye bağlanması ile JAK/STAT aktivasyonu tetiklenmekte ve kanser tedavisinde hedef olarak belirlenen güncel bir konu olarak çalışmaların odağında yer almaktadır. (Frühbeck G., 2006)

JAK/STAT yolu, reseptör olmayan dört adet tirozin kinaz (JAK) ve spesifik serin ve tirozin uçlarının fosforilasyonu ile düzenlenen yedi adet 85-95 kDa'luk transkripsiyon faktörü (STAT'lar) içermektedir. Tipik olarak, JAK/STAT sinyal iletim kaskadı interferonlar, interlökinler veya intrinsik kinaz aktivitesine sahip olmayan sitokin reseptörleri tarafından aktive edilmektedir. JAK etkileşimi ve aktivasyonu için, prolince zengin bir 'box1' bölgesi içeren fonksiyonel sitokin reseptörleri gereklidir (Ihle ve Kerr 1995). Ayrıca, 'box2' olarak adlandırılan “daha az ama iyi korunmuş” diziler JAK etkileşimleri ve izoform seçiciliğinde rol oynamaktadır. JAK ailesinin bilinen dört üyesinden JAK1, JAK2 ve TYK2 (tirozin kinaz 2) yaygın olarak eksprese edilirken, JAK3 yalnızca hematopoietik bağışıklık sistemlerinin hücrelerinde bulunmaktadır (Ihle IN., 1995). OB-R'de intrinsik bir tirozin kinaz alanı yoktur ve bu nedenle sitoplazmik kinazlar, özellikle JAK2'ye bağlanmaktadır. Box1 ve box2 bölgelerinin, JAK'ları bağladığı bilinmektedir. Buna rağmen, leptin sinyalizasyonu kapsamındaki JAK aktivasyonu için yalnızca Box1 ve civarındaki amino asitlerin gerekli olduğu bildirilmiştir (Kloek ve ark., 2002). Box1 ve hücre içi kısımdaki 31-36 alanındaki amino asitlerin sinyal aktivasyonu açısından gerekli olduğu belirlenmişken, bu etkileşim için 37-48 alanındaki amino asitlerin sinyal artışında rol oynadığı, ancak diğer moleküller ile yerinin doldurulabilir olduğu gösterilmiştir (Kloek ve ark., 2002). Tüm OB-R izoformlarının hücre içi membran bölgesinde yan yana Box1 JAK bağlanma alanını içerirken, OB-Rb formu Box2 bölgesi ve STAT bağlama alanlarını da içermektedir. Yalnızca, OB-Rb başlangıçta sinyal kapasitesine sahip izoform olarak görülmesine rağmen, kısa izoformların da farklı sinyal kapasiteleri olduğu gösterilmiştir (Hileman ve ark., 2000).



Şekil 3: Leptin'in JAK/STAT sinyal yolağı mekanizması

Leptin (L) bağlandığında, JAK'lerin yan yana gelmesine izin veren ve daha sonra aktive olacak ve reseptör (B) üzerindeki diğer JAK'ları ve tirozin kalıntıları tirozin-fosforilleyen bir konformasyonel değişim gerçekleşir (A). JAK2'nin aktivasyonu, reseptörün sitoplazmik bölgesindeki transfosforilasyon ve ardından tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile oluşur. Tyr1138'in fosforilasyonu, daha sonra reseptör ile ilişkili JAK'lerin substratları haline gelen STAT'lerin bir araya getirilmesine olanak tanır. STAT'lerin fosforilasyonu, reseptörden ayrışmalara ve hedef genlerin (D) promotör bölgelerine bağlanan gen ekspresyonunu düzenlemek üzere çekirdeğe translokasyon yapan aktif dimerler (C) oluşumuna yol açar (Frühbeck G., 2006'den değiştirilerek alınmıştır).

2.3.2. p38 MAPK Sinyal Kaskadı

MAPK (mitojenle aktive olan protein kinazlar) proliferasyon, farklılaşma, motilite, stres tepkisi, apoptoz ve hayatta kalma gibi çeşitli temel hücrel süreçlerde yer alan, oldukça korunmuş bir serin/treonin protein kinaz ailesidir. Genellikle kabul görmüş MAPK'ler arasında, hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz 1 ve 2 (Erk1/2 veya p44/42), c-Jun N-terminal

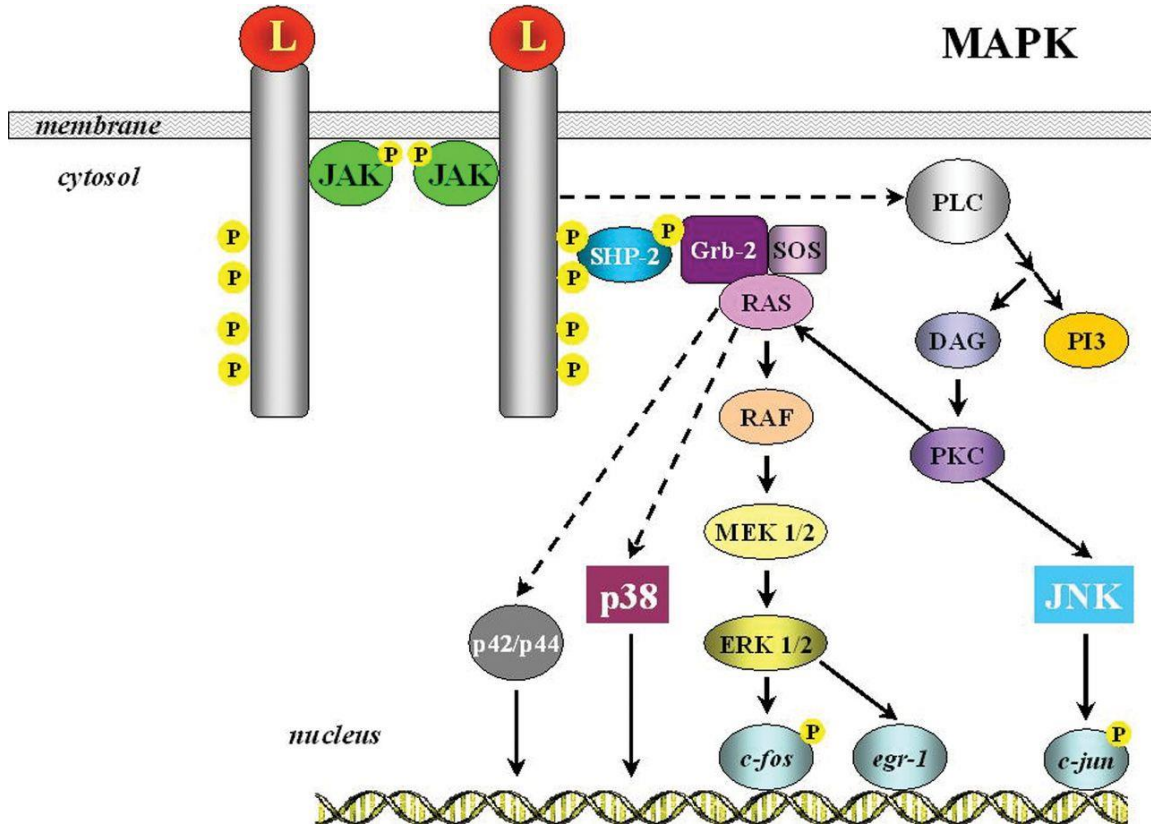
kinazları 1-3 (JNK1-3) / stres aktive protein kinazları (SAPK1A, 1B, 1C) , P38 izoformları (p38 α , β , γ ve δ) ve Erk5 bulunmaktadır. Daha az çalışılan atipik MAPK'ler arasında ise Nemo benzeri kinaz (NLK), Erk3 / 4 ve Erk7 / 8 bulunmaktadır (Cargnello ve Roux 2011).

P38 MAPK ailesinin ilk üyesi, lipopolisakkaritlere yanıt olarak hızlı bir şekilde fosforillenen, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe eden piridinilimidazol ilaçların hedefi olarak, IL-1, arsenit ve ısı şoku ile uyarılan hücrelerde aktivatör olarak hareket eden 4 grup tarafından 38 kDa'luk bir protein olarak tanımlanmıştır (Rouse ve ark., 2017). Bu protein, ozmotik yanıtın önemli bir düzenleyicisi olan *Saccharomyces cerevisiae* Hog1'in homologu olarak bulunmuş olup, p38 α (MAPK14) olarak tanımlanmıştır. Diğer p38 MAPK ailesi üyelerinin hepsinin amino asit dizisi %60 benzer olup, ardı ardına klonlanarak p38 β (MAPK11), p38 γ [SAPK (stresle aktive protein kinaz) 3, ERK (hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz) 6 veya MAPK12] ve p38 δ (SAPK4 veya MAPK13) olarak isimlendirilmişlerdir (Jiang ve ark.,1997). p38 MAPK'lardan dördü farklı genlerle kodlanmakta ve farklı doku ekspresyonu modellerine sahiptirler. p38 α çoğu hücre tipinde önemli düzeylerde ve her yerde bulunurken diğerleri daha dokuya spesifik bir şekilde eksprese edilir. Örnek vermek gerekirse; p38 β beyinde, p38 γ iskelet kasında ve p38 δ endokrin bezlerde bulunur. P38 MAPK ailesi üyelerinin örtüşen substrat spesifiklikleri olduğu gibi, birtakım farklılıkları da rapor edilmiştir. Belirli bazı substratlar p38 α ve p38 β tarafından p38 γ ve p38 δ 'e göre daha iyi fosforile edilebildiği gibi bazı substratlar için ise tam tersi geçerlidir (Cuenda ve Rousseau 2007). Spesifik p38 MAPK aile bireylerinin genetik olarak yok edilmesi, işlevsel çokluğun varlığını da göstermiştir. Örneğin, SAP'nin (sinapsla ilişkili protein) 97/hD1g (insan disklerinde bolca bulunur) ozmotik şokla indüklenen fosforilasyonuna genellikle p38 γ aracılık eder, ancak bu kinaz yokluğunda diğer p38 MAPK'ların bu işlevi gerçekleştirebildiği görülmüştür (Sabio ve ark., 2005).

MAPK ailesinin ERK üyeleri, iyi tanımlanmış Ras/Raf/MAPK sinyalizasyon kaskadının bileşenleridir ve leptin de dahil olmak üzere geniş uyarımlarla devreye girmektedir (Şekil 4). MAPK yolu, OB-Ra tarafından daha fazla olmak üzere, hem OB-Ra hem OB-Rb tarafından uyarılmaktadır (Bjørnbæk ve ark., 1997). OB-R'nin uç kısmı, MAPK sinyalizasyonu için gerekli olmasa da, maksimum reseptör aktivasyonunu sağlamak için uzun reseptörün hücre içi kısmının tamamı gerekmektedir. Bu, leptinin MAPK kaskadını iki farklı yoldan, yani JAK2 reseptörüyle ilişkili aktivasyonun tirozin fosforilasyonu yoluyla veya reseptör fosforilasyonundan bağımsız olarak tetikleyebildiğini göstermektedir (Hegyı ve ark., 2004).

Aktive edilmiş MEK'ler (MAPK / ERK kinazları) ERK'ları fosforile eder ve sonunda hücre çoğalması ve farklılaşmasına katılan c-fos ve egr-1 gibi spesifik hedef genlerin ifade edilmesine yol açarlar. Hem *in vivo* hem *in vitro* da merkezi ve çevresel olarak MAPK sinyal yolağının aktivasyonu gözlenmiştir. Osteoblastik prekürsör hücrelerde leptinin sitoplazma fosfolipaz A'nın ERK1/2 aktivasyonu aracılığıyla, MAPK kaskadı üzerinden apoptozu indüklediği ve bunun da sitokrom c salınımına ve sonucunda kaspaz 3 ve kaspaz 9 indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2003). Monositlerde leptin, p42 / 44 MAPK üzerinden ve bunun sonucunda NF-κB (nükleer faktör κB) / PU.1 bağlanma bölgesi aracılığıyla IL-1Ra'nın (IL-1 reseptör antagonisti) promoterini aktive etmektedir (Dreyer ve ark., 2003). Bir başka araştırma leptinin, beyaz yağ dokusunda NOS (nitrik oksit sentaz aktivitesini), PKA (protein kinaz A) ve p42 / 44 MAPK'yi içeren kompleks bir mekanizma ile stimüle ettiğini ortaya koymuştur (Mehebi ve ark., 2005).

Ozmotik stres, ısı şoku ve sitokinler de dahil olmak üzere geniş bir spekturumdaki uyarılar MAPK ailesinin başka bir üyesini, yani p38 MAPK'yi aktive eder (Sweeney G., 2002). Leptinin, p38 MAPK'ın fosforilasyonunu mono-nükleer hücrelerde ve L6 kas hücrelerinde, direkt olarak değil de insülinle uyarılmış p38 MAPK fosforilasyonunu azaltarak dolaylı yoldan arttırdığı gösterilmiştir (van den Brink ve ark., 2000). Leptin, diğer sitokinler, büyüme faktörleri ve stres aktivatörleri, stresle aktive protein kinazı JNK (c-Jun N-terminal kinaz) aktive etme kabiliyetine sahiptir. Bu bağlamda; leptinin, uyarılan Kupffer hücreleri vasıtasıyla LPS (lipopolisakarit)'deki p38 ve JNK MAPK aracılığıyla TNF-α (tümör nekroz faktörü-α) üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Shen ve ark., 2005). Vasküler düz kas hücrelerinde, leptin molekülü p38 MAPK yoluyla hipertrofiyi indüklemektedir (Frühbeck ve Salvador 2000), bu durum leptin hormonunun kardiyovasküler fizyolojideki potansiyel rolünü ve vaskülerde yeniden modellemeyi etkilediğini göstermektedir. Genel olarak, leptin sinyal iletiminin kesin yolu, yukarı akış aktivatörleri ile p38 ve JNK MAPK yollarının aşağı akış hedefleri tamamen belirlenmiş durumdadır. Aşağı yöndeki hedefler ile ilgili olarak, NF-κB'nin düzenlenmesi, bu temel transkripsiyon faktörünün, TNF-α ve IL-1β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmekte olduğundan ileriki çalışmalar için mutlaka çalışılması gereken bir yol olduğu öne sürülmüştür (Frühbeck G., 2006).



Şekil 4: Leptin'in MAPK yolağının mekanizması

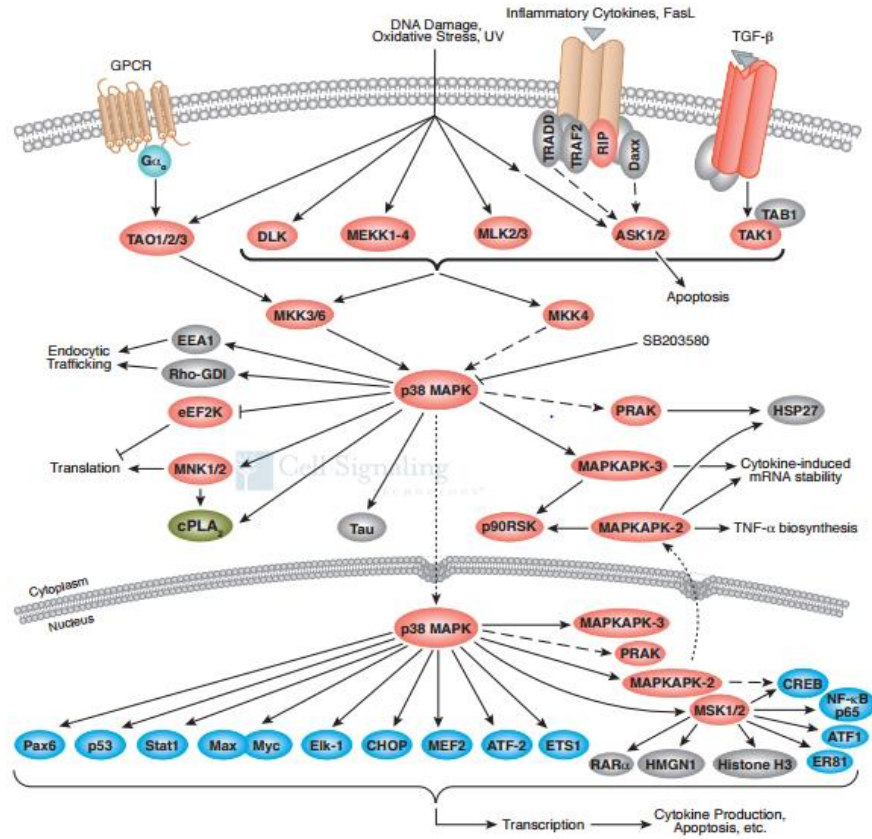
MAPK ailesinin ERK üyeleri, iyi tanımlanmış Ras / Raf / MAPK sinyalleşme kaskadının bileşenleri olup leptin (L) ile aktive olmuştur (Frühbeck G., 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

Kanonik p38 MAPK-aktivasyon yolu, hem substratlara bağlanma hem de p38 MAPK'lerin katalitik aktivitesini arttıran yapısal değişikliklere neden olan, aktivasyon halkasında treonin ve tirozin uçlarından MAP2K ile katalize edilmiş fosforilasyonunu içermektedir. Aslında, farelerde gen hedefleme deneyleri, MKK3 ve MKK6'nın p38α aktivasyonunda önemli rol oynadığını göstermiştir (Brancho ve ark. 2003). Bununla birlikte, p38α'nın (ve muhtemelen P38β) kanonik olmayan (non-kanonik) mekanizmalarının aktivasyonu da tanımlanmıştır. Biri, antijen reseptörü [TCR (T hücre reseptörü)] uyarılmış T-lenfositlerine spesifiktir (Salvador ve ark., 2005)

Kanonik MAP2K aracılı mekanizma ile karşılaştırıldığında kanonik olmayan TCR aracılı aktivasyon yolunun önemi, Tyr323'ün fenilalanin ile değiştirildiği p38α-knockin farelerinin üretilmesi ile araştırılmıştır. Bu fareler doğurgan olup, aktivasyon mekanizması olarak Tyr323 fosforilasyonu her dokuda bulunmamaktadır. Bununla birlikte, bu farelerdeki T

hücrelerinde p38 α , TCR stimülasyon sırasında aktive olmaz ve Tyr323 fosforilasyonun gerçekleştiği başka bir yolun kullanılması şarttır. Knockin farelerden, T hücrelerinde p38 α 'yı aktive etmedeki başarısızlık, hücre döngüsü girişinde anlık bir gecikme ile sonuçlanır, ancak bu nokta geçildiğinde, hücrelerin normal bölünmeye uğradığı görülmektedir. Ayrıca, TCR ile aktive olan knockin T-lenfositlerinde IFN γ (interferon γ) üretimi azalmaktadır. Bu nedenle, Tyr323 aracılı kanonik olmayan yol, TCR aracılığıyla p38 α 'nın aktivasyonunun fizyolojik yoludur ve normal Th1 fonksiyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir ancak Th1'in oluşması için gerekli değildir (Jirmanova ve ark., 2009). p38 α aktivasyonunun başka bir alternatif yolu şu şekildedir: TAB1 (TAK1-bağlayıcı protein1), p38 α 'ya bağlanabilir, ancak diğer p38 MAPK ailesi üyelerine bağlanamaz ve aktivasyon halkasında p38 α otofosforilasyonunu indükler (Ge ve ark., 2002).

