

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALORİ KISITLAMASINA MARUZ BIRAKILAN MMTV-TGF- α
TRANSGENİK FARELERİN OKSİDATİF STRES VE OTOFAJİ
İLİŞKİLİ GENLERİN TİMUS DOKUSUNDA
EKSPRESYONLARININ GÖSTERİLMESİ

Hanifenur MANCILAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Nehir Özdemir Özgentürk

Şubat, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALORİ KISITLAMASINA MARUZ BIRAKILAN MMTV-TGF- α
TRANSGENİK FARELERİN OKSİDATİF STRES VE OTOFAJİ
İLİŞKİLİ GENLERİN TİMUS DOKUSUNDA
EKSPRESYONLARININ GÖSTERİLMESİ

Hanifenur MANCILAR tarafından hazırlanan tez çalışması 28.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Cemal ÜN, Üye

Ege Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Kalori Kısıtlamasına Maruz Bırakılan MMTV-TGF- α Transgenik Farelerin Oksidatif Stres ve Otofaji İlişkili Genlerin Timus Dokusunda Ekspresyonlarının Gösterilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hanifenur MANCILAR

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu araştırma, GenEra Diagnostik Firması laboratuvarında bulunan cihazı hizmet alımı ile kullanılması yoluyla yapılmıştır.

Öncelikle “Hayatta en hakiki mürşit ilimdir.” sözüyle ve bilime verdiği önemi her konuşmasıyla vurgulamış olan Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK’e bugün bunları yazabilmeme sebep olduğu için teşekkür ediyor ve hayatımın sonuna kadar onun ilkelerinin yolundan gideceğime söz veriyorum.

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’ndaki yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini aktarıp beni yönlendiren, akademik kişiliği, samimiyeti ve başarılarıyla her türlü sorunumda desteğini her zaman yanımda hissettiğim ve birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK’e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Tez çalışmasında kullanılan fare doku örneklerinin temini konusunda destek olan Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Soner DOĞAN’a, Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu deneyleri sırasında laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan GenEra Diagnostik firmasından Begüm FİDAN’a, Deniz COŞKUN ÖZTÜRK’e ve Süheyla SEVİNÇ’e teşekkürlerimi sunarım.

Tezin oluşturulması sırasında hem bilimsel katkıları hem de bilgi ve tecrübeleriyle yönlendirip, destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden mezun sevgili Dr. Zehra ÖMEROĞLU ULU’ya çok teşekkür ederim.

Her aşamada yanımda olan kıymetli aile fertlerim; annem Seferiye MANCILAR, babam Muammer MANCILAR’a, ablam Serap BAŞARAN’a, ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Pelin Su TÜFEKÇİ’ye, Mehmet USTA’ya, Nilgün PEHLİVAN’a ve Orhan DEMİR’e en içten sevgi ve şükranlarımı sunarım.

HANİFENUR MANCILAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Çalışmaları	1
1.2 Tezin Amacı.....	4
1.3 Hipotez.....	5
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Meme Kanseri.....	6
2.1.1 Meme Kanseri ve Obezite.....	7
2.1.2 Kalori Kısıtlaması ve Kanser	8
2.2 Kalori Kısıtlaması	9
2.2.1 Kalori Kısıtlamasının Etkileri	11
2.4 Timus	13
2.5 Oksidatif Stres.....	15
2.5.1 Lipid Hasarı	16
2.5.2 Protein Hasarı.....	18
2.5.3 DNA Hasarı	18
2.5.4 Oksidatif Stresin Kalori Kısıtlamasıyla İlişkisi	19
2.6 Reaktif Oksijen Türleri	21
2.6.1 ROT Kaynakları.....	22
2.6.1.1 Endojen Kaynaklar.....	22
2.6.1.2 Eksojen Kaynaklar	22
2.6.2 ROT Özellikleri	23
2.6.2.1 Süperoksitler	23
2.6.2.2 Hidrojen Peroksit	23
2.6.2.3 Hidroksiller	23

2.6.3 ROT'un Fizyolojik Stres Üzerine Etkileri	24
2.6.3.1 İmmün Sistem Üzerine Etkileri.....	24
2.6.3.2 Redox Regülasyonu Üzerindeki Etkileri.....	24
2.6.3.3 Yaşlanma Üzerine Etkileri	25
2.7. Antioksidanlar.....	25
2.8 Otofaji	26
2.9 Otofaji ve Kanser İlişkisi	29
2.10 Transkriptom.....	30
2.10.1 RNA Seq	30
2.11 Real Time PCR	31
3 MATERYAL METOT	34
3.1 Materyaller.....	34
3.1.1 Doku Materyalleri	34
3.2 Metot.....	34
3.2.1 Kullanılan Hayvan Modelleri	34
3.2.1 Genlerin Belirlenmesi	34
3.2.2 RNA İzolasyonu ve Miktar Analizi	35
3.2.3 RNA Jel Elektroforezi.....	36
3.2.4 Primer Tasarlama	37
3.2.5 cDNA Sentezi	37
3.2.6 RNA Sekanslama ve Veri Analizi	38
3.2.7 Real-Time PCR.....	38
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	40
4.1 Sonuçlar	40
4.1.1 Genlerin Belirlenmesi	40
4.1.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi Sonuçları.....	40
4.1.3 RNA Miktarı Tayini Sonuçları	41
4.1.4 RNA Jel Elektroforezi.....	42
4.1.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	42
4.2 ÖNERİLER.....	58
KAYNAKÇA	67
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	80

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
C_t	Eşik değeri döngüsü
μg	Mikro gram
μL	Mikro litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
p	Olasılık değeri
sn	Saniye
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
g	Yerçekimi kuvveti

KISALTMA LİSTESİ

AL	Ad Libitum
AMP	Adenozin Mono fosfat
AMPK	Adenozin Mono fosfat Kinaz
ATP	Adenozin Trifosfat
CCR	Kronik Kalori Kısıtlama
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
DEGs	Farklı Oranda Ekspresse Olan Genler
DEPC	Dietil Pirokarbonat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
GO ID	Gen Ontolojisi Kimlik Numarası
ICR	Aralıklı Kalori Kısıtlama
MMTV	Fare Meme Tümör Virüsü
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
NGS	Yeni Nesil Dizileme
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIP3	Fosfotidil İnositol 3,4,5-trifosfat
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNA-seq	RNA Sekanslama
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TGF- α	Dönüşüm Büyüme Faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Meme kanseri risk faktörleri	7
Şekil 2.2 Kalori kısıtlamasının etkileri	11
Şekil 2.3 Timusun yapısı	14
Şekil 2.4 Oksidatif stresin şematik sunumu.....	16
Şekil 2.5 Lipid peroksidasyon süreci.....	17
Şekil 2.6 Ubikuitin-proteozom yolağı ile protein yıkımı	26
Şekil 2.7 Otofajinin aşamaları	27
Şekil 2.8 Otofaji çeşitleri	28
Şekil 2.9 Otofagozom oluşumunda LC3-FE ve p62/SQSTM1 proteinlerinin konumlanması.....	28
Şekil 2.10 Otofajiye bağlı olarak ortaya çıkan patolojik sonuçlar	29
Şekil 2.11 RNA-seq aşamaları.....	31
Şekil 2.12 Gerçek Zamanlı PCR fazları ve amplifikasyon eğrisi grafiğı	33
Şekil 3.1 RNA seq. Heatmap sonuçları	41
Şekil 3.2 RNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (soldan sağa örnek numaraları	42
Şekil 4.1 ADIPOQ geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	46
Şekil 4.2 CAR3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	46
Şekil 4.3 CD36 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	46
Şekil 4.4 CFL1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	47
Şekil 4.5 ADIPOQ, CAR3, CFL1 ve CD36 genlerine ait erime eğrisi grafiğı	47
Şekil 4.6 ADIPOQ, CAR3, CFL1 ve CD36 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi.....	47
Şekil 4.7 ADIPOQ, CAR3, CFL1 ve CD36 genlerine ekspresyon karşılaştırmaları	48
Şekil 4.8 GPX3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	48
Şekil 4.9 PRDX3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	48
Şekil 4.10 MGST1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	49
Şekil 4.11 GPX3, PRDX3 ve MGST1 genlerine ait amplifikasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.12 GPX3, PRDX3 ve MGST1 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi..	49
Şekil 4.13 GPX3, PRDX3 ve MGST1 genlerine ekspresyon karşılaştırmaları.....	50
Şekil 4.14 RGS14 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	50
Şekil 4.15 NONO geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	50
Şekil 4.16 NEIL3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	51

Şekil 4.17 CASP3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	51
Şekil 4.18 RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genlerine ait amplifikasyon eğrisi	51
Şekil 4.19 RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi.....	52
Şekil 4.20 RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genlerine genlerine ekspresyon karşılaştırmaları	52
Şekil 4.21 MAPK1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	52
Şekil 4.22 PYCR2 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	53
Şekil 4.23 STK26 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	53
Şekil 4.24 UCP1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları	53
Şekil 4.25 MAPK1, PYCR2, STK26 ve UCP1 genlerine ait erime eğrisi grafiği	54
Şekil 4.26 MAPK1, PYCR2, STK26 ve UCP1 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi.....	54
Şekil 4.27 MAPK1, PYCR2, STK26 ve UCP1 genlerine ait ekspresyon karşılaştırmaları	54
Şekil 4.28 SQSTM1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	55
Şekil 4.29 LC3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları.....	55
Şekil 4.30 SQSTM1 ve LC3 genlerine ait erime eğrisi grafiği	55
Şekil 4.31 SQSTM1 ve LC3 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi	56
Şekil 4.32 SQSTM1 ve LC3 genlerine ait ekspresyon karşılaştırmaları.....	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Kalori kısıtlamasının MDA seviyesi üzerine etkileri	20
Tablo 2.2 ROT türleri ve özellikleri.....	22
Tablo 3.1 Seçilen gen bölgeleri ve RT-PCR için kullanılacak olan forward ve reverse dizileri	35
Tablo 3.2 PCR cihaz protokolü.....	39
Tablo 4.1 Beslenme grupları arası ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olan genler ve p değerleri.....	40
Tablo 4.2 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri.....	41
Tablo 4.3 GAPDH ve diğer genlerin ortalama C _t değerleri.....	43
Tablo 4.4 Genlerin AL'ye göre 2 ^{-ΔΔC_t} değerleri.....	44
Tablo 4.5 18. Haftada genlerin ekspresyonlarının AL'ye göre kıyaslamaları	44
Tablo 4.6 50. Haftada genlerin ekspresyonlarının AL'ye göre kıyaslamaları	45
Tablo 4.7 82. Haftada genlerin ekspresyonlarının AL'ye göre kıyaslamaları	45

KALORİ KISITLAMASINA MARUZ BIRAKILAN MMTV-TGF- α TRANSGENİK FARELERİN OKSİDATİF STRES VE OTOFAJİ İLİŞKİLİ GENLERİN TİMUS DOKUSUNDA EKSPRESYONLARININ GÖSTERİLMESİ

Hanifenur MANCILAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak ve lizozomla bir araya gelerek parçalanmasına sebep olan bir mekanizmadır. Uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji vasıtasıyla parçalara ayrılır ve meydana gelen yapı taşları (örn. aminoasitler) hücrede tekrar kullanılır. Reaktif oksijen türlerinin (ROT), otofajik kesecik oluşumunda ve otofajinin hücre ölümü ya da hayatta kalımı üzerindeki rolünün düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Düşük konsanstrasyondaki reaktif oksijen türleri; hücre adezyonu, apoptoz, hücre sel sinyalleşme, transkripsiyon faktörü aktivitesi, hasarların azaltılması, tümör olasılığının azaltılması, patojen olguların azalması, immün işlevlerin değişimi gibi çeşitli fizyolojik süreçler için gereklidir. Açlık ve hipoksi gibi otofajiyi indükleyen farklı stresörler ROT üretimini artırabilir. Kalori kısıtlaması, yetersiz beslenme olmaksızın kalori alımının azaltılması ile uygulanmakta olup canlılarda hayat uzunluğunu arttırdığına dair birçok delil bulunmaktadır. Timus, diğer lenfoid organlar gibi, besin eksikliğine hızla yanıt verir. Kemirgenlerde yapılan kalori kısıtlaması çalışmalarında Aralıklı Kalori Kısıtlamasının (ICR) Kronik Kalori Kısıtlamasına (CCR) ve Ad Libitum (AL) beslenmeye kıyasla tümör gelişmesinde, oto-

immünite supresyonunda ve hayat süresinin uzamasında daha etkin bir deneysel manipölasyon olduğu bildirilmiştir. Grubumuz daha önce 2 farklı kalori kısıtlaması ve normal beslenen 18 haftalık MMTV-TGF α (Mouse Tumor Virus Transforming Growth Factor α) farelerinin timus dokularından yeni nesil dizileme teknolojisi kullanarak 3 RNA-Seq verisi elde etmiştir. Bu çalışmada kalori kısıtlamalarına bağılı olarak RNA-Seq DEG verisinde ekspresyonu değışen 17 gen belirlendi. Bu genlerin ekspresyonlarının validasyonu Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) ile yapıldı. Yaşamlarının 18., 50 ve 82. Haftalarındaki farelerin timus organının dokularından elde edilen total RNA'dan RT-PCR yapıldı. RT-PCR verilerinin analizinde söz konusu 17 genin yaşamın erken, orta ve geç dönemlerindeki ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Bulgularımıza göre AL, CCR ve ICR diyet tiplerinde ekspresyon farkı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, otofaji ve oksidatif stres genlerinin ekspresyonlarının kalori kısıtlamasıyla regölasyonlarının değıştiğini göstermiştir. Bu sonuç kalori kısıtlaması, otofaji, oksidatif stres, bağışıklık, kanser gelişimi çalışmaları için yeni ipuçları sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kalori kısıtlaması, meme kanseri, otofaji, oksidatif stres, Real Time PCR

EXPRESSION OF OXIDATIVE STRESS AND AUTOPHAGY RELATED GENES IN THYMUS TISSUE OF MMTV-TGF- α TRANSGENIC MICE EXPOSED TO CALORIE RESTRICTION

Hanifenur MANCILAR

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Autophagy is a mechanism that causes intracellular macromolecules and organelles to be taken into a vesicle and combined with the lysosome to break down. Long-lived proteins and intracellular organelles are broken down by autophagy and the resulting building blocks (eg amino acids) are reused in the cell. Reactive oxygen species (ROS) have been shown to be involved in autophagic vesicle formation and in regulating the role of autophagy in cell death or survival. Reactive oxygen species in low concentration; It is necessary for various physiological processes such as cell adhesion, apoptosis, cellular signaling, transcription factor activity, reduction of damage, reduction of tumor probability, reduction of pathogenic phenomena, alteration of immune functions. Different stressors that induce autophagy, such as starvation and hypoxia, can increase ROS production. Calorie restriction is practiced by reducing calorie intake without malnutrition, and there is ample evidence that it increases life expectancy in living things. The thymus, like other lymphoid organs, responds rapidly to nutrient deficiency. In calorie restriction studies in rodents, Intermittent Calorie Restriction (ICR) has been reported to be a more effective experimental manipulation in tumor development, auto-

immunity suppression and prolongation of lifespan than Chronic Calorie Restriction (CCR) and Ad Libitum (AL) feeding. Our group previously obtained 3 RNA-Seq data using next-generation sequencing technology from thymus tissues of 18-week-old MMTV-TGF α (Mouse Tumor Virus Transforming Growth Factor α) mice that were fed 2 different calorie restrictions and normally. In this study, 17 genes whose expression changed in RNA-Seq DEG data due to calorie restrictions were determined. The expressions of these genes were validated by Real Time PCR (RT-PCR). RT-PCR was performed from total RNA obtained from the tissues of the thymus organ of mice at 18, 50 and 82 weeks of life. In the analysis of RT-PCR data, it was aimed to investigate the differences in the expression levels of the 17 genes in question in the early, middle and late stages of life. According to our findings, there was a difference in expression in AL, CCR and ICR diet types. These results showed that the expression of autophagy and oxidative stress genes was altered by caloric restriction. This result will provide new clues for studies of calorie restriction, autophagy, oxidative stress, immunity, cancer development.

Keywords: Calorie restriction, breast cancer, autophagy, oxidative stress, Real Time PCR

1.1 Literatür Çalışmaları

Kalori kısıtlaması uygulamasının omurgalı ve omurgasız canlılarda hayat uzunluğunu arttırdığına dair birçok delil bulunmaktadır. Bununla beraber fizyolojiyi etkileyen bazı değişikliklerle neden olduğuna dair araştırmalar da bulunmaktadır. Reaktif oksijen çeşitlerinin meydana gelmesinin ve hasarların azaltılması, tümör olasılığının azaltılması, patojen olguların azalması, immün işlevlerin değişimi bu fiziksel değişimlerden bazılarıdır [1]. Fiziksel değişimlerin başlaması kalori kısıtlama süresiyle değişiklik göstermektedir. Kemirgenlerde yapılan kalori kısıtlaması çalışmalarında Kronik Kalori Kısıtlamasının (CCR), Ad Libitum (AL) beslenmeye kıyasla supresif tümör gelişmesinde, oto-immünite supresyonunda ve hayat süresinin uzamasında daha etkin bir deneysel manipülasyon olduğu bildirilmektedir [2].

Bağışıklık ve metabolik sistemler arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Sitokin ve kemokinler bu sistemler arasındaki iletişimi sağlamaktadır. Farelerle yapılan araştırmalarda obezitenin immün yetersizlik ve kronik enflamasyonla bağlantılı olduğunu ve erişkinlik öncesinde ölüme sebebiyet vereceğini bildirmişlerdir. Bu durumun tam karşıtı tesir göstererek, kalori kısıtlaması enerjetik dengeyi tersine çevirip immün sistemi kuvvetlendirdiği ve antikanser, antiaging etkili prosesleri etkilemektedir [3].

Yüksek verimli RNA dizilemenin en büyük üstünlüklerinden biri, qRT-PCR kullanılarak yapılan direkt öngörülerdir. Jung ve ark.'nın yaptığı çalışmada RNA-seq araştırmaları transkriptom analizinde farklı oranlarda eksprese olmuş genlerin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir metottur. RNA-seq metodunun sonuçları pek çok araştırmada Real Time PCR ile valide edilir [4].

Bu çalışmada ekspresyon seviyesini inceleyeceğimiz ADIPOQ, CAR3, CASP3, CD36, CFL1, GPX3, PRDX3, NEIL3, MGST1, MAPK1, PYCR2, STK26, UCP1, RGS14, NONO, SQSTM1, LC3 genlerinin otofaji ve oksidatif stres ile ilişkileri çeşitli yayınlarda gösterilmiştir.

Wang ve ark., CFL1 proteinin insan aortik endotelyal hücrelerinde hücreSEL döngüyü sürdürmek için anjiyotensin-(1-7) ile indüklenen otofajide baskın bir rol oynadığını saptamışlardır [5].

Li ve ark., yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin karaciğerlerinde otofajinin azaldığını gözlemlemişlerdir [6]. CD36, bağışıklık sisteminde en çok makrofajlarda incelenmiştir. Literatürde doğuştan gelen B tipi hücreler tarafından da yüksek oranda ifade edildiği, CD36'nın bu hücrelerde makro-otofaji/otofajiye sebep olduğu ve yokluğunda humoral bağışıklık tepkisinin bozulduğu bildirilmiştir [7].

Huang ve ark., STK26'nın bir substratı olan ATG4B, ATG8'in geri dönüşümlü modifikasyonu yoluyla otofagozom oluşumunu teşvik ederek otofajiyi uyardığını bildirmişlerdir. Farelerin intrakraniyal GBM ksenograft ile tedavisinde radyoterapi ile kombinasyon halinde ATG4B'nin inhibisyonunun, tümör büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığını ve önemli bir hayatta kalma yararı sağladığını bildirmişlerdir [8].

Fleming ve ark. (2019), NEIL3 ekspresyonunun aktivasyonunun, hücrelerin oksidatif veya inflamatuvar stres ile ilişkili mutajenik DNA hasarının onarılmasına yardımcı olduğunu göstermişlerdir [9].

Kuo ve ark., PYCR2 geninin ürünü olan proteinin oksidatif stresteki rolünü araştırmışlardır. Araştırmada, kısa saç tokası RNA'ların eksprese edilerek hem PYCR1 hem de PYCR2'nin susturulması, hücre proliferasyonunda kusurlara, mitokondriyal ağın kısmi parçalanmasına ve oksidatif strese aşırı duyarlılığa neden olduğunu bildirmişlerdir [10].

Sisteinil aspartat spesifik proteazlar veya CASP3 gibi kaspaz proteinleri, substratları bir aspartik asit kalıntısından hemen sonra degrade eder ve programlanmış hücre ölümünde önemli roller oynarlar. Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçma yeteneği temel özelliklerinden biridir ve antikanser savunma mekanizmalarını kırmalarına yardımcı olabilecek beceridir. Dolayısıyla kaspaz-3 ve/veya diğer kaspazların ekspresyonunun kaybı, mutasyona uğramış somatik hücrelerin hayatta kalmasında önemli bir adım olarak rol oynarlar. Literatürde yapılan bir çalışmada meme kanseri hastalarının çoğunda tümör hücrelerinin yanı sıra tümörü çevreleyen normal parankimde kaspaz 3 ekspresyonu olmadığı gösterilmiştir. Bu anahtar kaspazın ekspresyonunun veya fonksiyonunun kaybı, meme kanseri hücrelerini kemoterapötik ilaçlar da dahil olmak üzere belirli apoptotik uyarılara yanıt olarak apoptoza dirençli hale getirebilir ve bu nedenle hastalığın

sonucunu ve prognozunu etkileyebilir. Bu bulguların, kaspaz-3'ün yalnızca hastalık belirteci olarak değil, aynı zamanda meme kanseri için terapötik bir hedef olarak kullanılması açısından önemli klinik etkilerinin olabileceği belirtilmiştir [11].

Chang ve ark., GPX3'ün kanser sürecindeki rolünü araştırmışlardır. Bulgularına göre diğer antioksidanlara benzer şekilde, GPX3'ün tümör gelişimi sırasında hem bir tümör baskılayıcı hem de bir hayatta kalma proteini olarak kanserde ikiye bölünmüş bir role olduğunu saptamışlardır [12]. GPX3, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunun azaltılmasına neden olan ve tümör baskılayıcı olarak görev alan bir proteini ürettiği de bildirilmiştir [13].

