



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
KETON CİSİMLERİNİN ETKİSİ**

ZUHAL KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Süha YALÇIN

İSTANBUL-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
KETON CİSİMLERİNİN ETKİSİ**

ZUHAL KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Tez Sahibi : Zuhal Kaya
Tez Başlığı : Meme Kanseri Hücre Hatlarında Keton Cisimlerinin Etkisi
Sınav Yeri : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 22.02.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER

Prof. Dr. Nazlı ARDA

Kurumu

M.Ü.

M.Ü.

İ.Ü.

İmza

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01.../03/2018 tarih ve 94 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

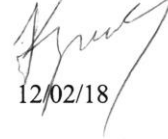
v.
Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



12/02/18

ZUHAL KAYA

TEŐEKKÖRLER

Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım danışman hocam **Prof. Dr. A. Süha Yalçın**'a engin bilgisi ve sonsuz desteğinden dolayı,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca destekleri için değerli hocalarım **Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer, Prof. Dr. Goncağül Haklar, Prof. Dr. Nazlı Arda, Prof. Dr. Önder Şirikçi, Doç. Dr. Betül Karademir** ve **Yrd. Doç. Dr. Saime Batırel'e**

Deneyisel çalışmalarımnda hep yanımda olan, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum çalışma arkadaşım, uzmanım **Ayşe Mine Yılmaz'a**

Yardımları ve gösterdikleri destek için tüm arkadaşlarım **Erdi Sözen, Hüsnüye Hacıoğlu Bay, Betül Güngördü, Tuğçe Demirel, Gökhan Biçim** ve **Şenol Yolcu'ya,**

Tüm eğitim hayatım boyunca her konuda benden desteklerini esirgemeyen çok sevgili **AİLEME,**

En içten **TEŐEKKÖRLERİMİ** sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Kanser	5
4.1.1. Meme Kanseri	5
4.1.1.1. Hücresel Steroid Reseptörleri ve Büyüme Faktörü Yolları.....	7
4.1.1.5. Meme Kanseri Alt tipleri	9
4.1.1.5.1. Lüminal A	9
4.1.1.5.2. Lüminal B	9
4.1.1.5.3. Üçlü Negatif / Bazal Benzeri	10
4.1.1.5.4. HER2 tipi	10
4.1.2. Kanserde Enerji Metabolizması.....	11
4.1.2.1. Kanser Hücrelerinde Glukoz Metabolizması.....	11
4.2. Ketojenik Diyet.....	16
4.2.1. Keton Cisim Metabolizması.....	18
4.2.2. Kanserde Ketojenik Diyetin Öngörülen Etki Mekanizması.....	19
4.2.2.1. Kanser Hücrelerinin Glukoz Bağımlılığı	19
4.3. Kanser ve Mitokondriyal Mekanizma.....	20
4.4. Kanser Tedavisinde Ketojenik Diyetler	23
5. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	24
5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	24
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	24
5.1.2. Kullanılan Kimyasallar	25
5.2. Yöntemler.....	25
5.2.1. Keton Cisim Çözeltilerinin Hazırlanması	25
5.2.2. Meme Kanseri Hücre Hatları ve Hücre Kültürü	26
5.2.2.1. Hücre Hatları	26
5.2.2.2. Hücrelerin Çözülmesi.....	27
5.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılmaları	27
5.2.3. Hemositometrik Hücre Sayımı.....	27
5.2.4. Hücre Canlılığının MTT Testi ile Belirlenmesi	28
5.2.5. Hücre Hatlarının Morfolojik İncelenmesi	28
5.2.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	28
6. BULGULAR	29
6.1. Hemositometrik Hücre Sayımı.....	30
6.2. Hücre Canlılığının MTT Testi ile İncelenmesi	35
6.3. Hücre Hatlarının Morfolojik İncelenmesi	41
7. TARTIŞMA	48
8. KAYNAKLAR	54
9. EKLER	63
EK-I- Özgeçmiş	63

KISALTMALAR

AcAc: Asetoasetat

Bcl-2: B hücre lenfoma 2

BRCA1: Meme kanseri geni

BRCA2: Meme kanseri geni

c-Myc: Proonkogen Proteini

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

ER: Östrojen Reseptörü

KD: Ketojenik Diyet

KE: Keton Ester

MAP: Mitojen Aktifleştirici Protein

MCT: Monokarboksilat taşıyıcıları

OXPPOS: Mitokondriyal Oksidatif Fosforilasyon

PR: Progesteron Reseptörü

ROS: Reaktif oksijen türleri

SCOT: Süksinil-CoA: 3-ketoasit KoA transferaz

β HB: Beta-hidroksibütirat

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1. Meme kanseri hücrelerinde steroid reseptörleri ve büyüme faktörü ile ilişkili metabolik yollar.	8
Şekil 4.2. Kanser hücrelerinde glukoz metabolizması	12
Şekil 4.3. Ketojenik diyet ve Atkins diyetinin kalorik bileşiminin karşılaştırılması .	17
Şekil 4.4. Keton cisimlerinin üretimi ve kullanımı	18
Şekil 4.5. Amerikan diyetinde ve ketogenik bir diyetle normal hücre ve tümör hücresi metabolizmasının karşılaştırılması	22
Şekil 6.1. İnsan fibroblast hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları	31
Şekil 6.2. MCF 7 hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları.....	32
Şekil 6.3. MDA MB 231 hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları.....	33
Şekil 6.4. MDA MB 435 hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları.....	34
Şekil 6.5. İnsan fibroblast hücreleri MTT testi sonuçları.....	37
Şekil 6.6. MCF 7 hücrelerinde MTT testi sonuçları.....	38
Şekil 6.7. MDA MB 231 hücreleri MTT testi sonuçları.....	39
Şekil 6.8. MDA MB 435 hücreleri MTT testi sonuçları.....	40
Şekil 6.9. Farklı koşullar altındaki insan fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	43
Şekil 6.10. Farklı koşullar altındaki MCF 7 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	44
Şekil 6.11. Farklı koşullar altındaki MDA MB 231 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	45
Şekil 6.12. Farklı koşullar altındaki MDA MB 435 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	46

1. ÖZET

Otto Warburg, yaklaşık yüz yıl önce, kanser metabolizmasının nicel araştırmalarına öncülük ederek kanser hücrelerinin, Warburg etkisi olarak bilinen aerobik koşullar altında artmış glikoliz fenotipi sergilediğini keşfetti. Kanser hücrelerindeki artmış glikolizin, mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklandığını ve ATP eksikliğinin bu şekilde telafi edildiğini ileri sürdü. Sonraki çalışmalar kanser hücrelerinin glukoz bağımlı oldukları için birincil enerji kaynağı olarak keton cisimlerini kullanamayacaklarını göstermiştir. Biz de çalışmamızda meme kanseri hücrelerinin birincil enerji kaynağı olarak keton cisimlerini kullanamayacaklarını düşünerek sağlıklı fibroblast hücreleri ile farklı meme kanseri hücrelerinde keton cisimlerinin canlılığa etkisini araştırdık. Bu nedenle glukoz ve keton cisimleri (β -hidroksibütirat ve asetoasetat) varlığında/yokluğunda kültürlenmiş meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını ölçtük. Sonuç olarak üç farklı meme kanseri hücre hattına (MCF 7, MDA MB 231 ve MDA MB 435) keton cisimlerinin uygulanmasıyla beraber, hücre canlılıklarında önemli bir azalış gözledik. Elde edilen veriler ışığında, keton cisimlerinin kullanılmasına uygun olarak beslenme manipülasyonunun, meme kanserinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak göz önüne alınabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, keton cisimleri, asetoasetat, β -hidroksibütirat

2. SUMMARY

About a hundred years ago, Otto Warburg discovered that cancer cells exhibit an increased glycolysis phenotype under aerobic conditions known as the Warburg effect, leading to quantitative research on cancer metabolism. He argued that increased glycolysis in cancer cells is caused by mitochondrial dysfunction and that ATP deficiency is compensated for in this way. Subsequent studies have shown that cancer cells can not use ketone bodies as a primary energy source because they are glucosamine-dependent. We also investigated the effects of healthy fibroblast cells and ketone bodies in different breast cancer cells on viability, considering that our breast cancer cells could not use ketone bodies as a primary energy source in our study. This is why we measure cell viability in breast cancer cells cultured in the presence / absence of glucose and ketone bodies (β -hydroxybutyrate and acetoacetate). As a result, we observed a significant decrease in cell viability with the administration of ketone bodies to three different breast cancer cell lines (MCF 7, MDA MB 231 and MDA MB 435). We think that nutritional manipulation in the obtained light, suitable for the use of ketone objects, can be considered as a new treatment approach in breast cancer.

Keywords: Breast cancer, ketone bodies, acetoacetate, β -hydroxybutyrate

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Keton cisimleri ekstrahepatik dokular için etkili bir enerji substratıdır. Ancak kanser hücreleri onları verimli bir şekilde kullanamazlar (Skinner ve ark., 2009). Çünkü kanserde azalan mitokondri sayısı, mitokondriyal şişme, mtDNA mutasyonları, değiştirilmiş mitokondriyal membran potansiyeli ve anormal mitokondriyal enzim fonksiyonu da dahil olmak üzere, geniş çapta mitokondriyal patoloji vardır (Isidoro ve ark., 2004; Kiebish ve ark., 2008; Modica-Napolitano ve Singh, 2004). Mitokondriyal yapıdaki ve işlevdeki bu kusurlar solunum kapasitesini zayıflatır ve hücrenin hayatta kalması için substrat seviyesinde fosforilasyona zorlar (Seyfried, 2012). Bu nedenle mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olan kanser hücreleri, sadece mitokondri içerisinde metabolize olan keton cisimlerini, enerji için verimli bir şekilde metabolize edemez (Maurer ve ark., 2015).

Mitokondriyal disfonksiyon, kanser hücrelerinin ketonları enerji için etkin bir şekilde kullanamamasını açıklamaktadır. Ancak, *in vitro* ortamda keton cisimlerinin anti-kanser etkileri net değildir. Keton cisimleri kanser hücrelerinin sağ kalımını ve çoğalmasını bozabilen birçok özelliğe sahiptir (Poff ve ark., 2014). Normal hücrelerde, glikoliz yoluyla oluşan pirüvat, mitokondriyal oksidatif metabolizma için TCA siklusuna yönlendirilirken, kanser hücrelerinde ise çoğunlukla laktik asit fermantasyon yolunda pirüvat kullanılır (Branco ve ark., 2016). Bu durum kanser hücrelerine çeşitli avantajlar sağlar. Bunlardan biri mitokondriyal oksidatif metabolizmanın ve eş zamanlı ROS oluşumunun baypas edilmesidir. Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla yüksek düzeyde oksidatif stres altındadırlar; bu durum onlara hayatta kalma avantajı sağlarken bir yandan da onları ROS aracılı apoptotik uyarılara karşı daha duyarlı hale getirir (Aykin-Burns ve ark., 2009).

Keton cisimleri ise glikolizi inhibe eder, böylece kanser hücreleri için enerji üretiminin ana yolunu kısıtlar (Wu ve ark., 1988). Kanser hücreleri, artmış reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini sağlamakla birlikte, redoks durumundaki küçük değişikliklere bile oldukça duyarlıdır (Schumacker ve ark., 2006). Buna karşılık keton cisimleri, mitokondriyal ROS üretimini düşürür ve normal hücrelerdeki endojen antioksidan savunmaları geliştirirken kanser hücrelerde geliştirmezler (Veech ve ark., 2001).

Keton cisimleri kanser epigenomunun kontrolü altında tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerin ekspresyonunu değiştirerek onların anti kanser etkilerini ortaya çıkarmaktadır (Ropero ve Esteller, 2007). Yani, kanser hücrelerinin büyüme, proliferasyon, enerji üretimi ve dönüşümü için glukozun bulunabilirliğine bağımlıdır (Poff ve ark., 2014).

Bu çalışmadaki amacımız meme kanserinde etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktır. Meme kanseri hücre hatlarının (MCF 7, MDA MB 231 ve MDA MB 435) keton cisimlerine maruz kalmasıyla canlılıklarının azaldığını gösteren çalışmamızın hem literatüre hem de kanser tedavisinde uygulanacak yeni tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, gen mutasyonları olan hücrelerin anormal ve kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve bu hücrelerin çevresindeki normal dokuları istila edebilecek veya vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeline sahip olduğu bir grup hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

En son istatistiklere göre Türkiye’de bir yıl içinde yaklaşık 174 bin kişiye kanser teşhisi konulmuştur. Türkiye’de 103 070 erkek ve 71 233 kadın kansere yakalanmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanserler akciğer ve prostat iken, kadınlarda en sık görülen meme kanseridir ve meme kanseri her 4 kadın kanserinden birisi olmaya devam etmektedir. Bir yıl içinde toplam 17 531 kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur (Türkiye Kanseri İstatistikleri, 2017, Ankara).

4.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, kadınlarda çok yaygın görülen bir kanser türüdür. Erkeklerde meme kanseri çok nadir olup, tüm meme kanserlerinin %1’den azı erkeklerde görülür. Dünya genelinde kanserden ölüm sebepleri arasında meme kanseri; tüm cinsiyetlerde, akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (Giordano ve ark, 2014; Jemal ve ark, 2009). Dünyada her yıl bir milyon kadına meme kanseri tanısı konulduğu ve 410 000 kadının bu hastalık nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmektedir (Montazeri, 2008).

Dünya’da toplam 14 milyon yeni kanser vakasının geliştiği ve en çok tanı konulan kanserlerin sırasıyla akciğer kanseri (%13) ve meme kanseri (%11,9) olduğu belirtilmiştir (Türkiye Kanseri İstatistikleri, 2017, Ankara). Sosyoekonomik ve sosyokültürel yönden birbirinden farklı toplumlarda gözlemlenen meme kanseri verileri karşılaştırıldığında birbirinden farklı insidans ve mortalite değerleri ortaya çıkmaktadır.

Meme kanseri insidansının gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek, meme kanserinden ölümün ise gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha düşük olması dikkat çekicidir. Bu durum az gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınların meme kanseri teşhis, tarama ve tedavi hizmetlerine ulaşmaktaki zorluklardan kaynaklandığını göstermiştir. Bu yüzden, özellikle az gelişmiş ülkelerde meme kanserinin erken teşhis, tarama ve tedavisine yönelik çabaların artırılması son derece önemlidir (Colditz ve ark, 2006).

Meme kanseri genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü etkileşimin olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %5-10'u, BRCA1 veya BRCA2 genleri içindeki ailesel/kalıtısal mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca meme kanseri tanısı alan kadınların yaklaşık %20-30'unda ailenin kanseri öyküsü vardır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda meme kanseri etiolojisinde; endokrin etkenler (östrojen ve progesteron hormon konsantrasyonu ve metabolizması), endokrin dışı etkenler (iyonize radyasyon, alkol, sigara, metaller, kozmik radyasyon, elektromanyetik alanlar, organik çözeltiler ve virüs gibi biyolojik ajanlar), davranışsal faktörler (stres, depresyon), genetik yatkınlık, tanımlanmış meme patolojileri, endojen hormonal faktörler (erken menarş, geç menopoz, çocuk doğurmak, laktasyon/emzirme, indüklenmiş abortus ve düşük), ekzojen hormonal faktörler (oral kontraseptifler, östrojen replasman tedavisi), obezite ve beslenme alışkanlıkları tanımlanmıştır (Pike ve ark, 1993).

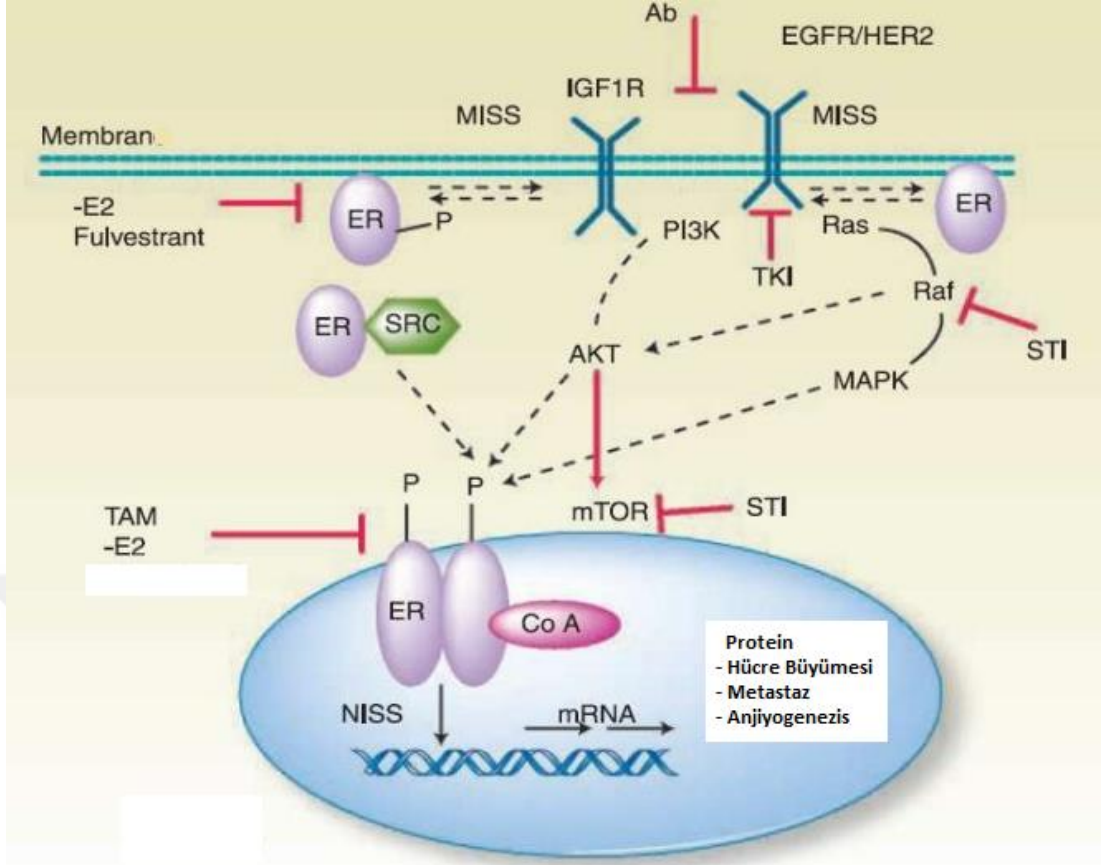
Meme kanserinin, diğer malignant şekillerdeki gibi, hücrel proliferasyon, farklılaşma, ölüm (apoptoz veya nekroz), DNA onarımı, doku bölümlendirmesi ve tedaviye yanıtları düzenleyen yollardaki bir dizi genetik ve sonuç olarak fenotipik değişikliklerin birikmesi ile ilerlediği düşünülmektedir. Geniş çaplı genetik değişiklikler göz önüne alındığında, meme kanserinin başta nokta mutagenezi olmak üzere kromozom instabilitesi ile karakterizedir. Bu kromozomal değişiklikler, santral sinirlerde ve meme epitel hücreleriyle ilişkili iç aparatındaki kusurlardan kaynaklanabilir. Bununla birlikte, bu kusurların kesin patogenezi belirsizdir (Pihan ve ark., 1998).