Son olarak, üçüncü bir kanonik olmayan MAP2K bağımsız mekanizma P38 için MAPK aktivasyonunun, HeLa hücrelerinde p38 α aracılı apoptoza yol açan bir abortif S-fazını indükleyen protein kinaz Cdc7'in aşağı regülasyonunu içerir ve altta yatan mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Im ve Lee 2008).



Şekil 5: p38 MAPK sinyal kaskadı

P38 MAPK'lar (α , β , γ ve δ), çeşitli çevresel stresler ve enflamatuar sitokinler tarafından aktive edilen MAPK ailesinin üyesidir. Diğer MAPK kaskadlarında olduğu gibi, membran-proksimal bileşen MAPKKK, tipik olarak bir MEKK veya karışık bir soy kinazı (MLK) 'dir. MAPKKK, MKK3 / 6, p38 MAPK kinazlarını fosforile eder ve aktive eder. MKK3 / 6, doğrudan apoptotik uyarılar tarafından uyarılan ASK1 ile doğrudan aktive edilebilir. P38 MAPK, ATF-2, Stat1, Max / Myc kompleksi, MEF-2, Elk-1 ve dolaylı olarak HSP27, MAPKAPK-2 (MK2), MAPKAPK-3 (MK3) ve birkaç transkripsiyon faktörünün düzenlenmesinde yer alır (Cuadrado ve Nebreda 2010'dan değiştirilerek alınmıştır).

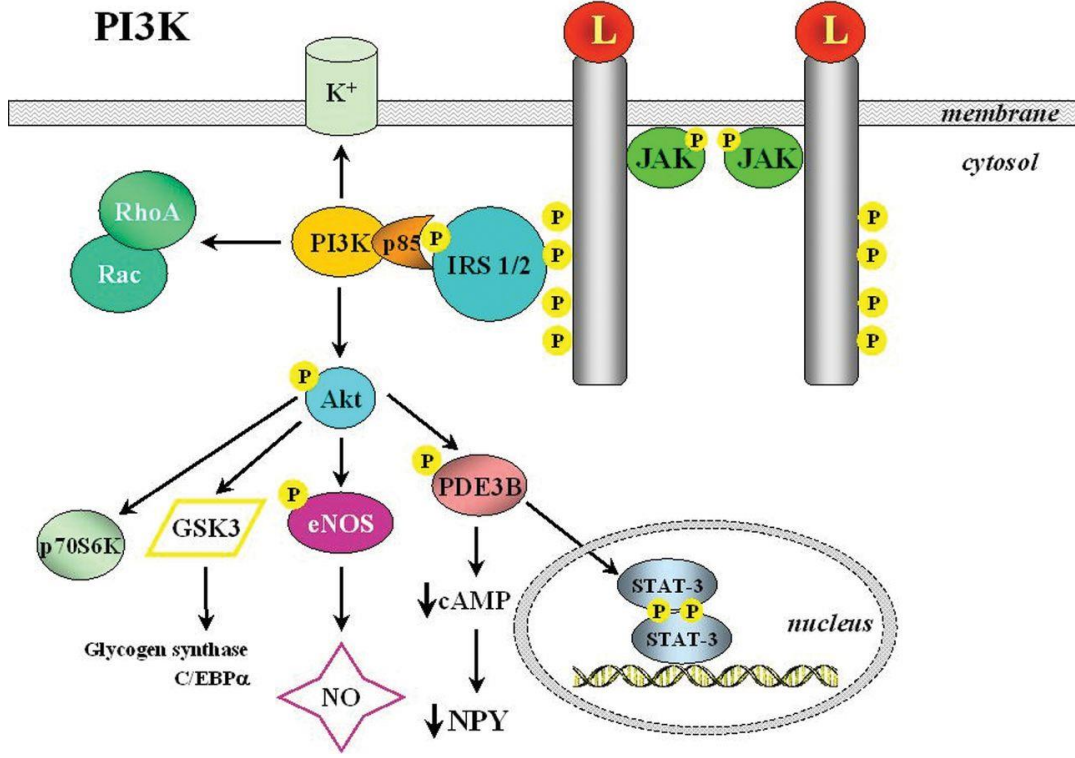
2.3.3. PI3K/PDE3B/cAMP Yolağı

PI3K (fosfatidil inozitol 3-kinaz) aktivitesi, özellikle insülin ifadesini gerektiren geniş bir ligand spektrumu tarafından düzenlenen önemli bir hedeftir. Aslında insüline bağımlı faaliyetlerin çoğu, PI3K aktivasyonu içermekte ve bu durum insülin ve leptin sinyal yolları arasındaki çapraz karışmanın önemli bir noktası haline gelmektedir (Hegyi ve ark., 2004; Benomar ve ark., 2005). PI3K ürünleri tipik olarak Akt (protein kinaz B) ve PKC (protein kinaz C) izoformları gibi protein kinazları uyarır (Sweeney G., 2002). Leptin'in insülin sinyalizasyon kaskadının bazı bileşenleri yolu ile etki ettiği rapor edilmiştir. İnsülinin reseptörüne bağlanması yoluyla, reseptörün intrinsik kinaz aktivitesi ile tirozinleri fosforilenmiş çeşitli IRS'ler (insülin reseptör substratları) işlevsel duruma geçer. IRS'lerin fosforilasyonu ile diğer sinyal moleküllerine bağlanmak için afinitesi artmakta ve böylece yolağın ileriki adımları başlamaktadır. IRS proteinleri, düzenleyici altbirimi p85 yoluyla katalitik kısmının aktivitesini arttırmakta ve böylece PI3K aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. Merkezi sinir sisteminde olduğu gibi, örneğin yağ dokusu, pankreas ve karaciğerde de, leptinin PDE3B'nin (fosfodiesteraz 3B), PI3K'ye bağımlı aktivasyonunu ve devamında cAMP redüksiyonunu içeren insülin benzeri bir sinyal yolağı oluşturduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2002).

Leptinin, IRS2 aracılı hipotalamik PI3K aktivitesini uyardığı gösterilirken, PI3K'nin farmakolojik blokajı, leptinin neden olduğu NPY/AgRP (beyindeki bir nöron adı) hiperpolarizasyonunu etkisiz hale getirerek, leptinin anorektik etkisini bloke ettiği gösterilmiştir (Niswender ve ark., 2001). İlginç bir şekilde PI3K'nin inhibisyonu, OB-Rb'nin yolağın akışının aşağısında çalışan melanokortin agonistlerinin anorektik etkisini etkileyemez. Ayrıca, leptin aracılı sempatik aktivasyon için PI3K aktivitesi gereklidir (Rahmouni ve ark., 2003). Farklı hücre dizilerinde sonuçlar aynı olmayabilmekte ve her bir hücre tipinde çalışan leptin-insülin çapraz-sinyal mekanizmalarının doğası farklı özellikler gösterebilir. Leptinin

iyi diferansiye olmuş, hepatoma hücre dizisinde insülin yolu üzerinde direkt bir etkisi yoktur; leptin ile önceden muamele, insülin kaynaklı IRS1 fosforilasyonunu ve bunun p85 ile olan ilişkisini geçici olarak arttırmaktadır. Leptin uygulaması insülin kaynaklı fosforilasyonu etkilemeksizin Akt fosforilasyonunu daha da arttırır. Üstelik, leptin tek başına GSK3 (glikojen sentaz kinaz 3) serin fosforilasyonu üzerine insülinde daha az etki eder (Szanto ve Kahn 2000). C2C12 kas hücrelerinde, leptinin PI3K'yi JAK2 ve IRS2'ye bağımlı yollar vasıtasıyla aktive ettiği bildirilmiştir (Kellerer ve ark., 1997). Bu miyotüplerde leptin hücre yüzeyine GLUT4'ü de çeker ve glukoz taşınmasını uyarır. Bu etki, hem PI3K hem de MAPK'yi inhibe edebilen Wortmannin (PI3K inhibitörü) tarafından bloke edilebilir. Leptinin neden olduğu PI3K uyarımı, makrofajlarda hormona duyarlı lipaz aktivitesini etkilerken, PI3K inhibitörleri kullanılarak bloke edilebileceği gözlenmiştir (O'Rourke ve ark., 2001) Pankreatik β hücrelerinde leptin, cAMP düzeylerini düşürerek ve glukagon benzeri peptid-1 ile uyarılan insülin sekresyonunu inhibe ederek, PDE3B regülasyonuna katılır. Aktive edilmiş PI3K'den farklı olan bir sinyal yolu, K^+ /ATP kanallarının indüksiyonunu aktive eder ve bu da hücre membranının hiperpolarizasyonunu tetiklemektedir (Zhao ve ark., 2000)

Leptinin uyarıcı ve inhibe edici etkileri tetiklediği diğer bir hormon PKC'dir. PKC stimülasyonuna yanıt olarak ob/ob farelerin pankreas adacıklarından insülinin salınmasının leptin tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca leptinin glukoz aracılı insülin sekresyonunu azaltma kabiliyetiyle, Ca^{2+} bağımlı PKC'nin aktivitesini azaltabilmesi ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Pankreatik adacıklardaki leptin etkisinin, insülin sekresyonunda fizyolojik olarak yer alan fosfolipaz C-PKC sinyalizasyon sisteminin PKC tarafından düzenlenen bileşenini bloke edebileceğini gösteren kanıtlar da bulunmaktadır (Sweeney G., 2002).



Şekil 6: Leptin'in PI3K yolağının mekanizması:

P3K yolağının leptin tarafından stimüle edilmesi, birden fazla bölgede hormonun birkaç farklı etkisini uygulamak için önemli bir kaskad olduğunu gösterir (Frühbeck G., 2006'den değiştirilerek alınmıştır).

2.3.4. Diğer Leptin-Aktive Sinyal Yolakları

Leptinin tüm dokularda çok işlevli sitokin gibi davrandığı ve tüm vücutta birçok hücrel fonksiyona dahil olduğu saptanmıştır. Leptin, etkilerini arttırmak için, birçok sinyal faktörü ile etkileşime girerek, her yerde bulunan reseptörleri aracılığıyla farklı sinyal iletim yollarıyla crosstalk yapar. Leptin tarafından aktive edilen ana yolaklar yukarıda tanımlanmıştır. Bununla birlikte, leptinin yer aldığı gözlemlenen birkaç sinyal olayı daha vardır. Bazıları açık bir şekilde kanıtlanmışken bazıları daha yeni yeni açıklanmaya başlanmıştır. Obezite ile ilişkili kardiyovasküler komplikasyonların patogenezinde leptinin rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Yang ve Barouch 2007). NO (nitrik oksit) ile leptin arasındaki morfolojik ve fizyolojik benzerliği göz önüne alarak, leptin ile aralarında potansiyel fonksiyonel bir ilişki kurulmuştur (Frühbeck ve ark., 2001). Leptin uygulamasının serum NO konsantrasyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (Frühbeck G., 1999). Buna ek olarak, NO'nun leptinin neden olduğu lipolizi kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir (Frühbeck ve Gómez-Ambrosi 2001). Kan basıncında homeostasiyle ilgili olarak, leptinin vasküler tonus kontrolünde aynı anda bir nörojenik baskı aksiyonu ve buna karşı bir NO aracılı baskılayıcı bir etki oluşturduğu gösterilmiştir (Frühbeck G., 1999). Ardından yapılan çalışmalar, leptinin kan basıncı regülasyonuna katılımını daha da açıklayarak leptin ile ortaya çıkan anjiyotensin

II bağımlı intraselüler kalsiyum artışının ve vazo-konstrüksiyonun inhibisyonu NO'ya bağlı bir mekanizma yoluyla olduğunu göstermektedir (Fortuño ve ark., 2002) Dahası, son zamanlarda, beyaz adipositlerde leptinin neden olduğu NO üretiminin PKA ve MAPK aktivasyonu yoluyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Mehebi ve ark., 2005).

Leptinin belirlenen ilk etkilerinden biri anjiogeneze olan katkısıdır. Endotel hücrelerinin işlevsel olarak başlıca OB-R'yi eksprese ettiği gözlenmiştir. Leptinin kültüre alınan endotel hücrelerinin bir araya toplanmasına, tüpleri oluşturmaya ve doku vaskülatürünü anımsatan bir retiküler diziye sahip olmasına neden olduğu gösterilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* test edilen etkiler, leptinin anjiyojenik süreçlerin teşvik edilmesine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (Bouloumié ve ark., 1998).

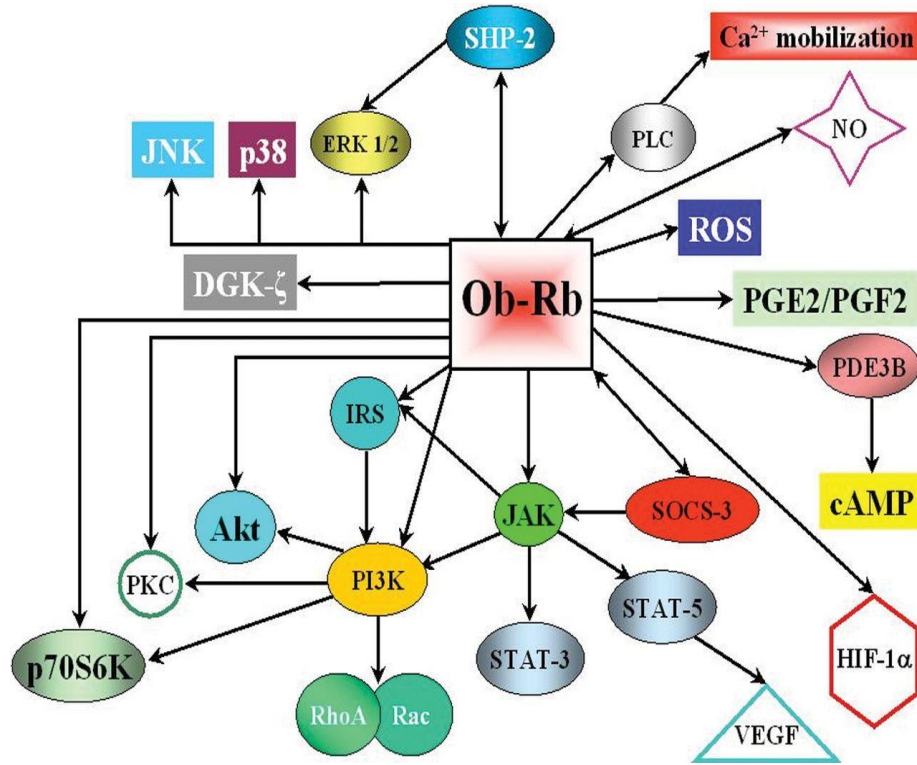
2.4. Leptin'in Anjiyogenik Rolü

Leptinin anjiyojenik etkileri arasında birkaç tane ilgi çekici olasılık belirtilmiştir. Birincisi, leptin, yağ kütlesi hacmi arttıkça yeni kan damarlarının oluşumuna katkıda bulunur ve böylece kan damarlarını yağ miktarı ile eşleştirir. Adipositler tarafından üretilen hormon sadece kan dolaşımına salınmakla kalmaz, aynı zamanda kan akımı ve yağ deposu boyutu arasında uygun bir dengeyi sağlayarak, parakrin olarak endotel hücreleri üzerine lokal hareket edebilir (Frühbeck G., 2006). Fakat bu işlev için esansiyel olduğu söylenemez, çünkü leptinin tamamen eksik olduğu çok büyük yağ depoları, yeterli miktarda kan tedarikini gerçekleştirebilmektedir. Hücre büyümesi, hücre göçü ve anjiyogenez, tümör hücreleri tarafından tümör proliferasyonunu ve ilerlemesini hızlandırmak için gerçekleştirilen normal biyolojik süreçlerdir. Bir anjiyojenik faktör olan leptin, kan damarlarını oluşturmak için bazı kanser hücreleri tarafından salınabilir. Primer tümör büyümesi ve metastaz oluşumunun ikisi de kan damarlarının yeni kan damarları oluşumuna bağlıdır. Sıçan insülinioma kaynaklı pankreatik β hücrelerinin, proliferatif bir yanıtı kontrol eden fonksiyonel bir leptin reseptörü eksprese ettikleri saptanmıştır (Islam ve ark., 1997). Benzer şekilde, OB-R'lerin insan kolon kanseri hücre hatlarında ve insan kolon dokusunda eksprese edildiği gösterilmiştir (Hardwick ve ark., 2001). Buna ek olarak, kolonik epitel hücrelerinin leptin ile uyarılmasının çoğalmayı hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Oksijen homeostazını korumak için, memeli mikro-damar sistemi oksijen ve besin maddelerini hipoksik dokuları beslemek için yeniden yapılanmaya uğrar.