Bir nukleus pulposus fenotipik markerı olan Karbonik Anhidraz III'ün (CAR3) ekspresyonunun hipoksiye vb. hücrel streslere duyarlı olduğu ve hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu bildirilmiştir [14].

PRDX3, mitokondride en bol bulunan ve etkili H_2O_2 'i ortadan kaldıran enzim olduğu için, matriste üretilen H_2O_2 'nin yaklaşık %90'ını ortadan kaldırdığını ve önemli bir mitokondriyal antioksidan proteindir bildirilmiştir [14]. PRDX3, inaktif dimer formuna oksitlenerek H_2O_2 'yi temizlediği belirtilmiş olup çeşitli çalışmalarda, PRDX3'ün oksidatif stresi ve apoptozu etkili bir şekilde inhibe edebileceğini ve hücrel hasarı hafifletebileceğini bildirmiştir [15,16].

MGST1 (mikrozomal glutatyon S-transferaz 1) geninin ürettiği proteinin yaşlanmaya bağlı oksidatif hasara karşı hücrede koruma sağladığı belirtilmiştir. MGST1' in bir peroksidaz olarak işlev gördüğü, böylece hücreleri potansiyel olarak reaktif bileşenlerden ve oksidatif stresten koruduğu bildirilmiştir [17].

MAPK1 birkaç proteinin kademeleri tarafından yürütülen otofajinin indüksiyonu için önemli bir yol alabileceği bildirilmektedir MAPK1/3'ün ATG7'ye bağlı otofajiyi uyarak hepatik lipid metabolizmasında etkin bir rol oynadığını gösterilmiştir [18].

UCP1 eksikliği olan farelerde, yüksek oksidatif stres seviyelerinin gözlemlendiği bildirilmiştir [19]. Yine farklı bir çalışmanın sonuçlarına göre UCP1 oksidatif hasarının seviyesini düşürdüğü ve ömrü uzattığı görülmüştür [20].

RGS14' ün sinaptik plastisite, hücre bölünmesi ve fagositoz gibi çeşitli biyolojik işlemlerde yer aldığı belirtilmektedir [21]. Literatürde yapılan bir çalışmada RGS proteinlerinin, birkaç farklı türde stres direncini ve uzun ömürlülüğü düzenlemede önemli roller oynadığını göstermiştir [22].

Nono geninin insan melanositlerinde hem melanoma hücre hattının hem de melanoma doku örneklerinin çekirdeğinde güçlü bir şekilde eksprese edildiği ve lokalize olduğu bildirilmiştir. Nono'nun kötü huylu melanomda yüksek oranda ifade edildiği ve habis melanoma gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [23]. Li ve ark., NONO ve PSPC1 genlerinin DNA çift ipliğinin bozulmasını onarıcı genler için mRNA seviyelerini etkileyerek dolaylı olarak onarımı da etkileyip etkilemeyeceğini test etmişlerdir. Sonuç olarak NONO ve ilgili proteinlerin, DNA çift ipliğinin bozulmasını onarımı için kritik olduğunu bulmuşlardır [24].

P62 olarak da bilinen SQSTM1 proteini hücrel homeostazı korumak için otofagozom üzerindeki vesiküller ve LC3 proteini ile aynı anda etkileşime girerek seçici otofajiyi kolaylaştıran bir reseptördür. p62/SQSTM1 memelilerde tanımlanan ilk seçici otofaji reseptörüdür. (SQSTM1) olarak da adlandırılan p62 proteini, yaygın olarak poliübikitinlenmiş protein kümeleri içeren inklüzyon cisimciklerinde bulunur [25].

LC3, otofagozom zarı oluştuktan sonra otofajinin geç basamaklarında yer alan otofaji marker proteinlerinden biridir. Sukserree ve ark., timik epitel hücrelerindeki otofajinin genetik mekanizmalarını araştırmışlardır. LC3 geninin fonksiyon kaybının otofajiyi baskıladığını, otofajinin baskılanması sonucunda da timik epitel hücrelerinde büyük miktarda p62/sektozom 1 (SQSTM1) birikimine yol açtığını bildirmişlerdir [26]. Hamurcu ve ark., otofajinin metastatik üçlü negatif meme kanseri ve metastatik olmayan meme kanseri hücrelerindeki rolünü araştırmışlar ve otofaji ile ilişkili genlerin (LC3 ve Beclin-1) ortadan kaldırılmasının otofajiyi inhibe ettiğini göstermişlerdir [27].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada farelerde beslenme biçimlerinin otofaji ve oksidatif stres üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kalori kısıtlaması çalışmalarında genellikle kullanılmakta olan kronik kalori kısıtlaması ve aralıklı kalori kısıtlaması yönteminin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin kontrol grubuyla birlikte karşılaştırılması sağlanacaktır. Otofaji ve oksidatif strese etkisi olduğu düşünülen 17 genin, transgenik farelerin 3 değişik yaşamsal döneminde beslenme tarzının etkisiyle meydana gelebilecek ekspresyon farklılıkların saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla dizileme verileri aracılığıyla otofaji ve oksidatif stres ile ilgisi biyoinformatik analizlerle saptanan 17 genin ekspresyonlarında bu değişikliklerin doğrulanması amacıyla gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) metodu kullanılarak timüs dokusunda doğrulanması hedeflenmiştir.

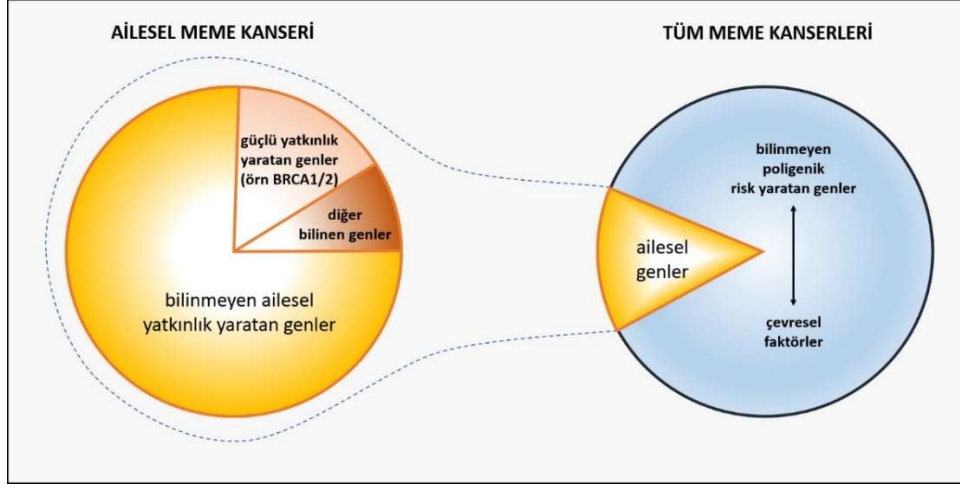
1.3 Hipotez

Literatür araştırmalarının sonucunda kalori kısıtlamasının, kanser, yaşlanma, oksidatif stres ve otofaji mekanizmalarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bölümümüzde daha önce yapılan araştırmada, yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak RNA sekanslama transkriptom analizi ile kalori kısıtlaması uygulanmış ve normal beslenmiş (Ad Libitum) yaşamın erken evresindeki (18. hafta) fareler arasında “farklı oranda ekspresse edilen genler (DEGs)” tespit edilmiştir. Tespit edilen DEGs içerisinde otofaji ve oksidatif stres ile ilişkili olan 17 gen belirlenmiştir. Bu ilişki sebebiyle kalori kısıtlamasının ve beslenme tipinin otofaji ve oksidatif stres ilişkili genlerin ekspresyonlarında anlamlı değişikliklere sebep olduğu, bu değişikliklerin kalori kısıtlamasının otofaji ve oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olup hücredeki stresi azalttığı hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Bu çalışmada, otofaji ve oksidatif stres ilişkili genlerin RNA-seq analizinden elde edilen ekspresyon değişim sonuçlarının, Real Time PCR ile doğrulanması beklenmektedir.

2.1 Meme Kanseri

Dünya genelinde kadınlar arasında ölüme sebep olan en önemli ikinci ölüm nedeninin meme kanseri olduğu belirtilmektedir [28]. Meme kanseri 2018'de Amerika Birleşik Devletleri'ndeki vakaların %30'nu oluşturduğu belirtilmektedir. Ayrıca, meme kanseri görülme oranı gün geçtikçe arttığı vurgulanmaktadır. ABD'de 2008'de de meme kanseri vakaları, toplam kanserin %23'ünü oluştururken, Türkiye'de ise kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturduğunu bildirilmektir. Meme kanseri, genetik materyalde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan genetik anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Meme kanseri vakalarının %5 ila %10'una kalıtsal genetik sebep olurken, meme kanseri vakalarının %85-90'ına çevresel faktörlerden ve yaşlanmadan kaynaklanan genetik anomalilerin sebep olduğu belirtilmektedir. Özellikle BRCA1, BRCA2 ve TP53 genlerinde oluşan patojenik varyantların meme kanseri ve yumurtalık kanseri için en yüksek penetransa sahip olduğu rapor edilmiştir. Tek genlerde oluşan patojenik varyantların dışında genlerde oluşan varyasyonların poligenik risk oluşturarak da kansere neden olduğu rapor edilmiştir [29].

Meme kanseri gelişiminde yaş, cinsiyet, ırk ve aile öyküsü gibi içsel faktörler ve ayrıca sigara içme, aşırı alkol alımı, egzersiz eksikliği, diyet ve obezite gibi dışsal faktörler gibi çeşitli risk faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedir [30]. Bu bağlamda, yaşam tarzı ile ilişkili faktörlerin meme kanseri gelişimi üzerinde genetik faktörlerle de birlikte etkisi olduğu bildirilmektedir [31] (Şekil 2.1) . Bu dışsal risk faktörleri ayrıntılı olarak incelenerek karakterize edilebilirse, meme kanseri gelişimi için daha etkili müdahale stratejileri geliştirilebilir [29].



Şekil 2.1 Meme kanseri risk faktörleri [32]

2.1.1 Meme Kanseri ve Obezite

Dünya Sağlık Örgütü obeziteyi, vücut kitle indeksinin (VKİ) 30 kg/m^2 'den yüksek olduğu durumlarda aşırı yağ birikimi durumu olarak tanımlamaktadır. Obezite, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen ciddi bir sağlık problemidir. Örneğin, İngiliz kadınların % 26 obez olarak kabul edilmektedir ve bu oranın 2030 yılına kadar % 43'e çıkacağı tahmin edilmektedir. Genetik, sağlıklı beslenme, fiziksel hareketsizlik, metaboloizma, çevresel faktörler, sosyoekonomik ve psikolojik durumlar obeziteye sebep olan faktörlerin başında gelmektedir [33]. Obezitenin, kadınlar arasında kanserden toplam ölümlerin %20'sinden ve erkekler arasında %14'ünden sorumlu olduğu bildirilmektedir [34]. Bergström ve ark., yaptıkları bir çalışmada aşırı kilolu kadınların %12, meme kanseri obez kadınların ise %25 oranında daha yüksek meme kanseri riskine sahip olduğunu bildirmiştir [35]. Dobbins ve ark. (2013) ayrıca obez kadınların ($\text{VKİ} > 30 \text{ kg/m}^2$) daha zayıf kadınlara kıyasla meme kanseri gelişimi açısından önemli ölçüde %25 daha yüksek risk taşıdığını bildirmişlerdir [33].

Meme kanseri gelişiminde obezite ve diyet faktörlerinin işlevinden sorumlu mekanizmayı anlamak ve mekanizmayı değiştirmek yeni tedavileri iyileştirmek için son derece önem taşımaktadır. Bu ilişkide insülin, IGF, seks hormonları, oksidatif stres ve adipokinlerin etkileri gibi çeşitli mekanizmaların rolü olduğu ileri sürülmüştür [36,37]. 2002 yılında, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), obezite ile kolon, postmenopozal meme, endometriyal, böbrek ve özofagus dahil olmak üzere birçok kanser arasında bir ilişki olduğuna dair yeterli kanıt olduğu sonucuna varmıştır. Obeziteye atfedilen kanser yüzdesi menopoz sonrası meme kanseri için %9 olarak bulunmuştur [38]. Bazı çalışmalar

menopoz öncesi kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini etkilemediğini veya gerçekte azalttığını öne sürerken, obezite, meme kanseri hastalarına göre %30 daha yüksek ölüm riski taşıdığı belirtilmektedir. Obezitenin meme kanseri riski üzerindeki bu farklı etkileri en iyi menopoz durumu ile açıklanabilir [39,40]. Yumurtalık östrojen üretiminin olmadığı postmenopozal kadınlarda, yüksek VİK olan kadınlarda meme kanseri insidansının artması, yağ dokusundan nispeten yüksek estradiol plazma seviyeleri ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir [41]. Yağ dokusunda östrojen oluşumu ve meme yağında aromataz ekspresyonu, meme kanseri riski ile ilişkin önemli bağlantılar olarak kabul edilmektedir. Buna karşılık, menopoz öncesi kadınlarda yüksek VİK ve meme kanseri riski arasındaki ters ilişki, obez kadınlarda progesteron serum düzeylerinin düşmesinden kaynaklanabileceği öngörülmektedir [42].

2.1.2 Kalori Kısıtlaması ve Kanser

CR, canlı organizmada yaşam kalitesini ve süresini etkileyebilecek ana sağlık düzenleyicilerinden bir tanesidir. Ek olarak, CR kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, inflamasyon ve nörojeniz gibi çeşitli patolojik hastalıklarla ilişkisinin olduğu belirtilmiştir [43]. Genel olarak kalori alımının genellikle yüzde 20 ila 40 oranında azaltıldığı bir diyet rejimi olan kalori kısıtlaması kemirgen modellerinde vücut ağırlığını azaltmak ve kanser gelişimini önlemek için en çok uygulanan müdahalelerden bir tanesidir [44]. CR'nin tümörün oluşumu üzerindeki etkisini ele alan ilk araştırma 1909 yılında Moreschi tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada CR ile beslenen sıçanlara verilen tümörlerin, tümörün gelişiminin durduğu gözlemlenmiştir [45]. CR ile ilgili daha sonra ki bir çalışma 1935'te McCay tarafından gerçekleştirildi ve bu çalışmaya göre, CR'nin sıçanların ömrünü uzattığını bildirilmiştir. Aynı çalışmada CR'nin yaşam süresini uzattığı ve tip 2 diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların gelişimini geciktirdiği bildirilmiştir [44]. CR'nin koruyucu etkisi 1940'larda Tannenbaum tarafından gerçekleştirilen araştırmalarda doğrulanmıştır [46]. Küçük kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarda CR'nin kansere eğilimi azalttığı ispatlanmıştır [44,47]. Bu koruyucu etki, farklı dokulardaki spontan tümörlerin başlamasında ve gelişmesinde geciktirmeyi kapsamaktadır [48,49].

Sözgelimi, yapılan bir çalışmada, AL olarak beslenen sıçanlarda tümörlerin hayat boyu oluşması oranı sırası ile erkeklerde %89, dişilerde ise %86 bulunurken, CR uygulanan farelerde ise hem erkek hem de dişilerde bu oran %64 şeklinde belirtilmiştir. CR ile beslenen dişi farelerde, lenfomada %29'dan %9'a kadar azalmalar, hipofiz tümörlerinde

%37'den %1'e düşüş ve tiroid tümörlerinde ise %8'den %0,8'e kadar azalma gözlemlenmiştir. CR'ye tabi tutulmuş erkek farelerde ise hepatoselüler tümörler %10'dan %1'e düştüğü görülmüştür [50]. Diğer taraftan, spontan ve indüklenabilir tümörlere daha hassas olan p53 geni indüklenmiş fareler üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada, 10. aydan başlayarak haftada bir gün %40'lık CR yapıldığında tümör gelişiminin geciktiği gözlemlenmiştir [51]. Kalori kısıtlamasının etkilerini değerlendiren bir meta-analiz çalışmasında CR'nin tümör insidansını yüzde 75 oranında önlediğini belirtmiştir [52].

CR ve kanser ilişkisini ele alan çalışmaların büyük çoğunluğu, CR'nin meme kanseri üzerindeki koruyucu rolleriyle ilişkilidir. Dirx ve ark. yaptıkları bir meta analiz çalışmasında, CR'ye tabi tutulmuş hayvanlarda, kontrol grubuna kıyasla %41 ila %69 arasında daha az oranda meme tümörü olduğu gözlemlenmiştir. CR uygulaması başlatılan farelerin yaşı, CR uygulamasının süresi, farelerin doğurganlık oranları ve enerji veren besleyici gıdaların çeşidi ele alındığında araştırmanın sonuçları üzerinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada, CR'nin farelerin meme tümörüne yalanmasını ve ilerlemesinin geciktirdiği ve meme tümörüne karşı koruma sağladığı ispatlanmıştır [53]. Doğan ve ark. tarafından MMTV-TGF- α transgenik farelerle yapılan bir çalışmada %25 CR uygulanan kronik kalori kısıtlamsı grubu, üç hafta AL bir hafta %50 kısıtlama ile beslenen aralıklı kalori kısıtlaması uygulanan farelerde meme kanseri gelişiminin geciktiği gözlemlenmiştir [54].

2.2 Kalori Kısıtlaması

Sık olarak uygulanan bir deneye dayalı manipülasyon metodu olan CR, yetersiz beslenmeye sebebiyet vermeden organizmanın aldığı kalori oranının kısıtlaması olarak tanımlanmaktadır. Enerji alımının sınırlandırılması, temel besinlerin yeterli oranda alınması ile kombine edilmektedir. 19.yy başından itibaren farklı organizmalarda bu manipülasyonun etkileri araştırma konusu olmuştur. Konuya ilişkin gerçekleştirilen araştırmalarda, çeşitli organizmalarda pek çok biyolojik süreç üzerinde farklı etkiler gözlemlenmiştir. Temel olarak, canlıların ömür sürelerini uzattığı, yaşlanmayı ertelediği, tümör gelişimini önlediği, otoimmüniteyi baskılayarak, immün sistemi farklı yollarla pozitif olarak etkilediği belirtilmiştir [55].

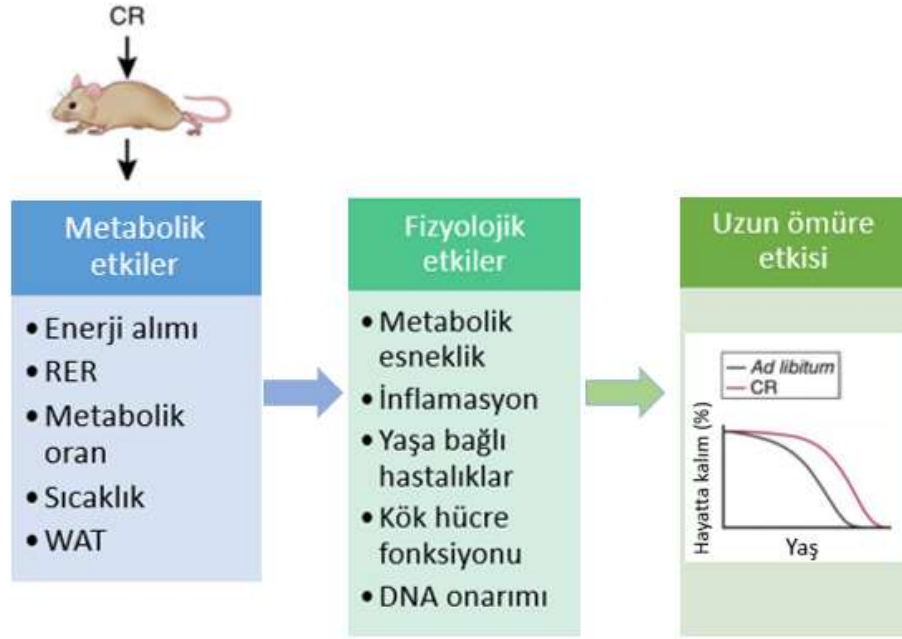
CR'nin farklı türlerde pozitif yönde etki göstermesi bilim insanlarını mekanizmaların açığa kavuşturulması için kapsamlı araştırmalara itmiştir. Araştırmalar fare, sıçan, köpek ve primatlar üzerine yoğunlaşmıştır. Zira bu organizma türleri üzerinde yapılan

araştırmalar, insan türüne filogenetik bakımdan daha yakın bulunmuş ve daha iyi kıyaslama olanağı sağlamaktadır. Bununla birlikte, omurgasız hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen gıda kısıtlamalarında, kısıtlanan kalori miktarının ölçülmesi sorun oluşturduğundan bu araştırmaların omurgalılar üzerinde gerçekleştirilmesi daha sağlıklı sonuçlar vereceğı öngörölmüştür [56].

Canlıların herhangi bir sınırlama uygulamadan besine ve suya ulaşabildiğı duruma, *ad libitum* beslenme adı verilmektedir. CR deneysel çalışma protokollerinde yaygın olarak, *ad libitum* olarak beslenen bir grup ve bu beslenmenin belli bir yüzdesi azaltılarak beslenen diğeri bir grup da bulunmaktadır. Bu protokollerde kalorinin yanında, makro ve mikro besin öğeleri de aynı oranda sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmalara bazı kaynaklarda diyet kısıtlaması (dietary restriction) adı da verilmektedir [57].

İki esas olarak, kronik kalori kısıtlaması (CCR) ve aralıklı kalori kısıtlaması (ICR) şeklinde iki kalori kısıtlaması (CR) türü mevcuttur. ICR, belirli zaman dilimlerinde CR'nin uygulanması şeklinde ifade edilmektedir. ICR, kimi bireylerde daha uygun olabilecek kilo vermek için alternatif bir tutum olarak, kilo vermek için CCR daha iyi olama dahi, ona eşdeğeri olduğu belirtilmektedir [55]. Pek çok çalışmada, ICR'nin kronik hastalıkların bir belirtisi olan insuline karşı duyarlılık, artmış yoğun lipoprotein kolesterolü ve yağ oksidasyonu gibi vakaları iyileştirdiğı gözlemlenmiştir [58]. Genetik olarak programlanmış hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilen CR araştırmalarında, ICR'nin CCR'ya oranla kanser oluşumunu engellemede daha etkili olduğu pek çok çalışma tarafından bildirilmiştir [59]. Bunun aksi yönde sonuçlar bulan çalışmalar da literatürde mevcuttur [55,60].

Kalori kısıtlamasının ömür süresi, yaşlanma, immun sistem, kanser, insulin direnci, oksidatif stres, metabolik pek çok hormon (Leptin, Adinopektin, Ghrelin, İnsulin) ve birtakım sinyal yolları gibi birden fazla metabolik süreç üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir [57].