4.1.1.1. Hücresel Steroid ve Büyüme Faktörü Yolları

Östrojen ve progesteron reseptörleri dimerik gen düzenleyici proteinlerdir. Östrojen ve progesteron, iyi bilinen endokrin steroid düzenleyicilerdir ve meme bezi patolojisinin birçok yönünü modüle eder. Bu iki hormon, meme epitel büyümesini, farklılaşmasını ve hayatta kalmayı yönlendirmek için birlikte çalışır (Dickson ve Stancel, 2000; Elledge ve Fuqua, 2000; Dickson ve Russo, 2000). Hem östrojen hem de progesteron hedef genlerin transkripsiyonunu modüle etmek için nükleer reseptörleri (sırasıyla ER ve PR) vasıtasıyla etki eder (Elledge ve Fuqua, 2000). ER'ler, a ve b reseptörlerinden oluşan homodimerik veya heterodimerik türlerde olabilir. Buna karşılık, PR daima heterodimerik bir proteindir. Her bir steroid reseptör dimeri, aynı kökenli palindromik DNA elementleri ile ligand bağlama ilişkisine izin vermek için ısı şoku proteinleri de dahil olmak üzere diğer proteinlerle ilişkilidir.

Steroid reseptörlerinin DNA etkileşimi reseptörlerin çinko parmak yapıları vasıtasıyla gerçekleşir ve duyarlı genlerin transkripsiyonunu kolaylaştırmak için kararlı bir başlatma kompleksinin oluşumunu teşvik eder (Elledge ve Fuqua, 2000; Dickson ve Russo, 2000).

Steroidler, c-Myc ve EGF reseptörü (EGFR) / HER-2 büyüme faktörü-reseptör yolları gibi nükleer protoonkogenler olarak bilinen hücre döngüsü düzenleyici genlerin sentezlenmesini doğrudan modüle edebilme yeteneğine sahiptirler (Suchard ve ark., 1993; Dickson ve Lippman, 1987). Pek çok meme tümör hücre dizisinde ve endometriyum ve beyin gibi normal ER içeren dokulardaki PR ekspresyonunun östrojen tarafından pozitif olarak düzenlendiği gösterilmiştir. ER-ve PR-pozitif epitel hücre popülasyonları, normal bezdeki proliferatif hücrelerin çoğunluğundan farklı olsa da kanserde bu hücreler hızla büyür (Clarke ve ark., 1998; Khan ve ark., 1999). Daha önceki çalışmalar ER ve tümör bastırıcı BRCA-1 arasında bir bağlantı kurmuştur. BRCA-1'in normal formunun ekspresyonu, ER'nin transaktivasyonel aktivitesini bastırır (Fan ve ark., 1999).



Şekil 4.1. Meme kanseri hücrelerinde steroid reseptörleri ve büyüme faktörü ile ilişkili metabolik yollar. (<http://samplexresume.co/er-pr.html> adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

4.1.1.2. Meme Kanseri Alt tipleri

Meme kanserinde alt türlerin profili, tümör hücrelerinden moleküler ve genetik bilgi kullanılarak saptanır. Çoğu araştırma meme kanserini dört moleküler alt tipe böler (Clark ve ark., 2011):

- Lüminal A
- Lüminal B
- Üçlü negatif / bazal benzeri
- HER2 tipi

4.1.1.2.1. Lüminal A

Lüminal tümör hücreleri, meme kanallarını astarlayan iç (lümen) hücrelerden başlayan meme kanseri hücrelerine benzemektedir. Lüminal A tümör olma eğilimi östrojen reseptörü pozitif (ER-pozitif), HER2 reseptör-negatif (HER2-negatif) ve tümör grade 1 veya 2 içeriğine bağlıdır. Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde 30-70'i lüminal A tümörleridir (Fan ve ark., 2006; Voduc ve ark., 2010; Foukakis ve Bergh, 2016; Carey ve ark., 2014; Howlader ve ark., 2014).

4.1.1.2.2. Lüminal B

Lüminal B tümörleri ER pozitif olma eğilimindedir. HER2-negatif veya HER2-pozitif olabilirler.

Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde 10-20'si lüminal B tümörleridir (Fan ve ark., 2006; Voduc ve ark., 2010; Foukakis ve Bergh, 2016; Carey ve ark., 2014; Howlader ve ark., 2014).

4.1.1.2.3. Üçlü Negatif / Bazal Benzeri

Üçlü negatif meme kanseri şunlardır:

- Östrojen reseptörü negatif (ER-negatif)
- Progesteron reseptör negatif (PR-negatif)
- HER2-negatif

Bazal benzeri tümörler, meme kanallarını çevreleyen dış (bazal) hücrelere benzer hücrelere sahiptir. Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde 15-20'si üçlü negatif / bazal benzeridir (Fan ve ark., 2006; Kohler ve ark., 2015).

4.1.1.2.4. HER2 tipi

Moleküler alt tip HER2 tipi, HER2-pozitif ile aynı değildir ve tedaviyi yönlendirmek için kullanılmaz. Çoğu HER2 tipi tümörler HER2 pozitif olmasına rağmen, yaklaşık yüzde 30'u HER2 negatiftir (Foukakis ve Bergh, 2016). HER2 tipi tümörlerin özellikleri (Voduc ve ark., 2010; Foukakis ve Bergh, 2016; Metzger-Filho ve ark., 2013):

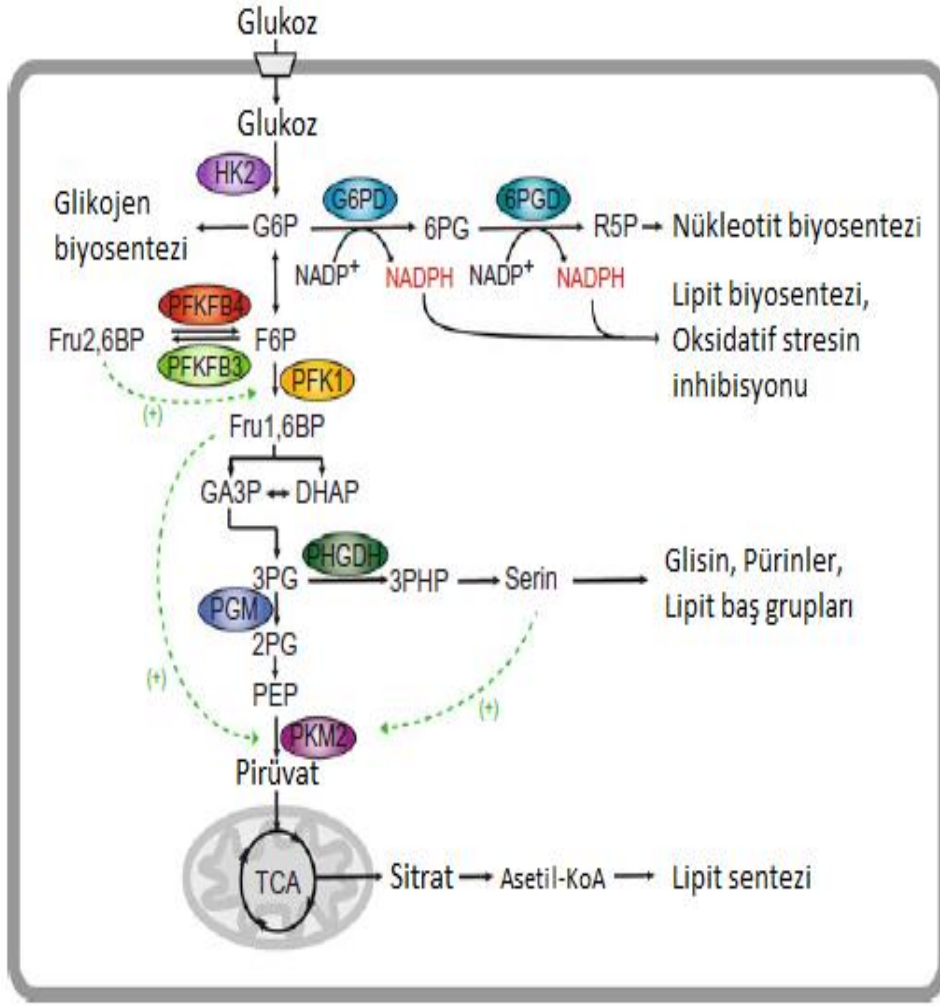
- ER-negatif
- PR-negatif
- Lenf nodu-pozitif
- Daha düşük tümör derecesi

Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde 5-15'i HER2 türüdür (Voduc ve ark., 2010).

4.1.2. Kanserde Enerji Metabolizması

4.1.2.1. Kansere Hücresinde Glukoz Metabolizması

Alman biyokimyacı Otto Warburg, geçtiğimiz yüzyılın ilk yarısında kanser dokusunun oksijen kullanımına bakılmaksızın büyük miktarda glukoz tükettiğini gözlemledi (Warburg ve ark., 1956). Bu gözlem, kanser hücrelerinde aerobik glikolizin tanımlanmasına yol açtı. Kansere hücrelerinde enerji üretimi için bu verimsiz yol “Warburg etkisi” olarak bilinmektedir (Brault ve Schulze, 2016). Başlangıçta, kanser hücrelerinde artan glikolitik ATP üretiminin, mitokondriyal genomun mutasyonundan kaynaklanan azaltılmış mitokondriyal fonksiyonun bir sonucu olduğu düşünülüyordu. Bununla birlikte, şimdi kanser hücrelerinde artan glukoz alımının ve glikolitik aktivitenin, glukozdan türeyen metabolitlerin biyosentetik yollara yönlendirilmesine izin verdiği bilinmektedir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Kanser hücrelerinde glukoz metabolizması.

Glukozun heksokinaz 2 (HK2) ile fosforilasyonu, glukozu hücre içinde tutar. Glukoz-6-fosfat (G6P), glikoliz, pentoz fosfat yolu veya glikojen biyosentezine girebilir. Fosfofruktokinaz-2 / fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB3 ve PFKFB4) ile allosterik aktivatör fruktoz-2,6-bisfosfat (FR2,6BP) seviyelerinin düzenlenmesi, fosfofruktokinaz 1'in (PFK1) aktivitesini kontrol eder. 3-fosfogliseratın (3PG) fosfogliserat dehidrogenaz (PHGDH) ile serin biyosentezine yönlendirilmesi, glisin, pürinler ve lipit baş gruplarının yanı sıra bir karbon metabolizmasını üretir. Pirüvat kinazın M2 izoformunun düşük aktivitesi (PKM2) glikolitik kaskatın son adımı kontrol eder ve böylece biyokimyasal reaksiyonlarda glikolitik ara ürünlerin kullanılmasına izin verir. NADPH'nin pentoz fosfat yolağının oksidatif kolu içindeki iki enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ile NADPH'nin üretilmesi, lipit biyosentezi ve antioksidan üretim için indirgeyici eşdeğerlikler sağlar.

Pek çok onkojenik sinyal yolağı, kanser hücrelerinde glikolitik aktiviteyi etkiler. Birçok glikolitik enzimin ekspresyonu, onkojenik transkripsiyon faktörü c-Myc ve hipoksi ile uyarılabilir faktör (HIF) tarafından indüklenir (Cairns ve ark., 2011). En iyi çalışılan yolaklardan biri, insan kanserinde sıkça aktive olan fosfatidilinozitol 3-fosfat kinaz (PI3K) yolağıdır. Normal hücrelerde, PI3K, hücre yüzeyi üzerindeki reseptör tirozin kinazlara bağlanan büyüme faktörüne tepki olarak aktifleştirilir. Bu, PI3K'nin lipit kinaz aktivitesini uyarır ve bir lipit ikinci mesajcısı olan fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PIP3) 'ı üretir (Vanhaesebroeck ve ark., 2012). Bu, serin / treonin kinaz Akt (c-Akt / PKB) de dahil olmak üzere birçok aşağı akım efektörünü aktive eder. Akt, insülin sinyallemesinin en önemli araçlarından biridir ve farklı dokularda bir takım önemli metabolik hedef proteinlere sahiptir ve böylece kan akışından glukozun uzaklaştırılmasını kontrol eder (Manning ve Cantley 2007).

Kanser hücrelerinde Akt, glukoz taşıyıcıları 1 ve 4'ün (GLUT1 ve GLUT4) plazma membranına lokalizasyonu arttırarak glukoz alımını arttırır. Akt, glikolitik basamakların ilk ve geri döndürülemez basamağını katalize eden ve mitokondriyal membrana lokalizasyonu arttıran enzim olan heksokinaz 2'nin (HK2) fosforilasyonuna da yol açar (Gottlob ve ark., 2001; Majewski ve ark., 2004). Bu, glukozun glukoz-6-fosfata dönüştürülmesini mitokondriyal ATP üretimine bağlar ve kanser hücrelerini apoptozdan korur. Akt ayrıca, fosfofruktokinaz-2 / fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFK-2 / Fru-2,6BPaz) kalp izoformunu fosforilleyerek glikolitik aktiviteyi modüle eder. Bu iki fonksiyonlu enzim ailesi, glikolizin ikinci geri döndürülemez basamağını katalizleyen enzimin [Fosfofruktokinaz 1 (PFK1)] allosterik aktivatörü olan fruktoz 6-fosfat (F6-P) ve fruktoz-2,6-bisfosfatın (F2,6-BP) karşılıklı dönüşümünü düzenler. Memeli genomu, birkaç PFKFB izoformunu (PFKFB1-4) kodlar (Rider ve ark., 2004). Beyin izoformunun (PFKFB3) yüksek kinaz aktivitesi, tümör hücrelerinde glikolizi teşvik edebilir (Yalcin ve ark., 2009). Bununla birlikte, PFKFB3 inhibisyonu otofajiyi de uyarır, böylece tümör hücrelerinde bir hayatta kalma mekanizması sağlanır (Klarer ve ark., 2014). Bir başka PFKFB izoformu olan PFKFB4, fonksiyonel olarak prostat kanseri hücrelerinin hayatta kalması için önemli bir gen olarak tanımlanmıştır (Ros ve ark., 2012).

PFKFB proteinleri tarafından glikolitik aktivitenin düzenlenmesi, AMP ile aktifleştirilmiş protein kinazın (AMPK) fonksiyonuyla sıkı bir şekilde ilişkilidir. PFKFB3 de dahil olmak üzere birçok PFKFB izoformu, AMPK tarafından C-terminal düzenleyici alandaki korunmuş bir serin üzerinde fosforile edilebilir. AMPK'ya bağlı fosforilasyon, PFKFB'nin kinaz alanının aktivitesini artırır (Barford ve ark., 1991). AMPK, düşük ATP seviyelerine tepki olarak aktive edildiğinde, AMPK ile PFKFB'nin fosforilasyonu, enerji yoksunluğu koşullarında glikolitik ATP üretimini artırır.

AMPK yolunun genel olarak tümör baskılayıcı fonksiyonlarına sahip olduğu düşünülürken, deneysel kanıtlar AMPK'nın, besinlerin az olduğu durumlarda kanser hücrelerindeki biyosentetik süreçleri sınırlamak, böylece antioksidan moleküllerin yenilenmesi için NADPH'yi korumak için önemli olabileceğini düşündürmektedir (Jeon ve ark., 2012). Oksidatif pentoz fosfat yolağının (PPP) enzimlerinin ikisi de kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlama ile ilişkilendirilmiştir.

Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD), rapamisin kompleksi 1'in (mTORC1) memelilerin hedefinin aşağı akışındaki metabolik transkripsiyon parçasıdır (Duvel ve ark., 2010). G6PD'nin aktivitesi, doğrudan bağlanma yoluyla p53 tümör supresörü tarafından engellenmektedir (Jiang ve ark., 2011). PPP'nin ikinci NADPH üreten enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrojenazın (6PGD) devrilmesi, akciğer kanseri hücrelerinde yaşlanmaya neden olur (Sukhatme ve Chan 2012).

6PGD, fosfogliserat mutazın (PGM) p53 tarafından inhibisyonuna yanıt olarak 3-fosfogliseratın (3PG) birikimi ile de engellenir (Hitosugi ve ark., 2012). TP53 ayrıca PFKFB proteinlerinin fruktoz-2,6-bisfosfataz alanına yapısal benzerlik gösteren TP53 ile uyarılan glikoliz ve apoptoz regülatörü (TIGAR) ekspresyonunu indükleyerek PFK1'in aktivitesini düzenler. TIGAR, DNA hasarına tepki olarak glikoliz inhibisyonu ve metabolitlerin PPP'ye yönlendirilmesi ile sonuçlanan F2,6-BP miktarlarını azaltır (Bensaad ve ark., 2006).