Birçok transkripsiyon faktörü, süreci yönlendiren çevresel ipuçlarını algılayarak anjiyogeneziyi ilerletmek için çalışır. Ortaya çıkan faktörlerden birisi, oksijen homeostazının düzenlenmesi için bir ana transkripsiyon faktörü olarak işlev gören HIF-1 α (hipoksi uyarılabilir faktör 1 α) 'dır. Fizyolojik koşullarda HIF-1 α , ubikutin bağlayarak proteinin yapısını değiştirme ve hızlı degradasyona uğramaya adapte edilmiştir. Hipoksik koşullar altında HIF-1 α , PI3K/Akt ve MAPK/ERK yolu ile aktive edilir. Daha sonra HIF-1 α çekirdeğe translokasyon yapar ve anjiyogeneze katılan genleri, VEGF'i (vasküler endotelial büyüme faktörü) kodlayan gen gibi- promotörlere bağlar (Strieter 2005). İlginç olarak, JAK2 / STAT5

yolağının, anjiyogeneze bağlı düzenlenme süreçlerine dahil olduğu gösterilmiştir (Dudley ve ark., 2005). Bu eksenindeki ana molekül, tirozin kinaz reseptörünün spesifik STAT aktivasyonu sergilediği gösterilen VEGF'dir. Anjiyogenezdeki tamamlayıcı rolü ile tutarlı olarak, VEGF ve STAT'lar leptin sentezi ve sekresyonunun iyi bilinen bir uyarıcısı olan hipoksi de dahil olmak üzere çeşitli hücre stresörlerine duyarlıdır. Hipoksi, HIF-1 α 'yı uyarırken aynı zamanda leptin ve VEGF'nin ekspresyonunu da belirgin bir şekilde artırır (Frühbeck G., 2006).

Aslında, HIF-1 α 'nın leptin gen promotörünü transaktive ettiği ve insan leptin promotörü olan farklı transkripsiyonel elementler vasıtasıyla düzenleyen insülin ile sinerjik olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Meissner ve ark., 2003). VEGF/leptin/HIF-1 α eksenini, neovaskülarizasyonu içeren, örneğin tümör büyümesi, diyabetik retinopati, adipoz kütlelenin genişlemesi, ateroskleroz ve karaciğer rejenerasyonu gibi süreçler ile ilgili detaylı önemlidir. Leptinin sinyal yollarındaki etkisi, apoptoz ve aktin-miyozin sito iskeletinin düzenlenmesi gibi sayısız hücresel süreçte rol oynayan Rho familyası GTPaz'ları da kapsar. (Sweeney G., 2002). Leptin'in reaktif oksijen türlerinin üretilmesine katılımı, diaçilgliserol kinaz- σ 'ya bağlanan prostaglandinlerin uyarılması, p90 ribozomal protein S6 ve p70S6K'nın harekete geçirilmesi, katekolamin salınımı gibi proseslerde leptin ile farklı seviyelerde etkileşime giren birçok sinyal molekülü vardır ki bunlar daha dikkatli düşünmeyi ve bu alanda daha çok çalışma yapmayı gerektirmektedirler (Frühbeck G., 2006).



Şekil 7: Leptin'in etki ettiği sinyal mekanizmaları ve anjiyogenik rolü

Leptinin dahil olduğu çok sayıda ve çeşitli yolları özetleyen şematik diyagram gösterilmiştir. (Frühbeck G., 2006'den değiştirilerek alınmıştır).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

MCF-7 hücre hatları ADÜ BİLTEM'den temin edilmiştir, ticari olarak üretilmiş olan hücre hatları olduğu için herhangi bir etik kurul onayı gerekmemektedir.

Tablo 1. : Kimyasal Malzemelerin Listesi

Ürün	Ürün Kodu	Firma
RIPA Lysis tamponu, 100 ml	sc-24948	Chem Cruz
Smart BCA protein assay kit, 2500 test	21071	Intron
İnsan rekombinant leptin, 1 mg	L-4146	Sigma-Aldrich
Fetal Bovin Serum (FBS), 100 ml	CP-16-1265	Capricorn
Bovin Serum Albumin (BSA),100 g	A-3059	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin, 100X, 20 ml	P-4333	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA (%0,25), 1X, 100 ml	T-4049	Sigma-Aldrich
L-Glutamine, 200 Mm, 100 ml	G-7513	Sigma-Aldrich
Gentamicin, 50 mg/ml	G-1397	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 500 ml	CP16-1273	Capricorn
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS), 500 ml	D-8537	Sigma-Aldrich
Amphotericin B, 20 ml	A-2942	Sigma-Aldrich
MCF-7 Hücre Dizisi	-	ADÜ-BİLTEM
75'lik steril flask	431464U	Corning
25'lik steril flask	-	Orange Scientific
1,5 ml'lik steril eppendorf	-	Axygen Quality
15 ml'lik steril falkon	-	Orange Scientific
50 ml'lik steril falkon	31434	Sigma-Aldrich
Steril 12 kuyucuklu mikroplate	3513	Costar
Pipet tek kullanımlık steril, 5 ml	160510	Sigma-Aldrich
Pipet tek kullanımlık steril, 10 ml	4488	Costar
2 ml'lik steril hücre dondurma tübü	TPP89020	Thermo scientific

3.2. Kullanılan Cihazlar

İnkübatör, Nuair (NU 5500, Plymouth, ABD)

Biyogüvenlik Kabini (2.seviye), Heraeus (HS12, Hanau, Almanya)

İnvert Mikroskop, (Olympus CK40, Tokyo, Japonya)

UV-Visible Multiskan Spektrofotometre, (Diagnostik Automation Inc, Los Angeles, ABD)

Soğutmalı Santrifüj (15 ml falkon için) (Hettich D78532, Tuttlingen, Almanya)

Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf için) (Eppendorf 5415R, Hamburg, Almanya)

Mikroplate Shaker (ısıtmalı), (Eksper HT, İzmir, Türkiye)

Mikroplate Yıkayıcı, (Eksper, İzmir, Türkiye)

EVE™ Otomatik Hücre Sayım Cihazı (NanoEnTek, Seul, Güney Kore)

3.3. Deney Düzeneginin Hazırlanması

Hücrelerin Çözdürülmesi

Önceden dondurulmuş olan MCF-7 adherent hücrelerinin çalışılmak üzere sıvı azottan çıkarılması ve kültür ortamına uygun prosedürleri takiben ekilmesi aşamasını içermektedir. Bunun için öncelikle su banyosu 37° C'ye ısıtılır, komplet hücre kültür ortamının ısısının su banyosunda 37° C'ye gelmesi sağlanır. Hücreler sıvı azot tankından, -196° C'den çıkarılır çıkarılmaz 37° C'lik su banyosunda hızla çözülür (Hücrelerin bulunduğu tüpün tamamen suya batırılmamasına dikkat edilir). Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik alkol ile silinir. 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml 37° C'de ısıtılmış taze besiyeri yavaşça eklenir ve ağzı sıkıca kapatılır. 1100 rpm (200g) 'de 5 dakika santrifüj edilir (Russo ve ark., 1977). Süpernatant pipetle aspire edilir ve atılır. Çöken hücre pelleti üzerine 5ml yeni ortam besiyeri eklenir ve pipetaj ile hücreler iyice süspanse edilir. 25 cm² 'lik flasklara aktarılır. Hücrelerin homojen dağılıp dağılmadığı invert mikroskop altında incelenir. %5'lik CO² inkübatörüne kaldırılır. Ertesi gün invert mikroskop altında hücre canlılığı incelenir. Hücreler adherent yapıda oldukları için canlı hücreler flask tabanına tutunmuş haldedirler. Ölü hücre ve

artıkların ortamdan uzaklaştırılması için eski ortam mediumu aspire edilir ve uzaklaştırılır, 6 ml yeni ortam besiyeri eklenir. Flask doluluk oranı %80-90 aralığına ulaştığı zaman 75 cm²'lik flasklara aktarılmak üzere pasajlama işlemi gerçekleştirilir.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler düzenli olarak invert mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) hücrenin morfolojisi ve sayısı yönünden incelendi. Hücrelerin durumuna göre ortalama 2 günlük aralıklarla pasajı yapıldı. %5 CO₂'li inkübatörden çıkarılan hücre kültür flaskları biyolojik güvenlik kabine alındı. Eski medium aspire edilerek atıldı. Hücrelerin flask dibinden kaldırılması için %0,25 lik tripsin-EDTA solüsyonundan 1 ml eklendi ve 1 dk kadar 37°C'de inkübatörde bekletildi. Mikroskopta yuvarlak hale gelen hücrelerin tutunmayı bırakıp kaymaya başladığı gözlemlendiği anda taze besiyerinden 5 kat yani 1 ml tripsin için en az 5 ml medium eklenerek tripsinin etkisi inhibe edildi. Hücre kültür flasklarındaki tripsinli ve kalkan hücreli medium pastör pipeti ile pipetaj yapılarak konik tabanlı santrifüj tüplerine aktarıldı. 1100 rpm'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi (Russo ve ark., 1977). Süpernatant atılıp pellet hücre yıkama çözeltisi (DPBS, Ca⁺² ve Mg⁺² negatif) ile yıkandı. Tekrar santrifüj edildi. Pellet oda sıcaklığına getirilen, 4ml hücre mediumu ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 1'er ml; 11'er ml taze besiyeri içeren 75 cm²'lik hücre kültür flasklarına eklendi. İvert mikroskop ile hücreler kontrol edildi. Hücre kültür flaskları üzerine pasaj sayısı ve tarih yazılarak, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü

Her pasaj işleminde hücrelerin canlılığı tripan mavisi boyası (Nanoentek, Seoul, G.Kore) ile kontrol edildi. Lam üzerine 10µl hücre süspansiyonu ve 10µl tripan mavisi koyularak karıştırıldı (Fogaça ve ark., 2017). EVE™ Automated Cell Counter, NanoEnTek hücre sayım cihazı kullanılarak hücreler otomatik olarak sayıldı ve canlı hücrelerin (boya almayan hücrelerin) yüzde oranı hesaplandı. Hücre sayım cihazı 1 ml'de ne kadar hücre olduğunu ve hücre canlılık yüzdesini otomatik olarak hesapladığı için cihazdaki veriler 3 tekrarlı olarak ölçülerek ortalaması alındı. (Automated ve Counter n.d.)

Hücre Dondurma Besiyerinin Hazırlanması

35 ml DMEM,

10 ml FBS,

5 ml DMSO (dimetilsülfoksit) reaktifleri karıştırılarak hazırlandı.

Hücrelerin Dondurulması

Hücreler pasajlanırken, 2.- 5. pasaj sayısı aralığında bazı hücrelerin pasajı devam ettirilirken, bir kısım hücre ileri çalışmalarda tekrar kullanılabilmesi amacıyla dondurularak saklandı.

Hücre kültür flasklarındaki medium pastör pipeti ile pipetaj yapılarak konik tabanlı santrifüj tüplerine aktarıldı. 1100 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet hücre yıkama çözeltisi ile yıkandı. Tekrar santrifüj edildi. Pellet, dondurma çözeltisinde süspanse edilerek son hacim yaklaşık 5×10^6 - 2×10^7 hücre/ ml olacak şekilde ayarlandı. Eş zamanlı olarak tripan mavisi ile canlılık kontrolü yapıldı. Bu karışımdan 1'er ml, -80°C 'ye dayanıklı krio tüplerine aktarıldı. Krio tüpleri üzerine tarih, pasaj sayısı ve canlılık oranı not edildi. Dakikada 1°C soğutan izopropil alkollü özel kontainer içinde -80°C soğutucuya konuldu. 1-2 gün içinde -196°C 'lik sıvı azot tanklarına ilerde kullanılmak üzere kaldırıldı.

MCF-7 Hücreleri İçin Complete Medium Hazırlanması

500 ml DMEM,

50 ml FBS,

5 ml Penisilin-Streptomisin (100 mM),

5 ml Gentamicin

500 µl Amphotericin B reaktifleri karıştırılarak hazırlandı.

3.3.1. Hücre Kültürü Uygulaması

Hücreler %90 doluluğa ulaştığında, pasajlanarak, 75'lik büyük flasklara aktarıldı. Daha sonra hücreler tamamen dolduğunda 12 kuyucuklu steril plaklarda 1.5×10^5 hücre/kuyucuk, 2 kuyucuk, deney tekrarlama sayısı $n=6$ olacak şekilde kültüre edildi. Yarı dolu kuyucuklar oluştuktan sonra, hücreler 200 µL DPBS (Ca^{+2} ve Mg^{+2} negatif Dulbecco's Fosfat Buffer Saline) ile yıkandı ve 48 saat boyunca fetal bovine serum içermeyen DMEM + %1 BSA içinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda leptin içeren (0, 0.6, 1.2, 6.25 ve 62.5

nM ki bu değerler sırasıyla 0,10, 20, 100 ve 1000 ng/ml'ye eşittir) enkübe edildi (Dubois ve ark., 2013). 48 saat süresi sonunda ortam medyumu toplandı. Toplanan ortam mediumunda MAPK multi ELİSA kiti ile p44/42 MAPK, p38 MAPK, MEK1, pMEK1, SAPK/JNK ve Psapk/JNK molekül düzeyleri saptandı. MCF-7 hücre ortam mediumlarındaki protein miktarı Smart BCA protein assay kit kullanılarak çizilen BSA standart grafiği denklemine göre hesaplandı. Sonuçlar ng /mg protein şeklinde verildi.

MAPK Multi Elisa Kit (*Yehua, Şangay, Çin*) ile Çalışılması

Bu kitin temel prensibi, MAPK'yi test etmek için biyotin çift antikor sandviç teknolojisine dayanan enzime bağlı immunosorbent testinin (ELISA) kullanılmasına dayanır (Engvall ve Perlmann 1971). P44/42 MAPK tavşan dedektif antikor, fosfo 38 MAPK (Thr180 / Thr182) tavşan dedektif antikor, MEK1 tavşan dedektif antikor, fosfo-MEK1 / 2 (Ser217 / 221) tavşan dedektif antikor, SAPK / JNK tavşan dedektif antikor ile önceden kaplanmış kuyulara antijen içeren örnek (serum, kan, plazma, hücre medyumu vb) eklenir ve inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bağışık kompleksi oluşturan streptavidin-HRP ile birleştirmek için biyotin etiketli antikorlar eklenir. İnkübasyon ve yıkamadan sonra bağlanmamış enzimleri çıkartılır, sonra A ve B substratlarını sırasıyla eklenmesi ile çözelti maviye dönüşecek ve daha sonra durdurma solüsyonunun eklenmesinin ardından solüsyonun içeriğindeki asit etkisi ile sarıya dönüşecektir. Çözeltinin tonları ve MAPK konsantrasyonu pozitif olarak korelasyona sahiptir.

Protokol şu şekildedir.

- 1- Kit çalışılmadan önce +4°C'den çıkarılır ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilir.
- 2- İlk olarak kitin manuelinde belirtilen standart konsantrasyonları hazırlanır. Stok standart çözeltisinden 120 µl alınır ve 120 µl standart diluent ile seyreltilir. Bu çözeltiden de 120 alınır ve üzerine ve 120 µl standart diluent eklenerek seri dilusyonlar ile konsantrasyonları (20, 40, 80, 160, 320, 640 ng/L) olacak şekilde 6 standart hazırlanır.
- 3- Kör'ü bulunduğu A1 kuyucuğa örnek, standart, biotin ve streptavidin eklenmez. A2-A7 arası kuyucuklara 50 µl standart eklenir. A8-H8 kuyucuklarına ise 40 µl örnek + 10 µl antikor eklenir. Kör kuyucuğu(A1) dışındaki tüm kuyucuklara (standart ve örneklerin bulunduğu kuyucuklar) 50 µl straptavidin-HRP eklenir. Üstü koruyucu plate membran ile kapatılır ve 37°C 150 rpm hafif çalkalayıcı ayarlı inkübatörde 60 dk inkübe edilir.