Şekil 2.2 Kalori kısıtlamasının etkileri

2.2.1 Kalori Kısıtlamasının Etkileri

CR'nin konusu üzerine yapılan araştırmalar sonucu ömür süresin üzerine pozitif yönde etkileri olduğu bildirilmiştir. Küçük kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar CR'nin ömür süresi ve ölüm üzerindeki etkileri, kısıtlamanın seviyesiyle ortalama ömrün en fazlası ve maksimum ömrün hangi seviyede arttığı arasında doğrusal bir bağlantı olduğu belirtilmektedir [57]. İlerleyen yaşlarda CR'nin uygulanmasının başlatılması, ömür süresinin üzerinde yine de önemli derecede etkileri bulunmaktadır. Ancak bunlar, erken evrede CR başlatıldığında belirlenen etkiye kıyasla daha azdır. Diğer taraftan CR artıkça ömür süresinin suresiz uzaması söz konusu değildir. Maksimum etki, %55-60 CR ile kendini göstermektedir. Bu orandan daha fazla CR'nin ömür süresini negatif yönde etkilediği belirtilmektedir [55].

CR'nin ömür süresi ile ilişkisini elen alan Yu ve ark. yaptıkları bir çalışmada %40'lık kalori CR'nin 6 aylık Fischer-344 (F344) sıçanlarının ömür sürelerinde önemli artış olduğunu gözlemlemişlerdir [61]. Benzer şekilde, Weindruch ve Walford, yaptıkları çalışmada 12 aylık fare suşunda (C57BL/6 ve B10C310) %40 oranında CR'nin ömür süresinnde önemli derecede artışlar olduğunu bildirmişlerdir [49]. Pugh ve ark. yaptıkları çalışmada, 12 aylık dönemde tedavi edilen erkek C57BL/6 (B6) farelerde CR'nin ömür

süresi üzerindeki uzatma etkisini doğrulamış ve bununla beraber bu fareler kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, CR grubunda yer alan farelerin lenfoid kanserinin gelişmesinde önemli derecede azalmalar meydana geldiğini ve bunun sonucunda daha uzun bir yaşam sürdüklerini bildirmişlerdir [62]. Lee ve ark., 14 aylık erkek B6C3F1 farelerinde %40 oranında uyguladıkları CR'nin yavaş yaşlanmayı belirleyen bir gen ekspresyon profili meydana geldiğini teyit etmişlerdir. Bununla birlikte, fareler arasında genotiplerin aynı olanların CR düzeyinde farklı oranlarda tepki verdiği gözlemlenmiştir [63].

CR'nin bağışıklık sistemini güçlendirdiğini ve böylece kanser yakalanma riski ve otoimmün hastalık sayısının azaldığı gözlemlenmiştir [57]. Ayrıca, CR'nin makrofaj işlevi üzerine de çok fazla etkisi bulunmaktadır. 8-12 hafta boyunca %50'lik CR uygulanan sıçanlarda, kan monositlerinin H_2O_2 oluşturulmasında %75'lik oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Prostaglandin üretiminde periton makrofajları tarafından da önemli derecede bir artış gözlemlenmiştir [64]. Azalan oksidatif stresin bu etkisi, immün sistemin bir etkisi olduğunu göstermektedir. Genel olarak, CR'nin immün sistem üzerindeki etkileri farklılık göstermekte olup, CR'nin bu süreçteki etkileri pek çok durumdan kaynaklandığı belirtilmektedir.

Oksidatif stres, serbest radikaller olarak adlandırılan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimiyle antioksidan savunma arasındaki dengede meydana gelen bozukluk olarak tanımlanır. ROT, normal hücresel metabolizmanın bir sonucu olup canlı organizmalar tarafından üretilmektedir [65]. Düşük ve orta konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre süreçlerinde çalışmaktadırlar. Fakat yüksek konsantrasyonlarda; lipidler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde negatif yönlü modifikasyonlar oluşturmaktadırlar. Oksidan/antioksidanlar arasındaki dengede oksidanlar lehine kaymalar “oksidatif stres” olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif stres; kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, yüksek tansiyon, iskemi/perfüzyon, şeker hastalığı, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiopatik pulmoner fibrozis, kronik obstruktif akciğer rahatsızlığı gibi pek çok patolojik durumun oluşma esnasında katkıda bulunmaktadır [65,66].

CR'nin temel hücresel etkilerinden bir tanesi oksidatif stresi mümkün olduğunca azaltmaktır. Örneğin, uzun süreli CR uygulanan sıçanlar yüzme egzersiziyle indüklenmiş oksidatif strese karşı, beyin, akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp de dahil olmak üzere pek çok dokuda korunabilmektedir. Yaşlanma ve CR'nin kreatin kinaz, glutamin sentetaz ve erkek ve dişi sıçanların serebellum, hipokampus ve korteks bölgelerinde protein karbonil

gelişimi üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan bir araştırmada, kreatin kinaz etkinliğinin beyin üç bölgesinde de neredeyse %30 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Fakat glutamin sentetaz etkinliği üzerine kayda değer bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Protein karbonil düzeyleri, bütün 3 beyin bölgesinde yaşla beraber önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir. CR, protein oksidasyonu ve kreatin kinaz aktivitesinde yaşla bağlantılı olarak azalma oranını düşürdüğü belirtilmiştir. Ayrıca glutamin sentetazın CR ile beslenen sıçanların beyindeki etkinliği normal beslenen genç sıçanların beyinlerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. CR bu sebeple yaşla ilişkili oksidatif stres seviyelerini düşürerek ve beyindeki protein hasarını azalttığı belirtilmektedir [55].

Azaltılmış oksidatif stres birden fazla farklı mekanizmayla sağlanabilmektedir. Bunlardan bir tanesi, oksijen serbest radikallerinin üretilmesinde bir azalma ve ROT' nin detoksifiye edildiği oranda bir artış ve bu nedenle oluşan hasarın oranında bir azalma şeklinde olabilmektedir. Bozulma ve onarma işlemlerinde, hasarın etkisini ortadan kaldırmak için bir regülasyona sebep olmaktadır. CR'nin oksidatif strese genel bir azalma meydana getirmek için çeşitli bileşenlerin ucunu modüle ettiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur.

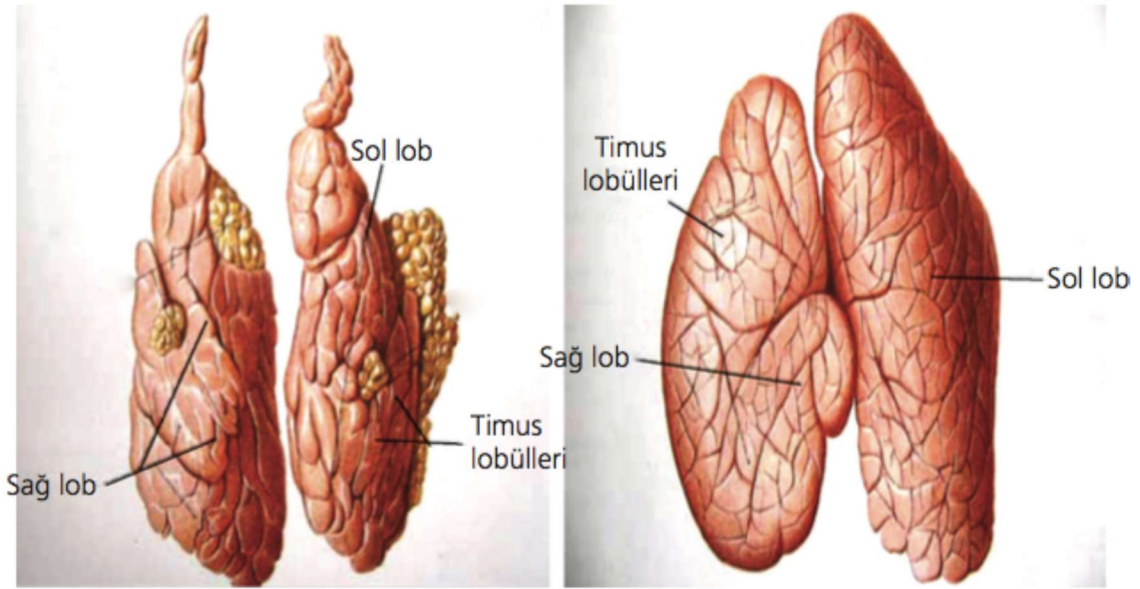
Adinopektin, Leptin, Ghrelin ve İnsulin benzeri büyüme faktörü (Igfl), gibi hormonların kanser oluşumu ve immunitede hayati roller oynadığı belirtilmiştir. Adinopektin, insulin hassaslığını başlatması açısından önemli bir hormondur, CR esnasında ekspresyonu artar. Leptin, stres hormonu seviyesini azaltırken, tiroid etkinliğini ve tiroid hormon seviyelerini yükseltmektedir [67]. CR, stres hormonlarının sekresyonunu artırıp ve tiroid hormonlarının da sekresyonunu azalttığından CR'de leptin ekspresyon seviyelerinde düşüş meydana gelmektedir. Ghrelin, proinflamatuvar sitokinleri azaltarak bağışıklık işlevlerini düzenlediği Ghrelinin CR ile birlikte sekresyonu artmaktadır. Igfl, CR ile bağlantısına bakıldığında ise literatürde bulunan pek çok CR'nin Igfl seviyesini düşürdüğünü bildirmekle beraber, CR'nin Igfl ekspresyon seviyelerinde herhangi bir artırma veya azaltma gibi bir etkisinin olmadığını savunan araştırmalar da bulunmaktadır [68].

2.4 Timus

Timus, Yunanca bir kelime olup kalp veya ruh manasına gelen “thymos” tan türetilmiştir. Eski Yunanlılar kurban yaptıkları hayvanların, kalbin üst tarafında, göğüsün boynu

kısmına kadar uzanan geniş bir doku kitlesi fark etmişiler ve buradaki kitlenin ruhun koltuğu olması gerektiği inancına varmışlardır. Bezin morfolojisini ilk defa Galen tarafından tanımlanmıştır [69]. 1950'lerde yapılan araştırmalarda, timusun lenfosit üretildiği yer olarak belirlenmiştir ve timus konusu üzerine araştırmalar artmaya başlamıştır [70]. Bununla beraber, immunologlar, hastalıklardaki periferik lenfositlerin kökenini ve fonksiyonunu anlamak için yaptıkları araştırmalarda timusun görevini bütünüyle ortaya konulmuştur [69].

İmmün sistemin gelişmesinde önemli organlarından bir tanesi olan timus, birincil lenfoid organlardan bir tanesidir. Timus, hem mezenkimal hem de endodermal kökenli bir organdır. Doğum öncesi ve sonrası kemik iliğinden köken alan T lenfositler timüse göçmektedir. Timüs, T hücrelerinin farklılaşarak olgun hale geldiği son kısımdır. T hücreleri lenfositlerin alt türlerinden biridir ve sonradan kazanılmış bağışıklık sistemi son derece önemlidir.



Şekil 2.3 Timusun yapısı [96]

Farelerin kullanıldığı bir CR modelinde, CR'nin timüsün yaşlanmasını geciktirdiği ispatlanmıştır. Yaşla beraber ortaya çıkan adipoz doku oluşumunu, adipogenez yolaklarını inhibe edip önlediği, timüsün korteks ve medullasında epitel doku yapısını muhafaza ettiği belirtilmiştir. Timüs ve öteki lenfoid organlar besin noksanlığına pek çok organdan daha hızlı şekilde tepki oluşturduğu belirtilmiştir [67]. Sağlıksız beslendiği belirlenen çocuklarda immün sistemin gelişemediği ve enfeksiyonlara daha duyarlı oldukları belirtilmiştir. Bununla beraber pek çok çalışmada, beslenme yetersizliği

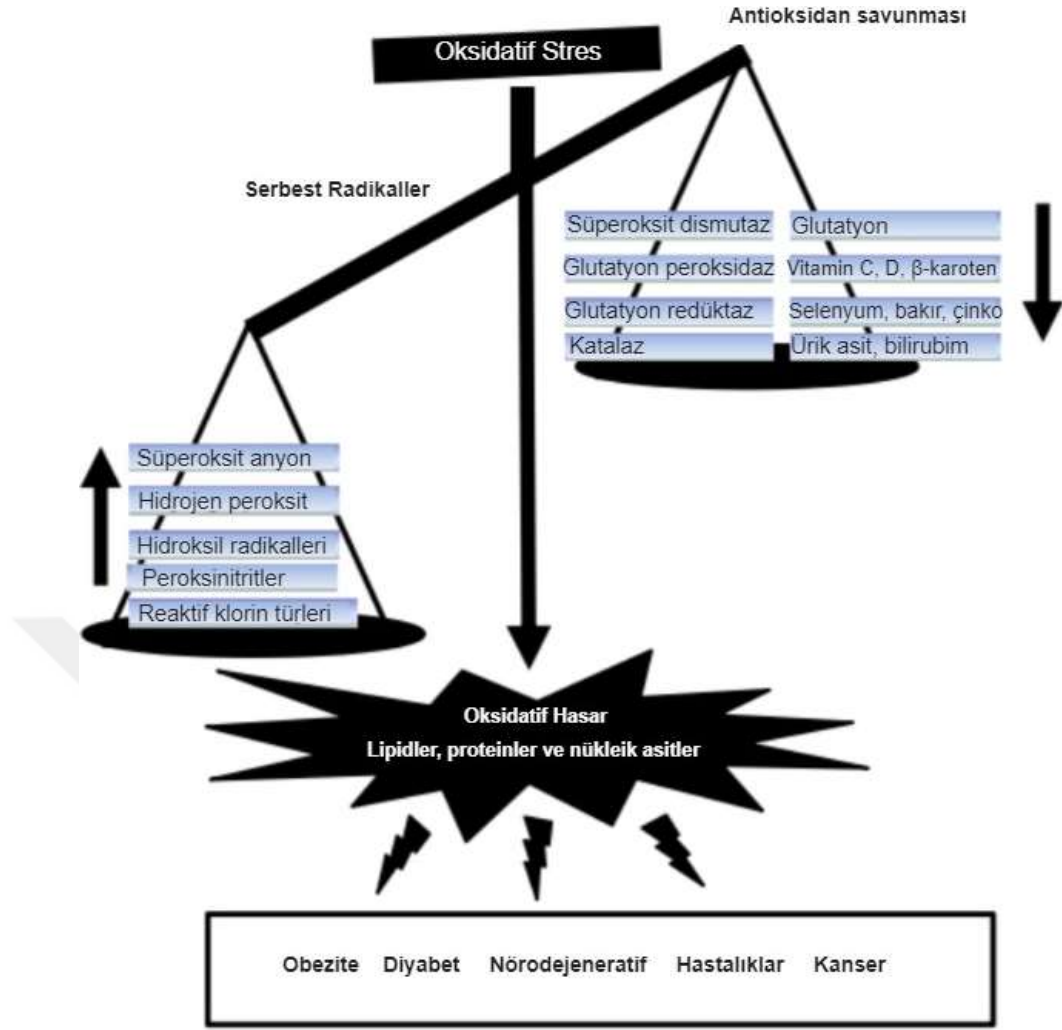
olmadan uygulanan CR'nin timüsün işlevlerini güçlendirdiği belirtilmiştir. Farelerde ve primatlarda, CR'nin T hücre işlevini ve repertuarını muhafaza ettiği belirtilmiştir. Doğal T hücrelerinin oluşumunu ya da korunmasını teşvik ettiği belirtilmiştir.

2.5 Oksidatif Stres (Proteozom)

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyesi normal fizyolojide antioksidan savunma sistemi ile düşük konsantrasyonlarda dengelenmektedir. Bununla birlikte, bazen ROT ve antioksidan savunma sistemi arasındaki denge bozulabilmektedir. ROT ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik çeşitli sebeplerden kaynaklanabilmektedir:

- Endojen ve ekzojen bileşiklerin neden olduğu artan ROT üretimi,
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların tüketimi,
- İnaktif antioksidan enzimler,
- Antioksidan seviyesini azaltmak, oksidatif stres, arasındaki dengenin bozulduğu bir durumdur.

ROT ve antioksidanlar önemli biyomoleküllere zarar vermektedir [71]. Artan ROT seviyesinin sonuçları, ROT üretiminin seviyesine ve yerine, antioksidan sistemlerin ve reaksiyona girdikleri biyomoleküllerin etkinliğine bağlı olarak değişmektedir. Aşırı ROT üretimi, lipitler, proteinler ve DNA'da anormal fonksiyonlara neden olduğundan zararlı olabilmektedir. Bu nedenle, oksidatif stresin kanser ve yaşlanma gibi birçok patofizyolojik koşulda rol oynadığı belirtilmektedir [29,72]. Canlı organizmalar için, ROT'un faydalı rollerini kullanabilmek için ROT seviyesini dengelemek son derece önem taşımaktadır. Bu denge “redoks düzenlemesi” adı verilen mekanizmalarla korunmaktadır [73]. Kanser ayırt edici özellikleri göz önüne alındığında, RAS, PI3K, AKT/PKB ve HER2 gibi çeşitli genlerdeki mutasyonların yanı sıra p53, RB ve ATM gibi genlerdeki mutasyonlar redoks regülasyonunda dağılıma neden olmaktadır. Bu nedenle, oluşan redoks durumu apoptozu inhibe eder ve proliferasyon, anjiyogenez ve metastaza yol açmaktadır. Hep birlikte alındığında, tümör oluşumu için redoks homeostazı ve sinyalizasyon gerekmektedir [29,74].

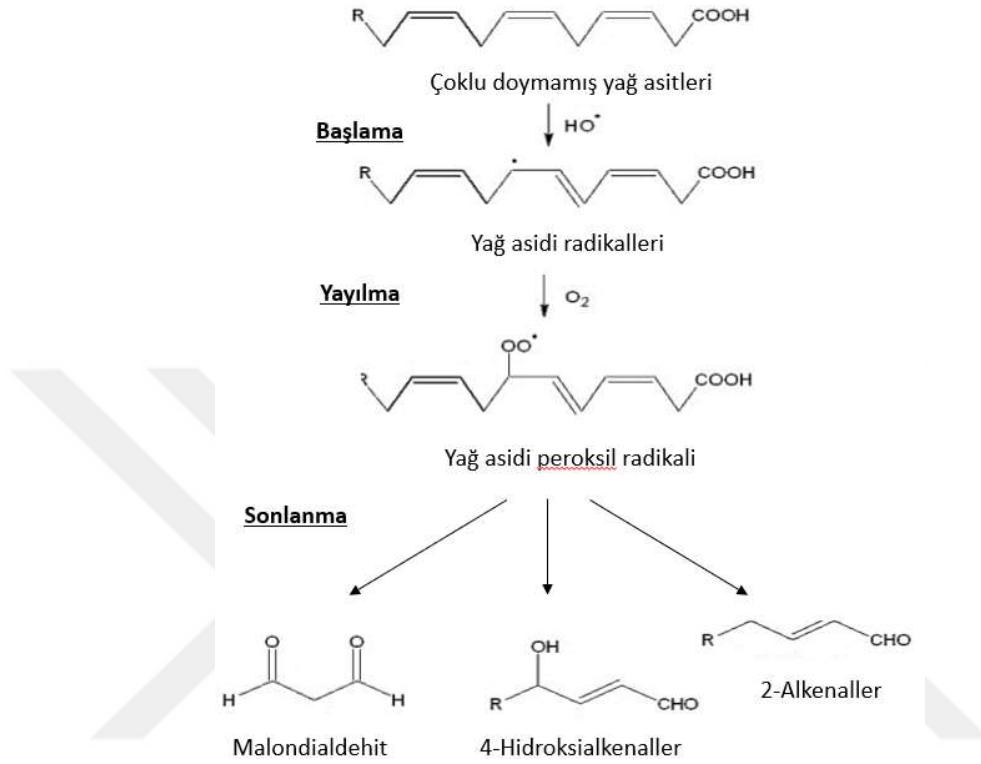


Şekil 2.4 Oksidatif stresin şematik sunumu [75]

2.5.1 Lipid Hasarı

Membran lipitlerinin ROT saldırısına en duyarlı kısmı, bol miktarda çift bağın bulunduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin bulunduğu kısımdır. Lipid peroksidasyonu, ROT'un lipitler içinde çoklu doymamış yağ asitlerine saldırdığı çok adımlı bir süreçten meydana gelmektedir [29,76]. Lipid peroksidasyonu; başlatma, yayılma ve sonlandırma olmak üzere üç adımdan oluşmaktadır [64]. Başlatma adımı ROT, OH radikalleri gibi karbon merkezli lipit radikalini ($L^{\cdot}$) oluşturan hidrojeni soyutlar. Yayılma aşamasında, $L^{\cdot}$, bir lipit peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) oluşturan O_2 ile reaksiyona girerek başka bir lipitten yeni bir $L^{\cdot}$ ve lipit hidroperoksit ($LOOH$) oluşumuna neden olan bir hidrojeni soyutlar. Yeni bir $L^{\cdot}$ üretimi, başka bir $L^{\cdot}$ oluşturduğu için zincir reaksiyonunu sürdürür. Sonlandırma adımı, E vitamini gibi antioksidanlar $LOO^{\cdot}$ 'ya bir hidrojen atomu verir ve daha sonra radikal olmayan ürünler oluşturan başka bir $LOO^{\cdot}$ ile reaksiyona girebilen bir E vitamini

radikali oluşturur. Lipid hidroperoksitler (LOOH), lipid peroksidasyonunun birincil ürünleri olup, malondialdehit (MDA) ve 4 hidroksinonenal (4-HNE), lipid peroksidasyonunun ikincil ürünleri olarak oluşmaktadır [77].