TP53 ile glikolitik aktivitenin modülasyonu, hücrelerin, DNA onarımı için nükleotidlerin üretimini arttırmasına izin verir. Bununla birlikte, silme yoluyla TP53'ün kaybı, biyosentetik reaksiyonları desteklemek için artmış NADPH üretimiyle sonuçlanır.

Kanser hücrelerinin sağ kalımı için önemli olduğu gösterilen bir diğer glikolitik enzim, fosfogliserat dehidrojenaz (PHGDH)'dir (Locasale ve ark., 2011; Possemato ve ark., 2011). PHGDH, 3-fosfogliseratın, iki amino asit olan serin ve glisinin biyosentezine yönlendirilmesini teşvik eder. Glisin, glutatyon üretimi için gerekli olduğu için, serin biyosentez yolağı boyunca arttırılmış akı, bu önemli antioksidanın yeterli üretimini sağlayabilir. Serin ve glisin, pürin biyosentezi için ara ürünleri, lipid sentezi için baş grupları ve DNA ile histonların modifikasyonu için metil grupları sağlayan tek karbonlu metabolizma (folat aracılı tek karbon metabolizması veya folat ve metiyonin döngüleri olarak da bilinir) ile yakından ilişkilidir (Locasale, 2013). Glisin metabolizmasındaki birçok enzim, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) kök hücrelerinde yukarı doğru düzenlendiği ve glisini CO₂, amonyak ve metil tetrahidrofolata (metil-THF) dönüştüren glisin dekarboksilazın aşırı ekspresyonu ile gösterilmiştir.

Glisin alımı kanser hücrelerinin çoğalması ile de bağlantılıdır (Zhang ve ark., 2012), serin *in vitro* ve *in vivo* p53 null kanser hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir (Maddocks ve ark., 2013). Kanser hücrelerinde en iyi çalışılan glikolitik enzim pirüvat kinazdır. Bu enzimin kas izoformu (PKM), M1 ve M2 olmak üzere iki ek varyantta bulunur ve bunlar tek bir ekzonda farklılık gösterir. Ekzon 9, M2 izoformuna (embriyonik izoform olarak da bilinir, PKM2) özgünken, M1 izoformu (PKM1) ekzon 10'u içerir. Kanser hücreleri de dahil çoğalan çoğalan hücreler ağırlıklı olarak PKM2'yi ifade eder (Christofk ve ark., 2008). PKM1'in aksine PKM2, yüksek aktiviteye sahip bir tetramerik durum ile düşük aktiviteli dimerik bir durum arasında geçiş yapabilir (Mazurek ve ark., 2005).

Bu, kanser hücrelerinin son glikolitik reaksiyon yoluyla metabolit akışını ince ayarlamalarına izin verir ve böylece biyosentetik reaksiyonlar için glikolitik ara ürünlerin kullanılmasına izin verir.

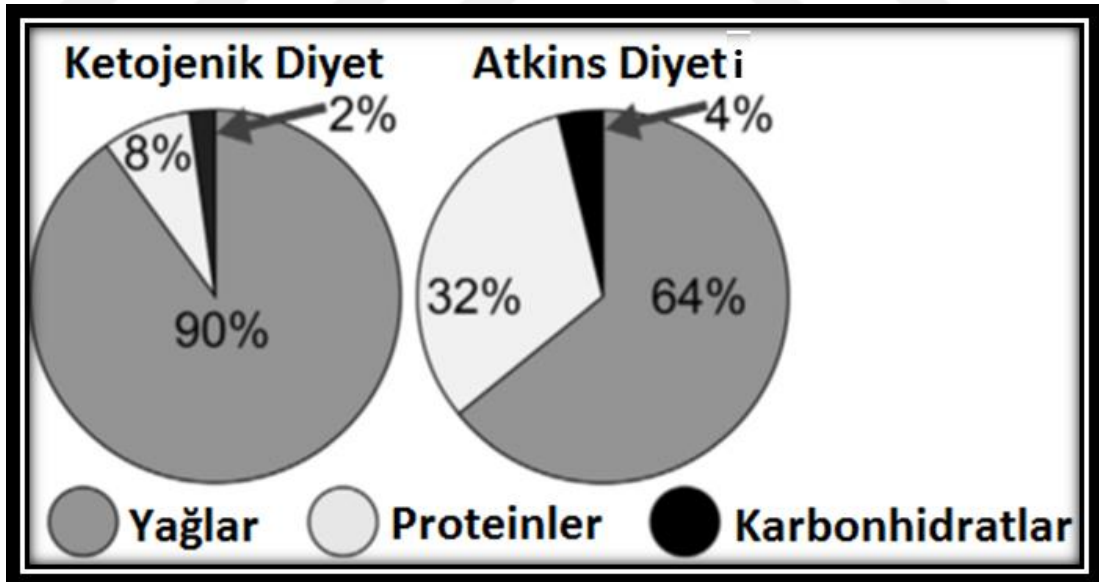
4.2. Ketojenik Diyet

Ketojenik diyet, orta ile düşük protein içeriğine sahip yüksek yağdan ve çok düşük karbonhidratlardan (vücudun adenozin trifosfat sentezi için glukoz yerine yağ yakmasına neden olan) oluşur. Genel olarak, ağırlıkça 3:1 veya 4:1 oranında yağ : karbonhidrat + protein içeriğinden oluşur (yaklaşık %8 protein, %2 karbonhidrat ve %90 yağ) (Allen ve ark., 2014; Lima ve ark., 2014).

İlk olarak 1921'de önerilen dört temel ketojenik diyet kategorisi vardı (Giordano ve ark., 2014). Yaygın olanı uzun zincirli trigliserit (LCT) temelli diyettir (Wilder, 1921). Bu diyet, 4:1 oranında yağ: protein + karbonhidrat içeriğinden oluşur. İlerleyen yıllarda diğer ketojenik diyetler ortaya çıktı. Orta zincir trigliserit (MCT) diyeti, klasik ketojenik diyetlerin şiddetli kısıtlamalarını aşmak için sunulmuştur (Huttenlocher ve ark., 1971; Liu ve Wang, 2013). MCT'lerdeki ana yağ asitleri kaprilik asit, kaprik asit ve daha az ölçüde kaproik asit ve laurik asittir (Ferreira ve ark., 2014). MCT'lerin LCT'ler üzerindeki en büyük avantajı, albüminle karaciğere hızla taşınması ve daha verimli bir şekilde emilmesidir. Karaciğer alımını takiben, karaciğer mitokondrisinde metabolize olurlar ve yağ asiti β -oksidasyonundan sonra keton cisimlerine dönüşürler (Giordano ve ark., 2014). Öte yandan, LCT'ler şilomikronlara eklenerek kan dolaşımına taşınır. LCT'ler, mitokondriye girmek için bir taşıyıcı olarak karnitine ihtiyaç duyarlar ve daha sonra β -oksidasyon çevriminden geçerler. MCT'lerle karşılaştırıldığında, LCT metabolizması daha yavaş işler ve daha fazla enerji harcamasını gerektirir (Ferreira ve ark., 2014).

Ayrıca epilepsi tedavisine yardımcı olmak için geliştirilen iki ilave diyet vardır: Modifiye Atkins diyeti ve Düşük Glisemik İndeks Tedavisi (LGIT) (Şekil 4.3.). Değiştirilmiş Atkins diyeti Johns Hopkins Hastanesinde tasarlanarak, daha az kısıtlayıcı ve daha lezzetli bir diyet tedavisi olarak önerilmiştir (Wibisono ve ark., 2015; Auvin, 2012).

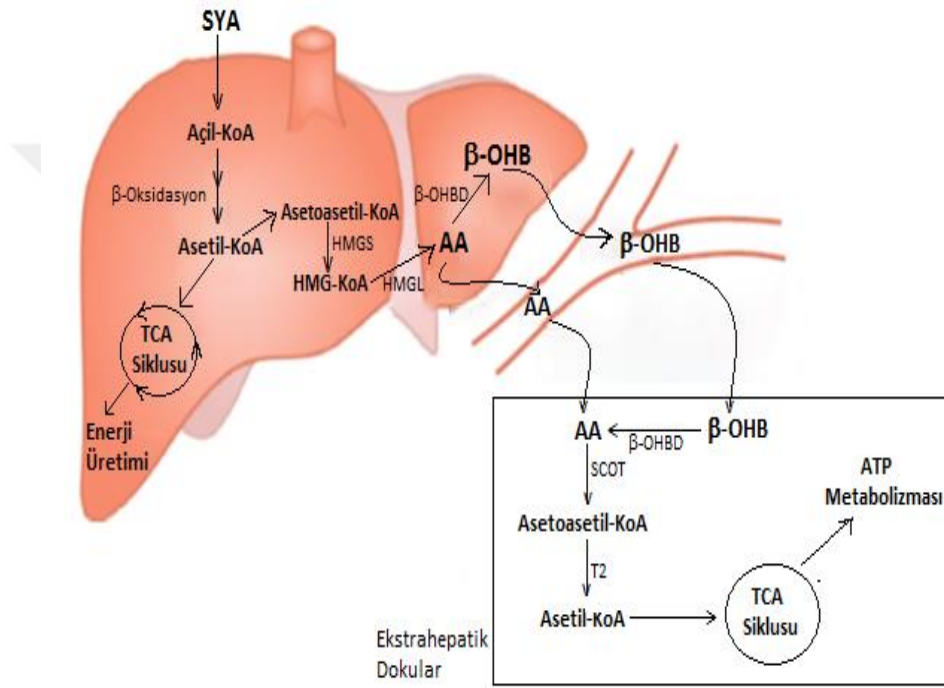
Atkins diyeti, diğer ketojenik diyetlerin aksine protein alımını veya günlük kaloriyi aşırı derecede sınırlandırmaz (Sharma ve Jain, 2014). LGIT ise keton düzeylerini yükseltmeden, glisemik indeksi 50'den düşük olan karbonhidratların daha ılımlı bir şekilde alınmasına izin vermektedir (Miranda ve ark., 2012). Tüm bu diyetler klinik tanı, yaş, cinsiyet, kilo, aktivite seviyesi ve her hastanın en iyi keton düzeylerini elde etmesine yardımcı olmak adına bir diyetisyen tarafından planlanmalıdır (Liu ve Wang, 2013; Paoli ve ark., 2015). Ayrıca ketojenik diyetlerin uyumu ve etkinliği, serum ve idrardaki β -hidroksibütiratın ölçülmesiyle izlenebilir (Gilbert ve ark., 2000).



Şekil 4.3. Ketojenik diyet ve Atkins diyetinin kalorik bileşiminin karşılaştırılması.

4.2.1. Keton Cisim Metabolizması

Keton cisimleri, mitokondriyal β -oksidasyonu sırasında oluşan asetil-KoA metabolizmasını takiben karaciğerde üretilir (Şekil 4.4.). Asetil-KoA, ATP üretimi için Krebs döngüsüne girebilir ve / veya kandan, kalp ve beyin gibi farklı dokulara taşınan keton cisimlerine (asetoasetat, β -hidroksibütirat ve asetona) dönüştürülebilir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Keton cisimlerinin üretimi ve kullanımı.

Karaciğerde serbest yağ asitleri (SYA), mitokondriyal β -oksidasyonuna giren asetil-KoA'ya dönüşür. Bu molekül, enerji üretmek için krebs döngüsüne girebilir veya keton cisimlerine (asetoasetat, β -hidroksibütirat ve asetona) dönüşmek için kandan farklı dokulara taşınır. Karaciğerde üretilen keton cisimleri beyinde, kalpte veya kasta asetil-KoA yoluyla enerji kaynağı olarak kullanılır. Bu işlem, AcAc'den asetoasetil-KoA oluşumunda rol oynayan süksinil-KoA: 3-ketoasit KoA transferaz (SCOT), asetoasetil-KoA'yı asetil-KoA'ya dönüştüren tiyolaz (T2) ve β HB'yi AcAc'ye dönüştüren β HBD gibi önemli mitokondriyal enzimlere bağlıdır (Branco ve ark.,2016).

Sirkülasyondaki en büyük keton cisim β HB iken, asetoasetat kimyasal olarak çok kararsız ve aseton ise az metabolize edilmiştir (Bender, 2014). Normal koşullar altında plazmadaki keton cisim konsantrasyonu nispeten düşüktür (<0.2 mM), ancak ketojenik koşullar altında seviyeleri 7-8 mM'ye kadar yükselebilir (Courchesne-Loyerve ark., 2013). Beyin, kas veya kalp gibi farklı dokularda, keton cisimleri bir enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere asetil-KoA'ya dönüştürülür.

β HB'den enerji geri kazanımı, β HB dehidrogenaz (β HBD) ve süksinil-CoA: 3-ketoasit KoA transferaz (SCOT) (Chriett ve Pirola, 2013) olmak üzere iki ana mitokondriyal enzimin ekspresyonuna bağlıdır (Şekil 4.5.). Bununla birlikte, keton cisimleri, hidrojen / karbon oranlarının daha yüksek olması ve yağ asitlerinden farklı olarak mitokondriyi ayrıştırmadığı için, pirüvat veya yağ asitlerine göre enerjik olarak daha etkilidir (Tieu ve ark., 2003; Zhou ve ark., 2007).

4.3. Kanserde Ketojenik Diyetin Öngörülen Etki Mekanizması

4.3.1. Kanser Hücrelerinin Glukoz Bağımlılığı

Glikoliz, glukozun oksijen varlığında asetil-KoA'ya dönüştürülüp mitokondride sitrik asit döngüsüne giren pirüvata enzimatik olarak parçalanmasına aracılık eder. Oksijenin olmaması durumunda, pirüvat alternatif olarak laktata dönüştürülür. Normal hücreler, oksidatif fosforilasyon yoluyla etkili bir şekilde ATP üretmek için pirüvat üretimini mitokondriyal solunuma bağlar ve genellikle laktat üretiminin yanı sıra düşük glikoliz seviyelerini gösterirler. Normal hücrelerden farklı olarak, kanser hücreleri, artmış glikoliz gerektiren ve defektif mitokondriyal solunum nedeniyle ortaya çıktığı düşünülen artmış glukoz tüketimini göstermektedir (Warburg, 1956). Son 60 yıldaki sayısız hayvan üzerinde yapılan çalışmalar, sadece kanser hücrelerinde artan glukoz tüketiminin gözlemine doğrulamakla kalmayıp, aynı zamanda tümör sağ kalımı ve metastaz için glukozun önemini ortaya koymaktadır (Rigo ve ark., 1996).

Anormal aerobik glikolize ek olarak, kanser hücreleri artmış pentoz fosfat yolu aktivitesine sahiptir (Boros ve ark., 1998). Pentoz fosfat yolu, indirgeyici eşdeğer iki molekül olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve riboz-5-fosfattan üretmek için glukozu okside hale getirir.

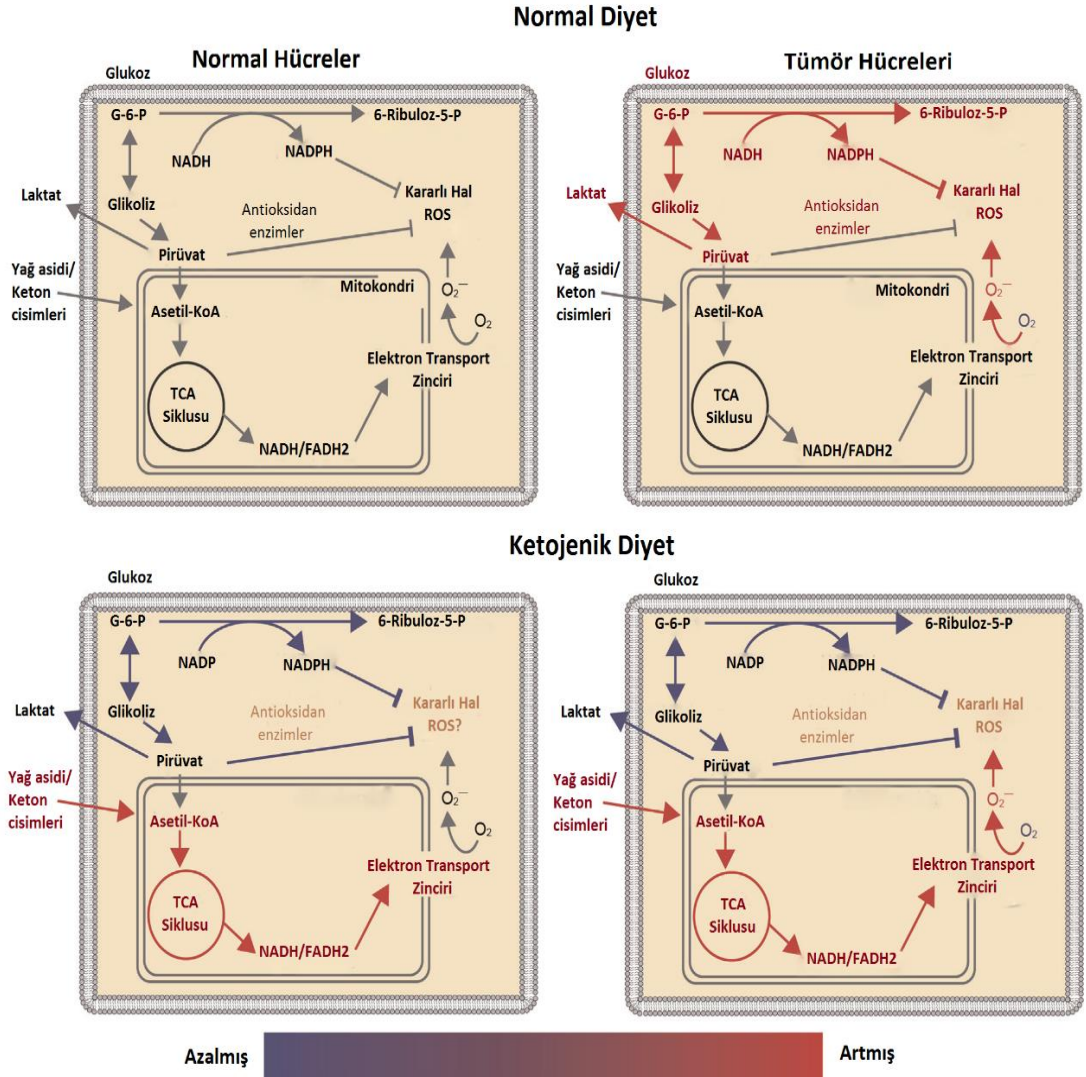
NADPH, glutatyon / glutatyon peroksidaz sistemi ve tiyoredoksin / tiyoredoksin peroksidaz sistemi için bir kofaktör görevi görür (Buettner,2011). Bu tiyol sistemleri, H₂O₂ ve organik peroksitlerin detoksifikasyonundan sorumludur, böylece oksidatif hasarı önleyip onararak redoks dengesini muhafaza eder.