- 4- İnkübasyondan sonra koruyucu plate membranı çıkarılır, içindeki sıvı dökülür ve iyice boşaltıldığından emin olduktan sonra yıkama işlemi yapılır.
- 5- Yıkama solüsyonu hazırlanır. 20 ml (30X) 600 ml distile suda çözülür ve plate yıkayıcıya yüklenir. Prosedürde yazılan yıkamaya ayarı 350 µl yıkama solüsyonu her bir kuyucuğa eklenip, içinde 30 sn bekletmeli ve aspire edilmeli modda ayalanarak yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.
- 6- Yıkama işleminden sonra plate yüz aşağı yapılarak kuyucukların boşaltıldığından ve içinde damla damla yıkama solüsyonu kalmadığından emin olduktan sonra sırasıyla önce 50 µl kromojen A solüsyonundan hemen ardından 50 µl kromojen B solüsyonundan eklenir. Yavaşça sallanır ve ışıktan uzakta 37°C'de 10 dk inkübe edilir. Renk oluşumu takip edilir.
- 7- Mavi renk oluşumu gözleendiği anda (ortalama 5 dk içinde) tüm kuyucuklara durdurma solüsyonundan 50 µl eklenerek reaksiyon durdurulur ve çözeltinin rengi maviden sarıya döner.
- 8- Durdurma solüsyonu eklendikten hemen sonra veya max. 10 dk içerisinde 96-well plate ELISA okuyucu cihazı kullanılarak 450 nm dalga boyunda okuma yapılır.
- 9- Standartların konsantrasyonlarına karşılık okunan OD değerlerine bağlı olarak standart grafiği çizilir. 4-parametre denklemi bulunur ve bu denklemden yola çıkılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplanır.

Smart BCA Protein Assay Kit(*Intron, Gyeonggi, G.Kore*) ile Kolorimetrik Total Protein Tayini

Total proteininin kolorimetrik tespiti ve nicelendirilmesi için bicinchoninic asit (BCA) yöntemi kullanılmıştır (Smith ve ark., 1985). Bu tahlilin mor renkli reaksiyon ürünü, bir bakır iyonu ile iki BCA molekülünün şelatlanmasıyla oluşturulmuştur. Bu suda çözünür kompleks 562 nm'de geniş bir çalışma aralığında artan protein konsantrasyonları ile doğrusal olan güçlü bir absorbans sergilemektedir. (20-2,000 ug / ml)

Protein makromoleküler yapısı, peptit bağlarının sayısı ve dört belirli amino asidin varlığı (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) BCA ile renk oluşumundan sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Buna göre, protein konsantrasyonları genellikle sığır serum albümini (BSA) gibi

ortak bir proteinin standartlarına referansla belirlenir ve raporlanır. Bilinen konsantrasyondaki bir dizi dilüsyon proteinden hazırlanır ve bilinmeyen örnek konsantrasyonlarının standart eğriye göre belirlenmesi prensibinden yararlanır.

Mikroplate prosedürü şu şekildedir:

- 1- BSA stok solüsyonundan yola çıkılarak, distile su kullanılarak seri dilüsyonlar ile 20-2000 ug/ml arasında çeşitli standartlar hazırlanır.
- 2- Steril 96 well-plate'in kör kuyucuğuna (A1) 25 µl distile su, A2-A8 arası standartların kuyucuklarına ise seyreltikten derişige sırasıyla standartlardan 25 µl, diğer kalan kuyucuklara (B1-C8) ise sırasıyla örneklerden 25 µl konulur.
- 3- Üzerine A solüsyonu ve B solüsyonunun (50:1) oranda karışımından hazırlanan çalışma solüsyonundan 200 µl eklenir ve 30 dk oda sıcaklığında beklenir.
- 4- Standartlar ve örneklerde mor renk oluşumu gözlenmeye başladıktan sonra 562 nm'de okuma yapılır.
- 5- Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerlerine göre Kjunction Software programı kullanılarak 4 parametre standart grafiği çizilir. Bu denklem kullanılarak örneklerin bilinmeyen konsantrasyonları yani total protein değerleri hesaplanır.

3.4. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların leptin dozlarına bağlı pozitif veya negatif korelasyon gösterip göstermediğini çift yönlü korelasyon testi kullanılarak tespit edildi ($p < 0,05$). Ayrıca gruplar kendi içerisinde ortalama \pm standart sapma tablosu ile değerlendirildi. Tüm sinyal moleküllerinin korelasyon eğrisi tek bir grafik üzerinde gösterildi.

MCF-7 hücrelerine leptinin farklı dozları uygulanarak 48 saat inkübasyonu sonucu toplanan ortam mediumlarındaki sinyal moleküllerinin istatistiksel analizi normal dağılıma uygunluğu değerlendirilerek, tek yönlü ANOVA ve Kruskal-Wallis yöntemleri kullanılarak yapıldı. Buna göre MEK1 molekülü normal dağılım gösterdiği için tek yönlü ANOVA

(Tamheinn) ile p44/42 MAPK, P38 MAPK, pMEK1, SAPK/JNK, Psapk/JNK ise normal dağılıma uymadığı için Kruskal-Wallis analizi ile değerlendirildi. Tüm çalışmalar %95 güven aralığı baz alınarak gerçekleştirildi ($p < 0,05$).

4. BULGULAR

MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanan çeşitli leptin dozları ile (sırasıyla 0, 10, 20, 100, 1000 ng/ml) 48 saat inkübasyonu sonucu toplanan ortam mediumlarındaki sinyal moleküllerinin düzeylerinin ortalama ve \pm standart sapmaları Tablo.1 de gösterilmektedir.

Tablo 2. Sinyal moleküllerinin ng/mg protein ortalamaları ve standart sapmaları

Leptin Dozu	Sinyal Molekülleri					
	P44/42MAPK	P38 MAPK	MEK1	pMEK1	SAPK/JNK	Psapk/JNK
Kontrol	450,9 \pm 26,6	468,6 \pm 13	486,1 \pm 11,6	492,1 \pm 10,4	448,8 \pm 31,7	451,5 \pm 0,37
10	595,7 \pm 9,37	661,3 \pm 53,1*	687,6 \pm 10,4*	694,6 \pm 70,1*	659,8 \pm 72*	650,6 \pm 47,4
20	631,5 \pm 2,70*	686,1 \pm 28,2*	748,4 \pm 39,2*	740,1 \pm 46,7*	683,2 \pm 71,2*	867,9 \pm 66,9*
100	677,5 \pm 34*	658,6 \pm 23,7**	695,3 \pm 39,1**	650,5 \pm 43,8**	663,4 \pm 39,2*	681,6 \pm 7,9**
1000	583,5 \pm 5,8*	594,3 \pm 50,2	653,5 \pm 0,31*	544,5 \pm 53,3	587,9 \pm 14,1	619,6 \pm 55,2

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren dozları ifade eder. ($p < 0,05$)

**: Leptin'in dozları arasında farklanma gözlenenleri ifade eder. ($p < 0,05$)

Tablo 3: p44/42 MAPK, P38 MAPK, MEK1 moleküllerinin farklanma gösteren dozlarının p değerleri

Sinyal Molekülü	Farklanma Gösteren Gruplar	P değeri
P44/42 MAPK	Kontrol – 20 Leptin	0,004
P44/42 MAPK	Kontrol – 100 Leptin	0,000
P44/42 MAPK	100 Leptin – 1000 Leptin	0,006
P38 MAPK	Kontrol – 10 Leptin	0,004
P38 MAPK	Kontrol – 20 Leptin	0,000
MEK1	Kontrol – 10 Leptin	0,000
MEK1	Kontrol – 20 Leptin	0,000
MEK1	Kontrol – 100 Leptin	0,000
MEK1	Kontrol – 1000 Leptin	0,000
MEK1	10 Leptin – 1000 Leptin	0,003
MEK1	20 Leptin – 1000 Leptin	0,012

Tablo 4: pMEK1, SAPK/JNK, Psapk/JNK moleküllerinin farklanma gösteren dozlarının p değerleri

Sinyal Molekülü	Farklanma Gösteren Gruplar	P değeri
pMEK1	Kontrol – 10 Leptin	0,016
pMEK1	Kontrol – 20 Leptin	0,000
pMEK1	20 Leptin – 1000 Leptin	0,004
SAPK/JNK	Kontrol – 10 Leptin	0,010
SAPK/JNK	Kontrol – 20 Leptin	0,001
SAPK/JNK	Kontrol – 100 Leptin	0,004
pSAPK/JNK	Kontrol – 20 Leptin	0,000
pSAPK/JNK	Kontrol – 100 Leptin	0,038
pSAPK/JNK	20 Leptin – 1000 Leptin	0,025

MEK1 molekülü için Tamheinn ile analiz yapılmış, diğer moleküller için Kruskall-Walls yöntemi kullanılmıştır.

Her bir sinyal molekülü tek tek değerlendirildiğinde, varyans analizi sonuçları şu şekildedir; P44/42 MAPK için veriler normal dağılıma uygun olmadığından non-parametrik bağımsız testlerden Kruskal-Walls ile varyans analizi gerçekleştirildi. Buna göre, p44/42 MAPK molekülünün ng/mg protein değerleri kontrol ile 20 ng/ml leptin dozu arasında belirgin bir artış göstermektedir ($p=0,004$; $p<0,05$). Aynı şekilde, kontrol ile obezite dozu olan 100 ng/ml leptin (Dubois ve ark., 2013) arasındaki artış ise oldukça belirgindir ($p=0,000$; $p<0,001$). 100 ng/ml leptin ve 1000 ng/ml leptin arasındaki fark azalış yönünde olmakla beraber istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi. ($p=0,006$; $p<0,05$)

P38 MAPK molekülünü değerlendirdiğimizde, veriler normal dağılıma uygunluk göstermediği için non-parametrik bağımsız testlerden Kruskal-Walls ile varyans analizi yapıldı. Buna göre p38 MAPK molekülünün ng/mg protein değerleri kontrol ile 10 ng/ml leptin ($p=0,004$; $p<0,05$) ve kontrol ile 20 ng/ml ($p=0,000$; $p<0,001$) leptin arasında artış yönünde istatistiksel açıdan oldukça belirgin bir fark tespit edildi. Kontrol ile diğer dozlar arasındaki artış olmakla beraber istatistiksel açıdan belirgin bir fark göstermediği saptandı. Aynı şekilde, leptinin fizyolojik dozları (10 ng/ml ve 20 ng/ml) arasında ve obezite dozu 100 ng/ml ile farmakolojik dozu 1000 ng/ml arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

MEK1 molekülünü değerlendirdiğimizde, veriler normal dağılıma uygun olduğu için ANOVA testi uygulanmıştır. Uygun olan yöntemi belirlemek için ise, varyansların homojenliğine bakıldı. Varyanslar homojen olmadığı için seçilen Anova yöntemi Tamheinn olarak belirlendi. Buna göre, kontrol ile bütün leptin dozları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,000$; $p<0,001$). Ayrıca fizyolojik leptin dozları olan 10 ng/ml 20 ng/ml ile farmakolojik doz 1000 ng/ml arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi. 10 ng/ml-1000 ng/ml için $p=0,003$; 20 ng/ml-1000 ng/ml için $p=0,012$ olarak saptanmıştır.

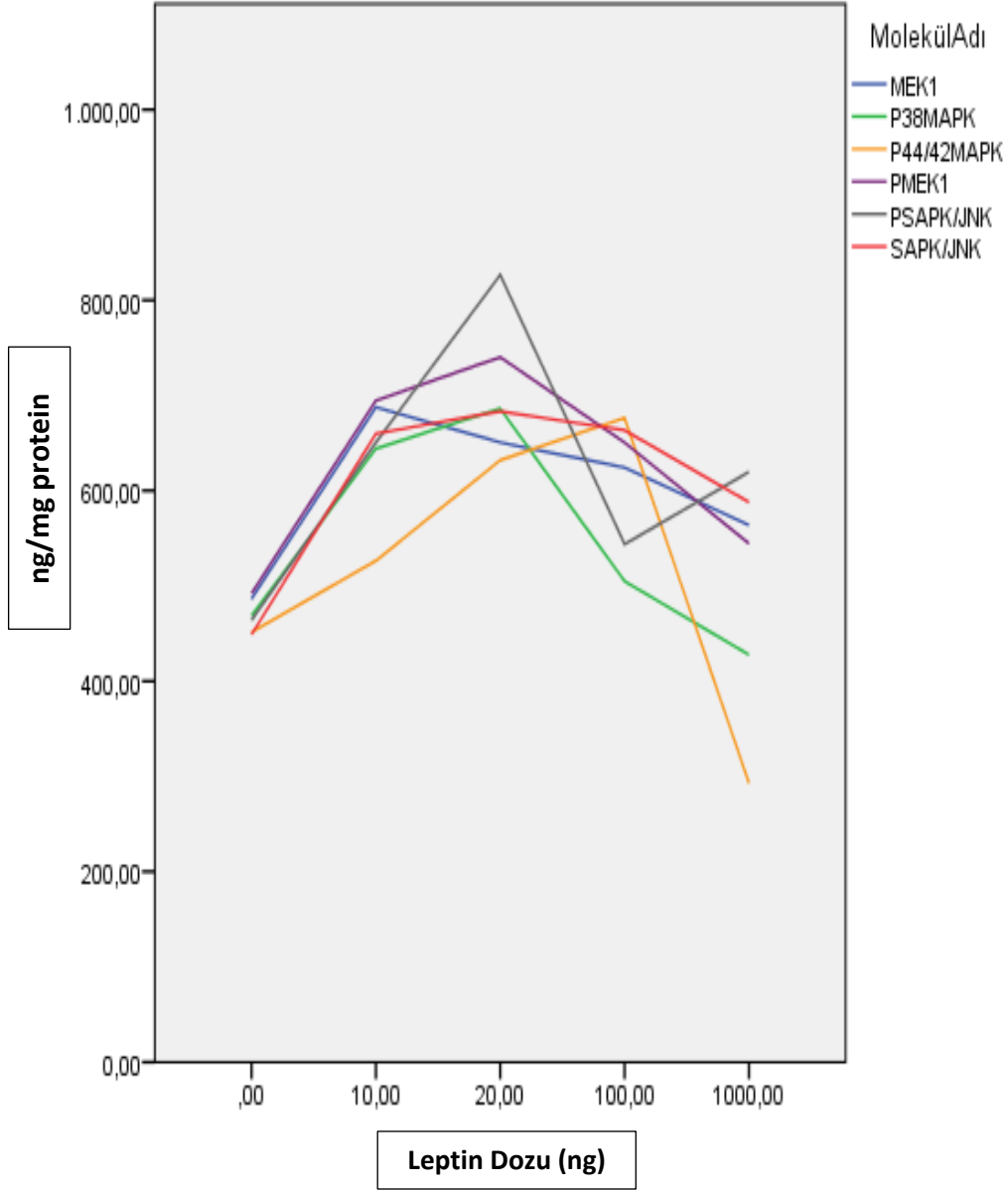
pMEK1 molekülünü değerlendirdiğimizde, veriler normal dağılıma uygun olmadığı için non-parametrik bağımsız testlerden Kruskal-Wallis ile varyans analizi yapıldı. Buna göre, pMEK1 molekülünün ng/mg protein değerleri kontrol ile 10 ng/ml leptin arasında ($p=0,016$; $p<0,05$), kontrol ile 20 ng/ml leptin arasında ($p=0,000$; $p<0,001$), 20 ng/ml leptin ile 1000 ng/ml leptin arasında ($p=0,004$; $p<0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlemlendi.

SAPK/JNK molekülünü değerlendirdiğimizde, veriler normal dağılıma uygun olmadığı için non-parametrik bağımsız testlerden Kruskal-Wallis ile varyans analizi yapıldı. Buna göre, SAPK/JNK molekülünün ng/mg protein değerleri kontrol ile 10 ng/ml leptin arasında ($p=0,010$; $p<0,05$), kontrol ile 20 ng/ml leptin arasında ($p=0,001$; $p<0,05$) ve kontrol ile 100 ng/ml leptin arasında ($p=0,004$; $p<0,05$) artış yönünde istatistiksel açıdan oldukça anlamlı bir fark tespit edildi.