Şekil 2.5 Lipid peroksidasyon süreci

MDA, araşidonik asit ve poli doymamış yağ asitlerinden (PUFAs) enzimatik veya enzimatik olmayan işlemler yoluyla ikincil bir yan ürün olarak üretilmektedir. MDA enzimatik olarak metabolize edilebilir. Bununla birlikte, bazı durumlarda MDA, biyolojik hasarlara neden olan protein veya DNA ile eklentiler yapabilmektedir. Histidin, lizin ve arginin gibi bazik amino asitler, MDA'nın elektrofilikliği nedeniyle MDA'ya karşı savunmasız durumdadır [29]. Schiff bazlı eklentiler, gelişmiş lipid peroksidasyon nihai ürünleri (ALEs) olarak da adlandırılan MDA ve serbest amino asitler arasındaki bu reaksiyonlardan üretilir. MDA ayrıca deoksiguanozin ve deoksiadenosine eklentiler oluşturmak için deoksiguanozin ve sitidin gibi nükleosidlerle reaksiyona girebilmektedir [29,78]. MDA, DNA hasarı ve mutasyonunun en önemli nedenlerinden bir tanesidir. MDA-DNA eklentileri, nükleotit eksizyon onarımı (NER) yolu ile onarılmaktadır. Bununla birlikte, MDA-DNA eklentileri onarım sistemi çalışmadığında iplik kopmalarına, nokta ve çerçeve kaydırma mutasyonlarına, hücre döngüsü durmasına ve

apoptozun indüksiyonuna neden olmaktadır. Örneğin, M1dG, insan ve kemirgen genomik DNA'sında bulunan guanine ekzosiklik bir katkı maddesidir. M1dG DNA replikasyonu sırasında yanlış kodlanır ve baz çifti değişimine ve çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmaktadır. MDA-DNA eklentilerinin sebep olduğu bu değişiklikler kansere ve diğer genetik hastalıklara yol açabilmektedir [79]. MDA, görselleştirmeyi mümkün kılan tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girme kabiliyeti nedeniyle lipid peroksidasyonunun biyobelirteçidir [29,80].

2.5.2 Protein Hasarı

ROT, amino asit oksidasyonuna, peptit zinciri parçalanmasına ve proteinlerin çapraz bağlanmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, bu değişiklikler proteinlerin proteazlar tarafından bozulmasına neden olabilmektedir [81]. Amino asit yan zincirleri, özellikle proteinlerin sistein ve metiyonin kalıntıları $O_2 \cdot^-$, $OH \cdot$ ve H_2O_2 gibi ROT'ne karşı daha savunmasızdırlar [82]. Bu kalıntılara yapılan ROT saldırısı sonucunda konformasyonel değişikliklere, proteinin açılmasına ve bozulmasına sebep olabilmektedir. Aktif bölgelerindeki metal içeren enzimler oksidasyona daha duyarlıdır. Oksitlendiğinde enzimler artık işlev göremez ve aktiviteleri inhibe edilmektedir [83]. ROT amino asitlere saldırdığında karbonil grupları üretilir. Proteinlerdeki karbonil grupları, ROT aracılı protein oksidasyonunun bir belirteci olarak gösterilmektedir [29]. Düşük protein karbonillerin seviyesi, Alzheimer hastalığı, diyabet ve yaşlanma gibi pek çok hastalıkta ilişkisinin olduğu belirtilmektedir [84,85].

2.5.3 DNA Hasarı

Aşırı ROT üretimi, nükleik asitlere zarar verebilmektedir. ROT, çeşitli değişikliklere sebep olan DNA'ya saldırısı nedeniyle mutajenik olarak bilinmektedir. DNA onarım sistemleri bir mutasyon replikasyon sırasında yanlış baz eşleşmesinden dolayı DNA'yı yenileyememektedir. ROT'un işlevlerinden bir tanesi de, DNA hasarının neden olduğu apoptozdur. ROT'un ayrıca mitokondriyal DNA hasarı nedeniyle yaşlanma sürecine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir [86]. Rot çoğunlukla mitokondride üretilmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal DNA, nükleer DNA'ya kıyasla ROT'un neden olduğu değişikliklere daha fazla maruz kalmaktadır. OH radikali, deoksiriboz şeker omurgası, pürin ve pirimidin bazları gibi DNA'nın tüm bileşenleri ile reaksiyona girme yeteneğine sahiptir. ROT saldırısı durumunda, değiştirilmiş pürin ve pirimidin baz yan ürünleri ve DNA-protein çapraz bağları üretilmektedir. $OH \cdot$ radikallerinin pirimidin saldırısı, timin glikol, urasil glikol ve 5-hidroksideoksi uridin gibi pirimidin eklentilerine sebep

olmaktadır. Pürine OH• radikal atakları gerçekleştiğinde 8-OHdG ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin oluşmaktadır. Bu eklentiler, genomda mismatch eşleşmelere ve nükleotid yer değiştirmelerine neden olur. Örneğin, 8-OHdG özellikleri nedeniyle mutajenez, karsinogenez ve yaşlanmaya sebep olur ve oksidatif DNA hasarının biyobelirteçlerinden bir tanesidir [29].

2.5.4 Oksidatif Stresin Kalori Kısıtlamasıyla İlişkisi

Oksidatif stres, yaşlanma ve nörogenez, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi yaşa bağlı hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik durumda görülebilmektedir. Ek olarak, çok sayıda araştırma, CR'nin kanser de dahil olmak üzere bu oksidatif stresle ilgili hastalıklara karşı korunmanın bir yöntemi olabileceğini ileri sürmüştür. CR'nin önleyici etkileri ile ilişkili olduğu savunulan üç mekanizma bulunmaktadır; CR, ROT oluşumunu azaltabilir, antioksidan savunma sistemini indükleyebilir veya oksitlenmiş makromoleküllerin miktarını artırabilmektedir. CR'nin genellikle oksidatif stresi inhibe ettiği ve antioksidan kapasiteyi arttırdığı bilinmesine rağmen, bu mekanizmalar son derece karmaşık ve birbiriyle ilişkilidir. Örneğin, CR bir antioksidan enzimin aktivitesini azaltabilir. Bununla birlikte, bu azalma azalan ROT seviyesiyle ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, CR'nin cinsiyet, tür, kullanılan doku türleri, incelenen ROT ve antioksidan türleri ve CR süresi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak oksidatif stres durumu üzerindeki etkileri de çalışmalarda irdelenmiştir.

MDA, lipitlere yapılan radikal saldırıdan sonra ikincil bir peroksidasyon yan ürünü olarak üretilir ve yaygın olarak Tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girme kabiliyeti nedeniyle bir lipit peroksidasyonunun biyobelirleyicisi olarak kullanılmaktadır [77]. Çok sayıda çalışma, farklı tip ve miktarda CR'nin MDA seviyesi üzerindeki etkisini bildirmiştir (Tablo 1). Farklı çalışmalardan elde edilen veriler, çeşitli kısıtlama protokolleri nedeniyle tutarlı değildir. Ayrıca, aynı CR oranını farklı uygulama süreleri olan farklı çalışmalar farklı sonuçlar bildirmiştir. Örneğin, Doguc ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışma, 10 hafta boyunca CR uygulanan sıçanların her birinde % 60'ında MDA seviyesinin azaldığı gözlemlenirken, Stankovic ve ark (2013) 5 hafta boyunca CR uygulanan sıçanların her birinde % 50-60 arasında MDA seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada CR uygulanan sıçanların %30-40'ında MDA seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir [87]. Al Safaei ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada ramazanda oruç tutan insanların MDA düzeyinin düştüğünü

bildirmişlerdir [88], BaHamam ve ark. ramazan oruç tutan insanların MDA seviyesinde her hangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir [89].

Tablo 2.1 Kalori kısıtlamasının MDA seviyesi üzerine etkileri

Parametre	Tür	Yaş	Cinsiyet	Değişiklik	Kaynak	Faktör
MDA	Sıçan	11 hafta	E		Hipokampal	AO(7 hafta)
MDA	İnsan	26.6±5yıl	E		Kan	Oruç
MDA	İnsan	55±5yıl	K/E		Serum	Oruç
MDA	Sıçan	5 ay	E		Eritrosit	%60'luk,CR (10 hafta)
MDA	Sıçan	15 hafta	E		Karaciğer	%60'luk,CR (5 hafta)
MDA	Sıçan	15 hafta	E		Karaciğer	%30-40 CR (5 hafta)
MDA	Sıçan	15 hafta	E		Karaciğer	%50-60 CR (5 hafta)
MDA	İnsan	50-70 yaş	E		Kan	IF(12 hafta)
MDA	Sıçan	21-23 hafta	E		Karaciğer	%40 CR (8-10 hafta)
MDA	Sıçan	10 hafta	E		Karaciğer	%50-60 CR (5 hafta)

AO: Aralıklı oruç, K:Kadın, E:Erkek, CR: Kalori kısıtlaması, MDA: Malondialdehit

Antioksidanlar serbest radikallere ve ROT'ine karşı detoksifikasyon sistemi görevi görmektedir. Katalaz, oksidatif hasara karşı ana savunma hatlarından bir tanesidir. Çok sayıda çalışma, farklı tipte ve miktarlarda CR'nin katalaz aktivite seviyesi üzerindeki etkisini incelemiştir. MDA seviyesine benzer şekilde, CR'nin katalaz aktivitesi üzerine etkilerine ilişkin veriler de çeşitli kısıtlama protokolleri nedeniyle tutarlı değildir. Bu çalışmalarda ise irdelenen doku ve kullanılan türler farklılık göstermektedir. Örneğin, 6 ay boyunca CR uygulanan bireylerin %30'unun karaciğerinde katalaz aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir [90]. Benzer şekilde, başka bir çalışmada, 17 hafta boyunca CR uygulanan sıçanların %30'unda katalaz aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir [91].

Süperoksit dismutaz (SOD), antioksidan savunma sisteminin bir parçası olan başka bir enzimdir. Çok sayıda çalışma, farklı tip ve miktarlardaki CR'nin SOD aktivite seviyesi üzerindeki etkisini bildirmiştir. CR'nin etkilerini gösteren SOD aktivitesine ilişkin veriler, çeşitli kısıtlama protokolleri nedeniyle tutarlı değildir. Örneğin, Doguc ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada, 10 hafta boyunca CR uygulanan sıçanların % 60'unda eritrositlerinde SOD aktivitesinin arttığını bildirirken Stankovic ve ark yaptıkları bir çalışmada beş hafta boyunca CR uygulanan farelerin % 50-60'ında karaciğerde SOD aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir [87]. Farelere başka bir gün oruç

uygulandığında IF etkilerinin normal beslenen farelere kıyasla böbrekteki SOD aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. CR'nin SOD aktivitesi üzerinde değişken etkileri bulunmaktadır. Bu farklılıklar incelenen doku ve kullanılan türlerdeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır [29].

Glutasyon bir tripeptit ve en önemli antioksidanlardan bir tanesidir. Çok sayıda çalışma, farklı tip ve miktarlardaki CR'nin GSH seviyesi üzerindeki etkisini bildirmiştir CR'nin glutasyon üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaların verileri, çeşitli kısıtlama protokolleri nedeniyle tutarlı değildir. Bununla birlikte, çalışmaların çoğu CR uygulaması nedeniyle önemli bir değişiklik göstermemektedir. Örneğin, Doguc ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada, 10 hafta boyunca CR uygulanan sıçanların % 60'ında Glutasyon düzeylerinde eritrositlerde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirilmişlerdir. Stankovic ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada karaciğer örneklerinde beş hafta boyunca CR uygulanan şıçanların %50-60'ında Glutasyon seviyesindeki eritrositlerde anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir [87].

2.6 Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROT), canlı organizmalarda serbest radikaller üretme yeteneğine sahip olan ve serbest radikaller ve radikal olmayan moleküller içeren genel bir kavramdır [92]. Normalde, O₂ tüketiminin %90'ından fazlası herhangi bir ROT üretimi olmaksızın elektrotranspor zincirinde suya dönüştürülmektedir [93]. Bununla birlikte, O₂ tüketiminin %10'u O₂'yi O₂•⁻radikaline dönüştürmek için bir elektron indirgemesi ile azaltılır ve daha sonra SOD tarafından H₂O₂'ye dönüştürülmektedir. Bu dönüşümü takiben H₂O₂, Fe⁺²'den bir elektronun çıkarılması yoluyla Fenton reaksiyonu ile OH radikali oluşturur. OH radikali daha sonra proteinler ve lipitler gibi biyomoleküllerden bir elektronun çıkarılmasıyla nötralize edilmektedir [94]. Böylece, normal aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak ROT üretilir (Tablo 2.2). ROT düşük konsantrasyonlarda çeşitli fizyolojik koşullarda pek çok hayati role sahiptir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonda canlı organizmalardaki biyolojik moleküllere zarar vermektedir. ROT türleri Tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 ROT türleri ve özellikleri

İsim	Formül	Özellikleri
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Serbest radikal, son derece kararsız, sinyal fonksiyonu
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Hücre toksisitesi, sinyal fonksiyonu, diğer ROT üretimi
Hidroksil radikali	$OH^{\bullet}$	Serbest radikal, son derece kararsız, çok reaktif ajan
Peroksil radikali	$ROO^{\bullet}$	Serbest radikal, lipid peroksidasyon ürünü
Tekli Oksijen	O_2	İndüklenmiş/uyarılmış oksijen molekülü, radikal ve radikal olmayan formu
Ozon	O_3	Çevresel toksin
Nitrik oksit	NO	Çevresel toksin, endojen sinyal molekülü
Peroksinitritin	$ONOO^{\bullet -}$	Süperoksit ve nitrik oksidin yüksek derecede reaktif reaksiyon ara maddesi
Nitrojen dioksit	NO_2	Yüksek derecede reaktif radikal, çevresel toksin

2.6.1 ROT Kaynakları

2.6.1.1 Endojen Kaynaklar

ROT, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlarla üretilmektedir. Endojen ROT üretimi esas olarak mitokondri, plazma zarı, endoplazmik retikulum ve peroksizomlarda yapılmaktadır. Ek olarak, ROT üretiminin en yüksek yapıldığı ana organel mitokondridir. Böylece mitokondriyal O_2 tüketiminin %1 kadarının elektron taşıma zincirinde Kompleks 1 ve 3'ten $O_2^{\bullet -}$ radikali üretmek için kullanılması önerilmektedir [73] $O_2^{\bullet -}$ radikalinin üretimi mitokondriden enzimatik değildir, ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, peroksidazlar, p66shc ve monoamino oksidaz gibi enzimatik yollar mitokondride ROT oluşumuna etki etmektedir. Örneğin, oksidatif stres oluştuğunda, p66Shc, ROT üretmek için sitokrom-c ile etkileşime girebilmek için mitokondrinin iç boşluğuna translokasyon gerçekleştirmektedir [95]. Peroksizomlar, ROT üretebilen başka bir organeldir. Elektronlar, peroksizomlarda H_2O_2 oluşturmak için farklı metabolitlerden O_2 'ye aktarılmaktadır. Peroksizomlarda $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$ ve $NO^{\bullet}$ te üretilmektedir. Endoplazmik retikulumda bulunan p-450 ve diamin oksidaz da ROT üretebilebilmektedir [29].

2.6.1.2 Eksojen Kaynaklar

Sigara dumanı, ozon maruziyeti, hiperoksi, iyonlaştırıcı radyasyon ve metal iyonları eksojen ROT kaynakları arasında yer almaktadır. Sigara dumanı, $O_2^{\bullet -}$ ve $NO^{\bullet}$ dahil olmak üzere birçok oksidan ve serbest radikal içermektedir.80 Lipid peroksidasyon, ozon maruz bırakılarak tetiklenebilir [96]. Ultraviyole A (UVA) fotonları porfirin ve NADPH

oksidazın uyarılmasıyla oksidatif hasara yol açmaktadır. 8-OHdG, OH• radikalının guanine saldırısıyla DNA'ya UVA ile ilişkili oksidatif hasarın ana ürünlerini oluşturur. Demir, bakır ve arsenik dahil ağır metal iyonları ROT üretimini tetikleyerek lipitler, proteinler ve DNA üzerinde zararlı etkilere neden olabilmektedir [29,97].

2.6.2 ROT Özellikleri

2.6.2.1 Süperoksitler

O₂•⁻ hem enzimatik hem de enzimatik olmayan işlemle üretilen en güçlü ROT olarak bilinmektedir. O₂•⁻ radikali O₂'ye bir elektron eklenerek üretilir. O₂•⁻ üretiminin birincil kaynağı mitokondridir [67].

O₂•⁻ üretimi genellikle elektronların bol miktarda bulunduğu mitokondrilerin iç zarında yapılmaktadır [86]. Aerobik yaşamın bir sonucu olarak, elektronlar mitokondride elektron taşıma zinciri yoluyla taşınır ve O₂'nin suya indirgenmesiyle sonuçlanmaktadır. Ancak, tüm elektronların yaklaşık % 1-3 elektron taşıma zincirinden kaçır ve bunun sonucunda O₂•⁻ üretilir [83]. Diğer serbest radikallerle karşılaştırıldığında, O₂•⁻ radikali yüksek derecede reaktif olmadığından membranlara nüfuz etme yeteneğine sahip değildir. İki tane O₂•⁻ radikali H₂O₂ üretmek için birbirleriyle reaksiyona girebilmektedir. Bu dismutasyon reaksiyonunda, bir radikal O₂'ye oksitlenirken diğeri H₂O₂'ye indirgenir. H₂O₂, süperoksit'e kıyasla daha karardır ve etkisini büyük ölçüde göstermek için membranlara nüfuz edebilmektedir [29].

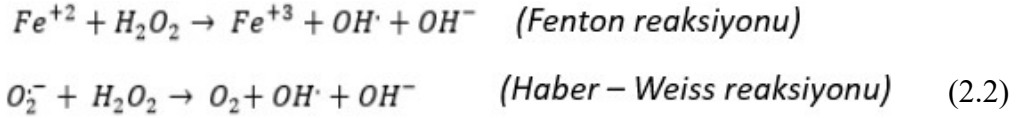
2.6.2.2 Hidrojen Peroksit

H₂O₂ eşleştirilmemiş elektron içermez, ancak HOCl ve OH gibi daha reaktif radikallerin üretimini tetikleme yeteneğinden dolayı ROT terimine dahil edilmektedir. H₂O₂, O₂•⁻ enziminin SOD enzimi tarafından katalizlenmesinden oluşmaktadır. Biyolojik zarlardan geçme yeteneklerinden dolayı hücreler için de son derece önemlidir. H₂O₂ DNA'nın kendisi direkt olarak ile reaksiyona girememektedir, ancak Fenton Reaksiyonu yoluyla hidroksil radikali üreterek DNA'ya zarar verebilmektedir [98]. H₂O₂ sadece zararlı etkilere sahip değildir, aynı zamanda hücre içi sinyal yollarında da önemli bir role sahiptir. H₂O₂, katalaz, glutatyon peroksidaz ve oksijene peroksiredoksinler ve iki su molekülü olan üç ana antioksidan tarafından katalizlenmektedir [99].

2.6.2.3 Hidroksiller

Tüm ROT arasında en reaktif olan ve biyomoleküllere en fazla zarar vereni OH• radikalidir. Ayrıca OH• radikali yaklaşık 10 saniyelik çok kısa bir yarılanma ömrüne

sahiptir. OH• radikali Fenton reaksiyonunda üretilmekte olup burada H₂O₂, Fe ve Cu varlığında katalize edilmektedir. Bu bağlamda, O₂ radikali metal iyonlarını geri dönüştürür ve iki reaksiyon kompleksine Haber-Weiss reaksiyonu adı verilmektedir. Bu nedenle geçiş metalleri OH• radikal üretimi kavramında hayati önem taşımaktadır [100]



Fe depolayan ferritin ve Cu taşıyan seruloplazmin gibi geçiş metalleri genellikle proteinlerle kompleks halinde bulunmaktadır. Aşırı miktarda süperoksit radikali, Fenton reaksiyonunda yer aldığında geçiş metallerinin salınmasına yol açmaktadır. OH• radikali DNA, lipitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi hücrelerde bulunan her biyomolekülle reaksiyona girebilmektedir [101].

2.6.3 ROT'un Fizyolojik Stres Üzerine Etkileri

Düşük konsantrasyonlardaki ROT, oksijen konsantrasyonu, hücre adezyonu ve apoptoz, hücrel sinyalleşme, transkripsiyon faktörü aktivitesinin redoks regülasyonu, NO üretimi ve vasküler regülasyon gibi çeşitli fizyolojik süreçler için gereklidir [73].

2.6.3.1 İmmün Sistem Üzerine Etkileri

ROT, bakterileri öldürmek için aktive olduklarında fagositlerden üretilirler. NADPH kompleksi oksijenin O₂•⁻ radikaline dönüştürüldüğü fagositlerde ROT üretiminden sorumludur [102]. Üretimi takiben O₂•⁻ radikali SOD ile H₂O₂ arasında dismutazlanır. Daha sonra H₂O₂ miyeloperoksidaz tarafından HOCl'ye dönüştürülür. Daha sonra ise HOCl'den OH• radikali oluşturulur. OH• radikal ve HOCl bakteriler için son derece toksiktir, bu nedenle ROT antimikrobiyal etkilerini doğrudan göstermektedir. HOCl ayrıca bakterilerin DNA replikasyonunu inhibe ederek savunma sisteminde hayati bir rol oynamaktadır [103].

2.6.3.2 Redox Regülasyonu Üzerindeki Etkileri

ROT, protein ve glutatyonun tiyol gruplarını oksitleme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, ROT bu proteinlerin konfigürasyonunu ve fonksiyonunu etkilemektedir. Protein kinaz C, kollajenaz ve tirozin kinazlar gibi sinyalizasyon ve karsinogenezde önemli olan bazı proteinler, ROT 'un neden olduğu bu oksidasyondan etkilenebilir [75]. Ek olarak, ROT sistein kalıntıları oksitleyerek AP-1 ve DNA etkileşimini azaltabilmektedir [104].