Önceki çalışmalar, glukoz yoksunluğunun, insan kanser hücrelerinde oksidatif strese ve toksisiteye neden olduğunu, normal hücelere göre süperoksit ve peroksit söndürücülerin eklenmesiyle tersine döndüğünü göstermiştir (Ahmad ve ark., 2005). Ayrıca, birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, metabolik oksidatif stres içeren mekanizma yoluyla seçici kanser hücresi toksisitesine neden olmak için glikolitik inhibitörlerin kullanımı başarıyla araştırılmıştır (Aykin-Burns ve ark., 2009; Coleman ve ark., 2007; Geschwind ve ark., 2002; Trachootham ve ark., 2009).

4.4. Kanser ve Mitokondriyal Mekanizma

Kanser tedavileri, kanser hücreleri ile normal hüceler arasında bulunan metabolik ve fizyolojik farklılıklardan yararlanmak için tasarlanmıştır. Normal hücelere kıyasla, kanser hücreleri artmış glukoz metabolizmasının yanı sıra kronik metabolik oksidatif stresin sonucu olduğuna inanılan mitokondriyal oksidatif metabolizma değişiklikleri sergilemektedir (Aykin-Burns ve ark., 2009; Kroemer ve Pouyssegur, 2008; Spitz ve ark., 2000) (Şekil 4.5.). Mitokondri, hücrel ATP üretiminde elektron taşıma zinciri (ETC) aktivitesinin kullanıldığı oksidatif fosforilasyon süreci boyunca hücrel enerji üretiminin düzenlenmesinde yer alır (Attardi ve Schatz, 1988). Mitokondriyal ETC'de, elektronlar, kompleks I-IV tarafından kapatılır ve ATP sentez yoluyla ATP üretimine (Kompleks V) bağlanan transmembran proton gradyanının oluşumuyla sonuçlanır.

Çalışmalar, baş ve boyun (Zhou ve ark., 2007), prostat (Petros ve ark., 2007), yumurtalık (Liu ve ark., 2001) ve karaciğer (Nishikawa ve ark., 2001) de dahil olmak üzere birçok insan kanserinde nükleer kodlanmış mitokondriyal proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikler yanında mitokondriyal DNA mutasyon prevalansının arttığını göstermiştir. Önceki veriler, mitokondriyal DNA'nın mutasyonlara duyarlılığının büyük oranda bu organeldeki ROS düzeyindeki artıştan kaynaklandığını ileri sürmektedir. Ayrıca, son çalışmalar, meme ve kolon kanseri hücrelerinin, normal kolon ve meme hücrelerine göre belirgin olarak artmış ROS düzeylerini göstermiştir. Bu farklılıklar, mitokondriyal ETC baskılayıcılarının varlığında daha belirgin olmakla beraber kanser hücrelerinde artmış ROS üretiminin başlıca kaynağı olarak disfonksiyonel mitokondriyal ETC'ler olduğu düşünülmektedir. Genel olarak, normal hücrelere kıyasla kanser hücre mitokondrisinde hücre içi O_2^- 'de ve H_2O_2 'de anlamlı bir artış olduğunu gösteren önemli literatür vardır ve bu, kanser tedavisinin güçlendirilmesi için bir hedef oluşturabileceğini göstermiştir (Allen ve ark., 2014; Coleman ve ark., 2008; Fath ve ark., 2011; Oberley, 2005; Wen ve ark., 2013).



Şekil 4.5. Amerikan diyetinde ve ketojenik bir diyetle normal hücre ve tümör hücresi metabolizmasının karşılaştırılması.

Normal hücelere kıyasla, tümör hücrelerinin artmış mitokondriyal DNA mutasyonlarının yanı sıra, nükleer kodlanmış mitokondriyal proteinlerin ekspresyonunda değişiklikler olduğu ve mitokondriyal solunum sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminin arttığı hipotezleşmiştir. Artmış tümör hücresindeki ROT, glukoz metabolizmasına bağlı olarak tümör hücresine bağımlılığı artırır ve pentoz fosfat şantı ve glikolizden pirüvat yoluyla NADPH ve pirüvat üretilmesine neden olur. NADPH ve pirüvat, hidroperoksitleri azaltır. Ketojenik diyetler, tümör hücrelerinin NADPH üretme kapasitesini düşürür, çünkü çoğu dokuda yağ metabolizması, pentoz fosfat şantına girmek için gerekli olan glikoz-6-fosfat (G-6-P) oluşturmak için glukoneogeneze uğrayamaz. Bu nedenle, ketojenik diyetler, NADPH rejenerasyonunu sınırlandırarak normal hücelere göre tümör hücrelerindeki oksidatif stresini daha da artırmaktadır (Allen ve ark., 2014).

4.5. Kanser Tedavisinde Ketojenik Diyetler

Kanser tedavisinde ketojenik diyetler hem hayvan modellerinde hem de hastalar üzerinde çalışılmıştır. 1987 yılının başlarında, Tisdale ve ark., ketojenik diyet ile beslenen kolon adenokarsinomalı farelerde azalmış tümör ağırlığı ve kaşeksi gelişimini gözlediler (Tisdale ve ark., 1987). Başka çalışmalar ise malign glioma, kolon kanseri, gastrik kanser ve prostat kanseri ile ketojenik diyetlerin tümör büyümesini azalttığını ve hayatta kalma oranını iyileştirdiğini göstermiştir (Maurer ve ark., 2015; Seyfried ve ark., 2012; Stafford ve ark., 2010).

Ayrıca ketojenik diyetler, bazı destekleyici bulgularla, malign glioma modellerinde ve küçük hücreli dışındaki akciğer kanseri modellerinde radyasyonun etkilerini güçlendirmesiyle ilgili hipotez haline getirilmiştir (Allen ve ark., 2014; Abdelwahab ve ark., 2012).

Ketozis durumunu da tetikleyen açlığın, klinik öncesi kanser tedavi modellerinde kemoterapiye cevap vermeyi arttırdığı ve kemoterapi ile görülen bazı normal doku yan etkilerini iyileştirdiği gösterilmiştir. Açlık dönemlerinin tümörlerin büyümesini geciktirdiği ve bir dizi kanser hücresi tipinde kemoterapiye duyarlılığı artırdığı bildirilmektedir (Lee ve ark., 2014). Yakın tarihli bir çalışmada ise standart tedavi ile beraber kalori kısıtlı ketojenik diyetle tedavi edilen glioblastoma multiformeli 65 yaşındaki kadın hastada düzelmelerin görüldüğü gözlenmiştir (Zucconi ve ark., 2010).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmamız, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEMHAM) laboratuvarlarında yapıldı. Deneylerde kullanılan cihazların listesi aşağıdadır.

- Distile su cihazı
- Mikroplak okuyucu
- Laminar kabin
- İnkübatör
- Masaüstü soğutmalı tüp santrifüjü
- Masaüstü soğutmalı ependorf santrifüjü
- Faz-kontrast mikroskobu
- İnvart mikroskop
- Hassas Terazî
- pH Metre
- Vorteks
- Orbital shaker
- Otoklav

5.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- Penisilin/Streptomisin
- DMEM
- DMEM-F12
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- L-Glutamin
- Dimetilsülfoksit (DMSO)
- Tripan mavisi
- Tripsin/EDTA çözeltisi
- Fosfat tamponu (PBS)
- Hücre proliferasyon kiti (MTT)
- SDS
- Metanol
- Asetoasetat (Lityum Tuzu)
- Beta Hidroksibütirat (Sodyum Tuzu)

5.2. Yöntemler

5.2.1. Keton Cisimlerinin Hazırlanması

Keton cisimlerinden asetoasetat (lityum tuzu, Sigma) ve beta hidroksibütirat (sodyum tuzu, Sigma) ticari olarak tuz şeklinde temin edildiği için fosfat tamponu içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Bunun için önce 0,001 mol asetoasetat (MA:108,02 g/mol) alınarak 10 mL'lik fosfat tamponunda [PBS (1x, w/o Ca^{+2} - Mg^{+2}), Dulbecco] çözüldü ve pH'nın 7,5 olması için 0,1 mol/L HCl kullanıldı. Bu şekilde 0,1 M'lık stok çözelti hazırlandı. Beta hidroksibütirattan (MA:126,09 g/mol) da 0,001 mol alınarak 10 mL'lik fosfat tamponunda çözüldü. Bu şekilde 0,1 M'lık stok çözelti hazırlandı.

5.2.2. Meme Kanseri Hücre Hatları ve Hücre Kültürü

5.2.2.1. Hücre Hatları

Bu çalışmada, ATCC'den ticari olarak temin edilen MCF 7, MDA MB 231, MDA MB 435 ve Fibroblast hücre hatları kullanılmıştır.

MCF 7 hücreleri, 1973 yılında Dr. Soule ve çalışma arkadaşları Michigan Kanseri Vakfı'nda metastatik hastalığı olan 69 yaşında bir hastanın plevral efüzyonundan izole edildi. MCF 7 yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır. Tüm dünyada meme kanseri araştırmaları için, anti kanser ilaçları da dahil olmak üzere uygun bir model hücre hattı olduğu kanıtlanmıştır. ER pozitif ve progesteron reseptör (PR) pozitif ve lüminal A moleküler alt tipine aittir (Comşa ve ark., 2015).

MDA MB 231 hücre hattı üçlü negatif meme kanseri alt birimine sahiptir. Üçlü negatif terimi, ER, PR ve HER2 protein ekspresyonundan yoksun meme tümörlerinin immünohistokimyasal sınıflandırmasını ifade eder.

MDA MB 435 hücre dizisi başlangıçta 1976'da R. Cailleau ve arkadaşları tarafından metastatik meme duktal adenokarsinomalı 31 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Bu hücre hattı HER2 meme kanseri alt birimine sahiptir. HER2 terimi, ER ve PR ekspresyonundan yoksun meme tümörlerinin immünohistokimyasal sınıflandırmasını ifade eder.

5.2.2.2. Hücrelerin Çözülmesi

Hücreler -150°C'den alındı ve hızla çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler içerisinde 10 ml besi yeri bulunan 15 ml'lik tüplere alınarak 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki kısım uzaklaştırıldıktan sonra çökelek kısmı resüspanse edilerek besi yeri içeren flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de inkübasyona bırakıldı, hücre çoğalması her gün takip edildi.

5.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılmaları

Hücrelerin besi yeri değişimleri, pH değişimine bağlı olarak üç dört günde bir gerçekleştirildi. Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi. Pasaj sırasında besi yeri flasklardan uzaklaştırıldı. PBS ile üç kez yıkanan hücreler, flaskın boyutuna göre eklenen tripsin-EDTA ile 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.

Tripsin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besi yeri ile birlikte 15 ml'lik tüplere toplanan hücreler 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üç dört pasajda bir hücreler *kryovel* kullanılarak, %80 besi yeri, %10 FBS, %10 DMSO içeren ortamda dondurularak daha sonraki deneylerde kullanılacak stoklara hazırlandı. Dondurulan hücreler bir gece -80°C'de bırakıldıktan sonra ertesi gün -150°C'ye kaldırıldı.

5.2.3. Hemositometrik Hücre Sayımı

Flasklardaki besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra, pasajlamada anlatılan şekilde toplanan hücreler, çökelek miktarına göre besi yeri ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alındı, 10 µl tripan mavisi ile pipetaj yapılarak karıştırıldı. Toma lamı ve lamel arasına boyanan hücrelerden 10 µl konularak ters-faz ışık mikroskopunda 10x büyütmede hücreler sayıldı. Tripan mavisi ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirilerek, aşağıdaki formüle göre mL'deki hücre sayısı hesaplandı.

Hücre sayısı/ml= Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x 10⁴

5.2.4. Hücre Canlılığının MTT Testi ile İncelenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan MTT stabil bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerde glikolitik yolda üretilen NAD(P)H'e bağımlı olarak indirgenir ve formazan kristallerinin oluşmasına sebep olur. Deney sonunda oluşan formazan kristali miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artar. Hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılıp, sayıldıktan sonra 50000 hücre/kuyu olacak şekilde 1000 µl besi yeri/kuyu içeren 24 kuyucuklu plaklara ekildi ve 24 saat 37°C'de kuyulara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün keton cisimlerinden (beta hidroksibütirat veya asetoasetat) hazırlanan ana stoklardan 10 mM ve 20 mM olacak şekilde hücrelere uygulandı. Deney koşulları şekil 5.1'de gösterildiği gibi hazırlandı. Bu maddelerin hücre canlılığına olan etkileri zamana bağlı olarak incelenmek üzere, keton cisim uygulamasından 24, 48 ve 72 saatin sonunda MTT'den 50µl eklendi. 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında hücre canlılığı mikropalak okuyucuda (Multiplate Reader) kullanılarak 540 nm'de ölçüldü. Absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak her bir grubun hücre canlılık oranı (%) hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = (\text{Örnek}_{540\text{nm}} - \text{Blank}_{540\text{nm}}) / (\text{Kontrol}_{540\text{nm}} - \text{Blank}_{540\text{nm}}) \times 100$$

5.2.5. Hücre Hatlarının Morfolojik İncelenmesi

Fibroblast ve meme kanseri hücre hatları (MCF 7, MDA MB 231 ve MDA MB 435), keton cisim muamelesinin ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücrelerin morfolojisi incelendi ve ters-faz ışık mikroskobu ile fotoğraflandı (10x'lik büyüme oranıyla).

5.2.6. Kullanılan İstatistik Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri GraphPadPrism yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde ANOVA testi kullanılarak anlamlılık sınırı p<0,05 olarak alınmıştır.

6. BULGULAR

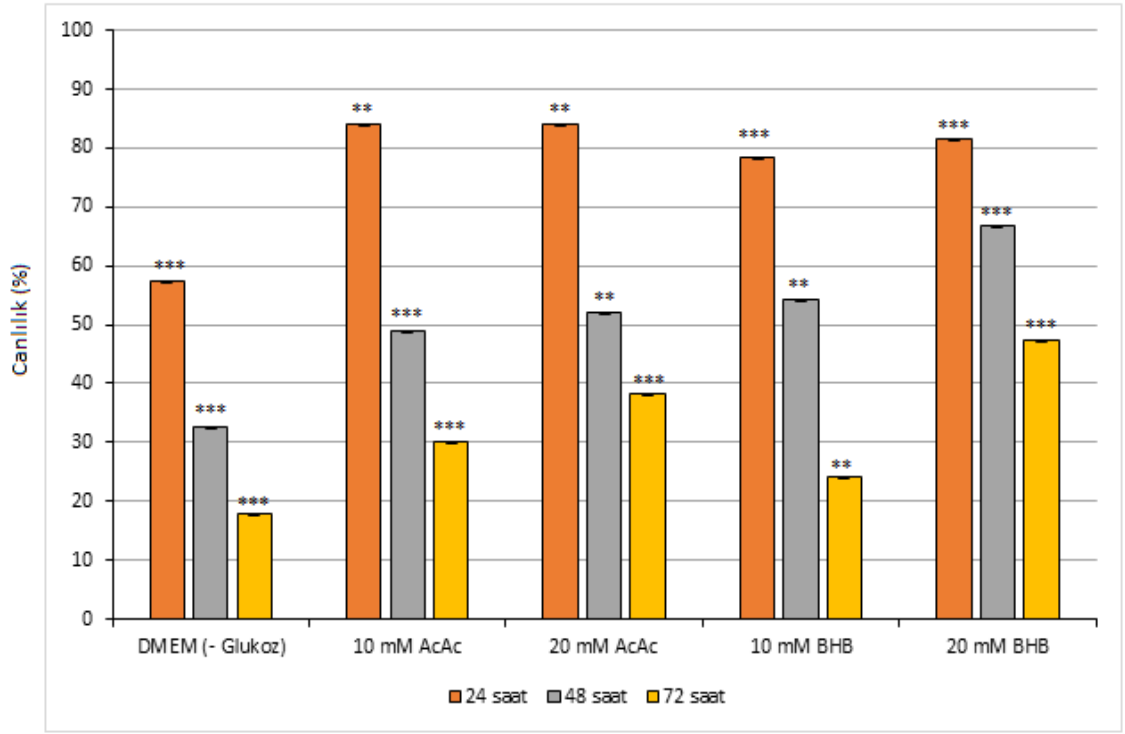
Bu çalışmada meme kanseri hücre hatları (MCF 7, MDA MB 231 ve MDA MB 435) ve fibroblast hücre hattında keton cisimlerinin canlılık üzerindeki etkisi incelendi. Canlılık tayini için hem hemositometrik hücre sayım yöntemi hem de MTT testi uygulandı. Ayrıca ışık mikroskopu yardımıyla hücrelerin morfolojik analizleri yapıldı. Bu işlemlerde, kontrol olarak glukoz içerikli besiyeri (DMEM) kullanıldı ve keton cisimleri içeren ortamlarla karşılaştırma yapıldı. Bu amaçla, 10 ve 20 mM olacak şekilde keton cisimleri asetoasetat (AcAc) ve β -hidroksibütirat (β HB) tuzları kullanıldı. Meme kanseri hücre hatları ile fibroblast hücre hattında canlılık testleri uygulandı. Hücreler DMEM, glukoz içermeyen DMEM ve glukoz içermeyen DMEM'deki keton cisimleri (10 ve 20 mM asetoasetat, 10 ve 20 mM β -hidroksibütirat) ile muamele edildi. Uygulamalardan 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerdeki canlılık değişimleri belirlendi.