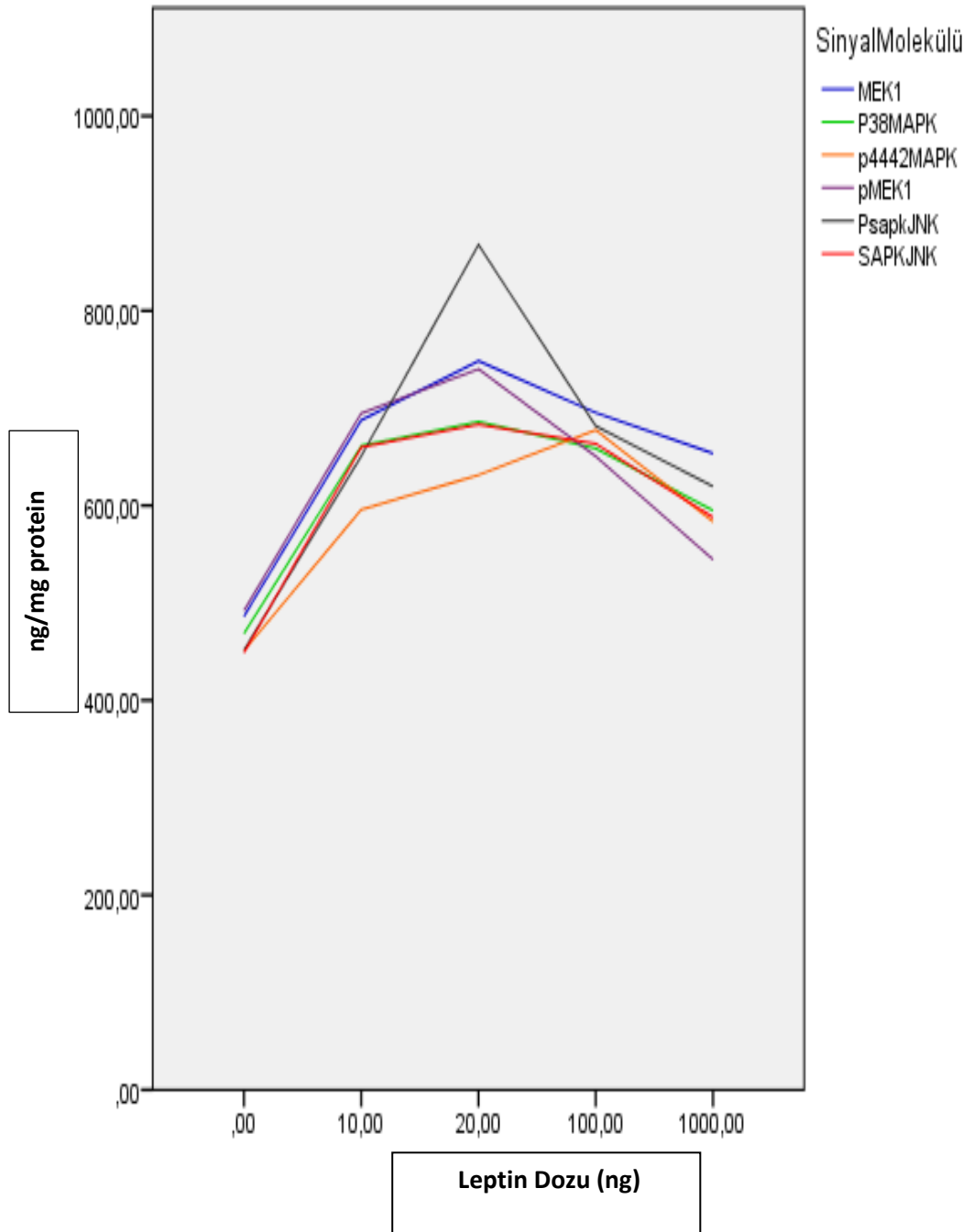
Psapk/JNK molekülünü değerlendirdiğimizde, veriler normal dağılıma uygun olmadığı için non-parametrik bağımsız testlerden Kruskal-Wallis ile varyans analizi yapıldı. Buna göre Psapk/JNK molekülünün ng/mg protein değerleri kontrol ile 20 ng/ml leptin arasında ($p=0,000$; $p<0,001$) oldukça belirgin bir artış olduğu saptandı. Kontrol ile obezite leptin dozu 100 ng/ml (Dubois ve ark. 2013) arasındaki artışın da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0,038$; $p<0,05$) Leptinin 20 ng/ml dozu ile farmakolojik dozu 1000 ng/ml (Dubois ve ark., 2013) arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma söz konusudur ($p=0,025$; $p<0,05$).

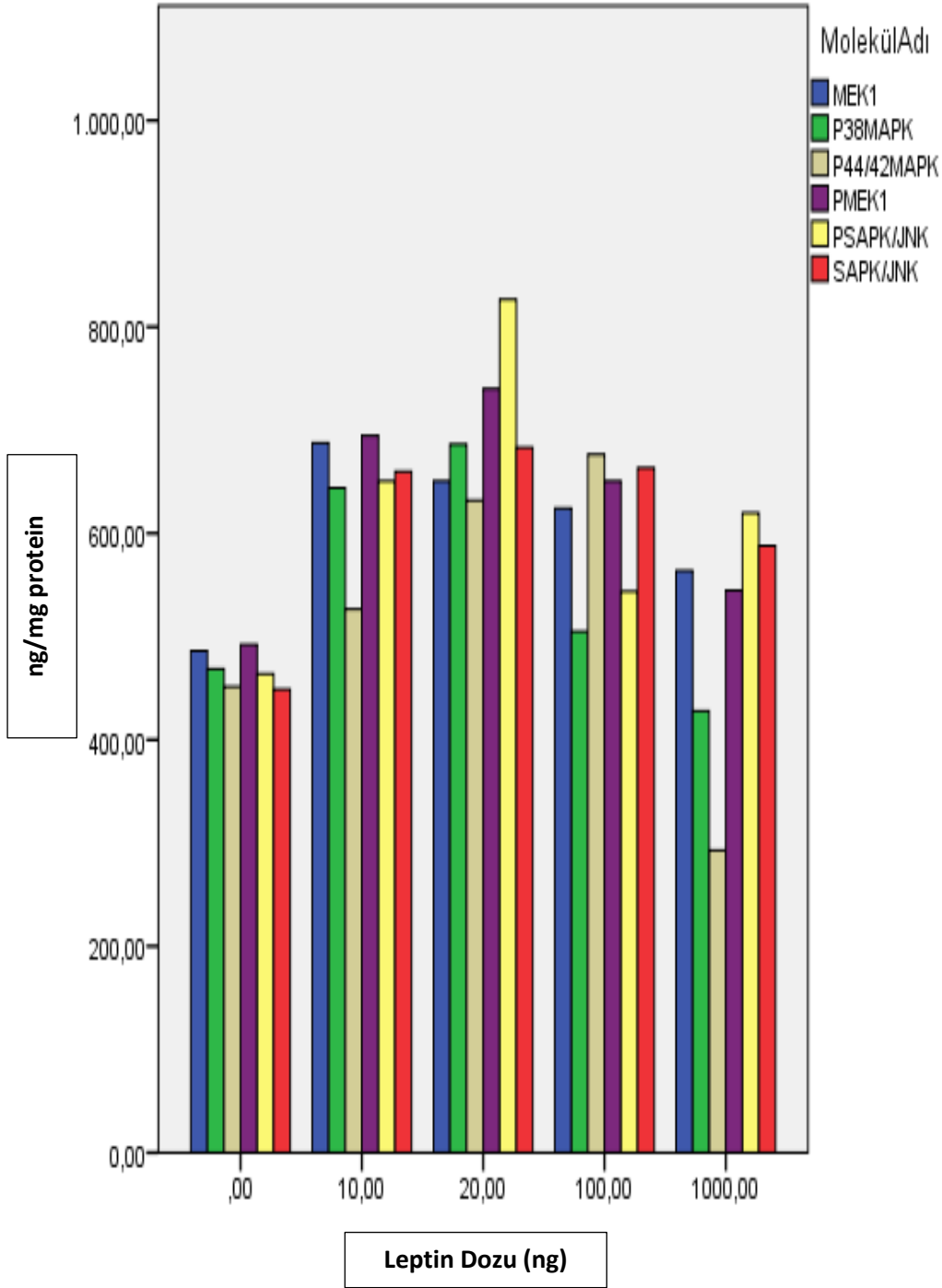
Sinyal moleküllerinin istatistiksel açıdan çizilen korelasyon eğrileri sapan değerler dahil ve sapan değerler çıkarılmış şekilde çizilmiş olarak Şekil 8.de gösterilmektedir.

Aynı şekilde leptin dozlarına bağlı olarak sinyal moleküllerinin miktarındaki değişim sapan değerler dahil ve sapan değerler çıkarılmış olarak Şekil.9'deki sütun grafiğinde gösterilmektedir.

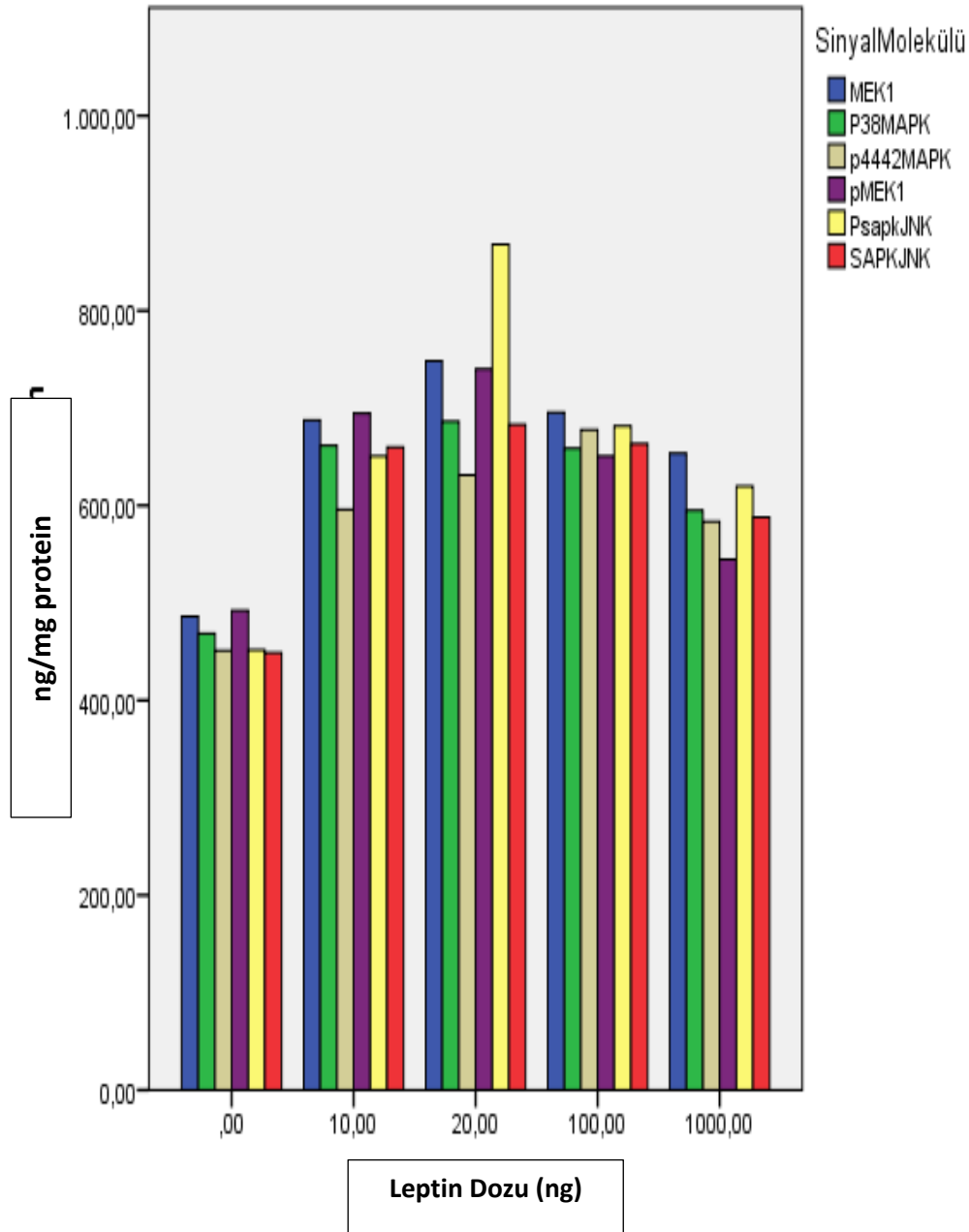


Şekil 8 : Leptinin indüklediği kanonik ve non-kanonik yollardaki P44/42 MAPK, P38 MAPK, MEK1, pMEK1, SAPK/JNK ve Psapk/JNK sinyal moleküllerinin miktarlarının leptin'in 10 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml dozlarına bağlı korelasyon eğrilerinin gösterilmesi outlier dahil (üstte), outlier çıkarılmış (altta) ($p < 0,05$)



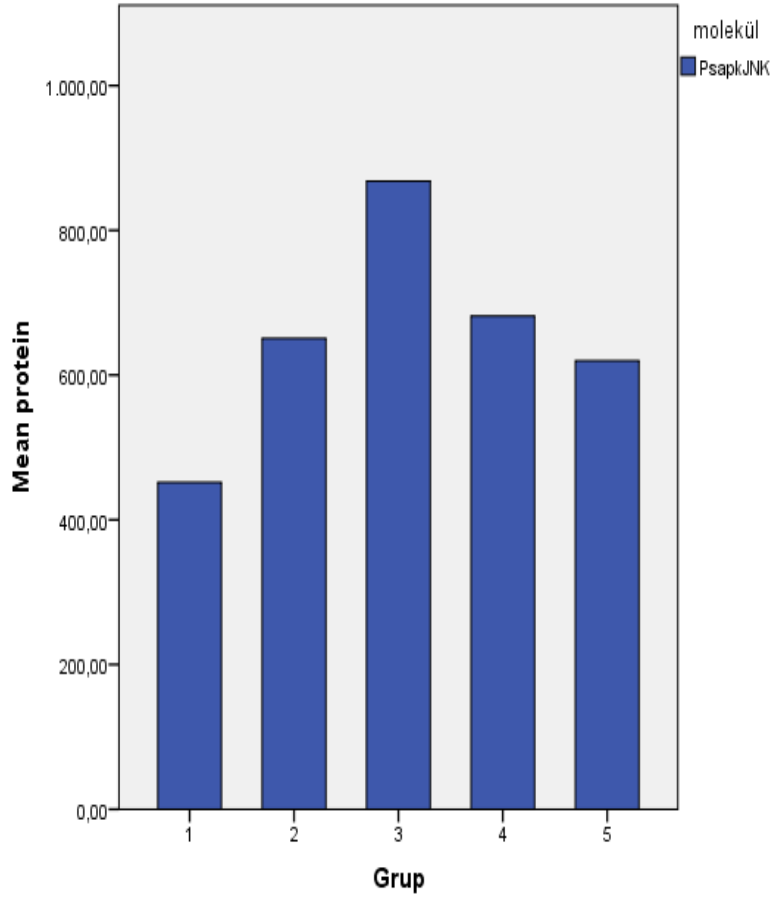


Şekil 9. Leptinin indüklediği kanonik ve non-kanonik yollardaki P44/42 MAPK, P38 MAPK, MEK1, pMEK1, SAPK/JNK ve Psapk/JNK sinyal moleküllerinin miktarlarının leptin'in 10 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml dozlarına bağlı değişiminin gösterilmesi ($p < 0,05$) outlier dahil üstte, outlier çıkarılmış (altta)

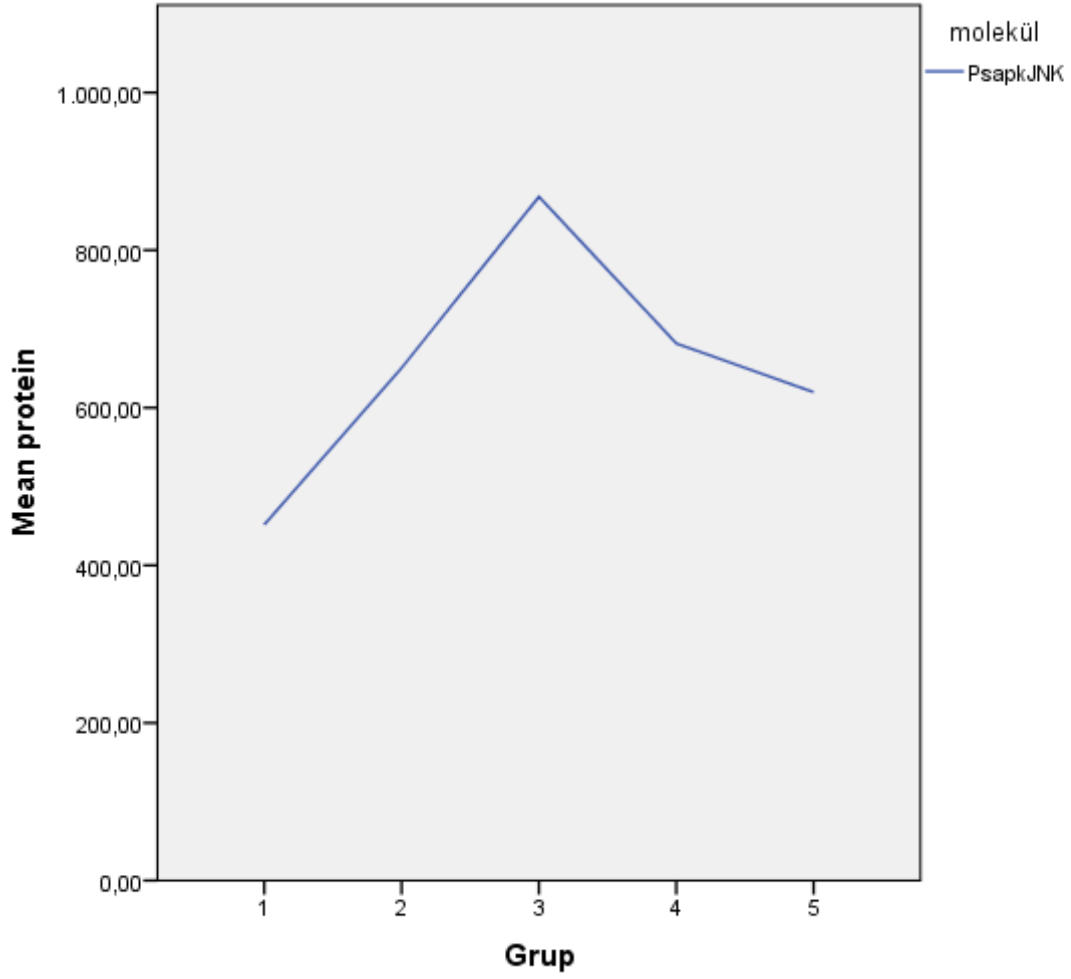


Elde edilen bulguların istatistiksel korelasyon sonuçlarına bakarak, p44/42 MAPK molekülü değerlendirildiğinde, 100 ng/ml leptin dozuna kadar pozitif korelasyon gözlenmiş olup 100 ng/ml'den itibaren miktarında düşüş saptanmıştır. Bunun nedeni olarak, farmakolojik leptin dozunun(1000 ng/ml)(Dubois ve ark., 2013) sinyal aktivasyonu için bir negatif feedback etkisi göstermiş olabileceği düşünülebilir. P38 MAPK molekülünün miktarı ise, 20 ng/ml leptin dozuna kadar pozitif korelasyon gösterirken, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml'lik leptin dozlarında ciddi bir düşüş görülmektedir.