2.6.3.3 Yaşlanma Üzerine Etkileri

Yaşlanma, fizyolojik ve fonksiyonel kapasiteyi azaltan zamana bağlı çeşitli değişikliklerin meydana geldiği fizyolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır. mTOR ve AMP ile aktive edilen kinaz (AMPK) gibi çeşitli faktörlerin yaşlanma sürecinin düzenlenmesinde rollerinin bulunduğu bildirilmiştir [105]. mTOR ve AMPK hem fizyolojik hem de hastalık koşullarında ROT tarafından düzenlenmektedir. ROT'un yaşa bağımlı hasara karşı stres yanıtına aracılık eden yaşlanma sürecini modüle ettiği ileri sürülmüştür [106]. Mitokondri tarafından artan ROT üretimi ve mitokondri DNA'sındaki (mtDNA) artmış 8-okso-dG içeriği yaşlı dokularda sıklıkla tespit edilir, bu da ilerleyen oksidatif DNA hasar birikiminin yaşlanmada kritik bir faktör olduğunu göstermektedir [107]

2.7. Antioksidanlar

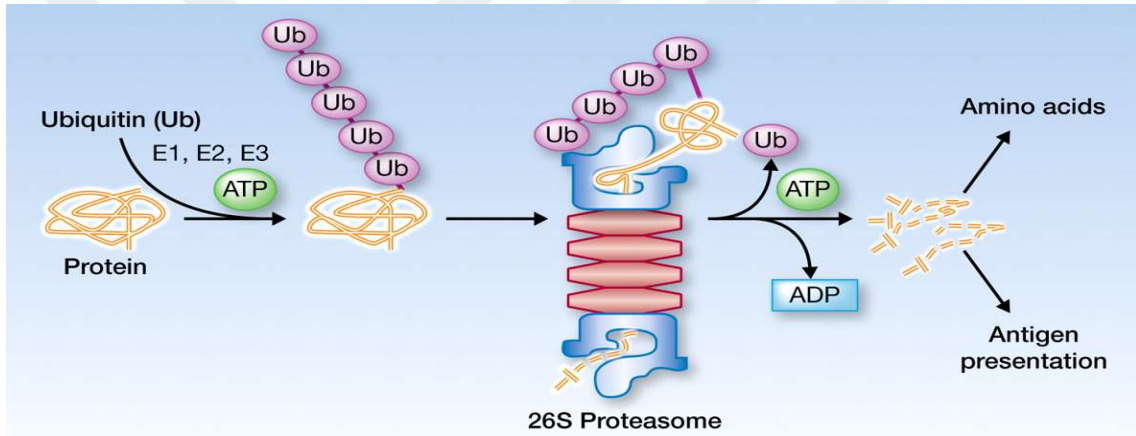
ROT homeostazı aerobik yaşamda çok önemlidir. Bu nedenle, önleme, müdahale ve onarım mekanizmalarını içeren bir savunma mekanizması geliştirilmiştir. Antioksidanlar biyolojik moleküllerde oksidatif hasarı geciktirebilecek ve önleyebilecek maddeler olarak adlandırılmaktadır. Önleme seviyesinde antioksidanlar ROT üretimini düşük konsantrasyonlarda tutar, müdahale seviyesinde ise antioksidanlar ROT'ni temizler ve son olarak onarım seviyesinde antioksidanlar ROT'nin neden olduğu hasarlı moleküllerin onarılmasında yardımcı olmaktadır. Antioksidan savunma mekanizmasının ilkeleri aşağıdaki ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. İlk olarak, ROT'ni temizlemek için SOD veya katalaz gibi enzimler kullanılabilir. Elektron taşıma zincirinden elektron kaçıışı ile ROT'nin üretimini kontrol altında tutabilme yeteneğine sahiptirler. Demir ve bakır iyonları gibi oksidanlar ferrinler, albümin ve hemoksazazlar tarafından minimum seviyede tutulur. Antioksidan savunma mekanizmaları ayrıca DNA'yı koruyan şaperon proteinlerini de içermektedir. Ayrıca, biyomoleküllere karşı saldırılarını durdurmak için ROT ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip olan glutatyon, ürat, albümin, α -tokoferol ve askorbat gibi bazı ajanlar da bulunmaktadır [108].

Özetlemek gerekirse, antioksidan mekanizma iki farklı şekilde çalışmaktadır. Bunlardan biri, bir elektronun serbest radikale (C vitamini, E ve karotenoidler) verilmesiyle ROT'nin bir antioksidan tarafından stabilize edildiği veya zararsız bir ürüne ayrıldığı zincir kırılmasıdır. Antioksidanlar ayrıca geçiş metal iyonlarını veya serbest radikallerin klerensini stabilize ederek önleyici bir şekilde çalışmaktadırlar. Antioksidan savunma

sistemi doku tipine, hücre tipine ve organellere bağlı olarak çalışmaktadır. Antioksidanlar başlıca enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar [98].

2.8 Otofaji

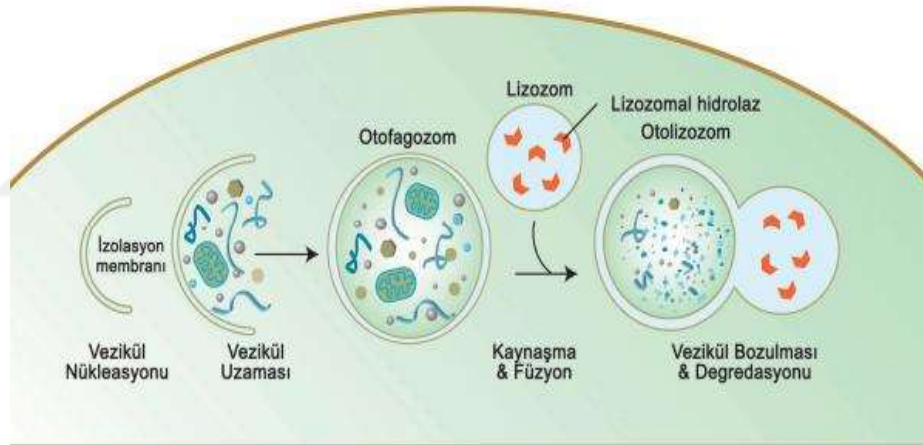
Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara gönderilmesi ve lizozomla bir araya gelerek parçalanmasına sebep olan bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır [109]. Kısa ömürlü proteinler ubiquitin-proteozom sisteminde parçalara ayrılmasına rağmen, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi vasıtasıyla parçalara ayrılır ve meydana gelen yapı taşları (örn. aminoasitler) hücrenin kullanımı için tekrardan kazanımını sağlarlar.



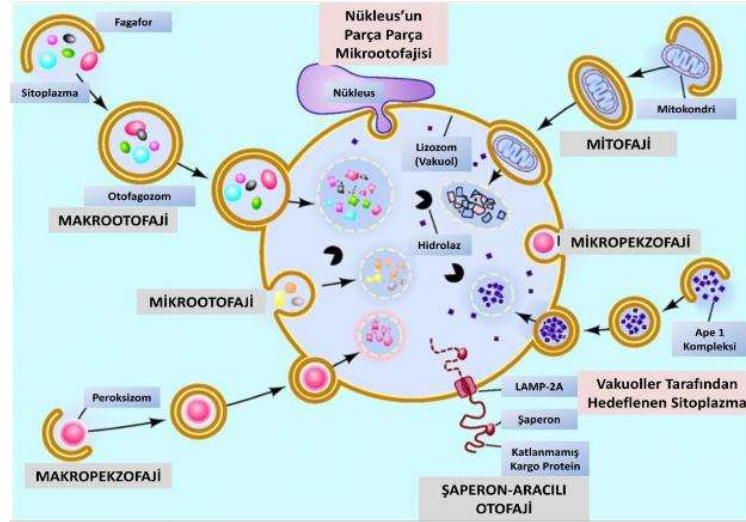
Şekil 2.6 Ubikuitin-proteozom yolağı ile protein yıkımı [110]

Otofajinin, kelime manası kendi kendini (auto) yeme (phagy) olarak tanımlanır ve hücrenin açlıkla karşılaşması karşısında kaldığı fizyolojik şartlarda, besin temin edebilmek için hücre içerisindeki yapıların ne şekilde parçalandığını ifade etmek hedefiyle kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan ilk araştırmalarda otofajinin, besin eksikliğinde hücre içi moleküllerin tekrardan kazanımını sağlayarak hücrenin stres şartlarına uyumunu kolaylaştırdığı böylece hücre homeostazisinin korunmasında etkin şekilde yol oynayan bir yol olduğu saptanmıştır [111]. Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar ise otofajinin; metabolizmanın regülasyonu, morfogenezis, hücrenin farklılaşması, yaşlanma, hücrenin ölümü ve bağışıklık sisteminin bir elemanı olarak hücre içi patojenlerin parçalanmasında da etkin bir rol aldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte araştırmalar, otofaji değişimlerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hayati sağlık problemlerinin de sebepleri içerisinde yer aldığını belirtmektedir [109,111].

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılıklı otofaji olarak üç ayrı mekanizma ile meydana gelmektedir [112]. Her üç otofaji tipinde de sitosolik bileşenlerin lizozomlarda proteolitik parçalanması gerçekleşmektedir. Makrotofaji hücrede bazal seviyede meydana gelmektedir. Protein parçalarının ve hasara uğramış organellerin parçalara ayrılmasında hayati roller oynamaktadır. Sitoplazmik kargonun lizozomlara çift zarlı yapıdaki otofagozomlar ile taşınması ve otofagozomun, lizozomlar ile füzyonu sonucunda otolizozomlar oluşur [113]. Mikrotofajide, sitosolik bileşenlerin lizozomların iç kısmına direkt olarak lizozomun invajinasyonula alınmasıyla gerçekleşmektedir. Hem makrotofaji hem de mikrotofajide, büyük yapıların seçici ya da seçici olmayan mekanizmalar ile alınması olabilmektedir. Şaperon-aracılı otofajide, KFERQ motifine sahip hedef proteinler, lizozomal zara şaperon protein kompleksi (Hsc-70) ile transloke olmaktadır. Bunlar lizozomal zar reseptörü olan lizozom ile ilgili zar proteini 2A (LAMP-2A) tarafından tanınır ve degradasyonları gerçekleşir [112].

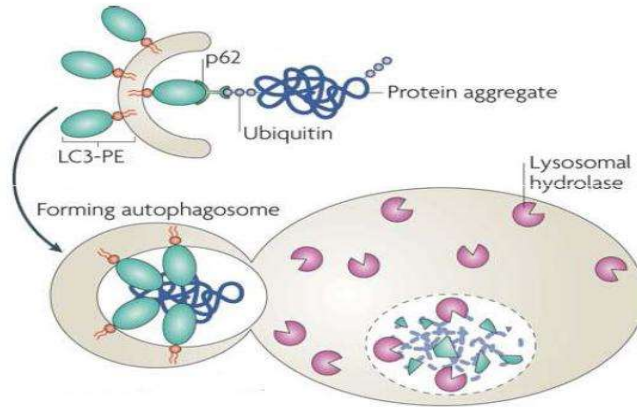


Şekil 2.7 Otofajinin aşamaları [114]



Şekil 2.8 Otofaji çeşitleri [115]

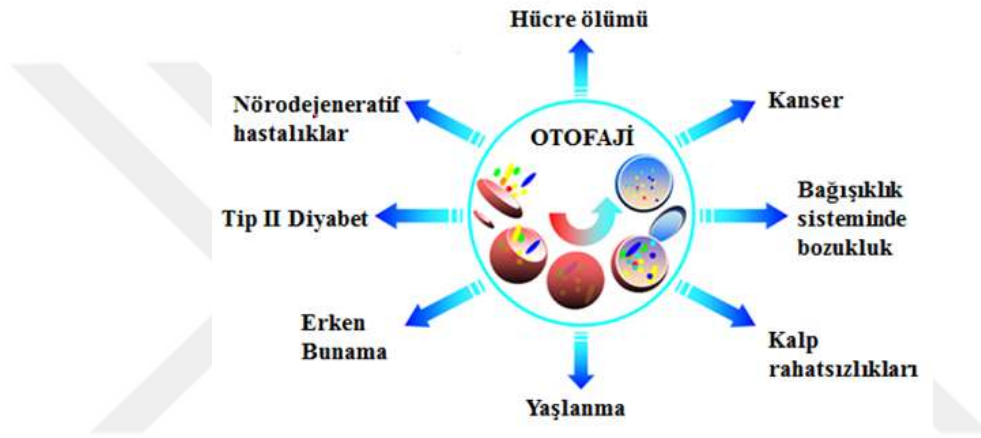
Otofaji mekanizmalarında rol alan proteinlerin büyük çoğunluğu “otofaji ile ilgili proteinler” (Autophagy-related proteins) veya özetle Atg proteinleri mayalarda gerçekleştirilen araştırmaların sonucunda gösterilmiştir. Günümüzü kadar tanımlanan yaklaşık 35 otofaji proteininin, filogenetik geçişte öteki canlılarda da muhafaza edildiği belirtilmiştir [116]. Atg proteinlerinin bir bölümü ve öteki protein kompleksleri “otofajik kesecik” veya başka bir ifadeyle izolasyon membranının ve otofagozomun meydana gelmesinde rol oynadığı belirtilmektedir. Hücrede otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum (ER) ile Golgi arasına serpiştirilmiş olan yapılarda meydana gelmektedirler. İzolasyon membranının kaynağı net şekilde bilinmese de en fazla kabul gören modelde bunun yeni sentez edildiği ya da ER, mitokondri dış membranı ve plazma membranından kaynaklanabileceği görüşü savunulmaktadır [115].



Şekil 2.9 Otofagozom oluşumunda LC3-FE ve p62/SQSTM1 proteinlerinin konumlanması

2.9 Otofaji ve Kanser İlişkisi

Genel olarak bir hücrenin yaşamını sürdürme mekanizması olarak kabul gören otofaji bazal şartlar altında, hasara uğramış organelleri ve protein komplekslerini parçalayarak hücrel homeostazın korunmasında etkin şekilde rol almaktadır. Buna rağmen stres şartları altında otofaji, makromoleküllerden besin temin ederek, enerji üretir ve risk potansiyeline sahip olan elemanları elimine ederek hücrenin yaşamını sürdürmesini destekleyici sitoprotektif bir cevap sağlamaktadır. Otofajın işleyişindeki bozukluklar pek fizyolojik fonksiyonu etkilemektedir ve bu durumun nörodejeneratif bozukluklar, kanser benzeri pek çok sayıda hastalığa sebep olduğu belirtilmektedir.



Şekil 2.10 Otofajiye bağlı olarak ortaya çıkan patolojik sonuçlar [117].

Kanser araştırmalarında ulaşılan son bulgular bilhassa tümör oluşumunun erken evrelerinde otofajinin bir tümör baskılayıcı olarak görev yapabildiği belirtilmektedir. Aslında pek çok otofaji bağlantılı protein (Beclin1, ATG5, ATG4c, ATG7) tümör baskılayıcı olarak kabul edilmektedir. Bunların yanında birtakım destekleyici0 proteinlerin de (Bif1, UVRAG) bu nitelikte olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, pek çok onkosupresor proteinin (DAPK, PTEN, TSC1/2, p53, LKB1) otofajiyi tetiklediği bildirilmiştir. Buna ek olarak pek çok onkoproteinin ise (Bcl2, AKT, class 1 PI3K) otofajiyi olumsuz şekilde düzenlediği gözlemlenmiştir. Bunun tersine yerleşik tümörlerde, esas olarak yaşamını sürdürebilme mekanizması olan otofaji; hipoksi ve besin eksikliğiyle karakterize edilen sert şartlar altında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyici işlevler görmektedir [118]. Artan veriler, otofajinin genetik veya kimyasal bir araçla inhibisyonunun, apoptotik hücre ölümünü hızlandırdığı ve pek çok kanserde tümör hücrelerinin büyümesini engellediğini göstermiştir. Bunun yanı sıra

artmış otofaji, kanser hücrelerinde radyasyon ve kemoterapiye cevapta sık şekilde gözlemlenmektedir. Diğer taraftan, otofaji, birtakım kanser türlerinin tedaviye olan direncine artırdığını savunan çalışmalarda bulunmaktadır zira otofajinin inhibisyonu ile kemoterapi tedavisine karşı tümör hücrelerinin daha hassas hale geldiği ısıpatlanmıştır. Bu nednele, kemoterapiye ek olarak otofajinin inhibisyonu birtakım kanser türlerinin tedavi edilmesinde umut vaat eden bir strateji olarak görölmektedir [154].

2.10 Transkriptom

Genom elemanlarının işlevlerinin açığa çıkarılmasıyla hastalık ve oluşum süreçlerinin anlaşılabilmesi için, bir hücre ya da hücre grubunda yer alan bütün transkriptlerin bilgisine ulaşılması hedeflenen omiks teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. Bununla beraber, yalnızca mRNA, miRNA, ya da kodlanamayan RNA' ların hedefe konulduğu alt kümeleri de bulunmaktadır. Herhangi bir dönemde o hücrelerde aktif halde bulunan genleri yansıtmaktadır. Hücrelerin farklılaşması ve kanserleşme evrelerini araştırmak için kullanılmaktadır. Transkriptom çalışmalarda yüksek randımanlı neticelerin alındığı; Microarray ve RNA-seq olmak üzere iki esas uygulama bulunmaktadır: Mikroarray, hibritleşme reaksiyonuna dayalı olan ve epeyce eskidir fakat halen yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Örneğin DNA ile proplar hibritleşir ve ışımaya meydana gelir. Propların eldesi için ön bir sekans bilgisi gerektirmektedir. Daha güncel ve daha gelişmiş metot olarak RNA-seq kullanılmaktadır [156]. Bu çalışmada daha önce bölümümüzde yapılan RNA-seq datalarının sonuçları kullanılmıştır ve kullanılan RNA-seq dataları, Illumina HiSeq 400 sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

2.10.1 RNA Seq

RNA sekanslama, Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanıldığı bir uygulamadır. Mikroarray metodunun gerektirdiği ön dizi bilgisini gerektirmemektedir. Bu metotta, esas olarak direkt RNA üzerinden dizileme olmamaktadır. RNA tek zinciri yapısı itibarı ile, DNA ile kıyaslandığında daha kırılgan bir yapıdadır. Bu sebeple dizilemesi daha zahmetlidir. Ancak onu cDNA'ya dönüştürerek dizilemek mümkündür. RNA sekanslama, SNP'lerin tespit edilmesi, mutasyonların tespit edilmesi, alternatif uç birleştirme tespitini, post-translasyonel modifikasyonların tespit edilmesi, ekson sınırlarının belirlenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte çeşitli kantitatif ölçümler yapılarak, ekspresyon oranlarının farklı uygulama ve gruplara göre tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin farklı dozlardaki bir ilacın bir canlı üzerindeki etkisinin

araştırılması ya da beslenme sınırlandırılmasının genler üzerindeki etkisinin araştırılmasında, ekspresyon düzeylerinin ölçülmesini sağlayarak analiz gerçekleştirmeye olanak sağlamaktadır [55].

RNA dizileme; kütüphane hazırlama, sekanslama ve data analizi olmak üzere 3 ana aşamadan oluşmaktadır. Bu çalışmada kullanılan RNA-seq dataları, Illumina HiSeq 400 sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Dizilemeyle gen ekspresyon tayini, transkriptlerin birleştirilmesi sırasında her bölge için eşleşen okumanın hesaplanması ile yapılmaktadır [119]. Pek çok çalışmada esas hedef olan çeşitli oranlarda ekspresse olan genlerin (DEGs) analiz edilmesiyle, değişim gösteren şartlara göre hangi genin ekspresyonunun hangi düzeyde değişiklik gösterdiğini, farklılaşma gösteren şeyi ne olduğunu ortaya çıkarmaktır. Bununla beraber bu genlerin tespit edilmesiyle, genlerin ayrı kategorilerde sınıflandırılması ve böylelikle ifadesi değişmiş olan genlerin hangi sistemler üzerinde aktif şekilde rol oynadığının kapsamlı bir şekilde görülmesi sağlanmaktadır. Bu kategorizasyon için gen ontoloji (GO) analizi kullanılmaktadır [119].



Şekil 2.11 RNA-seq aşamaları

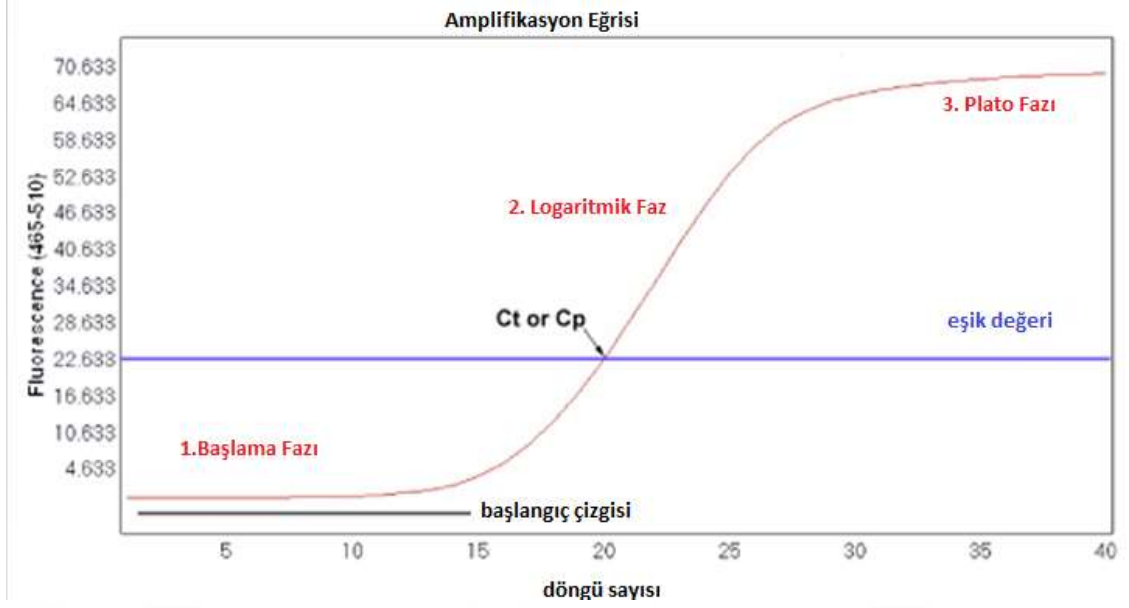
2.11 Real Time PCR

Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR), spesifik bazı sekansların çoğaltılması için kullanılan DNA replikasyonundan gelen bir reaksiyondur. Söz konusu reaksiyonun temel olarak üç aşaması bulunur. İlk olarak denatürasyon aşaması ile yüksek sıcaklıkta DNA'nın çift ipliğinin ayrılması sağlanır. Bağlanma aşamasında ise amplifiye edilmesi

planlanan bölgeye özgü spesifik primerler (Forward-Reverse) DNA'nın 3' ve 5' uçlarından bu zincirlere bağlanmaktadır. Bu bağlanma primerlerin T^m sıcaklığında gerçekleşir. Uzama aşamasında ise zincirlerin uzaması sağlanır ve bu 3 döngü 25-35 defa tekrarlanır. PCR reaksiyonun hedef örneğe, çalışmaya ve elde edilecek sonuçlara göre çok fazla çeşidi bulunmaktadır. Bu çeşitlerin bir türü olan Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR), PCR çoğaltımını anlık olarak görünür hale getirir. Bu amaçla floresan işaretli prob (Taqman) veya boyalar (Syber Green vb.) kullanılır. Uzama gerçekleştikçe ve DNA miktarı arttıkça floresan ışımda doğru orantılı olarak artar [120]. Birçok transkriptom analizi çalışmasında validasyonu yöntemi olarak kullanılır. Örneğin bir çalışmada, farelerde metastaz öncesi kanser oluşumu ve metastaza giden süreçleri incelemek amacıyla, meme ve akciğer kanseri hücre-hatlarından elde edilen RNA'ya, RNA-seq ile transkriptom analizi yapılmış, daha sonra elde edilen veriler RT-PCR ile valide edilmiştir [121].