6.1. Hemositometrik Hücre Sayımı

Farklı deney koşullarındaki hücrelerde canlılık değişimleri hemositometrik hücre sayımı ile incelendi (Şekil 6.1 – Şekil 6.4). Her grubun hücre sayıları DMEM grubundaki hücrelerin sayısına oranlandı ve hücre canlılığı sonuçları % olarak ifade edildi.

İnsan fibroblast hücrelerinde 24 saatin sonunda kontrol olarak kullanılan DMEM (glukozlu) ortamına kıyasla glukozsuz DMEM ortamındaki canlılığın anlamlı bir şekilde azalmış olduğu gözlemlendi. Glukozsuz DMEM ortamına eklenen 10 ve 20 mM’lık konsantrasyonlardaki keton cisim ortamlarındaki hücre canlılığında ise artış olduğu gözlemlendi. 48 saatlik ve 72 saatlik keton cisim maruziyetleri göz önüne alındığında ise kontrol ortamıyla keton cisim ortamları arasında farklılıklar olduğu gözlemlendi. Keton cisimlerinin 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra canlılıkta daha az miktarlarda arttırdığı gözlemlendi. Bu durumun nedenin anlaşılması için ek deneylerin yapılmasını gerekmektedir (Şekil 6.1).

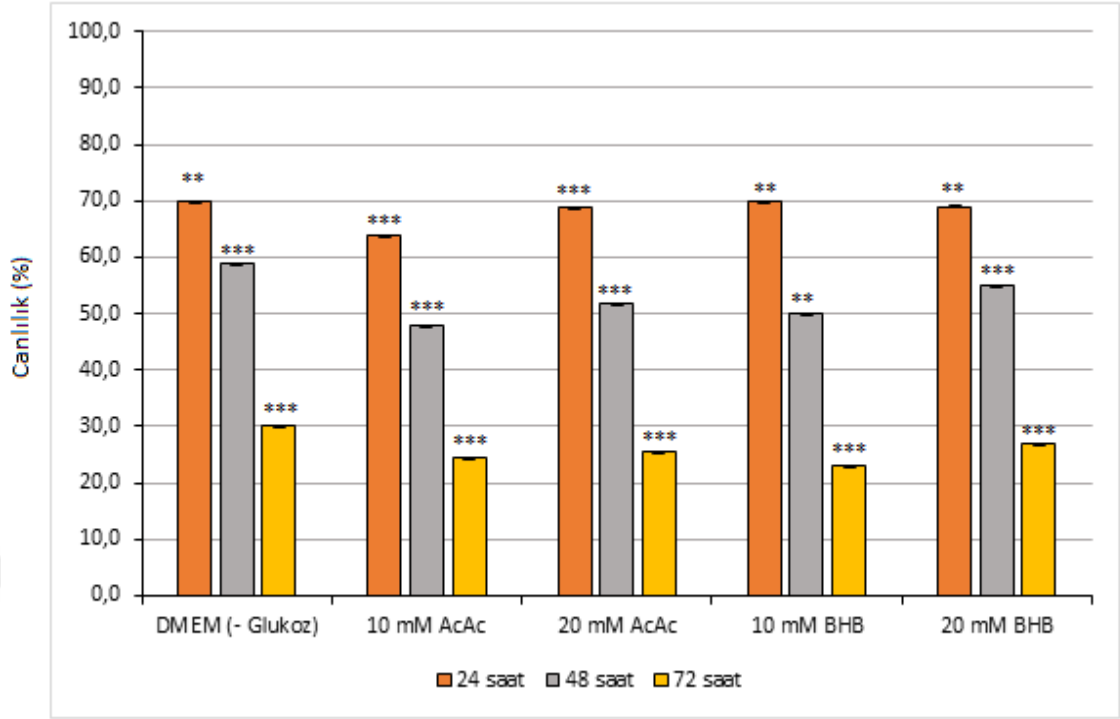
Meme kanseri hücre hatları olan MCF 7, MDA MB 231 ve MDA MB 435 hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saatlik maruziyette ise kontrol ortamına kıyasla glukozsuz ortamda canlılıkta anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir. 10 ve 20 mM’lık konsantrasyonlardaki keton cisim takviyeleri canlılıktaki azalmayı tersine çevirememiştir. Bu durumun kanser hücre hatlarının glikolitik yola bağımlı oluşlarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. (Şekil 6.2 – Şekil 6.4).



Şekil 6.1. İnsan fibroblast hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

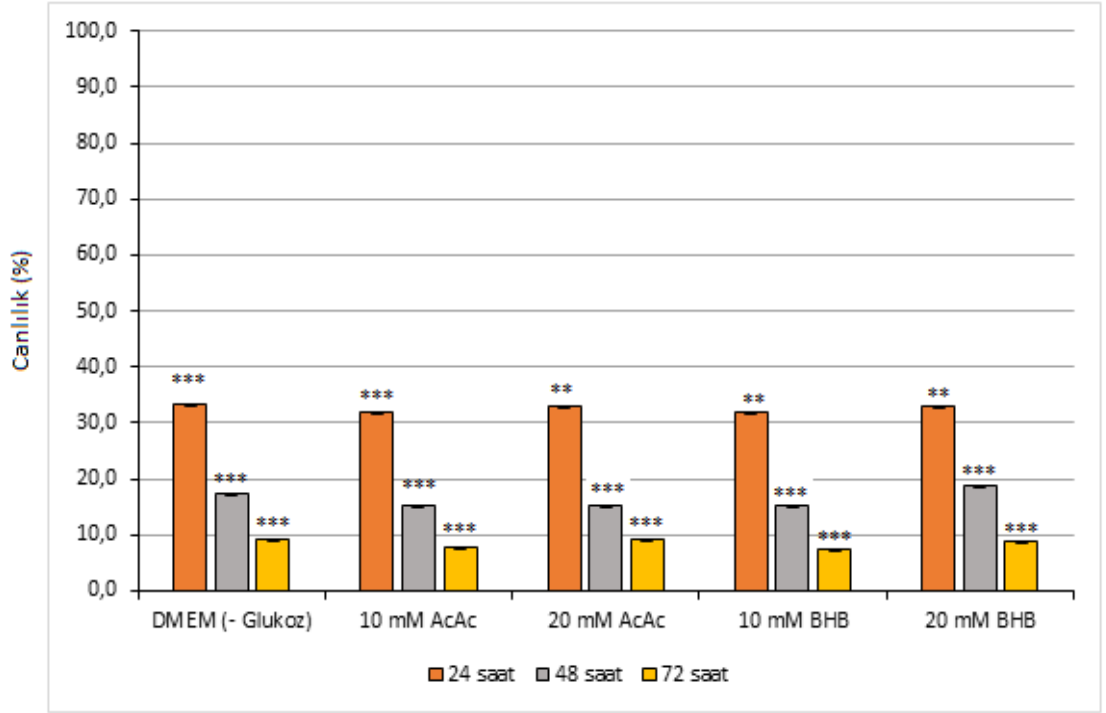
DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Şekil 6.2. MCF 7 hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları.

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

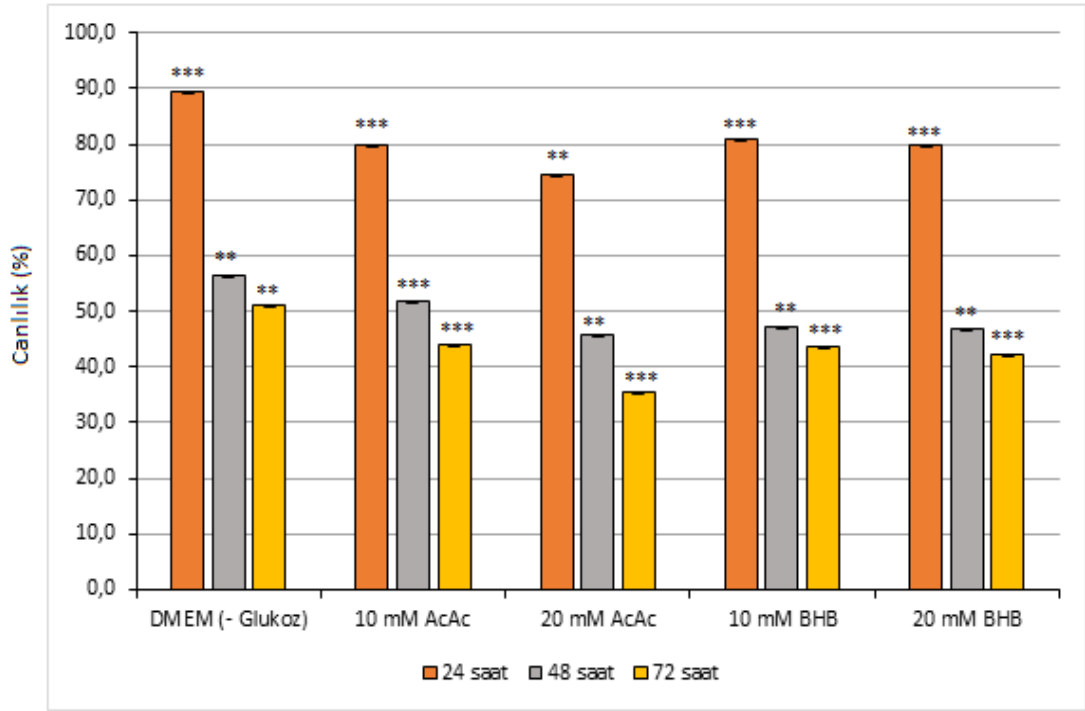
DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Şekil 6.3. MDA MB 231 hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Şekil 6.4. MDA MB 435 hücrelerinde hemositometrik hücre sayımı sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

6.2. Hücre Canlılığının MTT Testi ile İncelenmesi

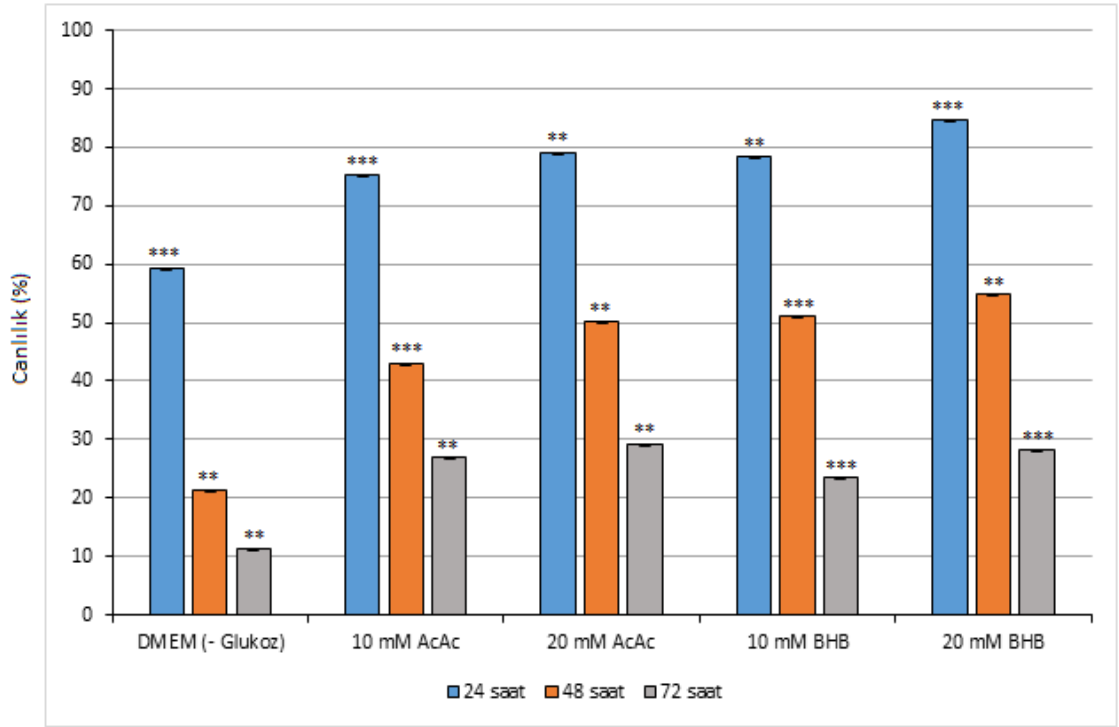
Farklı deney koşullarındaki hücrelerde canlılık değişimleri MTT testi ile incelendi (Şekil 6.5 – Şekil 6.8). Her grubun hücre sayıları DMEM grubundaki hücrelerin sayısına oranlandı ve hücre canlılığı sonuçları % olarak ifade edildi.

İnsan fibroblast hücreleri farklı deney koşullarına maruz bırakıldığında 24 saatin sonunda kontrol olarak kullanılan DMEM (glukozlu) ortamına kıyasla glukozsuz DMEM ortamındaki canlılığın anlamlı bir şekilde azalmış olduğu gözlemlendi. Glukozsuz DMEM ortamına eklenen 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlardaki keton cisim ortamlarındaki hücre canlılığında artış olduğu gözlemlendi. Bu durumla beraber normal hücre hatlarında, glukozun men edildiği durumlarda keton cisimlerinin enerji olarak kullanıldığı hipotezini desteklemeye çalıştık. Sağlıklı hücre hattı olan fibroblast hücre hattında, keton cisimleri SCOT enzimi aracılığıyla enerji substratı olan asetil-KoA'ya dönüşmektedir. Bu şekilde fibroblast hücre hattı glukoz eksikliğinde ortamda keton cisimleri varsa bunları enerji substratı haline dönüştürebilir. Ama 48 saatlik ve 72 saatlik keton cisim maruziyetleri göz önüne alındığında kontrol ortamıyla keton cisim ortamları arasında farklılıklar olduğu gözlemlendi. Keton cisimlerinin 48 ve 72 saatlik maruziyetinden sonra canlılıktaki artış daha az seviyede gerçekleşti. Bu durumun nedenin anlaşılması için ek deneylerin yapılmasını gerekmektedir (Şekil 6.5).

Meme kanseri hücre hattı olan MCF 7 hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saatlik maruziyette ise kontrol ortamına kıyasla glukozsuz ortamda canlılıkta anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir. Ama 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlardaki keton cisim takviyeleri canlılıktaki azalmayı tersine çevirememiştir. Bu durumun kanser hücre katlarında SCOT enziminin eksikliğinden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Yani, kanser hücre hatları SCOT enzimi ekspresyonundaki eksiklik ya da az oluşundan kaynaklı olarak keton cisimlerini enerji olarak kullanamaz. Bu durumda glukozun eksikliğiyle beraber kanser hücrelerinin canlılığında azalma beklenmektedir. Bu da kanser hücre hatlarının glikolitik yola bağımlı oluşlarından kaynaklanmaktadır (Şekil 6.6).

Meme kanseri hücre hattı olan MDA MB 231 hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saatlik maruziyette ise kontrol ortamına kıyasla glukozsuz ortamda canlılıkta anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir. Ama 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlardaki keton cisim takviyeleri canlılıktaki azalmayı tersine çevirememiştir. Bu durumun kanser hücre katlarında SCOT enziminin eksikliğinden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Yani, kanser hücre hatları SCOT enzimi ekspresyonundaki eksiklik ya da az oluşundan kaynaklı olarak keton cisimlerini enerji olarak kullanamaz. Bu durumda glukozun eksikliğiyle beraber kanser hücrelerinin canlılığında azalma beklenmektedir. Bu da kanser hücre hatlarının glikolitik yola bağımlı oluşlarından kaynaklanmaktadır (Şekil 6.7.).