Aynı durum, MEK1, pMEK1, SAPK/JNK ve Psapk/JNK moleküllerinde de görülmektedir. 20 ng/ml leptin dozuna kadar istatistiksel açıdan anlamlı bir pozitif korelasyon görülürken, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml leptin dozlarında düşüş saptanmıştır. Bütün sinyal moleküllerinden elde edilen sonuçları genel olarak değerlendirdiğimizde, leptin verilmeyen kontrol gruplarıyla kıyaslandığında leptin uygulanan ilk iki dozda (10 ng/ml ve 20 ng/ml) istatistiksel açıdan anlamlı bir pozitif korelasyon gözlenirken, daha yüksek dozlarda leptin artışına karşılık sinyal moleküllerinin miktarında bir azalma görülmektedir. Bu durum, bir tek p44/42 MAPK da biraz daha farklı işlemektedir. P44/42 MAPK molekülünde leptinin ilk 3 dozunda (10 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml) istatistiksel olarak belirgin bir anlam ifade eden ($p<0,05$) pozitif korelasyon gözlenir. Farmakolojik leptin dozunda (1000 ng/ml) ise ciddi bir düşüş olduğu görülmektedir.



Şekil 10: Psapk/JNK molekülünün leptin dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi (1: 0 (ng/ml) Leptin, 2: 10(ng/ml) leptin, 3: 20 (ng/ml) leptin, 4 :100(ng/ml) leptin, 5 : 1000(ng/ml) leptin uygulanan grupları ifade etmektedir.)



Şekil 11.: Psapk/JNK molekülünün leptin dozlarına göre korelasyon eğrisinin gösterilmesi (1: 0 (ng/ml) Leptin, 2: 10(ng/ml) leptin, 3: 20 (ng/ml) leptin, 4 :100(ng/ml) leptin, 5 : 1000(ng/ml) leptin uygulanan grupları ifade etmektedir.

Bakılan tüm sinyal molekülleri arasında Psapk/JNK molekülünün diğerlerinden farklı olarak çarpıcı sonuçlar verdiğini görmekteyiz. Uygulanan leptin dozlarında 20 ng/ml'ye kadar artış trendi gösterdiği, 20 ng/ml noktasında en yüksek değerine ulaşarak daha sonra artan leptin konsantrasyonlarına rağmen salınan molekül düzeylerinde düşüş gözlemlendiği korelasyon eğrisinden ve sütun grafiğinden çok net bir şekilde gözlenmektedir. İstatistiksel varyans analizi sonuçları ile de desteklenen bu artış ile leptinden en çok etkilenen molekül olarak Psapk/JNK olduğunu göstermiş bulunmaktayız.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri ve obezite arasında güçlü bir ilişki olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. İlginç olarak, obezitenin karsinogenez üzerindeki etkisi açısından menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınlar arasında önemli bir fark vardır. Premenopozal kadınlarda vücut ağırlığının meme kanseri riskiyle ters orantılı olduğu görülürken, postmenopozal kadınlarda obezite meme kanseri gelişiminde önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Postmenopozal obez kadınlarda, C19 steroid androstenedionun aromatisasyonu ile yağ doku tek östrojen üretimi kaynağıdır. Obezitede artan aromataz aktivitesi ve androstenedion üretimi, obez kadınlarda toplam östrojen havuzu daha fazla olmasına neden olmaktadır. Yağ dokusundan türeyen östron hormonu, biyolojik açıdan daha güçlü olan östradiole periferik dönüşüm için kolaylıkla hazırlanır. Obezite plazma estradiol'ünün seks hormonu bağlayıcı globuline (SHGB) bağlanmasını da etkilemektedir. Bu nedenle, postmenopozal obez kadınlarda östrojen stimülasyonunun artması meme kanseri riskinin artmasına neden olabilmektedir (Cirillo ve ark., 2008).

Meme kanseri progresyonu, tümör başlangıcı, primer tümör büyümesi, invazyon, metastatik yayılımı da içeren çok adımlı bir süreç olup, endotel ve bağışıklık hücreleri, fibroblastlar ve adipositler gibi çeşitli stromal bileşenlerle kompleks etkileşimi kapsamaktadır. Adipositler, meme kanseri mikroçevresinin ana bileşeni olup çeşitli adipokinleri salgılamaktadır. Bir adipokin olan leptin adipositler ve meme kanseri hücreleri tarafından üretilmekte ve parakrin, otokrin ve ayrıca endokrin olarak etki eder. Son birkaç yıldır yapılan çeşitli çalışmalar, leptinin meme tümörü progresyonunu, meme tümörü hücreleri ile etkileşime girerek ve dolaylı olarak tümör mikroçevresinin çeşitli bileşenlerini değiştirerek etkilediğini ortaya koymuştur. Obez durumda aktif leptin sinyal ağı; proliferasyonun artması, apoptozun azalması, mezenkimal fenotipin kazanılması, potansiyel migrasyon ve tümör hücrelerinin metastaz potansiyelinin artırılması gibi birden fazla onkogenik yolun eş zamanlı olarak aktive edilmesine yol açar. Ek olarak leptin, leptin uyarımı üzerine VEGF'yi ve proinflamatuvar sitokinleri salan makrofajların ve monositlerin neo-anjiyogenezini ve sürekli olarak alımını destekler. Leptin, östrojen, IGF-1, insülin, VEGF ve inflamatuvar sitokinler de dahil olmak üzere daha başka birçok obezitede etkili olan molekülerin aktivitelerini arttırmakta ve faaliyetlerini güçlendirmektedir. Son araştırmalara göre, leptinin kanserin başlangıcı ve meme kanseri kök hücrelerinde de rol oynamasına karşın, bu sonuçları

güçlendirmek ve altta yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Leptinin meme kanserinin ilerlemede ve çeşitli basamaklarındaki potansiyel tüm rolleri ve aynı zamanda obezite ile olan güçlü bağları göz önüne alındığında, leptin sinyal ağı obez meme kanseri hastaları için önemli bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmaktadır (Saxena ve Sharma 2013).

Epidemiyolojik çalışmalar, obezitenin artan kanser riski ve kötüleşen tedavi sonucuyla ilişkili olduğunu açıkça göstermektedir. Obezitenin yaygınlığı göz önüne alındığında, obez meme kanseri hastalarında kötü prognoz altında yatan mekanizmaları anlamak çok önemlidir. Obez ortamda adipositlerin (örn., hormonlar, adipokinler, leptin) ürettiği faktörlerle eşzamanlı insülin direncinin kombinasyonu, tümör proliferasyonunu kolaylaştıran, konak immün tepkiden kaçınan ve tedaviye direnci indükleyen bir tümör mikroçevresine katkıda bulunabilir. Ayrıca, obezite önceki çalışmalarda da görüldüğü gibi, pro-anjiyogenik bir konudur. Buna rağmen, yağ dokularını arttıran vasküler sistem yetersiz ve işlevsiz olup hipoksi ve inflamasyona yol açmaktadır. Bu durum, kanseri tetikleyici olarak anti-anjiyogenik tedavinin etkinliğini ortadan kaldıracak çok sayıda anjiyogenik ve inflamatuvar faktör üretilmesini sağlar. Ayrıca, obezitede görülen lokal ve sistemik inflamasyon aynı zamanda inflamatuvar sitokin sinyali yoluyla kanserin ilerlemesini ve artan fibröz oluşumunu teşvik etmektedir (Fukumura ve ark. 2016).

Leptinin ER pozitif meme kanseri hücrelerinin büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, leptinin doğrudan veya dolaylı olarak ErbB-2 (EGFR ile ilişkili tirozin kinazlardan oluşan bir protein) ve EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü)'yi aktive edebilme yeteneği, ErbB-2'yi aşırı ifade eden ve üçlü negatif meme kanseri alt tiplerinde de bu büyüme faktörünün rolü gösterilmiştir. Bu bağlamda, farklı prelinik çalışmalar, leptinin, hem ErbB-2'yi aşırı ifade ettiğini hem de üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarının büyümesini artırdığını doğrulamıştır (Ray ve ark., 2007).

Dubois ve ark. (2013) yaptıkları çalışmaya göre, leptinin anjiyogenik etkilerine bakıldığında, leptin ve adiponektin reseptörleri ifade eden endotel hücrelerinin (HUVEC) çoğalmasının, leptin tarafından uyarıldığı ve adiponektin tarafından inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Her iki adipokin de global olarak apoptozu ve kaspaz aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca leptinin migrasyonu arttırdığı adiponektinin ise azalttığı ve leptin HUVEC hücreleri tarafından oluşturulan tüplerin alanını (in vitro anjiyogenezi gösteren yapılar) arttırırken, adiponektin bu yapıların oluşumunu engelledi. Leptin ile muamele edilen

MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri, leptin uygulanmamış hücelere göre daha fazla VEGF salgılamak, adiponektin tedavisi, VEGF salınımını inhibe etti. Son olarak, leptin uygulanan MCF7 hücreleri, leptin uygulanmayan hücelere göre daha invaziv idi. Bu etki MDA-MB-231 hücrelerinde görülmemiştir. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinde, leptin hücre proliferasyonunu indükleyebilir ve tüm meme kanseri tedavilerinin etkinliğini azaltabilir (tamoksifen, 5-fluorourasil, taksol ve vinblastin). Bu sonuçlar, obezite durumunda adiponektin'in aksine, leptinin tümör invazyonunu ve anjiyogeneziyi teşvik ederek metastazların öncülüğüne yol açtığını ve aşırı kilolu olgularda tedavi etkinliğini azaltabileceğinden dolayı artan kanser mortalitesi riskini açıklayabilmektedir.

Agrawal ve ark. (2011), leptin kaynaklı sitokin üretiminde JAK2/STAT3, p38MAPK ve ERK1/2'nin rolünü belirlemek için, leptin kaynaklı sitokin sekresyonu üzerine JAK2 (Tyrphostin AG490), STAT3 (WP1066), p38MAPK (SB203580) ve ERK1/2 (U0126) inhibitörlerinin etkisini araştırmışlardır. Safaştırılmış B hücreleri 24 saat süreyle JAK2, STAT3, p38MAPK, ERK1/2 inhibitörlerinin varlığında veya yokluğunda 50 ng/ml leptin ile inkübe edildi ve sitokinler, süpernatantlarda ELISA tahlili ile ölçüldü. Her inhibitör IL-6, TNF- α ve IL-10'un leptin ile indüklenen salgılamasını, değişken oranlarda önemli derecede ($P < 0.05$ - $P < 0.001$) bloke ettiğini gözlemlemişlerdir.

İnsan primer ve metastatik meme kanserinde transforme olmayan meme bezine kıyasla primer tümörlerde leptinin ekspresyon seviyeleri ObR ile pozitif korelasyon göstermekte ve her iki molekül de, daha az diferansiye G3 (yüksek dereceli) tümörlerde en fazla bulunmaktadır. Bu bulgularla uyumlu olarak, Ishikawa ve ark., (2004) aynı zamanda primer meme karsinomasında leptin ve ObR ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulmuşlardır. Leptin ekspresyonu hem normal hem de transforme meme epitel hücrelerinde bulunurken, leptinin aşırı ekspresyonunun normal epitel ile karşılaştırıldığında primer meme karsinomlarının % 92'sinde ortaya çıktığı bulunmuştur. Önemli bir nokta ise, leptin için güçlü immünreaktivitesi olan ObR pozitif kanserlerin % 34'ünde uzak metastazlar tespit edildiği, ancak ObR ekspresyonu veya leptinin aşırı ekspresyonu bulunmayan tümörlerin hiçbirinde uzak metastaza rastlanmamıştır. Birlikte ele alındığında, bu veriler leptin ve reseptörünü içeren bir otokrin halkanın meme kanserinde etkili olabileceğini ve meme kanseri hücrelerinin metastaz yapma kabiliyetini sürdürebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, leptin reseptörünün çeşitli izoformları meme kanserinde farklı bir rol oynayabilmektedir. Laud ve ark., (2002) 20 tane tümoral meme dokusunda ve iki farklı insan meme kanseri hücre

dizisinde (T47-D ve MCF-7) leptin reseptörünün uzun ve kısa izoformlarını araştırmışlar ve leptin reseptörünün iki formunun da tümörlü dokuların hepsinde sentezlendiğini rapor etmişlerdir. Kanıtlar, leptinin meme kanseri de dahil olmak üzere insanlarda farklı kanser tiplerinin patogeneğinde yer alabileceğini göstermektedir. Özellikle, tümör hücresi büyümesinin, migrasyon ve metastazın stimülasyonu ve anjiyogenezin artırılması da dahil olmak üzere leptinin birkaç davranışı meme kanserinde önemli bir rol oynayabilmekte olduğu gösterilmiştir (Cirillo ve ark., 2008).

Artan kanıtlar, hem östrojene bağımlı hem de östrojenden bağımsız meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun leptin eklenmesiyle güçlendiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, leptinin fizyolojik konsantrasyonu (10 ng/ml) STAT3 ve MAPK yollarını aktive ederek T-47D (metastatik bölgede izole edilen meme bezi hücresi) meme kanseri hücrelerinin ve HBL100 (meme epitel süt bezi hücreleri) transforme olmayan meme epitel hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı saptanmıştır. Leptinin östrojen reseptörü pozitif MCF-7, T47-D ve ZR-75-1 insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini zamana ve doza bağılı olarak uyardığı da gösterilmiştir. STAT3 ve MAPK sinyalizasyon aktivasyonunun, bu hücrelerde leptin ile muamele edilerek indüklendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bir inhibitör olan AG490 (JAK2 inhibitörü) ile STAT3 fosforilasyonunun blokajı, leptinle indüklenen MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını ortadan kaldırırken UO126 (MAPK/ERK inhibitörü) ile MAPK aktivasyonunun inhibisyonu, leptinin indüklediği hücre çoğalmasında herhangi bir önemli değişiklik meydana getirmemiştir (Ray ve ark., 2007). T-47D hücrelerinde ve östrojen reseptör negatif MDA-MB-361, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre dizilerinde leptinin büyümeye uyarıcı etkisini bildirilmiştir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular leptin reseptörlerinin çok çeşitli tümör hücrelerinde eksprese edildiğini ve leptinin normal ve malign meme epitel hücrelerinin fenotipi üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kanıtlar leptin sisteminin östrojen bağımlı meme karsinomasının patogeneğinde ve progresyonunda rol oynadığını düşündürmektedir (Cirillo ve ark., 2008).

Literatür araştırmalarından yola çıkarak bu tez çalışmasında, leptinin indüklediği metabolik sinyal yollarından non-kanonik sinyal moleküllerinin yer aldığı p38 MAPK ve SAPK/JNK ve buna ek olarak, kanonik sinyal moleküllerinden olan p44/42 MAPK ve MEK1 moleküllerinin incelenmesine karar verilmiş olup, ER⁺ MCF-7 hücresi seçilmiştir. Leptinin fizyolojik (10 ng/ml), 20 ng/ml, obezite (100 ng/ml) ve farmakolojik (1000 ng/ml) kullanılmıştır.(Dubois ve ark., 2013). Leptin dozuna bağılı olarak sinyal moleküllerinde

gözlenen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı ANOVA ve Kruskal-Wallis yöntemlerine başvurulmuş ve değerlendirildi.