RT-PCR'da kullanılan en temel beş saptama yöntemi vardır. Bunlar; moleküler boncuk yöntemi, hidroliz probu yöntemi (TaqMan Problemleri), "scorpion primeri", DNA ile birleşen boyaların, hibridizasyon probu yöntemidir. SYBR Green, DNA ile birleşen boyalardan biridir ve yeşil ışık yayar [122].

RT-PCR reaksiyonu da 3 aşamadan oluşmaktadır. 1. Aşamada mRNA'nın uçlarındaki dizilerden faydalanıp, viral bir enzim olan ters transkriptaz enzimi ile RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. 2. aşamada ise elde edilen cDNA'nın spesifik primerler ile amplifikasyonu gerçekleştirilir. 3. Aşamada ise kullanılan cihaz ile amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerin tespiti ve sayılması gerçekleşir. Bu süreçte, 3 ayrı faz görülür. İlk olarak birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün oluşmadığı arka plan fazı vardır. Daha sonra, logaritmik fazda ürün miktarı üslü şekilde artar. Son olarak, ekspanensiyel çoğalma olmayan reaksiyon ortamındaki enzim, primer ve nükleotidlerin tükendiği plato fazı gerçekleşir. Geleneksel PCR'nın aksine ölçüm plato fazından sonra değil, logaritmik faza göre yapılır. Böylece inhibitör miktarından, reaksiyon koşullarından ve amplifikasyon etkinliğinden daha az etkilenilir [122]



Şekil 2.12 Gerçek Zamanlı PCR fazları ve amplifikasyon eğrisi grafiği

Floresan ölçümler RT-PCR sırasında her döngünün sonunda gerçekleştirilir. Bu sayede amplifikasyonun logaritmik fazı tespit edilmiş olur. RT-PCR reaksiyonu için diğer bir önemli değer ise eşik değeridir. Her çoğalmanın başlangıçtaki hedef dizi sayısı farklıdır. Reaksiyon boyunca diziler çoğalır ve her çoğalmanın eşit sayıda ürün içerdiği döngü, reaksiyonun eşik değerinin ifade eder [122].

RT-PCR'da hücredeki miktarı bilinen, organizmanın her hücresinde eksprese olan ve hücrelerin temel fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gerekli olan "housekeeping genler" her çalışmada mutlaka standart olarak kullanılır. Bu genlerden, GAPDH, ACTB ve TBP genleri sıklıkla standart olarak kullanılan genlerdir [122].

3.1 Materyaller

3.1.1 Doku Materyalleri

Çalışmamızda, MMTV-TGF- α farelerinden temin edilen timüs dokusu kullanılmıştır. Buna göre, hayatlarının 10. haftasından itibaren üç beslenme grubu oluşturulan (AL, ICR, CCR) fareler ve 17-18. Haftalarda, 49-50. haftalarda ve 80-81. haftalarda sakrifiye edilmiştir. CCR, AL beslenmeden %15 kısıtlama ile olmuştur. ICR, açık periyotta AL beslenmeden %60 kısıtlama ile olmuştur.

3.2 Metot

3.2.1 Kullanılan Hayvan Modelleri

Yaptığımız çalışmada bölümümüzde daha önce yapılan çalışmadaki MMTV-TGF- α transgenik farelerinden elde edilen timüs dokuları kullanılmıştır. Bölümümüzde yapılan çalışmada önceden tanımlanmış büyüme protokolü esas alınarak fareler Yeditepe Üniversitesi Hayvan Tesislerinde yetiştirilmiştir. Bu protokole göre, yaşamlarının 10. haftasından itibaren 3 beslenme grubuna (AL, CCR, ICR) ayrılan fareler ve 17 ile 18. haftalarda 49 ile 50. haftalarda ve 80 ile 81. haftalarda sakrifiye edilmiştir. CCR, AL beslenmeden %15 kısıtlama ile olmuştur. ICR, açık periyotta AL beslenmeden %60 kısıtlama ile olmuştur. Diyet olarak Altromin TPF1414 kullanılmıştır. Söz konusu diyet Kobay A.Ş. (Ankara/ Türkiye) firmasından alınmıştır. Diyetin içerik ve bileşenleri Tablo 3.1’de belirtildiği gibidir. Farelerden alınan timüs dokusu RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2.1 Genlerin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılması planlanan genler RNA-seq datasında farklı ekspresyon veren genlerden seçilmiştir. Bu sisteme göre meme tümöründe, otofaji ve oksidatif strese etkili olan ve en fazla tekrarlayan mutasyona uğramış genlerden 17 gen seçilmiştir.

Tablo 3.1 Seçilen gen bölgeleri ve RT-PCR için kullanılacak olan forward ve reverse dizileri

Primer	Dizi (5' -> 3')	Tm Değeri [°C]
Adipoq-F	GCACGAGGGATGCTACTGTT	59,4
Adipoq-R	CACAAGTTCCTTGGGTGGA	59,4
Car3-F	TGCCGGGACTATTGGACCTA (20)	59,4
Car3-R	GCTCACAGTCATGGGCTCTT (20)	59,4
Casp3-F	AGCTTGGAACGGTACGCT	56,0
Casp3-R	AGATCCCAGAGTCCACTGAC	59,4
Cd36-F	CCTTTCTGCTATGTCTTAATGCAA (24)	57,6
Cd36-R	TCACTGTGTCTTACCCTGGAA (21)	57,9
Cfl1-F	AGACAAGGACTGCCGCTATG (20)	59,4
Cfl1-R	TTGCTCTTGAGGGGTGCATT (20)	57,3
Gpx3-F	GTTTACGGCTTGGCACAACA (20)	57,3
Gpx3-R	TGCTGGCCCCAAGAATGATG (20)	59,4
Prdx3-F	TGCTCGTCATGCAAGTGCTA (20)	57,3
Prdx3-R	GCTGACTTTCCTTGGGCAGA (20)	59,4
Neil3-F	GAACAGAGCTGGGGCTTCTC (20)	61,4
Neil3-R	CTCTGTTGGCTTTCCACCGA (20)	59,4
Mgst1-F	ATCGTTCCTTTCTCGGCAT (20)	57,3
Mgst1-R	AGCAATGGTGTGGTAGATCCG (21)	59,8
Mapk1-F	CTTCCCTCCTCCCACTCGTA (20)	61,4
Mapk1-R	ACGAGGAAGGAGGACAACAC (20)	59,4
Pycr2-F	GGGATACTTGGGGCCTCTCT (20)	61,4
Pycr2-R	AGATGGACCCGAATTGCTCG (20)	59,4
Stk26-F	AGCAGGACGAGAATAATGCGA (21)	57,9
Stk26-R	CGGTTTCAGCCACAGCAATAC (21)	59,8
Ucp1-F	ACGTCCCCTGCCATTTACTG (20)	59,4
Ucp1-R	GGACATCGCACAGCTTGGTA (20)	59,4
Rgs14-F	CCAGTGAACATCGACCGACA (20)	59,4
Rgs14-R	TGGTACAGCGGGGATTTGAC (20)	59,4
Nono -F	GCCAAGCTGCAACAATGGAA (20)	57,3
Nono -R	GCGGCGTTTATTTGGAGCAA (20)	57,3
SQSTM1-F	GCACAGGCACAGAAGACAAG	59,4
SQSTM1-R	CACCGACTCCAAGGCTATCT	58,8
LC3-F	CTTCGCCGACCGCTGTAA	60,1
LC3-R	GCCGGATGATCTTGACCAACT	60,4

3.2.2 RNA İzolasyonu ve Miktar Analizi

17 ve 18. haftalarda, 49 ve 50. haftalarda ve 80 ve 81. haftalarda sakrifikasyon yapılan MMTV-TGF- α farelerden temin edilen timüs dokusundan kesilen 25-30 mg numuneler alınmıştır. Bu numunelerden RNA izolasyonu yapılmasında Qiagen RNeasy Mini Kit kullanılmıştır. En başta numuneler ependorf tüplere alınıp liziz tampon içerisine 1ml için 10 μ L ayarlanacak biçimde β -merkaptoetanol eklenmiştir. Sonrasında numunelerin

üzerlerine 300 µL lizis tampon çözeltisi eklenmiştir. Homojenizatörle dokular parçalanmıştır. Tüp içerisine 300 µL daha lizis tampon çözeltisi eklenmiştir. 3 dk maximum hızda santrifüj edilen numunelerin katmanlı yapı meydana getirmesi sonucunda, supernatant kısım başka bir tüpe alınıp pelet bölümü atılmıştır. %70 yoğunluktaki etanolden, supernatant ile eşit hacimde tüpün içine eklenip pipetaj ile karışması sağlanmıştır. RNAeasy kolonları altına ikişer mL'lik toplama tüpleri yerleştirilmiştir ve her defasında maximum 700 µL olacak biçimde kolonlardan numuneler geçirilmiştir. RNeasy kolonlar 8.000xg'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Sonrasında 700 µL RW1 tamponu eklenmiş ve 15 saniye 8.000xg'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında 500 µL RPE tamponu eklenmiştir 15 saniye 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir. 500 µL RPE tamponu daha eklenmiştir ve bu defa 2 dk 10.000xg'de santrifüj edilmiştir. RNeasy kolonu 1 dk boş şekilde maximum hızda santrifüj edilmiştir. 1.5 mL'lik yeni tüpler kolon altına konulup 30 µL RNaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dk 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Son aşama bir defa daha tekrarlanmıştır.

Meydana gelen çözeltilerden RNA konsantrasyonu ve miktar saptanması amacıyla Nano-Drop spektrofotometreyle ölçüm metodu kullanılmıştır. Öncesinde referans olarak RNaz içermeyen sudan 1 µL alet kuyusuna damlatılıp boş ölçüm alınmıştır. Sonrasında RNA bulunduğu farzedilen çözeltilerden 1 µL alınıp alet kuyusuna damlatılmış ve ölçümler yapılmıştır. Numunelerin saflık seviyesi ve RNA oranı sayısal ve grafik şeklinde özetlendi.

3.2.3 RNA Jel Elektroforezi

RNA Elektroforez jel yapılmasında önce (75 mL %1lik) hazırlanması amacıyla 0,75 g agaroz tartılıp sterilize edilen bir beher içerisine aktarılmıştır. 5X'lik MOPS'tan 15 mL ve DEPC' li sudan 46,87 mL alınıp beher içine aktarılmıştır. Sonrasında beherin ağzı kapatılıp mikrodalga fırına konulup agarozun çözülmesi sağlanmıştır. Buharlaştıran sıvı yerine DEPC' li su eklenmiş ve etüvde sıcaklığın 60°C'ye ulaşması için bekletilmiştir. Bir tüpte 13,12 mL formaldehit etüv içerisinde ısıtılarak sıcaklığın 60°C'ye ulaşması sağlanmıştır. Toplamda 75 mL hacime ulaşması için formaldehit beher içerisine aktarılmıştır. Birkaç kez el ile karıştırılıp formaldehitin karışımın içerisine iyi bir biçimde dağılması amaçlanmıştır. Sonrasında jel dökülüp taraklar yerleştirilmiştir. Donması beklendikten sonra 1X MOPS, tank tamponu olarak kullanılmıştır. RNA numuneleri yükleme için;

Gerekli Malzemeler

- 5X MOPS (2 µL)
- RNA (2 µL)
- Steril DEPC'li Su (2,5 µL)
- Formaldehit (3,5 µL)
- Formamid (10 µL)
- Etidyum Bromür (mg/mL) (0,5 µL) olmak üzere

Toplam = 20,5 µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

RNA numunesi ihtiva eden tüpler, 55°C'de 15 dk kuru ısıda inkübe edilmiştir. Daha sonra numunelere 2 µL yükleme tamponu eklenip, jele yüklenmiştir. Jelde 60 Voltta 90 dk yürütülmüştür.

3.2.4 Primer Tasarlama

Bu çalışmada Gerçek Zamanlı PCR'da kullanılacak olan, seçilen 17 gene ait ileri (Forward) ve geri (Reverse) yönlü primerler literatürdeki örnekleri incelenerek PrimerBlast ve Primer3 programları kullanılarak dizayn edildi. Belirlenen primerler hizmet alımı ile sentezletirildi.

3.2.5 cDNA Sentezi

Komplementer DNA sentezlenmesi için ticari kit olan GeneMark First Strabded Synthesis Kit (SAMscript) kullanılmıştır. Deney sırasında yapılan aşamalar buz üstünde yapılmıştır. cDNA sentezinden önce bütün RNA konsantrasyonları eşitlenmiştir. Bu amaçla tüm numunelerden farklı oranlarda toplamda 10 µg RNA bulunacak şekilde alınıp RNaz'sız tüpe aktarılmıştır. Tüpe, 1 µL random primer eklenmiştir. Ardından 3 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Bu sırada, bir tüp içinde yukarıdaki maddeler baz alınarak 9 numune için bir karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımdan 5,5 µL alınıp tüplerin içerisine konulup toplam hacmin 20 µL'ye ulaşması sağlanmıştır. 25°C'de 10 dk, 42°C'de 60 dk ve 72°C'de 5 dk bekletilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar real time PCR uygulanmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

cDNA sentezi için gereken bileşenler ve hacimleri;

- RT tampon (10x) (4 µL)
- dNTP Karışımı (2 µL)
- RT enzim (1 µL)

- RNaz inhibitörü (1 µL) şeklindedir.

3.2.6 RNA Sekanslama ve Veri Analizi

RNA sekanslama verileri, onuncu haftadan itibaren kalori kısıtlaması uygulamasının iki çeşidi uygulanmıştır ve 17-18. haftalarda sakrifikasyon yapılan MMTV-TGF- α fareleriyle kontrol grubu olarak Ad-Libitum beslenen aynı türdeki farelerden izole edilen timüs dokusundan elde edilen RNA kullanılarak sağlanan verilerdir. Bu verilerin içerisinde 3 besleme grubu için 3 farklı veri bulunmaktadır. Bu veriler, belirlenmiş beslenme grupları için $p < 0.05$ istatistiksel seviyede 6091 tane değişik oranda eksprese olan gen (DEG) olduğunu göstermektedir. Bunların, 2281 adedinin AL-CCR arasında, 2825 adedinin CCR-ICR arasında, 445 adedinin AL-ICR arasında olduğu saptanmıştır. Bu datalar belirlenmiş genler için bir arama havuzu amacıyla kullanılmıştır. Belirlenen genlerin bu verilerde aranması için Linux terminal kullanılmıştır. R programı aracılığıyla gerekli datalar çekilmiştir. Bunun için aşağıdaki sıralı kodlar yazılmıştır.

1. \$ R

R program diline giriş yapıldı.

2. > library (cummRbund)

Komutu ile R içindeki CummeRbund kütüphanesine ulaşıldı.

3. >cuff_data <- readCufflinks ('diff_out')

Cuffdiff çıktısından bir CummeRbund veritabanı oluşturuldu.

4. >mygene<- getGene (cuff_data, 'Gen')

>expressionBarplot (mygene)

İstenen bir genin farklı datalardaki ifade derecesi görüntülenmiştir.

Ardından belirlenen genlerin sonuçlarına göre, üç besleme grubu için ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı tekrar bu verilerin kullanılması sonucunda saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olan genler kaydedilmiştir.

3.2.7 Real-Time PCR

cDNA elde edildikten sonra Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) metodu için ticari kitlerden olan GM SYBR Q-PCR Kiti kullanılmıştır. Deney esnasında yapılan aşamalar buz üstünde gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar 1/3 oranında distile suyla seyreltilmiştir. RT-PCR

tepkimleri için gereken bileşenler aşağıdaki şekilde ve toplamda hacim 15 µL olacak biçimde kullanılmıştır.

Bileşenler:

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılacak olan protokol;

- 7,5 µl Master Mix. (2 U of rekombinant Hot Start Taq DNA Polimeraz, Reaksiyon Buffer, 3 mM MgCl₂, 250 µM dNTP, SYBR Green I, Enzim Stabilizatör)
- 0,27 µl Forward Primer
- 0,27 µl Reverse Primer
- 4,96 µl Su
- 2 µl Örnek

Hazırlanan karışım 94°C’de 15-30 sn, 60°C’de 30-60 sn (30X) ve 72°C’de 30-60 sn sentezlenir.

Hazırlanan karışım BIORAD CFX Connect cihazına konulup aşağıdaki şartlarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2 PCR cihaz protokolü

Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
95	120 sn	1 siklus
95	15sn	40 siklus
59-62	30 sn	
72	30 sn	

RT-PCR tepkimesi gerçekleştirildikten sonra, Ct değerleri incelenen 17 gen ve GAPDH geninde kat değişimi (fold change) hesaplanması amacıyla kullanılmıştır. ΔC_t ve $2^{-\Delta \Delta C_t}$ değerlerinin hesaplanması için karşılaştırmalı Ct metodu kullanılmıştır.

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Genlerin Belirlenmesi

Genlerin belirlenmesinde IntOGen mutasyon platformu kullanılarak aşağıdaki genler seçildi. Bu seçimde oksidatif stres ve otofaji ile ilişkili genlerde mutasyon oluşumu en çok tekrarlanan genlerin seçilmesine dikkat edildi. Böylece şu genler belirlendi:

*ADIPOQ, CAR3, CASP3, CD36, CFL1, GPX3, PRDX3, NEİL3, MGST1, MAPK1, PYCR2, STK26, UCP1, RGS14, NONO, SQSTM1, LC3

4.1.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi Sonuçları

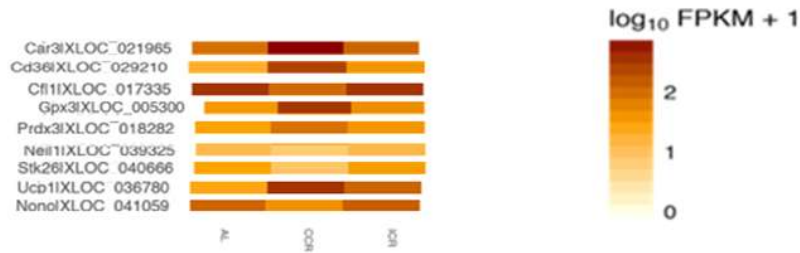
Belirlenen genlerin ifade edilmesindeki değişiklikler, daha önceki çalışmada elde edilmiş RNA-seq datalarından tespit edildi. Bu datalar, belirlenen beslenme grupları için $p < 0,05$ istatistiksel önem derecesinde 6091 adet farklı oranda ifade olan gen (DEG) olduğunu gösterir. Bu genler belirlediğimiz genler için arama havuzu olarak kullanıldı ve seçilen genlerden 17 tanesinin AL-CCR beslenme grupları arasında ifade edilmesindeki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna ulaşıldı.

Tablo 4.1 Beslenme grupları arası ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olan genler ve p değerleri

GEN	BESLENME GRUBU	p DEĞERİ
ADIPOQ	AL-CCR	0.000347135
CAR3	AL-CCR	0.000347135
CASP3	AL-CCR	0.000347135
CD36	AL-CCR	0.000347135
CFL1	AL-CCR	0.000347135
GPX3	AL-CCR	0.000347135
PRDX3	AL-CCR	0.000347135
NEİL3	AL-CCR	0.000347135
MGST1	AL-CCR	0.000347135
MAPK1	AL-CCR	0.0106793

Tablo 4.1 Beslenme grupları arası ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olan genler ve p değerleri (devamı)

PYCR2	AL-CCR	0.00118274
STK26	AL-CCR	0.000347135
UCP1	AL-CCR	0.000347135
RGS14	AL-CCR	0.000347135
NONO	AL-CCR	0.000347135
SQSTM1	AL-CCR	0.00666999
LC3	AL-CCR	0.000347135



Şekil 3.1 RNA seq. Heatmap sonuçları

4.1.3 RNA Miktarı Tayini Sonuçları

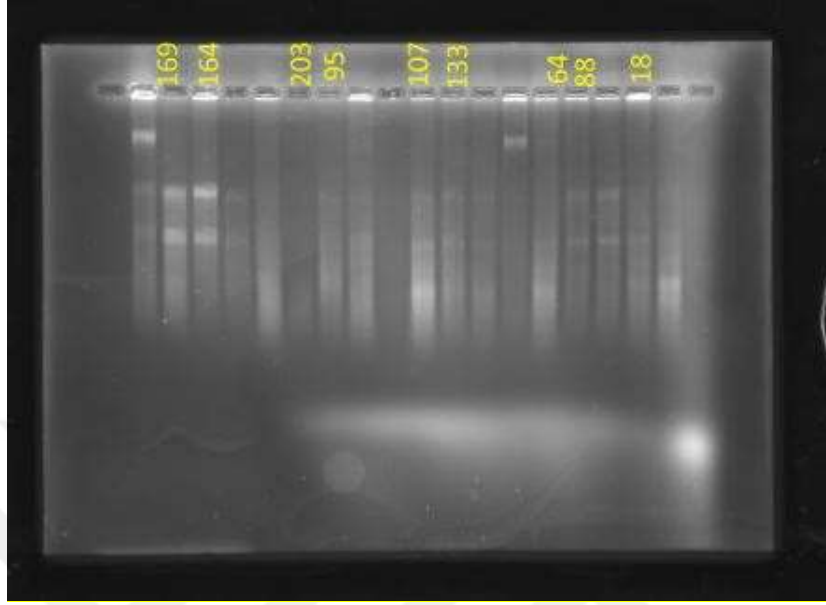
RNA konsantrasyon ve miktar tayini için NanoDrop spektrofotometre ile ölçüm yöntemi kullanıldı. Öncelikle referans olarak RNaz'sız sudan 1 µL aletin kuyusuna damlatılıp boş (blank) ölçüm alındı. Daha sonra RNA içerdiği düşünülen çözeltiden 1 µL alınıp NanoDrop'un kuyusuna damlatıldı ve ölçüm yapıldı. Örneklerin saflık derecesi ve RNA miktarı sayısal ve grafik olarak elde edildi.