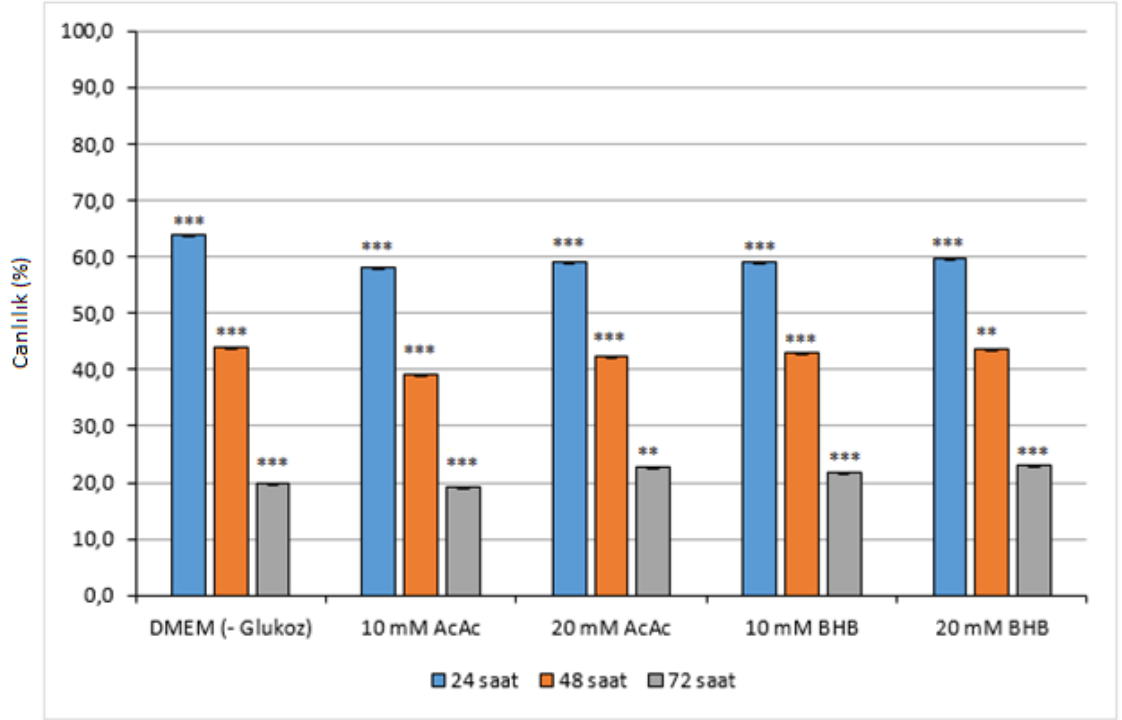
Meme kanseri hücre hattı olan MDA MB 435 hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saatlik maruziyette ise kontrol ortamına kıyasla glukozsuz ortamda canlılıkta anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir. Ama 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlardaki keton cisim takviyeleri canlılıktaki azalmayı tersine çevirememiştir. Bu durumun kanser hücre katlarında SCOT enziminin eksikliğinden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Yani, kanser hücre hatları SCOT enzimi ekspresyonundaki eksiklik ya da az oluşundan kaynaklı olarak keton cisimlerini enerji olarak kullanamaz. Bu durumda glukozun eksikliğiyle beraber kanser hücrelerinin canlılığında azalma beklenmektedir. Bu da kanser hücre hatlarının glikolitik yola bağımlı oluşlarından kaynaklanmaktadır. MDA MB 435 hücreleri hem MCF 7 hücrelerine hem de MDA MB 231 hücrelerine kıyasla glukozu daha az bağımlı olduğu gözlemlendi. 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetlerde ortamdaki glukozun çekilmesi bu hücrelerinin canlılıklarında diğer iki meme kanseri hücrelerine göre daha az azalma meydana getirmiştir. Bu durumun anlaşılması için üç meme kanseri hücrelerinde daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir (Şekil 6.8.).



Şekil 6.5. İnsan fibroblast hücreleri MTT testi sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

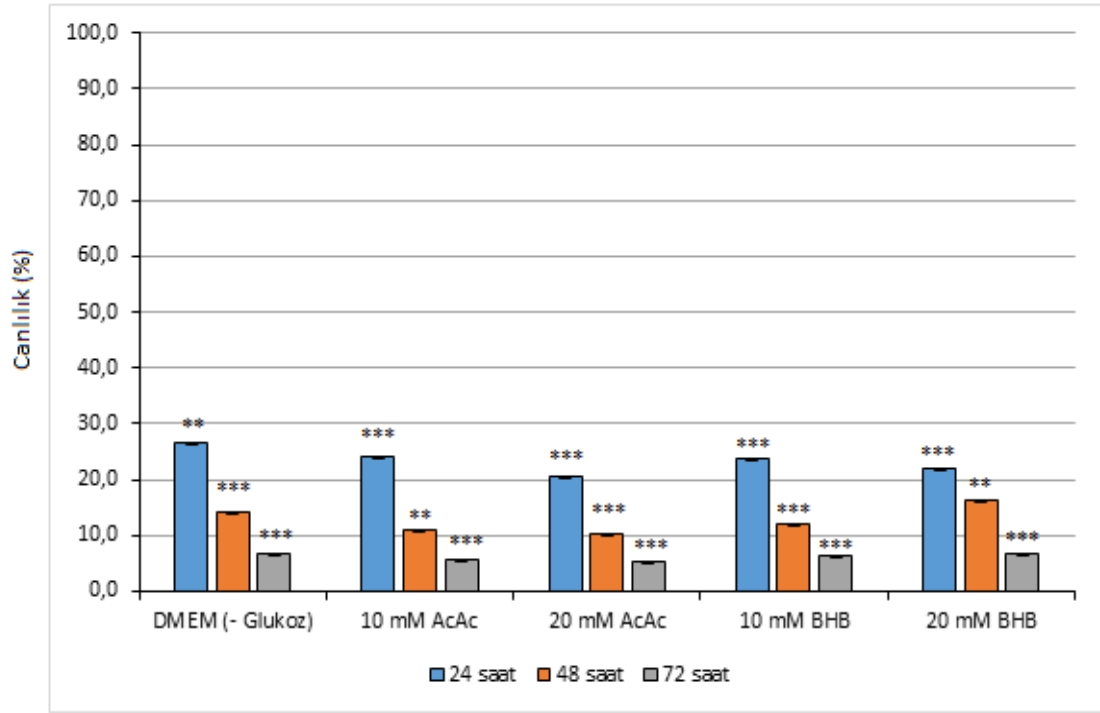
DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Şekil 6.6. MCF 7 hücreleri MTT testi sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

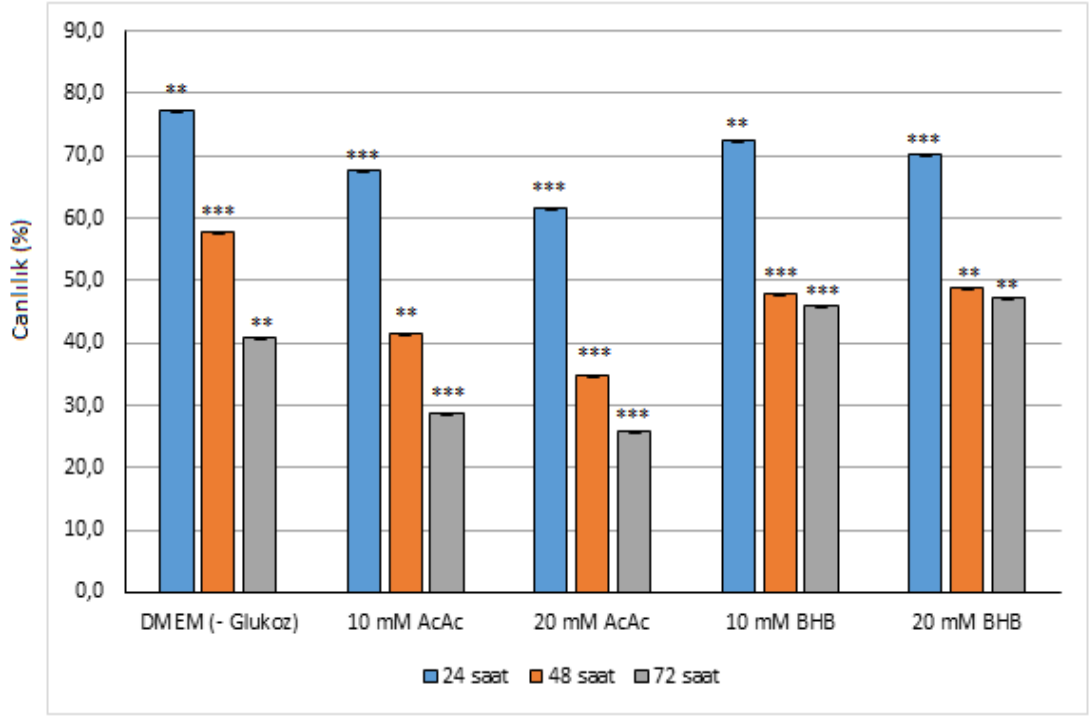
DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Şekil 6.7. MDA MB 231 hücreleri MTT testi sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Şekil 6.8. MDA MB 435 hücreleri MTT testi sonuçları

Sonuçlar DMEM grubunun değerlerine oranlanarak % canlılık değerleri şeklinde verilmiştir.

DMEM grubuyla karşılaştırıldığında: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

6.3. Hücre Hatlarının Morfolojik İncelenmesi

Farklı deney koşullarındaki hücrelerde morfolojik değişimler ışık mikroskopu ile incelendi (Şekil 6.9 – Şekil 6.12). Her gruptaki değişimler DMEM grubundaki hücrelerle kıyaslanarak incelendi.

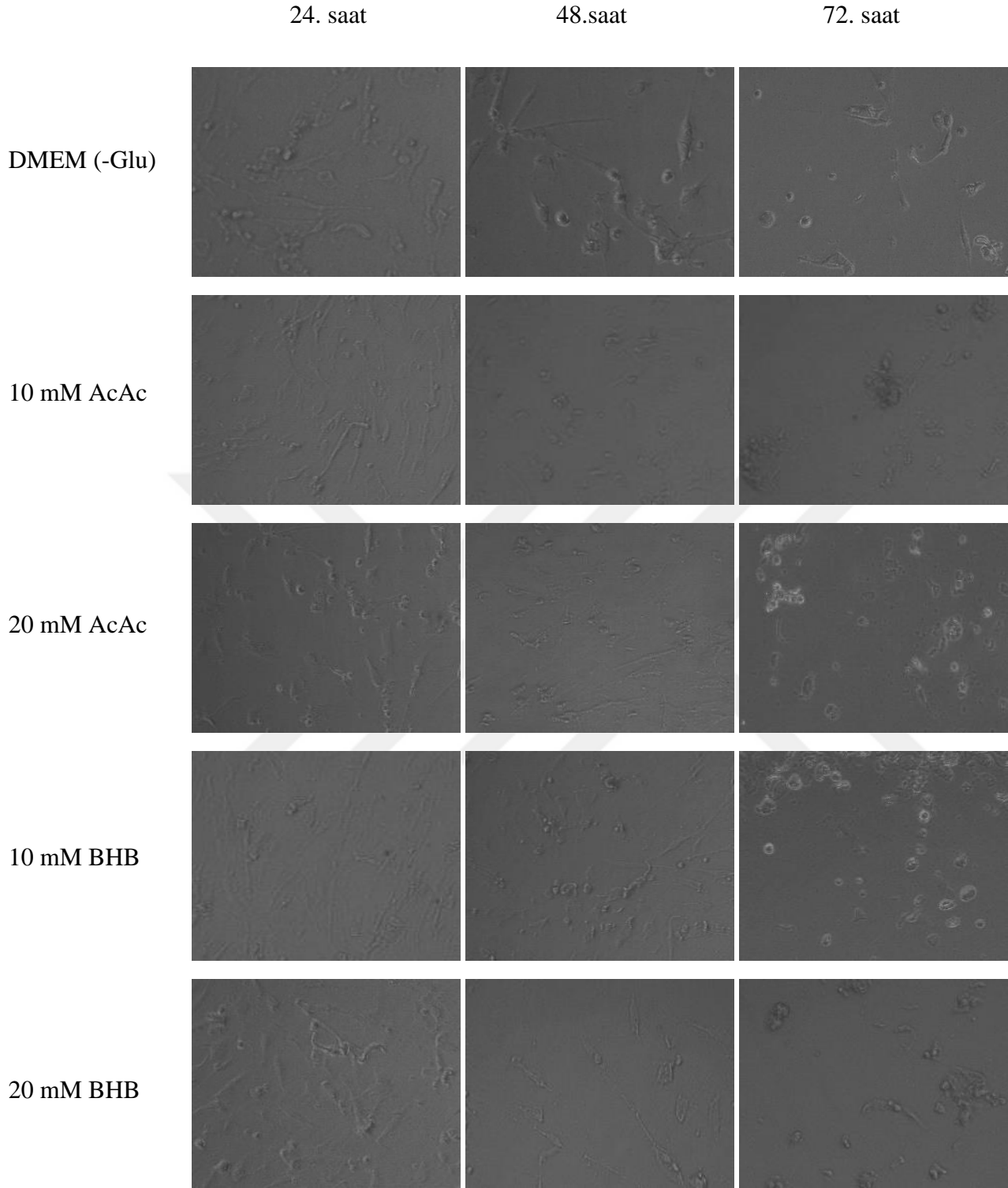
Fibroblast hücre hattı hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol hücreleri, kültür plakaları boyunca düzenli bir yayılım/büyüme göstermişlerdir. 24 saatlik tedaviden kontrol hücrelerine kıyasla hücre morfolojisinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. 48 saatlik tedaviden sonra, hücreler arası boşlukların artmasıyla birlikte, hücre boyutlarında azalma ve hücrelerin daha dairesel forma dönüştüğü görülmüştür. 72 saatlik tedaviden sonra ise, hücreler arası boşluklar artmaya devam etti ve morfolojide belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Yüzen hücre sayısında artış görülmüştür (Şekil 6.9).

MCF 7 hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol hücreleri, kültür plakaları boyunca düzenli bir yayılım/büyüme göstermişlerdir. 24 saatlik tedaviden sonra hücrelerde, hücreler arası boşlukların artmasıyla birlikte, hücre boyutlarında azalma ve hücrelerin daha dairesel forma dönüştüğü görülmüştür. 48 saatlik tedaviden sonra, hücreler arası arttığı ve hücre sayısında daha belirgin azalış görülmüştür. 72 saatlik tedaviden sonra ise, hücreler arası boşluklar artmaya devam etti ve morfolojide belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Yüzen hücre sayısında artış görülmüştür (Şekil 6.10).

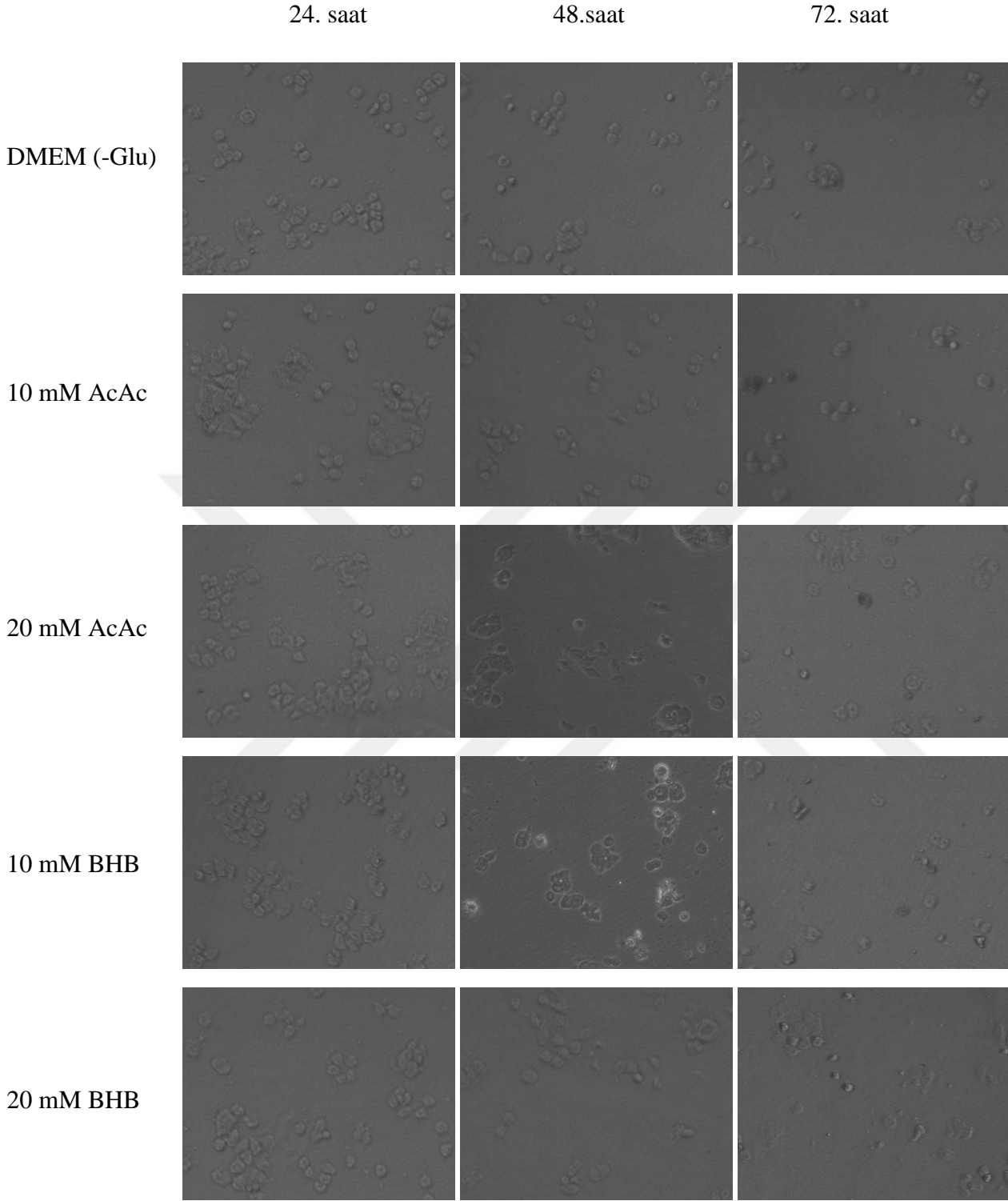
MDA MB 231 hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol hücreleri, kültür plakaları boyunca düzenli bir yayılım/büyüme göstermişlerdir. 24 saatlik tedaviden sonra hücrelerde, hücreler arası boşlukların artmasıyla birlikte, hücre boyutlarında azalma ve hücrelerin daha dairesel forma dönüştüğü görülmüştür. 48 saatlik tedaviden sonra, hücreler arası boşluklar arttığı ve hücre sayısında daha belirgin azalış görülmüştür. 72 saatlik tedaviden sonra ise, hücreler arası boşluklar artmaya devam etti ve morfolojide belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Yüzen hücre sayısında artış görülmüştür (Şekil 6.11).

MDA MB 435 hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol hücreleri, kültür plakaları boyunca düzenli bir yayılım/büyüme göstermişlerdir. 24 saatlik tedaviden sonra hücrelerde, hücreler arası boşlukların artmasıyla birlikte, hücre boyutlarında azalma ve hücrelerin daha dairesel forma dönüştüğü görülmüştür. 48 saatlik tedaviden sonra, hücreler arası boşluklar arttığı ve hücre sayısında daha belirgin azalış görülmüştür. 72 saatlik tedaviden sonra ise, hücreler arası boşluklar artmaya devam etti ve morfolojide belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Yüzen hücre sayısında artış görülmüştür (Şekil 6.12).