İstatistik varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde, çalışılan her bir molekül için en belirgin artışın, ortak olarak 0-20 ng/ml leptin arasında görüldüğü ($p=0,000$; $p<0,001$), 100 ng/ml ve 1000 ng/ml değerlerin arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Moleküllerin leptin dozlarına verdikleri yanıt gruplar arası değerlendirildiğinde oldukça uyumlu olduğunu görmekteyiz. Bunun sebebi MAPK kaskad mekanizmasının birbirlerini tetikleyici şekilde ilerlemesinden ileri gelmektedir. Bir uyarana (bizim çalışmamızda bu uyarıcı leptin oluyor) karşı aktive olan Ras gibi aktivatörler MEK1'i uyarır, MEK1 MAP3K tarafından fosfatlanarak pMEK1 oluşur, pMEK1 formu ERK1/2 yi yani diğer adıyla p44/42 MAPK 'yı uyarır. P44/42 MAPK ise MAPKAK'ları aktive eder ve biyolojik yanıt (diferansiyasyon, gelişme vb.) oluşur. Bu basamak, kanonik yolak üzerinde ilerleyen MAPK'ların fosforilasyonu ile kooperatif etki gösteren bir mekanizmadır.

Non-kanonik yolakta ise yine bir uyarana (leptin) yanıt olarak Ras, Rho familyasından aktivatörler devreye girer ve MEKK (3,4) 'ler uyarılır. Daha sonra MKK-3, MKK-4 devreye girer ve p38 MAPK uyarılır, MAPKAK'lardan MSK veya MNK aktive olur ve apoptoz, inflamasyon, büyüme, gelişme gibi biyolojik yanıtlar oluştururlar. Aynı mekanizma üzerinden MEKK (1,2,4)'ün uyardığı sinyal molekülü ise JNK 1-3 (diğer adıyla SAPK) dür. Fosfatlandığında Psapk/JNK oluşur ve MAPKAK'ları aktive eder, inflamasyon, apoptoz, büyüme gibi biyolojik yanıtlar oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, leptinin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak bu yolakların birden fazla koldan eş zamanlı uyarılması ve buna bağlı olarak bu yolaklar üzerindeki sinyal moleküllerinin ifadelerinin artması ve uyarıya yanıt olarak, miktarlarında kantitatif artış olması, teorik anlamda beklediğimiz bir durumdur. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında ise, leptinin fizyolojik dozlarından, başka bir deyişle düşük dozlarından itibaren kanonik ve non-kanonik sinyal yolaklarını aktive ettiğini sinyal moleküllerindeki keskin artışlardan net bir şekilde görebiliyoruz. Burada önemli olanın, obez bireylerde meme kanseri riskinin normal bireylere göre daha fazla olmasından kaynaklı obezitedeki sürekli yüksek leptin dozlarına maruz kalan bu yolaklardaki sinyal moleküllerinin miktarının incelenmesidir. Fizyolojik dozlara göre artış olmakla beraber bu artışın istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmediğini

gözlemlemiş bulunmaktayız. Aynı şekilde farmakolojik leptin dozu ile obezite leptin dozu arasında da herhangi anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Hatta obezite leptin dozundan itibaren sinyal moleküllerinin miktarında azalma gözlenmektedir.

Çalışmamız sonucunda leptinden en çok etkilenen molekülün Psapk/JNK olduğunu ispat etmiş olup, bu molekülün leptine bağlı etkileşimini biyokimyasal olarak değerlendiren ilk çalışma olmanın özelliğini taşıyan bir araştırma gerçekleştirdiğimizi belirtmek isterim.

Sinyal moleküllerin leptin dozlarına bağlı olarak değişimleri de kendi içerisinde bir uyum yakalamış olup, leptinin düşük dozlarında sinyal aktivasyonunun daha etkili olduğu doz artışında ise, bir süre sonra aşırı leptin birikimine bağlı olarak negatif feedback etkisi ile yollardaki sinyal salınımlarını inhibe ettiği şeklinde bir yorum yapılabilir. Daha kesin bir sonuç alınabilmesi için bu deney düzeneğinin gen ekspresyon analizleriyle de desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde, meme ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri için, hastaların çoğunun aşırı kilolu veya obez olduğu görülmektedir. Bu nedenle geleneksel terapilerin (örn., kemoterapi) yanı sıra anti-VEGF gibi hedefe yönelik yeni terapiler değerlendirilirken, klinik öncesi çalışmaların tasarımında vücut ağırlığının önemli bir parametre olarak dahil edilmesi gerekmektedir. Daha da önemlisi, obezitenin tümör progresyonunu ve tedaviye direnci arttırdığı mekanizmaları daha iyi anlayarak, kanser hastaları için mevcut bakım standardını iyileştirebilecek olduğumuzun bilincinde olmalıyız (Fukumura ve ark., 2016). Obezlerde klinik tanı belirleyicisi olan leptin hormonunun farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak anjiyogenezi tetiklediği ve p38 MAPK sinyal moleküllerini arttırıcı etki göstererek aktivasyonunu sağladığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, meme kanseri hücrelerinde tümörün ilerlemesi ve anjiyogenezinde potansiyel bir tetikleyici görevi gördüğünü söylemek mümkündür. Bu tez çalışmasında, meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7) leptinin farklı konsantrasyonları uygulanarak hücrelerin ortama salgıladığı kanonik ve non-kanonik sinyal yollarındaki p44/42 MAPK, p38 MAPK, MEK1, pMEK1, SAPK/JNK ve Psapk/JNK moleküllerinin miktarlarını inceleyerek, doza bağlı bir korelasyon olup olmadığı gözlemlenmiştir. Leptin dozlarına bağlı sinyal moleküllerinin miktarları arasında istatistiksel açıdan belirgin bir farklanma olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Literatür bilgilerine göre; leptinin farklı konsantrasyonlarının kanonik ve non-kanonik sinyal yollarını indükleyerek bu yollar üzerindeki sinyal moleküllerinin salınımı ile başta anjiyogenez olmak üzere tümör patogenezinde önemli rolü olan basamakların aktivasyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir. Buna bağlı olarak, leptinin farklı konsantrasyonları ile sinyal moleküllerinin miktarları arasında istatistiksel bir korelasyon yakalamayı umarak bu çalışmayı gerçekleştirdik. Nitekim, elde edilen bulgulara göre leptinin düşük dozlarında (10 ng/ml ve 20 ng/ml) leptin verilmeyen kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan %95 güven aralığında anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Leptinin yüksek konsantrasyonlarında ise, moleküllerin miktarlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı bir artış veya azalış söz konusu olmadığından 100 ng/ml ve 1000 ng/ml leptin dozlarının sinyal molekülleri üzerine istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık sağlamadığını söyleyebiliriz. Bu durumu yorumlamak gerekirse, leptinin aşırı birikiminin sinyal yolağı üzerindeki indükleyici etkisini baskılayıp bir çeşit negatif feedback mekanizması

oluşturmasından ileri gelebileceğini düşünmekteyiz. Malgorzata ve ark., (2013) da leptinin 100 ng/ml ve üzeri dozlarında istatistiksel açıdan belirgin bir farklanma görememişlerdir (Szczena ve ark., 2013). Bu durumun, hormonun etkisinin maruz bırakıldığı süre ve duruma göre de değişebildiğini düşündürmüştür. Biz 48 saat uyguladığımız ve tek süre çalıştığımız için zamana bağlı herhangi bir yorum yapmamız mümkün olmamaktadır. İleriye yönelik çalışmalarda leptin uygulamalarının düşük ve yüksek dozlarla birlikte daha uzun zaman dilimlerine yayılarak çalışılması leptinin etkilerinin aydınlatılması açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada meme kanseri ve obezite arasındaki ilişkiyi MCF-7 hücrelerine leptinin düşük dozları (10 ng/ml, 20 ng/ml) ile yüksek dozları (100 ng/ml, 1000 ng/ml) uygulanarak leptin aracılı sinyal yollarından kanonik sinyal molekülleri p44/42 MAPK ve MEK1, pMEK1 ve non kanonik sinyal moleküllerinin p38 MAPK, SAPK/JNK, Psapk/JNK miktarlarının doza bağlı değişimleri incelenmiş olup; leptin ve meme kanseri ilişkisini inceleyecek olan araştırmacılar için bir ön fikir oluşturacak niteliktedir. Böylece, ileride yapılacak olan çalışmalarda leptinin indüklediği farklı sinyal yolları incelenebilir ve yeni bağlantılar saptanabilir. Sonuç olarak, inflamasyon ve metabolik yolları hedeflemenin, kanser hastalarının ana alt grubunun klinik sonuçlarını iyileştirme vaadini sunacağını ve anti kanser terapi yöntemlerinin geliştirilmesinde katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Agrawal, Sudhanshu, Sastry Gollapudi, Houfen Su, and Sudhir Gupta. “Leptin Activates Human B Cells to Secrete p38 MAPK Activation and signaling TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway.” *Journal of Clinical Immunology* 2011, 31(3), 472–78.

Automated, Countess and Cell Counter. n.d. “Comparison of Image-Based Cell Counting Methods :” (C), 1–4.

Battle M, Gillespie C, Quarshie A, Lanier V, Harmon T, Wilson K, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. “Obesity Induced a Leptin-Notch Signaling Axis in Breast Cancer.” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 2014, 134(7), 1605–16.

Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA “The Full-Length Leptin Receptor Has Signaling Capabilities of Interleukin 6-Type Cytokine Receptors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93(16), 8374–78.

Benomar, Yacir, Anne-France Roy, Alain Aubourg, Jean Djiane, Mohammed Taouis. “Cross down-Regulation of Leptin and Insulin Receptor Expression and Signalling in a Human Neuronal Cell Line.” *Biochemical Journal* 2005, 388(Pt 3), 929–39.

Bjørnbæk, Christian, Shigeo Uotani, Barbara Da Silva, Jeffrey S. Flier. “Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor.” *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(51), 32686–95.

Bouloumié, Anne, Hannes C. A. Drexler, Max Lafontan, Rudi Busse. “Leptin, the Product of Ob Gene, Promotes Angiogenesis.” *Circulation Research* 1998, 83(10), 1059 LP-1066.

Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ. “Mechanism of p38 MAP Kinase Activation in Vivo.” *Genes & Development* 2003, 17(16), 1969–78.

van den Brink GR, O'Toole T, Hardwick JC, van den Boogaardt DE, Versteeg HH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. “Leptin Signaling in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, Activation of p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase

and p70 S6 Kinase.” *Molecular Cell Biology Research Communications* 2000, 4(3), 144–50.

Cargnello, Marie, Philippe P. Roux. “Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 2011, 75(1), 50–83.

Cirillo, Donatella, Anna Maria Rachiglio, Raffaele La Montagna, Antonio Giordano, Nicola Normanno. “Leptin Signaling in Breast Cancer: An Overview.” *Journal of Cellular Biochemistry* 2008, 105(4), 956–64.

Cuadrado, Ana , Angel R. Nebreda. “Mechanisms and Functions of p38 MAPK Signalling.” *Biochemical Journal* 2010, 429(3), 03 LP-417.

Cuenda, Ana, Simon Rousseau. “p38 MAP-Kinases Pathway Regulation, Function and Role in Human Diseases.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2007, 1773(8), 1358–75.

Dignam JJ, Wieand K, Johnson KA, Fisher B, Xu L, Mamounas EP. “Obesity, Tamoxifen Use, and Outcomes in Women With Estrogen Receptor-Positive Early-Stage Breast Cancer.” *Journal of the National Cancer Institute* 2003, 95(19), 1467–76.

Dreyer MG, Juge-Aubry CE, Gabay C, Lang U, Rohner-Jeanrenaud F, Dayer JM, Meier CA “Leptin Activates the Promoter of the Interleukin-1 Receptor Antagonist through p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase and a Composite Nuclear Factor Kappa B/PU.1 Binding Site.” *Biochemical Journal* 2003, 370(Pt 2), 591–99.

Dubois, Virginie, Laetitia Delort, Hermine Billard, Marie Paule Vasson, and Florence Caldefie-Chezet. “Breast Cancer and Obesity: In Vitro Interferences between Adipokines and Proangiogenic Features And/or Antitumor Therapies?” *PLoS ONE* 2013, 8(3).

Dudley, Andrew C., David Thomas, James Best, Alicia Jenkins. “A VEGF/JAK2/STAT5 Axis May Partially Mediate Endothelial Cell Tolerance to Hypoxia.” *Biochemical Journal* 2005, 390(Pt 2), 427–36.

Engvall, Eva and Peter Perlmann. “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G.” *Immunochemistry* 1971, 8(9), 871–74.

Fogaça Manoela Viar, Priscila de Matos Cândido-Bacani, Lucas Milanez Benicio, Lara

Martinelli Zapata, Priscilla de Freitas Cardoso, Marcelo Tempesta de Oliveira, Tamara Regina Calvo, Eliana Aparecida Varanda, Wagner Vilegas & Ilce Mara de Syllos Cólus. “Effects of Indirubin and Isatin on Cell Viability, Mutagenicity, Genotoxicity and BAX/ERCC1 Gene Expression.” *Pharmaceutical Biology* 2017, 55(1), 2005–14

Fortuño A, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Muñiz P, Salvador J, Díez J, Frühbeck G. “Leptin Inhibits Angiotensin II-Induced Intracellular Calcium Increase and Vasoconstriction in the Rat Aorta.” *Endocrinology* 2002, 143(9), 3555–60.

Frühbeck, G. “Pivotal Role of Nitric Oxide in the Control of Blood Pressure after Leptin Administration.” *Diabetes* 1999, 48(4), 903 LP-908.

Frühbeck, Gema. “Intracellular Signalling Pathways Activated by Leptin.” *The Biochemical Journal* 2006, 393(Pt 1), 7–20.

Frühbeck, Gema, Javier Gómez-Ambrosi. “Modulation of the Leptin-Induced White Adipose Tissue Lipolysis by Nitric Oxide.” *Cellular Signalling* 2001, 13(11), 827–33.

Frühbeck, Gema, Javier Gómez-Ambrosi, Francisco José Muruzábal, María Angela Burrell. “The Adipocyte: A Model for Integration of Endocrine and Metabolic Signaling in Energy Metabolism Regulation.” *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 2001, 280(6), E827 LP-E847.

Frühbeck, Gema, Javier Salvador. “Is Leptin Involved in the Signaling Cascade After Myocardial Ischemia and Reperfusion?” *Circulation* 2000, 101(18), e194 LP-e194.

Fukumura, Dai, Joao Incio, Ram Shankaraiah, Rakesh K. Jain. “Obesity and Cancer: An Angiogenic and Inflammatory Link.” *Microcirculation* n/a-n/a. 2016.

Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. “MAPKK-Independent Activation of p38 α Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38 α .” *Science* 2002, 295(5558), 1291 LP-1294.

Gonzalez-Perez, Ruben Rene, Viola Lanier, Gale Newman. “Leptin’s Pro-Angiogenic Signature in Breast Cancer.” *Cancers* 2013, 5(3), 1140–62.

Gonzalez, Ruben Rene, Paul C. Leavis. “A Peptide Derived from the Human Leptin Molecule Is a Potent Inhibitor of the Leptin Receptor Function in Rabbit Endometrial Cells.”

Endocrine 2003, 21(2), 185–95.

Guo, Shanchun, Ruben R. Gonzalez-Perez. “Notch, IL-1 and Leptin Crosstalk Outcome (NILCO) Is Critical for Leptin-Induced Proliferation, Migration and VEGF/VEGFR-2 Expression in Breast Cancer” edited by L. Zhang. *Public Library Of Science* 2011, 6(6), e21467.

Guo, Shanchun, Mingli Liu, Guangdi Wang, Marta Torroella-Kouri, Ruben R. Gonzalez-Perez. “Oncogenic Role and Therapeutic Target of Leptin Signaling in Breast Cancer and Cancer Stem Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1825(2), 207–22.

Hardwick, James C. H., Gijs R. Van Den Brink, G. J. Offerhaus, Sander J. H. Van Deventer, Maikel P. Peppelenbosch. “Leptin Is a Growth Factor for Colonic Epithelial Cells.” *Gastroenterology* 2001, 121(1), 79–90.

He, Qiye, Jeff Johnston, Julia Zeitlinger, Kansas City. “HHS Public Access.” 2015, 33(4), 395–401.

Hegyí, Krisztina, Kristóf Fülöp, Krisztina Kovács, Sára Tóth, András Falus. “Leptin-induced Signal Transduction Pathways.” *Cell Biology International* 2004, 28(3), 159–69.

Hileman, Stanley M., Jens Tornøe, Jeffrey S. Flier, Christian Bjørnbæk. “Transcellular Transport of Leptin by the Short Leptin Receptor Isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney Cells.” *Endocrinology* 2000, 141(6), 1955–61.

Ihle, James N. “Cytokine Receptor Signalling.” *Nature* 1995, 377(6550), 591–94.

Ihle, James N., Ian M. Kerr. “Jaks and Stats in Signaling by the Cytokine Receptor Superfamily.” *Trends in Genetics* 1995, 11(2):69–74.

Im, Jun Sub, Joon Kyu Lee. “ATR-Dependent Activation of p38 MAP Kinase Is Responsible for Apoptotic Cell Death in Cells Depleted of Cdc7.” *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(37), 25171–77.

Islam, Md.Shahidu., Nicholas M. Morton, Anders Hansson, Valur Emilsson. “Rat Insulinoma-Derived Pancreatic -Cells Express a Functional Leptin Receptor That Mediates a Proliferative Response.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, 238(3), 851–55.