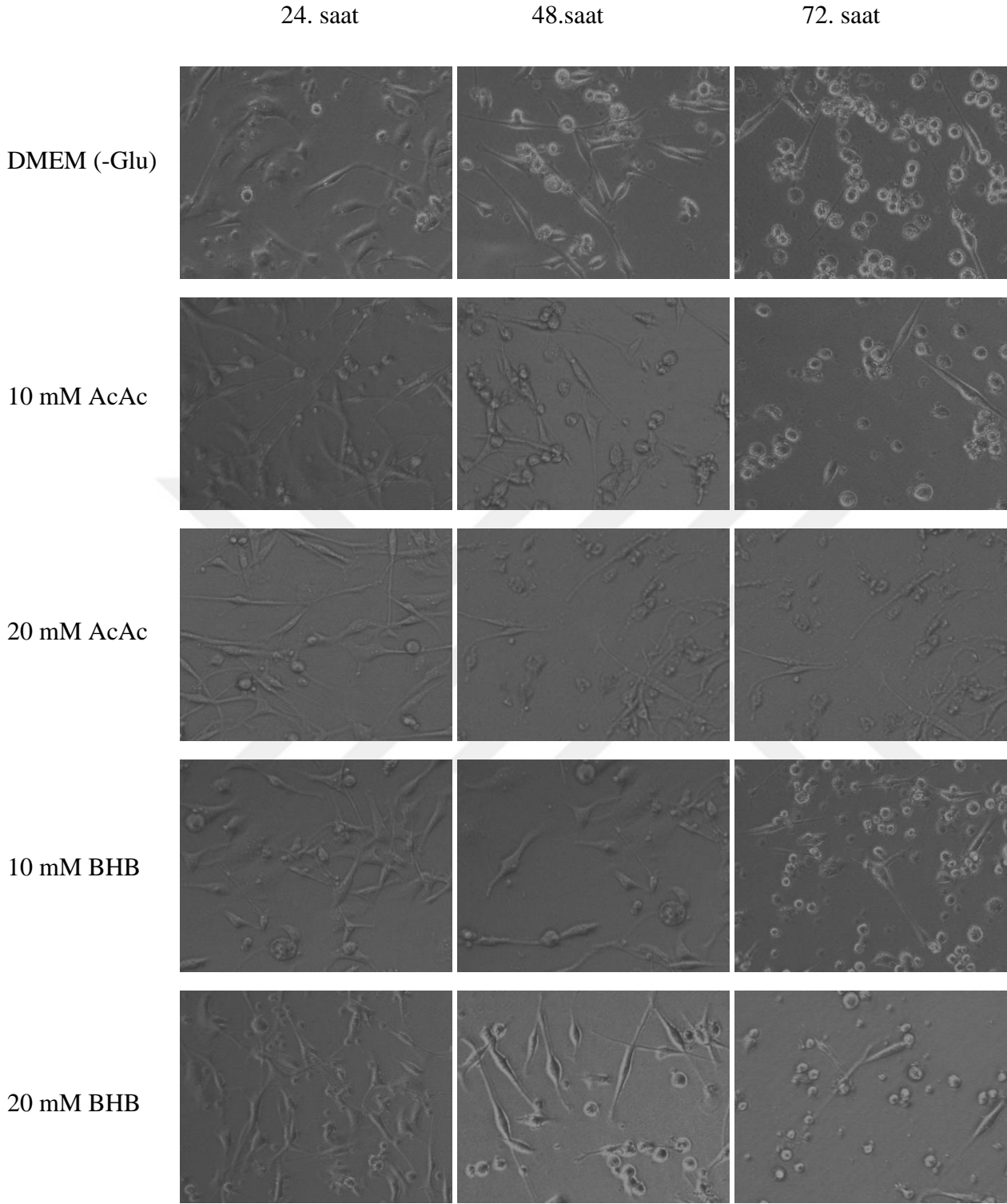




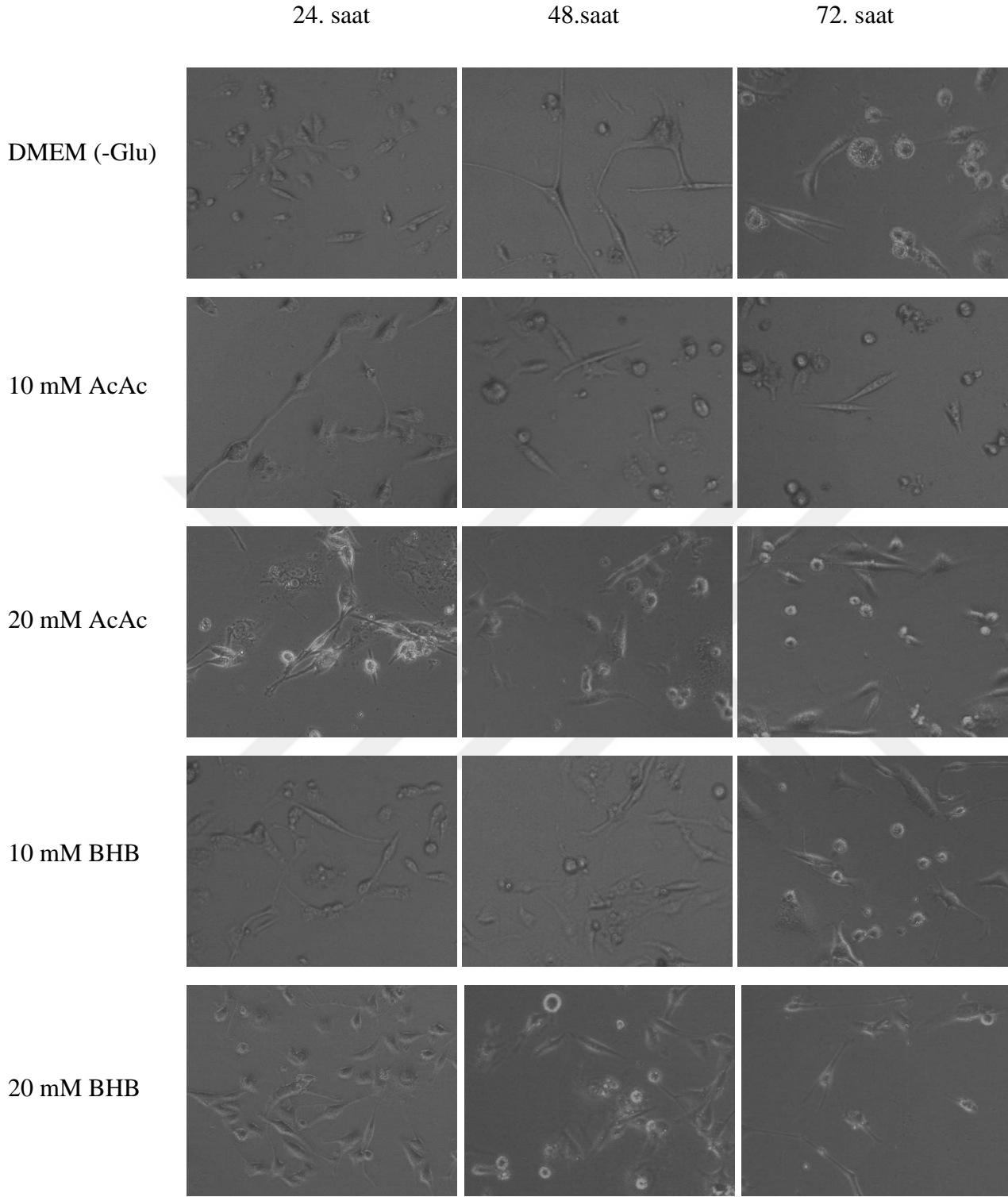
Şekil 6.9 Farklı koşullar altındaki insan fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (10x büyütme).



Şekil 6.10. Farklı koşullar altındaki MCF 7 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri (10x büyütme).



Şekil 6.11. Farklı koşullar altındaki MDA MB 231 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (10x büyütme).



Şekil 6.12. Farklı koşullar altındaki MDA MB 435 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (10x büyütme).

Sonuç olarak canlılık analizleri hem hemositometrik hücre sayımıyla hem de MTT testi ile yapıldı. İki ayrı canlılık tayininde de benzer sonuçlar elde edildi. Bu yöntemler bize normal hücre hattı olan fibroblast hücre hattında glukozlu, glukozsuz ve keton cisim kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkileri hakkında bilgi verdi. Esas olarak incelemek istediğimiz üç meme kanseri hücre hattında da aynı koşullarda (glukozlu, glukozsuz ve keton cisim içeren ortamlar) hücre canlılığını inceledik. Buradan yola çıkarak kontrol hücre hattı olarak kullandığımız fibroblast hücreleri ile meme kanseri hücreleri arasında ilişki araştırdık. Canlılık testleri dışında hücrelerin farklı koşullar altında büyütülmesi sonrası morfolojik değişimlerini değerlendirdik.



7. TARTIŞMA

Sağlıklı hücrelerde metabolik aktiviteler için gerekli enerji öncelikle mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ile karşılanır. Bu yolla glikolizden daha fazla ATP üretilmektedir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinin metabolik özelliklerinden biri kandan glukoz alarak aerobik glikoliz için kullanmaktır. Kanser hücrelerinde enerji üretimi için kullanılan bu verimsiz yol ilk kez 1920'lerde Alman bilim adamı Otto Warburg tarafından tanımlanmıştır ve Warburg etkisi olarak bilinmektedir (Zheng, 2012).

Ketojenik diyetin kanser hücrelerindeki rolünü araştıran çalışmamızda, glukoz açısından kısıtlanmış olan ketojenik diyet ile bir yandan kanser hücrelerinin enerjiden yoksun bırakılarak ölmesi sağlanırken aynı zamanda diğer hücrelerin canlılıklarını devam ettirmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, hücre kültürü çalışmalarımızda ketojenik diyeti temsilen keton cisimlerini kullandık. Sağlıklı fibroblast hücreleri ile farklı özellikteki meme kanseri hücre hatlarında asetoasetat ile β -hidroksibütiratın canlılık üzerine etkilerini inceledik.

Kontrol olarak kullandığımız glukozlu ortama kıyasla glukozsuz ve keton cismi uygulanan ortamlardaki canlılık değişimlerini gözledik. Canlılık değişimleri için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerini kullandık. İlk olarak insan fibroblast hücrelerine uygulanan keton cisim maruziyetinde 24 saatin sonunda elde ettiğimiz veriler başlangıçta kurulan hipotezi destekler nitelikteydi. Ancak 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucunda keton cismi içeren ortamlara maruz bırakılan fibroblast hücrelerinin canlılıklarında azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlarla, ketojenik diyetin kanser hücrelerinde enerji yoksunluğuna yol açıp normal hücrelerde enerji substratı oluşturması sebebiyle kanser tedavisinde yeni terapötik yöntemler oluşturması ile ilgili olarak gerekli verileri elde edemedik. Fibroblast hücre hattı ve keton cisim ilişkisi üzerine daha verimli sonuçlar elde etmek için daha farklı deneyler yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Üç farklı meme kanseri hücre hattını incelediğimizde ise bunların glukoz ve keton cismi içeren ortamlara verdikleri tepkiler birbirinde farklıydı. MCF 7 hücrelerine odaklandığımızda, kontrol olarak kullandığımız glukozlu DMEM ortamına kıyasla glukozsuz ortamda büyütülen hücrelerin canlılığında azalma meydana gelmiştir. Glukozsuz ortama keton cismi eklendiğinde ise hücre canlılığında değişim oluşmayıp azalma devam etmiştir. Yani, MCF 7 hücreleri keton cisimlerinin enerji substratı olarak kullanamamışlardır. MDA MB 231 hücrelerinin benzer ortamlara verdikleri tepkileri incelediğimizde ise MCF 7 hücrelerine kıyasla glukozsuz ortamdaki canlılıklarının daha fazla azalma gösterdiklerini ve bu nedenle glukoz daha fazla bağımlı olduklarını gözledik. Yine glukozsuz ortama keton cisimleri eklendiğinde canlılıklarındaki azalmaların devam ettiğini gözledik. MDA MB 435 hücrelerinde ise, uygulanan deney koşulları neticesinde glukozsuz ortamda canlılıklarının azaldığını ve keton cisimlerinin eklenmesinin durumu değiştirmeyip azalmanın devam ettiği sonucunu elde ettik. Ama MDA MB 435 hücrelerinin glukoz verdiği tepkiyi diğer meme kanseri hücre hatlarıyla kıyasladığımızda hem MCF hücrelerine hem de MDA MB 231 hücrelerine oranla glukoz daha az bağımlı olduklarını gösterdik. Bu durumun üç meme kanseri hattının da farklı alt tiplere sahip olması sebebiyle gerçekleşebileceği düşüncesinde olsak da henüz yeterli verilere sahip değiliz. Meme kanseri hücre hatlarında elde ettiğimiz sonuçlar Warburg etkisini destekler nitelikteydi. Buradan yola çıkarak çalışmamızın hem ketojenik diyet mekanizmasına yönelmeye ve mekanizmasının anlaşılmasına yönelik altyapı oluşturması adına hem de üç ayrı meme kanserinin moleküler mekanizmasının anlaşılması için daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

Benzer şekilde, Skinner ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, keton cisimlerinin insan nöroblastoma hücrelerine uygulanmasıyla beraber canlılıklarında önemli bir azalış olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca keton cisimlerinin kontrollere kıyasla nöroblastoma hücrelerinde apoptozda önemli bir artış olduğunu göstermişlerdir. Bu veriler, sinir kökenli nöroblastoma hücrelerinin keton cisimlerini enerji kaynağı olarak kullanma kabiliyetine sahip olmadığı hipotezini desteklemektedir.

Poff ve ark. (2014) çalışmalarında, önemli keton cisimlerinden biri olan asetoasetat (AcAc) eklentisinin, yedi agresif insan kolon ve meme kanseri hücre hattında proliferasyon ve ATP üretimini inhibe ettiği, ancak sağlıklı primer fibroblastlarda proliferasyonu etkilemediğini gözlemişlerdir. Benzer şekilde β HB, 20 mM'ye kadar doza bağımlı bir şekilde transforme lenfoblastların, HeLa hücrelerinin ve melanoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken, β HB ve AcAc takviyesi nöroblastoma hücrelerinde canlılığı azalttığı ve apoptozu arttırdığı, ancak fibroblastlar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Shukla ve ark. (2014) hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yürüttükleri çalışmalarında, keton cisimlerinin ve ketojenik diyetin pankreatik kanser kaşeksisi üzerine etkisini incelemişlerdir. Keton cisimleriyle tedavi sonrasında tümör hücrelerinde azaltılmış glikolitik akı gözlemişlerdir. Ayrıca keton cisim takviyesi apoptozu indüklerken, glutamin alımını, toplam ATP içeriğini ve çoklu pankreatik kanser hücre hatlarında hayatta kalmayı da azaltmıştır. Pankreas kanseri hücrelerinde keton cisimlerine bağlı intraselüler metabolomik yeniden programlama, hücre hattı modellerinde kaşeksinin önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Fare ortotopik zenograft modellerinde ise ketojenik diyetin tümör büyümesinde ve kaşeksizde azalma gözlemişlerdir.

Fine ve ark. (2009)'larının yedi agresif kanser hücre hattı ve üç fibroblast (kontrol) hattında yaptıkları çalışmada, keton cisimlerinin agresif kanserlerde hücre büyümesini inhibe edebileceğini ve bu duruma uncoupling protein 2'nin ekspresyonunun katkıda bulunan bir faktör olduğunu incelemişlerdir. Keton cisimlerinin, bu tür kanserlerde metabolize edilmesi durumunda, telafi edici mitokondriyal solunum yolu ATP üretimi olmaksızın glikolizi ve sonuçta meydana gelen ATP üretimini inhibe edebildiğini, böylece hücre çoğalmasını inhibe edebileceğini önermişlerdir. Sonuç olarak, agresif kanser hücre hatlarında ATP konsantrasyonu ve hücre büyümesinde paralel azalmalar olduğunu (CaCO₂ ve SW48 hatlarında bulunan inhibisyon en fazlayken, MCF7'deki inhibisyon en azdır) bulunmuştur.

Branco ve ark. (2016) yayınladıkları çalışmada, normal hücrelerde glikoliz yoluyla oluşan pirüvatın, mitokondriyal oksidatif metabolizma için TCA siklusuna yönlendirilirken, kanser hücrelerinde ise çoğunlukla laktik asit fermantasyon yolunda pirüvat kullanıldığını ifade etmişlerdir. Bu durumun kanser hücrelerine çeşitli avantajlar sağladığını ve bunlardan birinin de kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla yüksek seviyeli oksidatif stres olduğundan bu durumun onlara hem hayatta kalma avantajı sağladığını hem de onları ROS aracılı apoptotik uyarılara karşı daha duyarlı hale getirdiğini belirtmişlerdir.