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-Activated Protein Kinases , *Cell Biology And Metabolism* , 1997, 272(48),30122–28.

Jirmanova, Ludmila, Dandapantula N. Sarma, Dragana Jankovic, Paul R. Mittelstadt, Jonathan D. Ashwell. “Genetic Disruption of p38 α Tyr323 Phosphorylation Prevents T-Cell Receptor-mediated p38 α Activation and Impairs Interferon- γ Production.” *Blood* 2009, 113(10),2229 LP-2237.

Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Häring HU “Leptin Activates PI-3 Kinase in C2C12 Myotubes via Janus Kinase-2 (JAK-2) and Insulin Receptor Substrate-2 (IRS-2) Dependent Pathways.” *Diabetologia* 1997, 40(11), 1358.

Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, Cheng SL. “Leptin Induces Apoptosis via ERK/cPLA2/Cytochrome c Pathway in Human Bone Marrow Stromal Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(24), 21920–29.

Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG Jr “Regulation of Jak Kinases by Intracellular Leptin Receptor Sequences.” *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(44), 41547–55.

Lipsey, Crystal C., Adriana Harbuzariu, Danielle Daley-Brown, Ruben R. Gonzalez-Perez. “Oncogenic Role of Leptin and Notch Interleukin-1 Leptin Crosstalk Outcome in Cancer.” *World Journal of Methodology* 2016, 6(1), 43.

Mehebik, Nadia, Anne-Marie Jaubert, Dominique Sabourault, Yves Giudicelli, Catherine Ribière. “Leptin-Induced Nitric Oxide Production in White Adipocytes Is Mediated through PKA and MAP Kinase Activation.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2005, 289(2), C379 LP-C387.

Meissner, Udo, Iris Ostreicher, Ida Allabauer, Wolfgang Rascher, Dötsch J. “Synergistic Effects of Hypoxia and Insulin Are Regulated by Different Transcriptional Elements of the Human Leptin Promoter.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 303(2), 707–12.

Miller-Kleinhenz, Jasmine M., Erica N. Bozeman, Lily Yang. “Targeted Nanoparticles for

Image-Guided Treatment of Triple Negative Breast Cancer: Clinical Significance and Technological Advances.” *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2015, 7(6), 797–816.

Mullen, McKay, Ruben Gonzalez-Perez. “Leptin-Induced JAK/STAT Signaling and Cancer Growth.” *Vaccines* 2016, 4(3), 26.

Nadal-Serrano, M., J. Sastre-Serra, A. Valle, P. Roca, J. Oliver. “Chronic-Leptin Attenuates Cisplatin Cytotoxicity in MCF-7 Breast Cancer Cell Line.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 2015, 36(1), 221–32.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW “Intracellular Signalling: Key Enzyme in Leptin-Induced Anorexia.” *Nature* 2001, 413(6858):794–95.

O’Rourke, Lisa, Steven J. Yeaman, Peter R. Shepherd. “Insulin and Leptin Acutely Regulate Cholesterol Ester Metabolism in Macrophages by Novel Signaling Pathways.” *Diabetes* 2001, 50(5), 955 LP-961.

Papanikolaou V, Stefanou N, Dubos S, Papathanasiou I, Palianopoulou M, Valiakou V, Tsezou A. “Synergy of leptin/STAT3 with HER2 Receptor Induces Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells through Regulation of Apoptosis-Related Genes.” *Cellular Oncology* 2015, 38(2), 155–64.

Rahmouni, Kamal, William G. Haynes, Donald A. Morgan, Allyn L. Mark. “Intracellular Mechanisms Involved in Leptin Regulation of Sympathetic Outflow.” *Hypertension* 2003, 41(3), 763 LP-767.

Ray, Amitabha, Katai J. Nkhata, Margot P. Cleary. “Effects of Leptin on Human Breast Cancer Cell Lines in Relationship to Estrogen Receptor and HER2 Status.” *International Journal of Oncology* 2007, 30(6), 1499–1509.

Ren H, Zhao T, Wang X, Gao C, Wang J, Yu M, Hao J. "Leptin Upregulates Telomerase Activity and Transcription of Human Telomerase Reverse Transcriptase in MCF-7 Breast Cancer Cells.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010.

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T,

Nebreda AR. “A Novel Kinase Cascade Triggered by Stress and Heat Shock That Stimulates MAPKAP Kinase-2 and Phosphorylation of the Small Heat Shock Proteins.” *Cell* 1994, 78(6), 1027–37.

Russo, Jose, Ronald H. Bradley, Charles Mcgrath, and Irma H. Russo. “Scanning and Transmission Electron Microscopy Study of a Human Breast Carcinoma Cell Line (MCF-7) Cultured in Collagen-Coated Cellulose Sponge1.” *Cancer Research* 1977, 37, 2004–14

Sabio G, Arthur JS, Kuma Y, Peggie M, Carr J, Murray-Tait V, Centeno F, Goedert M, Morrice NA, Cuenda A. “p38 γ Regulates the Localisation of SAP97 in the Cytoskeleton by Modulating Its Interaction with GKAP.” *The European Molecular Biology Organization Journal* 2005, 24(6), 1134–45.

Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ Jr, Ashwell JD. “Alternative p38 Activation Pathway Mediated by T Cell Receptor-Proximal Tyrosine Kinases.” *Nature Immunology* 2005, 6(4), 390–95.

Saxena, Neeraj K. , Dipali Sharma. “Multifaceted Leptin Network: The Molecular Connection Between Obesity and Breast Cancer.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2013, 18(3), 309–20.

Shen, Jinhua, Isao Sakaida, Koichi Uchida, Shuji Terai, and Kiwamu Okita. “Leptin Enhances TNF- α Production via p38 and JNK MAPK in LPS-Stimulated Kupffer Cells.” *Life Sciences* 2005, 77(13), 1502–15.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. “Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid.” *Analytical Biochemistry* 1985, 150(1), 76–85.

Strieter, Robert M. “Masters of Angiogenesis.” *Nature Medicine* 2005, 11(9), 25–27.

Sweeney, Gary. “Leptin Signalling.” *Cellular Signalling* 2002, 14(8), 655–63.

Szanto, Ildiko, C.Ronald Kahn. “Selective Interaction between Leptin and Insulin Signaling Pathways in a Hepatic Cell Line.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97(5), 2355–60.

Szczesna, Malgorzata, Katarzyna Kirsz, Mirosław Kucharski, Paweł Szymaszek, Dorota

Anna Zieba. “Obesity and Leptin Resistance: The Role of Growth Hormone.” *Health* 2013, 5(8), 29–39.

Yang, Ronghua, Lili A. Barouch. “Leptin Signaling and Obesity: Cardiovascular Consequences.” *Circulation Research* 2007, 101(6), 545–59.

Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE. “Leptin Induces Insulin-like Signaling That Antagonizes cAMP Elevation by Glucagon in Hepatocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(15), 11348–54.

Zhao, Allan Z., Jjing-Ning Huan, Sandhya Gupta, Rekha Pal, Abhiram Sahu. “A Phosphatidylinositol 3-Kinase-Phosphodiesterase 3B-Cyclic AMP Pathway in Hypothalamic Action of Leptin on Feeding.” *Nature Neuroscience* 2002, 5(8), 727–28.

Zhou, W., S. Guo, R. R. Gonzalez-Perez. “Leptin pro-Angiogenic Signature in Breast Cancer Is Linked to IL-1 Signalling.” *British Journal of Cancer* 2011, 104(1), 128–37.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burçin İrem ABAS
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Şişli 25.03.1991
Telefon : 0 (543) 330 6050
E-mail : burcinirem.abas@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora		
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyokimya	Devam ediyor.
Lisans	Ege Üniversitesi Biyokimya	08.07.2013

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

41. FEBS Kongresinde 3484 no'lu "Anti-tumoral Effects of Silymarin, Curcumin and Propolis on Leptin Induced Breast Cancer Cells" Poster Sunumu - Gönül Külahçioğlu Kanser Araştırmaları Bursu, 3-7 Eylül 2016

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2015 – devam ediyor	Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD	Araş. Gör.
2012	İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü (Stajyer)	Öğrenci

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

1. Kızılay Z, Erken HA, Çetin NK, Aktaş S, Abas Bİ, Yılmaz A. Boric acid reduces axonal and myelin damage in experimental sciatic nerve injury, *Neural Regeneration Research* 2016, 11, 1660-1665.

2. Uysal P, Avcil S, Abas Bİ, Yenisey Ç. Evaluation of Oxidant–Antioxidant Balance in Children with Atopic Dermatitis: A Case–Control Study, *American Journal of Clinical Dermatology* 2016, 17, 527-537.

2. PROJELER

PROJE NO	TÜRÜ	KONU	PROJE EKİBİ	PROJE SÜRESİ BAŞLA MA-BİTİŞ TARİHİ	TOPLA M BÜTÇE (TL)
TPF-16030	Yüksek Lisans Tez projesi (Burçin İrem ABAS)	Leptinin meme kanseri hücre hatlarındaki (MCF-7) anjiyogenik etkilerinin araştırılması ve non-kanonik sinyal moleküllerinin leptine bağlı değişimlerinin araştırılması	Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Arş.Gör. Burçin İrem ABAS	6 AY 27-04-2016 27-10-2016	7.495
TPF-16026	Uzmanlık Tez Projesi (Akay EDİZSOY)	Geçici mekanik ileus oluşturulmuş ratlarda barsak mukoza hasarının iyileşmesine probiyotikle beslenmenin etkisi	Prof.Dr. Mehmet Hakan ÇEVİKEL Araş.Gör.Dr. Akay EDİZSOY Yrd.Doç.Dr.Eyüp Murat YILMAZ Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Prof.Dr. Serhan SAKARYA İbrahim METEOĞLU Arş.Gör. Burçin İrem ABAS	6 AY 27-04-2016 27-10-2016 08-08-2016	15.000
TPF-16007	Araştırma projesi	Deneyssel siyatik sinir yaralanmasında ozonun etkisi	Yrd.Doç.Dr. Zahir KIZILAY Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Arş.Gör. Burçin İrem ABAS Yrd.Doç.Dr. Ali YILMAZ	1 YIL 10-03-2016 10-03-2017	25.000
TPF-	Araştırma	Subaraknoid kanamalarda	Yrd.Doç.Dr. Ahmet	2 YIL - 6	25.000

16009	Projesi	endotel hasari, fibrinolizisin serebral vazospazm ve etkileri	ŞAİR Doç.Dr.Ayça ÖZKUL Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Arş.Gör. Burçin İrem ABAS Yrd.Doç.Dr. Ali YILMAZ	AY 10-03-2016 10-09-2018	
TPF-16006	Araştırma Projesi	Polikistik over sendromu (PCOS), obesite gelişiminde makrofajların birbirine dönüşümü arasındaki moleküler mekanizmanın araştırılması	Yrd.Doç.Dr. Tolga ATAKUL Prof.Dr. Samet KAFKAS Yrd.Doç.Dr.Ahmet ANIK Yrd.Doç.Dr. Özgür Deniz TURAN Prof.Dr. Hasan YÜKSEL Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Arş.Gör. Burçin İrem ABAS	1 YIL 10-03-2016 10-03-2017	25.000
TPF-16015	Araştırma Projesi	Nasal polip hastalarında inflamatuvar ve non-inflamatuvar sitokinler ile birlikte amfiregülin (areg) ve il-19'un doku ve serum düzeylerinin araştırılması	Yrd.Doç.Dr. Murat DOĞAN Yrd.Doç.Dr. Mustafa ŞAHİN Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Arş.Gör. Burçin İrem ABAS	1 YIL 10-03-2016 10-08-2017	25.000
TPF-16005	Araştırma Projesi	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA)H) yaşlanmanın hızlandığı bir süreç midir?	Prof.Dr. Mehmet POLATLI Yrd.Doç.Dr. Onur YAZICI Yrd.Doç.Dr. Şule TAŞ GÜLEN Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Arş.Gör. Burçin İrem ABAS	2 YIL 10-03-2016 10-03-2018	22.000
TPF-16002	Araştırma Projesi	Patellofemoral ağrıda kinezyolojik bantlama uygulamasının ağrı, fonksiyon ve kartilaj biobelirteçleri üzerine etkisi	Yrd.Doç.Dr. Elif AYDIN Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Dr. Serkan SABANCI Doç.Dr. İmran KURT ÖMÜRLÜ Arş.Gör. Burçin İrem ABAS Prof.Dr. Gülcan GÜRER	2 YIL 10-03-2016 10-03-2018	24.150
TPF-16008	Araştırma Projesi	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Hastalarının Klinik, Fonksiyonel, Radyolojik ve İnflamatuvar Belirteçler Bazında	Yrd.Doç.Dr. Onur YAZICI Yrd.Doç.Dr. Şule TAŞ GÜLEN Prof.Dr. Mehmet	2 YIL 10-03-2016 10-03-2018	24.990

		Gruplandırılması ve Bu Grupların Birbiri Arasındaki İlişkilerinin ve Ayırt Edici Özelliklerinin Belirlenmesi	POLATLI Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Yrd.Doç.Dr. Ufuk ERYILMAZ Araş.Gör. Burçin İrem ABAS		
TPF-17005	Araştırma Projesi	İnsan kaynaklı kolorektal kanser dokusundan izole edilen hücrelerden organoid tümör oluşturulması	Yrd.Doç.Dr. Altay KANDEMİR Yrd.Doç.Dr. Murat YILMAZ Yrd.Doç.Dr. Erdem Barış CARTI Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Araş.Gör.Burçin İrem ABAS Yrd.Doç.Dr. Nesibe KAHRAMAN ÇETİN Vet. Hek. SERDAR AKTAŞ	1 yıl Proje devam ediyor	25.000
TPF-17029	Araştırma Projesi	Ratlarda deneysel sepsis modelinde laparoskopi ve laparotominin stres ve hemodinami üzerine etkisi	Yrd.Doç.Dr. Erdem Barış CARTI Yrd.Doç.Dr. Murat YILMAZ Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Araş.Gör.Burçin İrem ABAS	1 yıl Proje devam ediyor	25.000
TPF-17019	Araştırma Projesi	5-FU kemoterapi protokolü ile indüklenmiş intestinal mukozit modelinde probiyotiklerin koruyucu etkisinin araştırılması	Yrd.Doç.Dr. Murat YILMAZ Yrd.Doç.Dr. Erdem Barış CARTI Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Araş.Gör.Burçin İrem ABAS	1 yıl Proje devam ediyor	25.000
TPF-17010	Araştırma Projesi	Statik manyetik alanın osteoblastlarda mineral değişimine etkilerinin araştırılması	Prof.Dr. Hulki BAŞALOĞLU Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Prof.Dr. Yelda ÖZSUNAR DAYANIR Yrd.Doç.Dr. Mustafa GÖK Yrd.Doç.Dr. H. Kübra BAŞALOĞLU Uzm.Dr. Can BAŞALOĞLU Araş.Gör.Burçin İrem ABAS	1 yıl Proje devam ediyor	22.000
TPF-17008	Araştırma Projesi	Kas-iskelet sistemi yakınmaları ile başvuran	Prof.Dr. Taşkın ŞENTÜRK	1 yıl Proje	22.000

		obez hastalarda obezite ve romatizmal hastalık ilişkisi	Yrd.Doç.Dr. Songül ÇILDAĞ Araş.Gör. Dr. Reyhan KÖSE Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Yrd.Doç.Dr. Mustafa ÜNÜBOL Araş.Gör. Burçin İrem ABAS	devam ediyor	
TPF-17009	Araştırma Projesi	Hashimoto tiroiditi ve kronik spontan ürtikerli hastalarda tiroid peroksidaz spesifik IgE düzeylerinin karşılaştırılması	Yrd.Doç.Dr. Songül ÇILDAĞ Prof.Dr. Taşkın ŞENTÜRK Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Yrd.Doç.Dr. Mustafa ÜNÜBOL Araş.Gör. Burçin İrem ABAS	1 yıl Proje devam ediyor	25.000
TPF-17024	Araştırma Projesi	Anne kanında anjiyogenetik moleküller TPF-ve anti-anjiyogenik denge nasıl korunmaktadır?	Prof.Dr. Samet KAFKAS Yrd.Doç.Dr. Tolga ATAKUL Uzm. Dr. Ahter Tanay TAYYAR Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Araş.Gör. Burçin İrem ABAS	1 yıl Proje devam ediyor	22.000
TPF-17032	Araştırma Projesi	Lineer ve makrosiklik gadolinium preparatlarının HCN-2 kortikal nöron hücrelerinde oksidatif strese etkileri farklı mıdır?	Yrd.Doç.Dr. Özüm TUÇYÜREK Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY Yrd.Doç.Dr. Figen TÜRKDOĞAN Araş.Gör. Burçin İrem ABAS	1 yıl Proje devam ediyor	25.000

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Burçin İrem ABAS, Çiğdem YENİSEY. Anti-tumoral Effects of Silymarin, Curcumin and Propolis on Leptin Induced Breast Cancer Cells, 41. FEBS Kongresi, 3-7 Eylül 2016, Aydın, Poster bildiri

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Burçin İrem ABAS, Çiğdem YENİSEY. Servikal Kanser: Silymarin veya Kemoterapi, XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Kasım 2015, Antalya, Sözlü bildiri.