Aynı zamanda ketojenik diyetin, tümör hücrelerinde glukoz metabolizması ve glukozla ilgili sinyalleme hedef aldığını ve normalde PI3K / Akt / mTOR yolağının aktivasyonu, artmış heksokinaz II (HKII) aktivitesi ve glukoz taşıyıcılarının membran translokasyonu ve upregülasyonu yoluyla glukoz uptake'ini arttırdığını belirtmişlerdir. Ama dolaşımdaki glukoz düzeylerinde azalma, enerji üretimi ve makromoleküler biyosentezi tehlikeye düşürdüğünden dolayı, kan insülin / IGF-1 seviyelerindeki azalma, PI3K / Akt / mTOR yolağı ile sinyalleşmeyi azaltarak, glikolitik metabolizma ve makromoleküler biyosentezi bozduğunu belirtmişlerdir. Normal hücrelerin aksine, tümör hücreleri keton cisimlerini metabolize etmek için etkili bir şekilde adapte olamadığından, kanser hücrelerinin büyüme, proliferasyon, enerji üretimi ve dönüşümü için glukozun bulunabilirliğine oldukça bağımlı olduğunu belirtmişlerdir. Maurer ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, rat hipokampal nöronlarda ve beş glioma hücre hattı üzerinde keton cismi olan 3-hidroksibütiratın etkinliğini incelemişlerdir. Ayrıca *in vivo* olarak ortotopik xenograft glioma fare modellerinde kalorisi kısıtlanmış ketojenik diyetin etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak, karbonhidrat yönünden kısıtlanmış ketojenik diyet altında tümör hücrelerinin normal hücrelere kıyasla dezavantaja sahip olduklarını bulmuşlardır. Keton cisim metabolize edici enzimler 3-hidroksibütirat dehidrogenaz 1 ve 2 (BDH1 ve 2), 3-oksoasit-KoA transferaz 1 (OXCT1) ve asetil-KoA asetiltransferaz 1 (ACAT1) glioma hücre hatlarında protein seviyeleri ve mRNA'da eksprese edilirken glioma hücrelerinde HIF1-a yolunda aktivasyon görmemişlerdir. Bu da 3-HB ve süksinatın sonraki akümüülasyonunun varlığı ile tutarlıdır. *In vivo* çalışmada ise ketojenik diyet, kan 3-HB seviyesinde güçlü artışa yol açtı.

Aksine, Martinez-Outschoorn ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, katabolik fibroblastların, insan kanser hücrelerinin anabolik büyümesini ve bunların metastaz yayılımını teşvik etmek için mitokondriyal yakıtlar (keton cisimleri gibi) üretimini önerdiler. Bu yeni paradigmayı "iki bölmeli tümör metabolizması" olarak adlandırdılar. Keton cisim üretimini artıran hız sınırlayıcı enzimleri, yani BDH1 ve HMGCS2'yi aşırı eksprese eden hTERT ölümsüzleştirilmiş fibroblastlar ürettiler. Benzer şekilde, keton cisimlerinin yeniden kullanılmasına izin veren anahtar enzimler OXCT1 / 2 ve ACAT1 / 2 eksprese eden MDAMB231 insan meme kanseri hücreleri ürettiler. İlginç bir şekilde, sonuçları doğrudan ketojenik fibroblastların katabolik olduğunu ve caveolin-1 (Cav-1) protein ekspresyonunda bir kayıp ile otofajiye uğradığını gösterdiler. Ayrıca, ketojenik fibroblastlar, meme kanseri hücrelerinin mitokondriyal kütlesi ve büyümesini arttırdığını belirttiler. Bununla birlikte, ketojenik fibroblastlar, tümör anjiyogenezinde belirgin bir artış olmaksızın etkili bir şekilde tümör büyümesini teşvik ettiğini belirttiler. Kısaca, keton cisimlerin, onko-metabolitler olarak davrandığını ve doğrudan HMGCS2, ACAT1 / 2 ve OXCT1 / 2 enzimlerinin metabolik onkogenler olduğunu göstermişlerdir.

Martinez-Outschoorn ve ark., yaptığı bu çalışma bugüne kadar ketojenik diyetle yapılan hücre kültürü çalışmalarına farklı bir bakış açısı getirmiştir. Ama bu çalışma henüz yeni ve tek olduğu için ilerleyen zamanlarda hem ko-kültür çalışmalarının artması hem de ketojenik diyet mekanizmasının aydınlatılmasını ümit etmekteyiz.

Martuscello ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada glioblastoma (GB) üzerinde kısıtlayıcı bir ketojenik diyet (KD) kullanarak hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak araştırmışlardır. KD'i hem lezzet açısından güçlendirmek için yüksek yağlı düşük karbonhidratlı (sHFLC) bir diyet geliştirmişler. Bu diyeti KD'in metabolik ve anti-tümör etkilerini taklit etmesine göre programlamışlardır. Çoklu hastadan türeyen gliomasfer çizgiler kullanılarak, *in vitro* ve *in vivo* test etmişlerdir. Hücresel çoğalma, klonojenik frekans ve tümör kök hücre popülasyonu etkileri *in vitro* olarak nörosfer testi (NSA) kullanılarak belirlemişlerdir. Anti-tümör etkinliği, preklinik ksenograft modellerinde *in vivo* olarak test ettiler ve mTOR yolu ile mekanik düzenlenmesini araştırdılar.

Sonuç olarak keton takviyesiyle birleştirilen, *in vitro* glukozun fizyolojik seviyelere indirgenmesi GB hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini ve tümör kök hücre genişlemesini azalttığını belirtmişlerdir. *In vivo* olarak, sHFLC diyeti, tümör progresyonunun subkutan bir modelinde tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde azalttığını ve bir ortotopik ksenograft modelinde sağ kalımı arttırdığını gözlemlemişlerdir. Böylece sHFLC diyetinin KD için uygun bir tedavi seçeneği olduğunu ve klinik test için düşünülmesi gerektiğini göstermişlerdir.

Noh ve ark. (2006), fare hipokampal hücre hattında (HT22) ve sıçan primer hipokampal nöronlarda keton cisimlerinin [asetoasetat (AcAc) ve β -hidroksibütirat (β HB)] rolünü araştırmışlardır. Sonuç olarak, 5 mM lityum AA ve 4 mM Na β HB ile ön muamelenin HT22 hipokampal hücre hattını ve primer hipokampal nöronal kültürünü 5 mM glutamat toksisitesine karşı koruduğunu bulmuşlardır. HT22 hücreleri glutamata 2 ve 8 saat maruz kaldıklarında 5 mM AA ile ön muamele geçirmeleri ROS üretimini azalttığını ve erken apoptoza yol açtığını gözlemlemişlerdir.

Magge ve ark. (1979), keton cisimlerinin, transformasyona uğramış lenfoblastların (Raji hücreleri) büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, 20 mM'ye kadar D- β -hidroksibütiratın hücre büyümesini engellediğini ve bu etkinin geri dönüşümlü olmadığını belirtmişlerdir. Toplam glukoz kullanımı ve toplam laktat üretimi, hücre proliferasyonunun inhibisyonuyla orantılı olarak azaltılmıştır. Dahası, *in vivo* diyetle indüklenen ketozisin, C57BL/6 farelerin akciğerlerinde B16 melanoma kitlelerinin sayısının üçte ikisini azalttığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçların kanser kaşeksisinin klinik tedavisindeki önemi tartışılmıştır. Bu çalışma, bizim bulduğumuz sonuçlara benzer şekilde keton cisimlerinin kanser hücrelerinde kullanılmadığını göstermiştir. Buradan yola çıkarak, çalışmamızın ketojenik diyet mekanizmasının anlaşılmasına yönelik altyapı oluşturması ve üç ayrı meme kanserinin moleküler mekanizmasının anlaşılması için daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

8. KAYNAKLAR

1. Abdelwahab MG, Fenton KE, Preul MC et al. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. *PloS One*. 2012;7(5).
2. Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE et al. Mitochondrial O_2^- and H_2O_2 mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(6):4254–4263.
3. Allen BG, Bhatia SK, Anderson CM et al. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: history and potential mechanism. *Redox Biol*. 2014;2C:963-70.
4. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell Biology*. 1988;4:289–333.
5. Auvin S. Should we routinely use modified Atkins diet instead of regular ketogenic diet to treat children with epilepsy? *Seizure*. 2012;21:237–40.
6. Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. Increased levels of superoxide and H_2O_2 mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J*. 2009;418:29-37.
7. Barford D, Hu SH, Johnson LN. Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J Mol Biol*. 1991;218(1):233–260.
8. Bender DA. Energy Nutrition. *The Metabolism of Carbohydrates and Fats. Introduction to Nutrition and Metabolism*. Boca Raton, FL, USA:CRC Press. 2014;115–163.
9. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 2006;126(1):107–120.
10. Boros LG, Lee PW, Brandes JL et al. Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: Is cancer a disease of cellular glucose metabolism?. *Medical Hypotheses*. 1998;50(1);55–59.
11. Branco AF, Ferreira A, Simões RF et al. Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(3):285-98.
12. Brault, C and Schulze A. The Role of Glucose and Lipid Metabolism in Growth and Survival of Cancer Cells. *Recent Results Cancer Res*. 2016;207:1-22.

13. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2011;11(4):341–346.
14. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85–95.
15. Carey LA, Cheang MCU, Perou CM. Chapter 29: Genomics, Prognosis, and Therapeutic Interventions, in Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the Breast*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
16. Chriett S, Pirola L. Essential roles of four-carbon backbone chemicals in the control of metabolism. *World J Biol Chem*. 2015;6:223–30.
17. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N et al. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*. 2008;452:181–186
18. Clark SE, Warwick J, Carpenter R et al. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *Br J Cancer*. 2011;104(1):120-7.
19. Clarke RB, Howell A, Anderson E. Estrogen sensitivity of normal human breast tissue in vivo and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship to progesterone receptor expression. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;45:121.
20. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer?. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):75-83.
21. Coleman MC, Asbury CR, Daniels D et al. 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008;44(3):322–331.
22. Comşa S., Cimpean A. M. & Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35:3147-3154.
23. Courchesne-Loyer A, Fortier M, Tremblay-Mercier J et al. Stimulation of mild, sustained ketonemia by medium-chain triacylglycerols in healthy humans: estimated potential contribution to brain energy metabolism. *Nutrition*. 2013;29:635–40.
24. Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Rev*. 1987;8:29.
25. Dickson RB, Russo J. Biochemical control of breast development. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the breast*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000;15.

26. Dickson RB, Stancel G. Estrogen-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000.
27. Duvel K, Yecies JL, Menon S et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 2010;39(2):171–183.
28. Elledge RM, Fuqua SAW. Estrogen and progesterone receptors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the breast*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:471.
29. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(6):560-9.
30. Fan S, Wang JA, Yuan R et al. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science.* 1999;284:1354.
31. Fath MA, Ahmad IM, Smith CJ et al. Enhancement of carboplatin-mediated lung cancer cell killing by simultaneous disruption of glutathione and thioredoxin metabolism. *Clinical Cancer Research.* 2011;17 (19):6206–6217.
32. Ferreira L, Lisenko K, Barros B et al. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2014;98:1–8.
33. Fine EJ, Miller A, Quadros EV et al. Acetoacetate reduces growth and atp concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2. *Cancer Cell Int.* 2009;9:14.
34. Foukakis T, Bergh J. Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer. In: UpToDate. Hayes DF, Vora SR (eds.). Waltham, MA: UpToDate, 2017.
35. Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, C et al. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Research.* 2002;62(14):3909–3913.
36. Gilbert DL, Pyzik PL, Freeman JM, The ketogenic diet: seizure control correlates better with serum beta-hydroxybutyrate than with urine ketones. *Journal of Child Neurology.* 2000;15(12):787–790.
37. Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ et al. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol.* 2014;32:2078-2099.
38. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* 2001;15(11):1406–1418.

39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74
40. Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J et al. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell*. 2012;22(5):585–600.
41. Howlader N, Altekruse SF, Li CI et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(5).
42. Isidoro A, Martinez M, Fernandez P et al. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*. 2004;378:17-20.
43. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:225-249.
44. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*. 2012;485(7400):661–665.
45. Jiang P, Du W, Wang X et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol*. 2011;13(3):310–316.
46. Khan SA, Sachdeva A, Naim S et al. The normal breast epithelium of women with breast cancer displays an aberrant response to estradiol. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8:867.
47. Kiebish MA, Han X, Cheng H et al. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res*. 2008;49:2545-56.
48. Klarer AC, O’Neal J, Imbert-Fernandez Y et al. Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer Metab*. 2014;2(1):2.
49. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6).
50. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer’s Achilles’ heel. *Cancer Cell*. 2008;13(6):472–482.

51. Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Science Translational Medicine*. 2014;4(124).
52. Lima PA, Sampaio LP, Damasceno NR. Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. *Clinics (Sao Paulo)* 2014;69:699–705.
53. Liu VW, Shi HH, Cheung AN et al. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Research*. 2001;61(16):5998–6001.
54. Liu YM, Wang HS. Medium-chain triglyceride ketogenic diet, an effective treatment for drug-resistant epilepsy and a comparison with other ketogenic diets. *Biomed J*. 2013;36:9–15.
55. Locasale JW, Grassian AR, Melman T et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*. 2011;43(9):869–874.
56. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(8):572–583.
57. Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM et al. Serine starvation induces stress and p 53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 2013;493(7433):542–546.
58. Magee BA, Potenzy N, Rafe AM, Conyers RAJ. The inhibition of malignant cell growth by ketone bodies. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1979;51:529-539.
59. Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P et al. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell*. 2004;16(5):819–830.
60. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261–1274.
61. Martuscello RT, Vedam-Mai V, McCarthy DJ et al. A supplemented high-fat low-carbohydrate diet for the treatment of glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2015;22(10):2482-95.
62. Maurer GD, Brucker DP, Baehr, O et al. Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*. 2015;11:315.
63. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(4):300–308.

64. Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G et al. Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol*. 2013;31(25):3083-90.
65. Miranda MJ, Turner Z, Magrath G. Alternative diets to the classical ketogenic diet—can we be more liberal? *Epilepsy Res*. 2012;100:278–285.
66. Modica-Napolitano J, Singh K. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*. 2004;4:755-817.
67. Montazeri A, Vahdaninia M, Harirchi I et al. Quality of life in patients with breast cancer before and after diagnosis: an eighteen months follow-up study *BMC Cancer*. 2008;8:330.
68. Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*. 2001;61(5):1843–1845.
69. Noh, HS., Hah, YS., Nilufar, R et al. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res*. 2006;83:702-709.
70. Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2005;59(4):143–148.
71. Paoli A, Moro T, Bosco G et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3) supplementation on some cardiovascular risk factors with a ketogenic Mediterranean diet. *Marine Drugs*. 2015;13:996–1009.
72. Petros A, Baumann AK, Ruiz-Pesini E et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(3):719–724.
73. Pihan G.A, Purohit A, Wallace J et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*. 1998;58(17):3974-3985.
74. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*. 1993;15:17-35.
75. Poff AM, Ari C, Arnold P et al. Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer. *Int J Cancer*. 2014;135:1711-1720.
76. Possemato R, Marks KM, Shaul YD et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 2011;476(7360):346–350.

77. Rider MH, Bertrand L, Vertommen D et al. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J.* 2004;381(3):561–579.
78. Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ et al. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *European Journal of Nuclear Medicine.* 1996;23(12):1641–1674.
79. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol.* 2007;1:19-25.
80. Ros S, Santos CR, Moco S et al. Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. *Cancer Discov.* 2012;2(4):328–343.
81. Schumacker P. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* 2006;10:175-81.
82. Seyfried TN. *Cancer as a metabolic disease: on the origin, management, and prevention of cancer.* Hoboken, NJ: Wiley. 2012.
83. Seyfried TN, Sanderson TM, El-Abbadi MM et al. Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer. *British Journal of Cancer.* 2003;89(7):1375–1382.
84. Sharma S, Jain P. The modified atkins diet in refractory epilepsy. *Res Treat,* 2014.
85. Shukla SK, Gebregiworgis T, Purohit V et al. Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer Metab.* 2014;2:18.
86. Skinner R, Trujillo A, Ma X, Beierle EA. Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg.* 2009;44:212-216.
87. Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA et al. Glucose deprivation induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2000;899:349– 362.
88. Stafford P, Abdelwahab MG, Kim Y et al. The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma. *Nutrition & Metabolism.* 2010;7:74
89. Suchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Rev.* 1993;14:659.

90. Sukhatme VP, Chan B. Glycolytic cancer cells lacking 6-phosphogluconate dehydrogenase metabolize glucose to induce senescence. *FEBS Lett.* 2012;586(16):2389–2395.
91. Tieu K, Perier C, Caspersen C et al. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Investig.* 2003;112:892–901.
92. Tisdale MJ, Brennan RA, Fearon KC, Reduction of weight loss and tumour size in a cachexia model by a high fat diet. *British Journal of Cancer.* 1987;56(1):39–43.
93. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature Reviews. Drug Discovery.* 2009;8(7):579–591.
94. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:535–602.
95. Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y et al. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life.* 2001;51:241-7.
96. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 28(10):1684-91, 2010.
97. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123:309-314.
98. Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Medicinal Chemistry.* 2013;5(1):53–67.
99. Wibisono C, Rowe N, Beavis E et al. Ten-year single-center experience of the ketogenic diet: factors influencing efficacy, tolerability, and compliance. *J Pediatr.* 2015;166:1030 e1–1030 e6.
100. Wilder R. The effects of ketonemia on course of epilepsy. *Mayo Clin Proc.* 1921;2:307-308.
101. Wu GY, Thompson JR. The effect of ketone bodies on alanine and glutamine metabolism in isolated skeletal muscle from the fasted chick. *Biochem J.* 1988;255:139-44.
102. Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):174–179.
103. Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell.* 2012;148(1–2):259–272.

104. Zhou S, Kachhap S, Sun W et al. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(18):7540–7545.
105. Zuccoli G, Marcello N, Pisanello A et al. Metabolic management of glioblastoma multiforme using standard therapy together with a restricted ketogenic diet: Case report. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:33.



EK-I-ÖZGEÇMİŞ

Adı	Zuhal	Soyadı	Kaya
Doğum Yeri	Diyarbakır	Doğum Tarihi	01.12.1988
Uyruğu	T.C.	Tel	00506 361 67 36
E-mail	zelalzuhalkaya@yandex.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı	
Lisans	Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2013
Lise	Hasan Ali Yücel Lisesi	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırmacı	Piya Biyoteknoloji	1

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	YÖK-Dil	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
56,25	62,5							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	85,84014	85,04633	70,22097

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Excel	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)