Tablo 4.2 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri

Doku Örneği	Sakrifiye Haftası	Beslenme Grubu	Konsantrasyon	A260/280
T 169	17/18	AL	514,6	2,1
T 164	17/18	CCR	608,3	2,11
T 203	17/18	ICR	311,7	2,11
T 95	49/50	AL	243,6	2,09
T 107	49/50	CCR	440,4	2,09
T 133	49/50	ICR	206,4	2,08
T 64	80/81	AL	299,2	2,08
T88	80/81	CCR	262	2,09
T18	80/81	ICR	358,5	2,09

4.1.4 RNA Jel Elektroforezi

RNA jel elektroforezi sonucunda aşağıdaki jel görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 3.2 RNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (soldan sağa örnek numaraları)

169 (18. HAFTA AL), 164 (18. HAFTA CCR), 203 (18. HAFTA ICR), 95 (50. HAFTA AL), 107 (50. HAFTA CCR), 133 (50. HAFTA ICR), 64 (82. HAFTA AL), 88 (82. HAFTA CCR), 18 (82. HAFTA ICR)

4.1.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Gerçek Zamanlı PCR sonucunda farklı beslenme grubunda ve farklı haftalarda olan örneklerde 17 gen için ekspresyon miktarlarındaki kat değişimi değerleri (4.1) kullanılarak hesaplanmıştır. Aynı PCR çalışmasında bulunan genlerin amplifikasyon eğrileri, erime eğrileri, kümeleme (Clustergram) analizleri ve ekspresyon karşılaştırmaları grafikler olarak grafikler Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de gösterilmiştir.

GAPDH ve belirlenen genlerin ortalama C_t değerleri Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3 GAPDH ve diğer genlerin ortalama C_t değerleri

		18. AL	18. CCR	18. ICR	50. AL	50. CCR	50. ICR	82. AL	82. CCR	82. ICR
1.çalışma	GAPDH	18,74	19,36	19,82	20,31	20,15	19,02	19,33	20,98	20,15
	ADIPOQ	25,96	25,34	26,30	24,58	25,43	24,68	24,82	22,93	25,24
	CAR3	25,26	23,16	26,15	22,58	23,26	23,51	23,09	20,36	22,63
	CD36	27,08	27,92	27,40	28,39	29,07	27	27,44	27,03	28,14
	CFL1	22,12	21,23	23,61	22,62	22,07	21,09	24,02	22,98	21,04
2.çalışma	GAPDH	19,62	20,20	20,04	21,20	22,08	19,49	20,39	21,73	20,83
	GPX3	25,53	23,44	26,42	23,11	23,45	23,38	23,63	21,60	23
	PRDX3	26,14	25,48	26,86	26,17	26,63	25,79	26,43	25,71	25,69
	MGST1	26,21	25,75	26,72	26,22	26,35	25,96	25,75	23,99	26,18
3.çalışma	GAPDH	19,32	19,71	19,39	20,61	22,20	19,07	20,15	21,70	21,07
	RGS14	28,74	26,63	27,93	27,13	27,02	25,88	28,82	28,61	26,84
	NEIL3	25,61	25,35	26	25,22	25,30	25,11	26,06	26,11	25,27
	NONO	23,85	23,03	23,39	23,45	23,49	22,46	24,09	24,67	23,13
	CASP3	29,17	27,22	29,15	28,13	28,08	26,88	29,78	28,57	26,66
4.çalışma	GAPDH	20,16	20,56	20,54	21,46	22,86	19,69	20,88	21,86	20,93
	MAPK1	28,05	29,09	28,55	30,05	31,17	28,11	29,18	31,51	30,08
	PYCR2	26,65	27,05	27,18	27,88	28,09	26,20	27,73	28,50	27,14
	STK26	26,89	26,75	27,31	27,72	27,86	26,08	28,10	29,48	27,91
	UCP1	26,32	25,74	27,28	24,10	24,84	24,23	24,38	22,82	24,39
5.çalışma	GAPDH	19,99	20,50	20,45	21,28	22,78	19,65	20,69	21,79	21,02
	SQSTM1	26,58	25,72	26,91	26,72	26,76	25,04	27,14	25,75	25,31
	LC3	32,11	29,43	32,37	28,63	29,43	28,79	29,36	27,27	28,44

2^{-ΔΔC_t} Kat değişim değeri her haftada (18-50-82) kontrol grubu olarak alınan AL ve referans geni olarak alınan GAPDH üzerinden aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\Delta C_t (\text{Kontrol}) = C_t(\text{Kontrol grubu Hedef geni}) - C_t(\text{Kontrol grubu Referans geni})$$

$$\Delta C_t (\text{Deneyisel}) = C_t(\text{Deney grubu Hedef geni}) - C_t(\text{Deney grubu Referans geni})$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deneyisel}) - \Delta C_t(\text{Kontrol})$$

$$2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{Kat değişim değeri}$$

Tablo 4.4 Genlerin AL'ye göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

Genler	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	18. AL	18. CCR	18. ICR	50. AL	50. CCR	50. ICR	82. AL	82. CCR	82. ICR
GAPDH	1	7,01	2,46	1	2	2,6	1	4,53	7,94	
ADIPOQ	1	2,36	1,67	1	1,33	0,38	1	11,63	1,32	
CAR3	1	6,59	1,14	1	1,49	0,21	1	20,97	2,45	
CD36	1	0,86	1,68	1	1,49	1,06	1	4,20	1,09	
CFL1	1	2,85	0,75	1	3,51	1,18	1	6,45	13,93	
GPX3	1	6,36	0,72	1	1,45	0,25	1	10,34	2,10	
PRDX3	1	2,35	0,81	1	1,34	0,40	1	4,17	2,27	
NEIL3	1	1,56	0,80	1	2,82	0,36	1	1,81	3,24	
MGST1	1	2,06	0,94	1	1,68	0,36	1	8,57	1,01	
RGS14	1	5,70	1,84	1	3,25	0,82	1	3,39	7,46	
NONO	1	2,31	1,44	1	2,95	0,69	1	1,97	3,68	
CASP3	1	5,10	1,06	1	3,12	0,82	1	6,77	16,45	
MAPK1	1	0,64	0,92	1	1,21	1,13	1	0,39	0,55	
PYCR2	1	1	0,90	1	2,28	0,94	1	1,13	1,53	
STK26	1	1,46	0,98	1	2,39	0,91	1	0,76	1,18	
UCP1	1	1,97	0,67	1	1,58	0,27	1	5,78	1,02	
SQSTM1	1	2,60	1,09	1	2,77	1,04	1	5,62	4,44	
LC3	1	9,13	1,16	1	1,64	0,29	1	9,06	2,36	

Tablo 4.5 18. Haftada genlerin ekspresyonlarının AL'ye göre kıyaslamaları

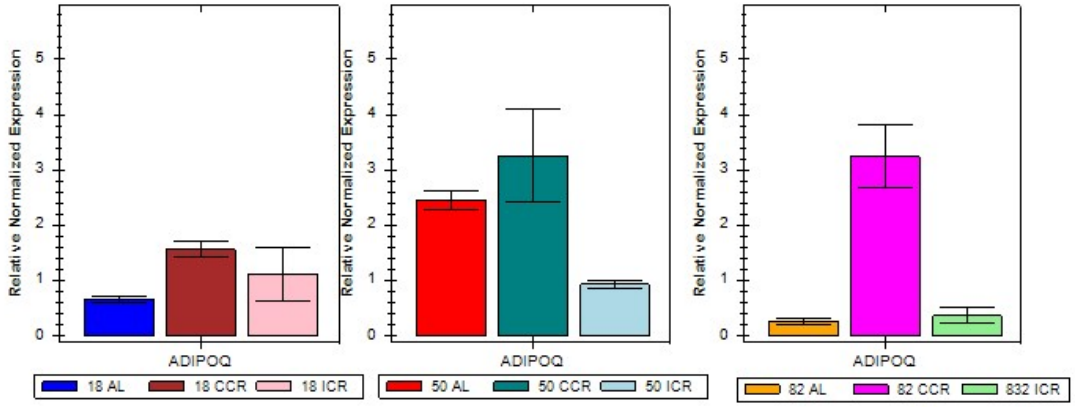
Genler/Beslenme çeşitleri	CCR	ICR	Genler/Beslenme çeşitleri	CCR	ICR
ADIPOQ	Arttı	Arttı	NONO	Arttı	Arttı
CAR3	Arttı	Arttı/Eşit	CASP3	Arttı	Arttı/Eşit
CD36	Azaldı	Arttı	MAPK1	Azaldı	Azaldı/Eşit
CFL1	Arttı	Azaldı	PYCR2	Eşit	Azaldı/Eşit
GPX3	Arttı	Azaldı	STK26	Arttı	Azaldı/Eşit
PRDX3	Arttı	Azaldı	UCP1	Arttı	Azaldı
NEIL3	Arttı	Azaldı	SQSTM1	Arttı	Arttı/Eşit
MGST1	Arttı	Azaldı/Eşit	LC3	Arttı	Arttı/Eşit
RGS14	Arttı	Arttı			

Tablo 4.6 50. Haftada genlerin ekspresyonlarının AL'ye göre kıyaslamaları

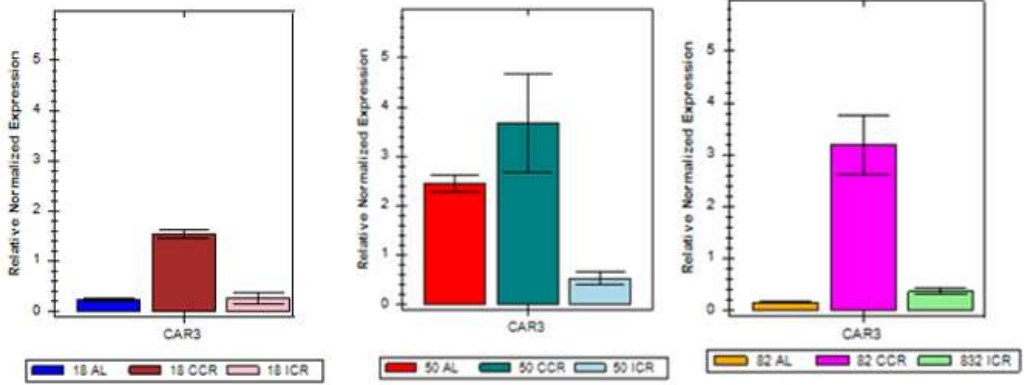
Genler/Beslenme çeşitleri	CCR	ICR	Genler/Beslenme çeşitleri	CCR	ICR
ADIPOQ	Arttı	Azaldı	NONO	Arttı	Azaldı
CAR3	Arttı	Azaldı	CASP3	Arttı	Azaldı/Eşit
CD36	Arttı	Arttı/Eşit	MAPK1	Arttı/Eşit	Arttı/Eşit
CFL1	Arttı	Arttı	PYCR2	Arttı	Azaldı/Eşit
GPX3	Arttı	Azaldı	STK26	Arttı	Azaldı/Eşit
PRDX3	Arttı	Azaldı	UCP1	Arttı	Azaldı
NEIL3	Arttı	Azaldı	SQSTM1	Arttı	Arttı/Eşit
MGST1	Arttı	Azaldı	LC3	Arttı	Azaldı
RGS14	Arttı	Azaldı/Eşit			

Tablo 4.7 82. Haftada genlerin ekspresyonlarının AL'ye göre kıyaslamaları

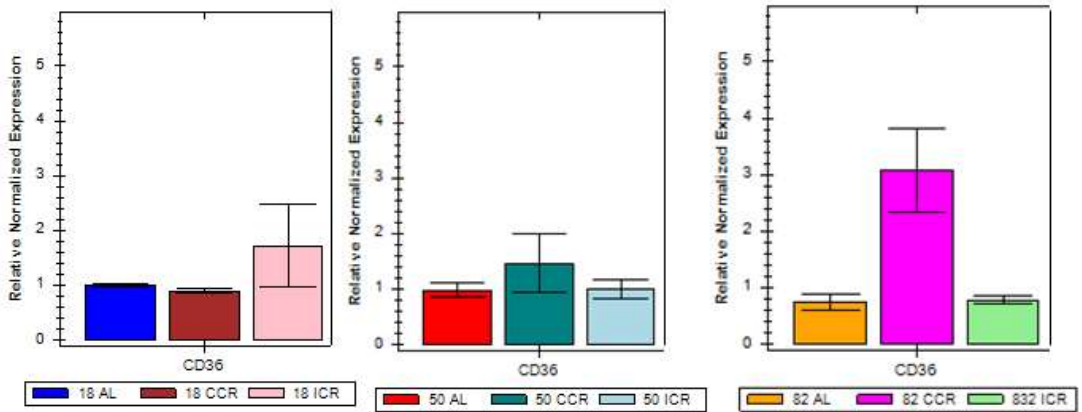
Genler/Beslenme çeşitleri	CCR	ICR	Genler/Beslenme çeşitleri	CCR	ICR
ADIPOQ	Arttı	Arttı	NONO	Arttı	Arttı
CAR3	Arttı	Arttı	CASP3	Arttı	Arttı
CD36	Arttı	Arttı/Eşit	MAPK1	Azaldı	Azaldı
CFL1	Arttı	Arttı	PYCR2	Arttı/Eşit	Arttı
GPX3	Arttı	Arttı	STK26	Azaldı	Arttı/Eşit
PRDX3	Arttı	Arttı	UCP1	Arttı	Eşit
NEIL3	Arttı	Arttı	SQSTM1	Arttı	Arttı
MGST1	Arttı	Eşit	LC3	Arttı	Arttı
RGS14	Arttı	Arttı			



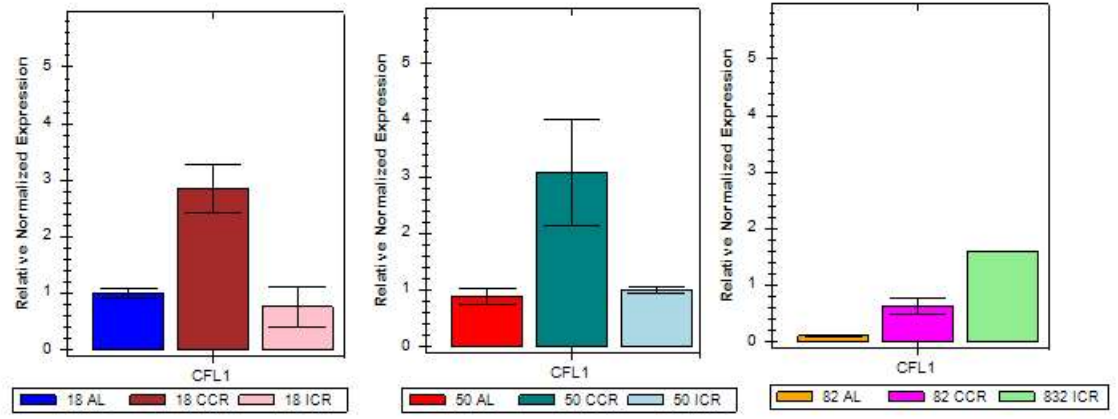
Şekil 4.1 ADIPOQ geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



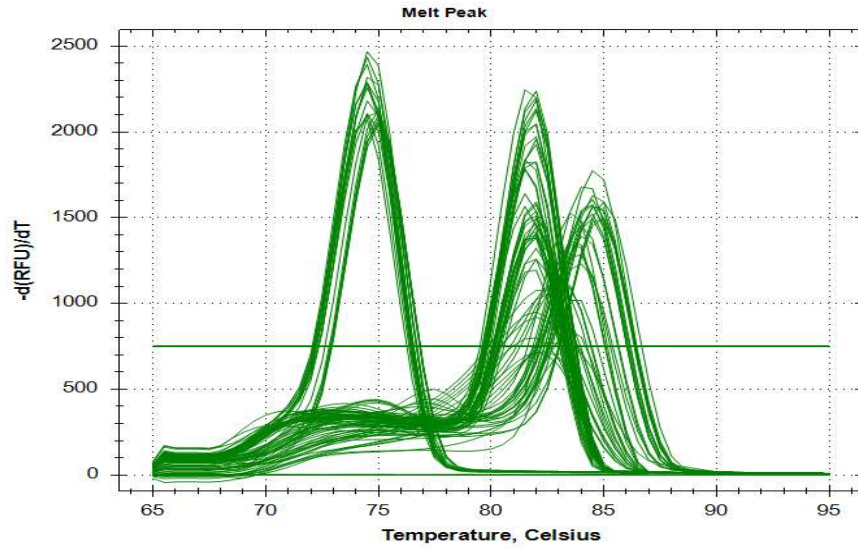
Şekil 4.2 CAR3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



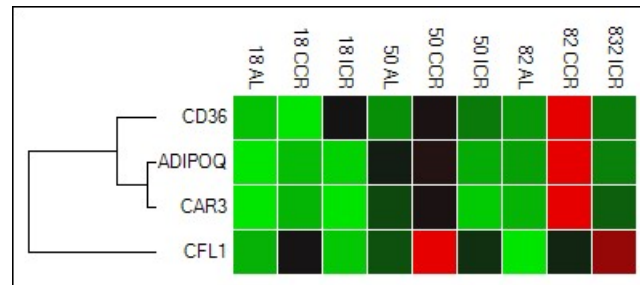
Şekil 4.3 CD36 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



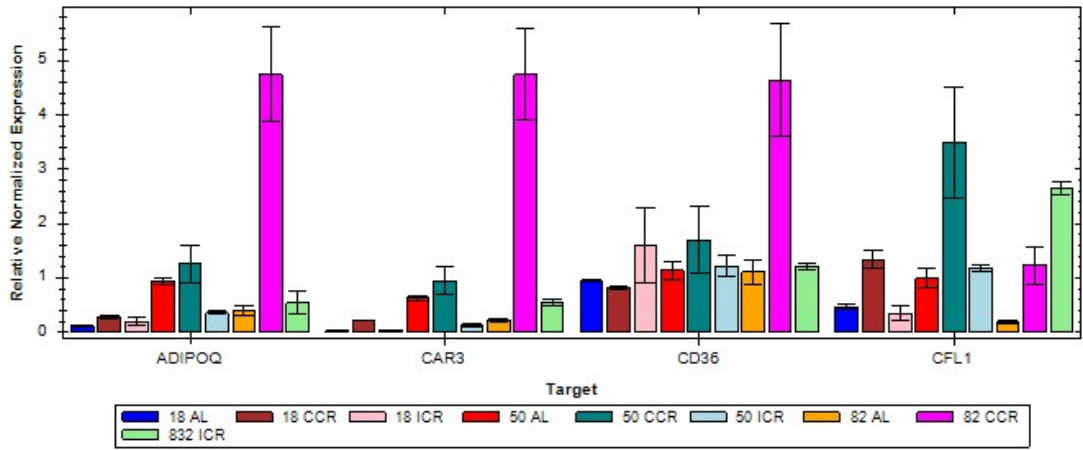
Şekil 4.4 CFL1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



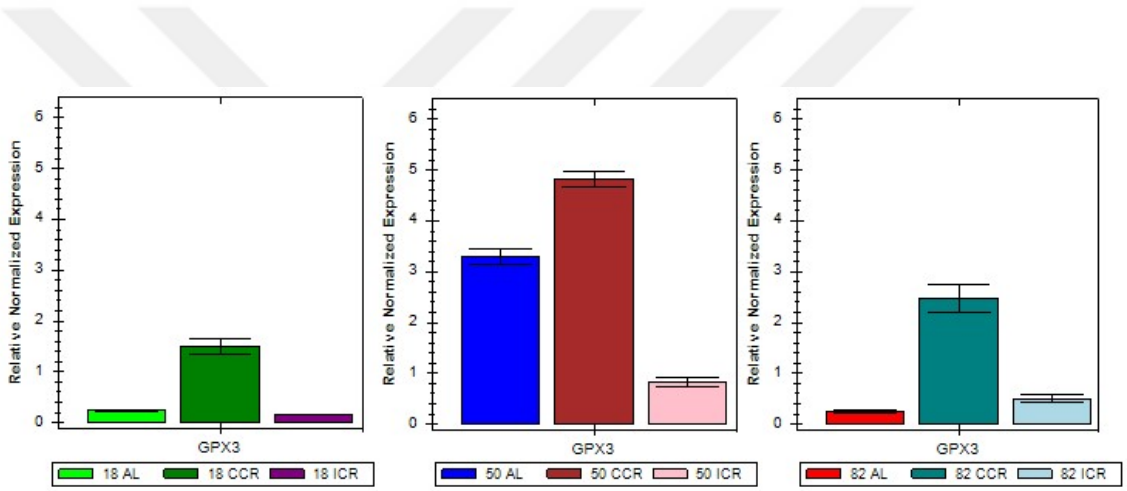
Şekil 4.5 ADIPOQ, CAR3, CFL1 ve CD36 genlerine ait erime eğrisi grafiği



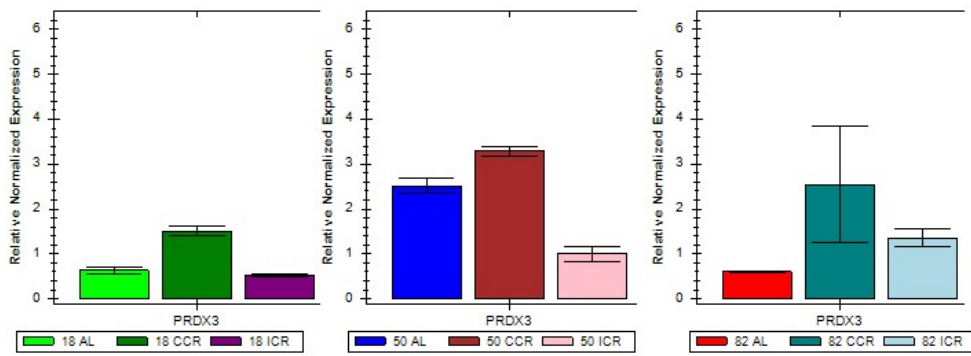
Şekil 4.6 ADIPOQ, CAR3, CFL1 ve CD36 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi



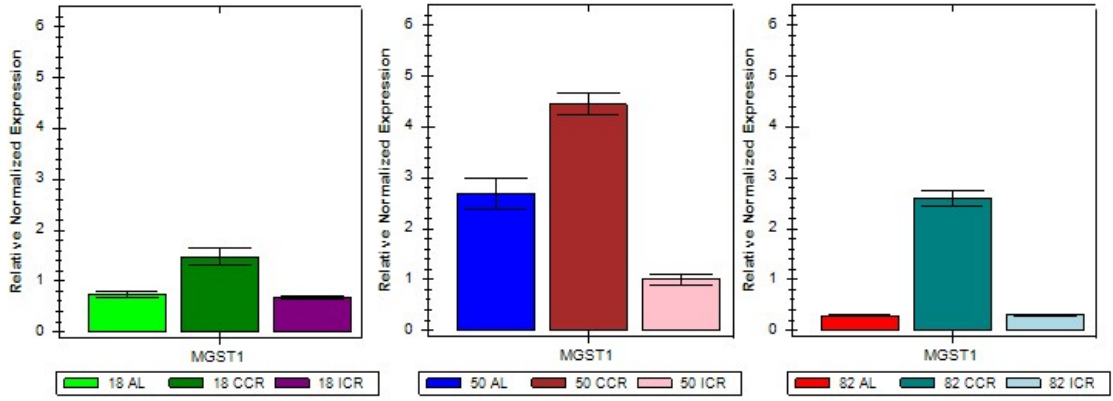
Şekil 4.7 ADIPOQ, CAR3, CFL1 ve CD36 genlerine ekspresyon karşılaştırmaları



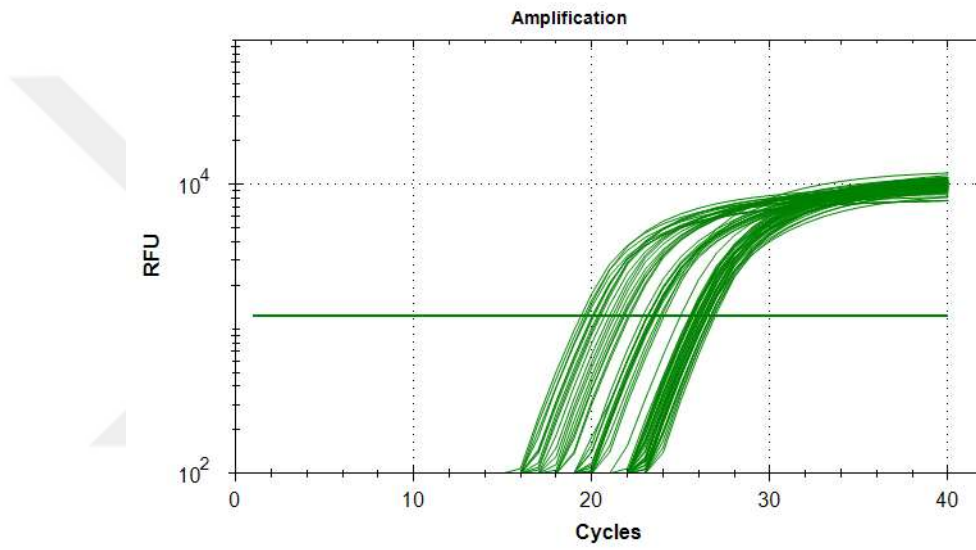
Şekil 4.8 GPX3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



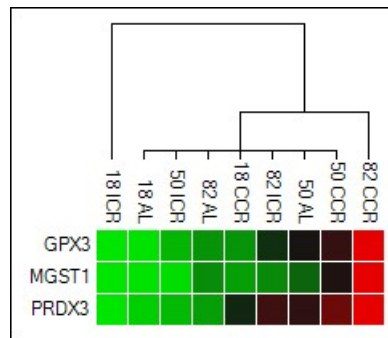
Şekil 4.9 PRDX3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



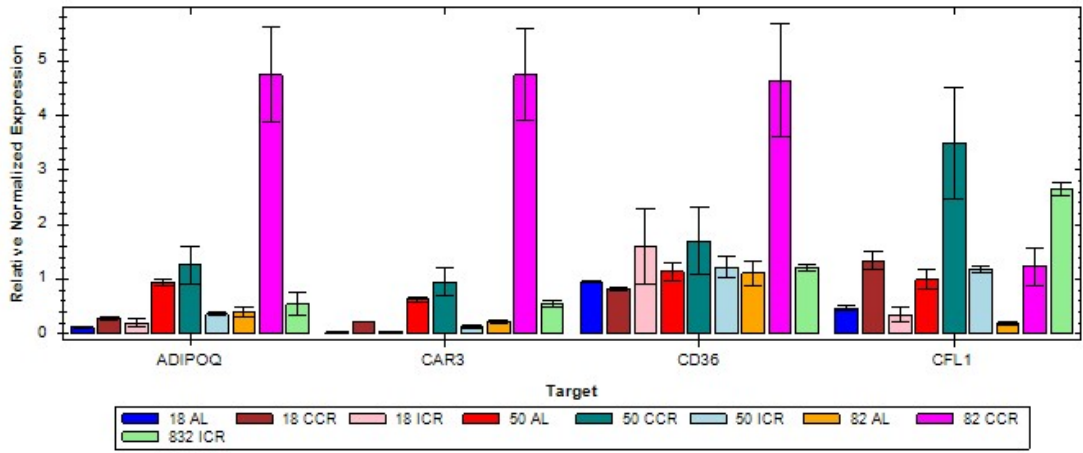
Şekil 4.10 MGST1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



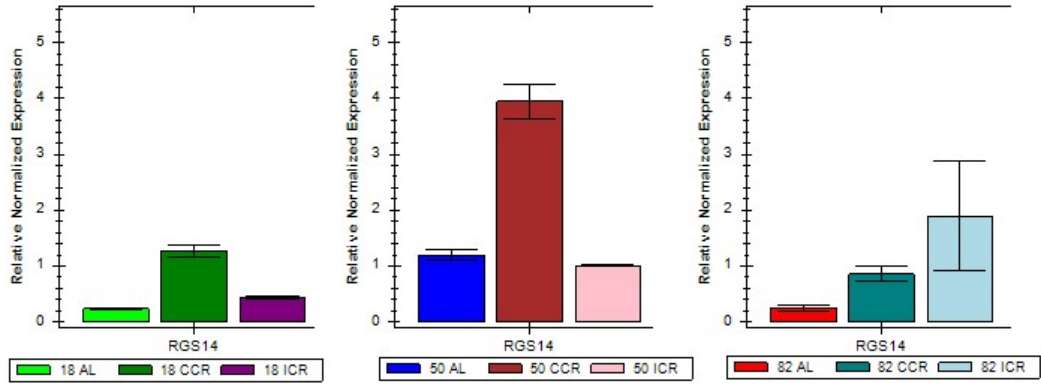
Şekil 4.11 GPX3, PRDX3 ve MGST1 genlerine ait amplifikasyon eğrisi



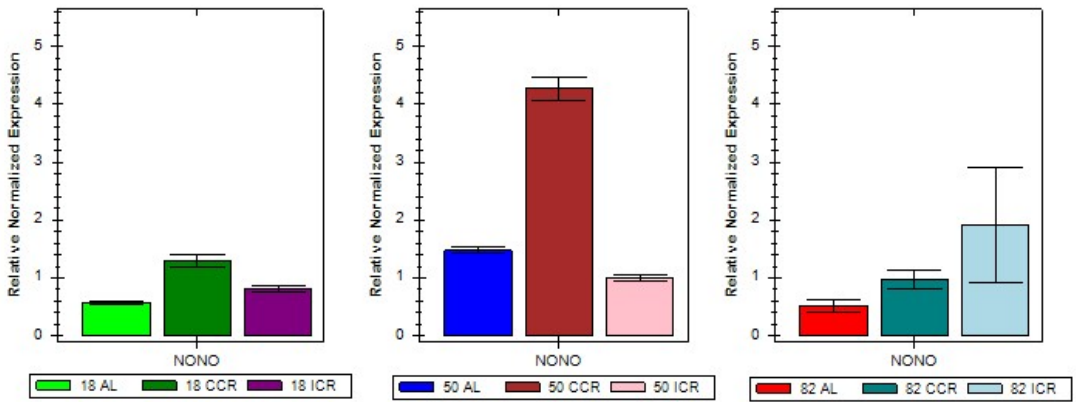
Şekil 4.12 GPX3, PRDX3 ve MGST1 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi



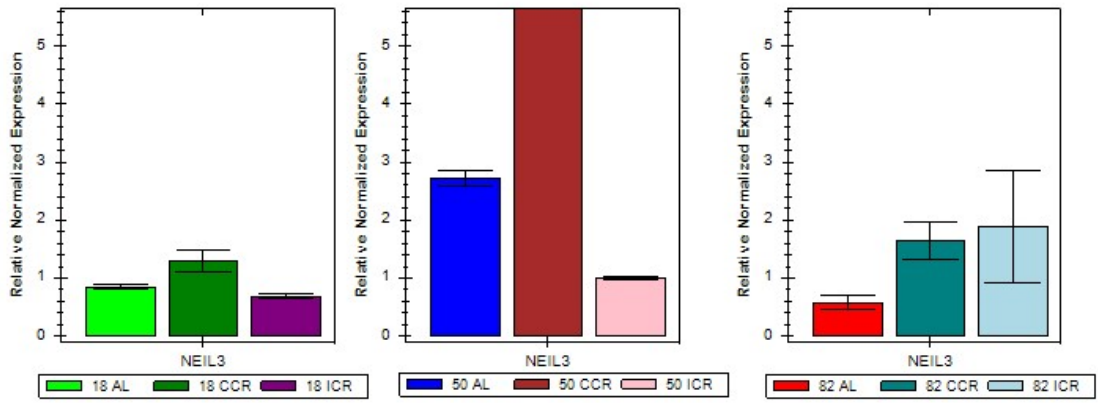
Şekil 4.13 GPX3, PRDX3 ve MGST1 genlerine ekspresyon karşılaştırmaları



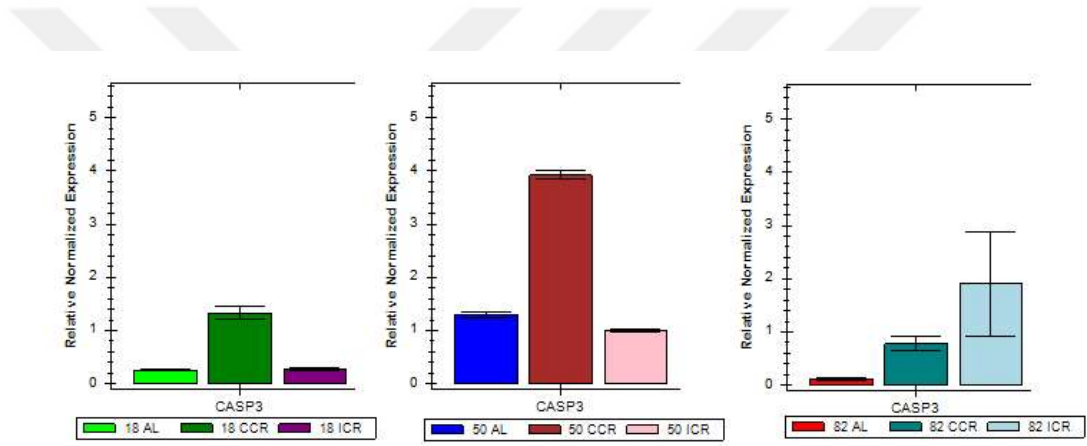
Şekil 4.14 RGS14 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



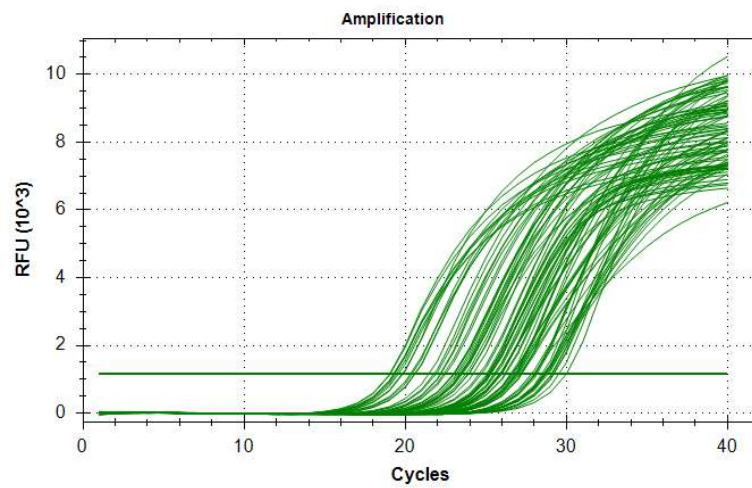
Şekil 4.15 NONO geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



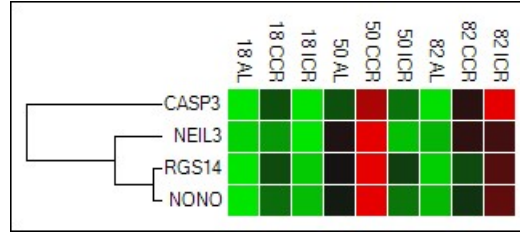
Şekil 4. 16 NEIL3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



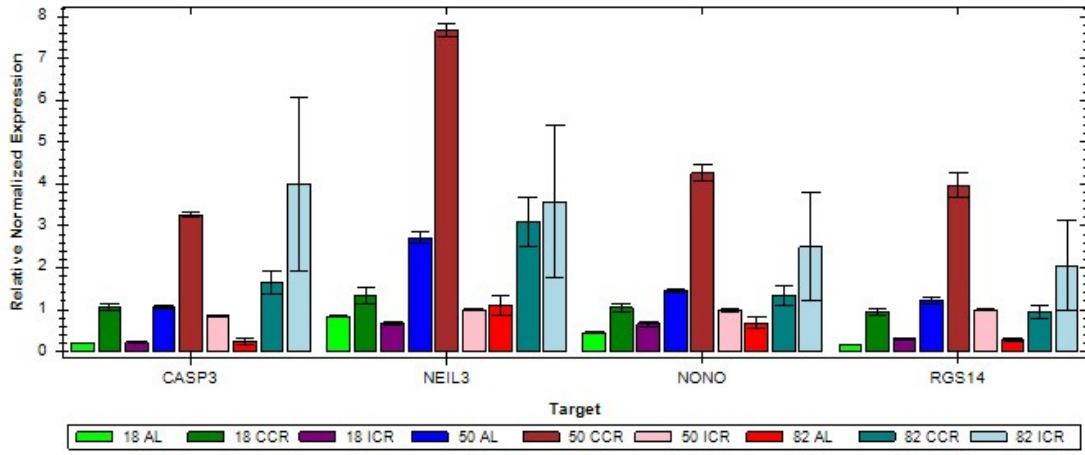
Şekil 4.17 CASP3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



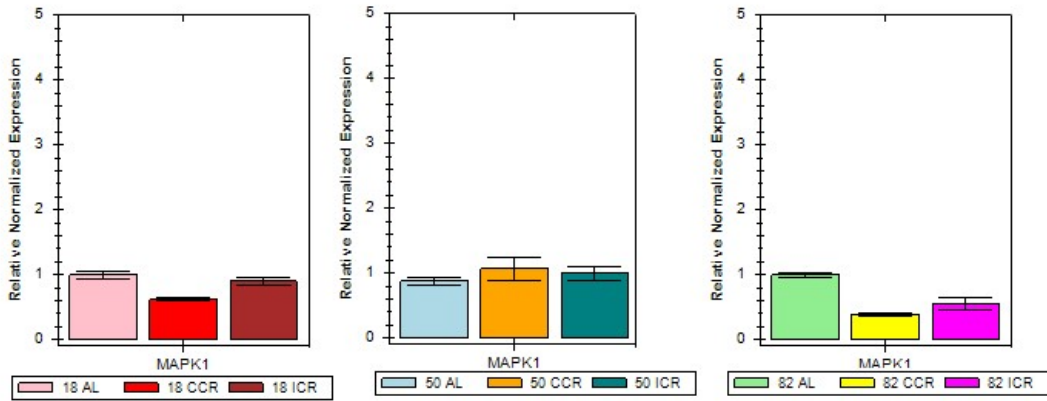
Şekil 4.18 RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genlerine ait amplifikasyon eğrisi



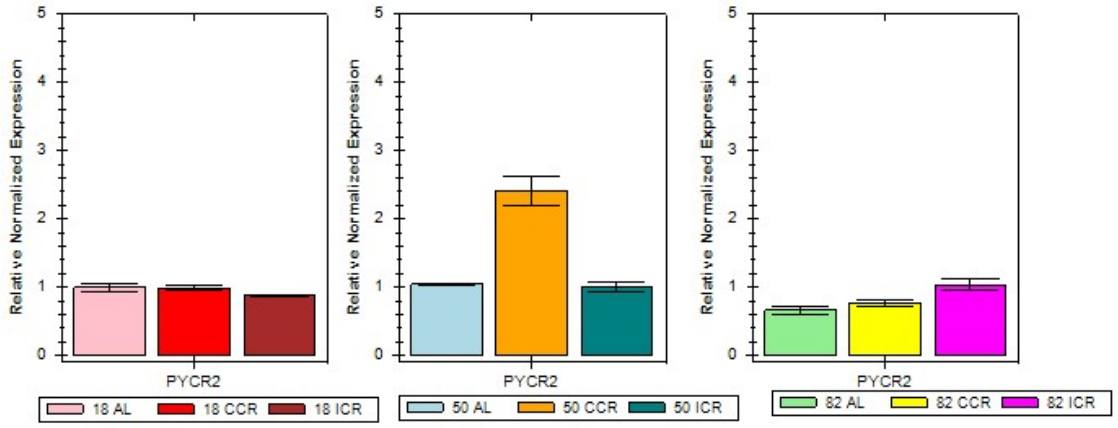
Şekil 4.19 RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi



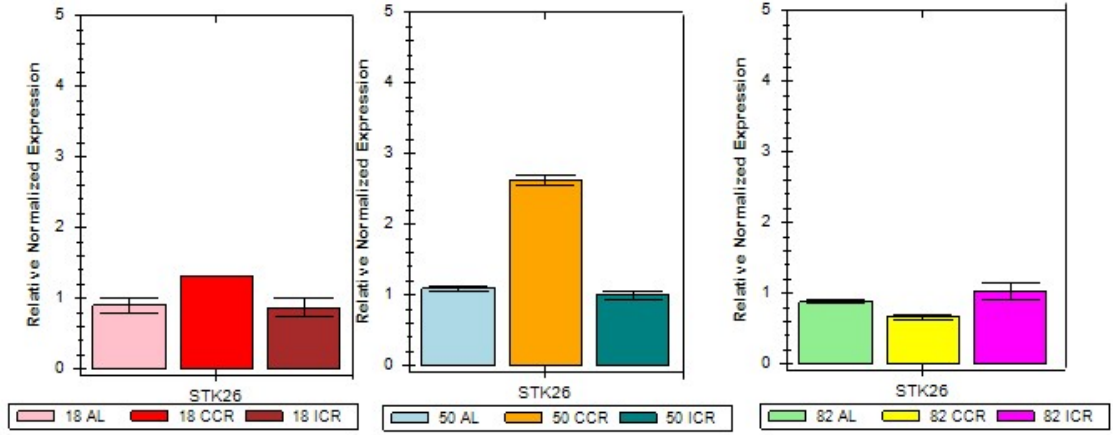
Şekil 4.20 RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genlerine genlerine ekspresyon karşılaştırmaları



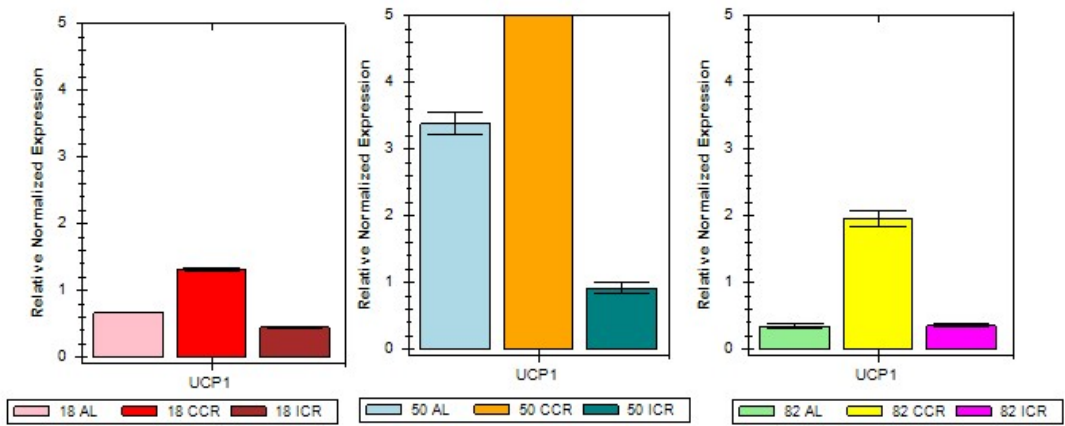
Şekil 4.21 MAPK1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



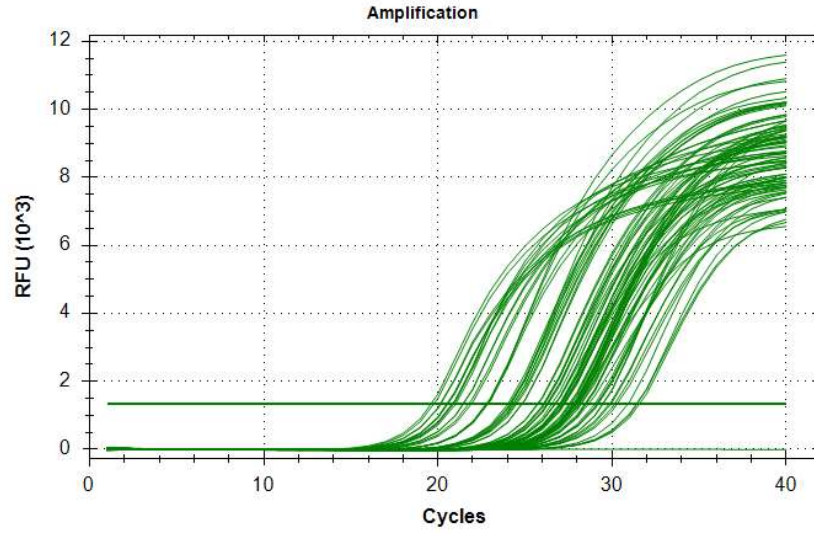
Şekil 4.22 PYCR2 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



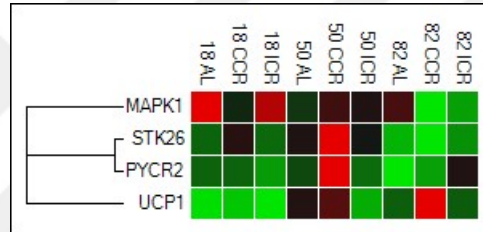
Şekil 4.23 STK26 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



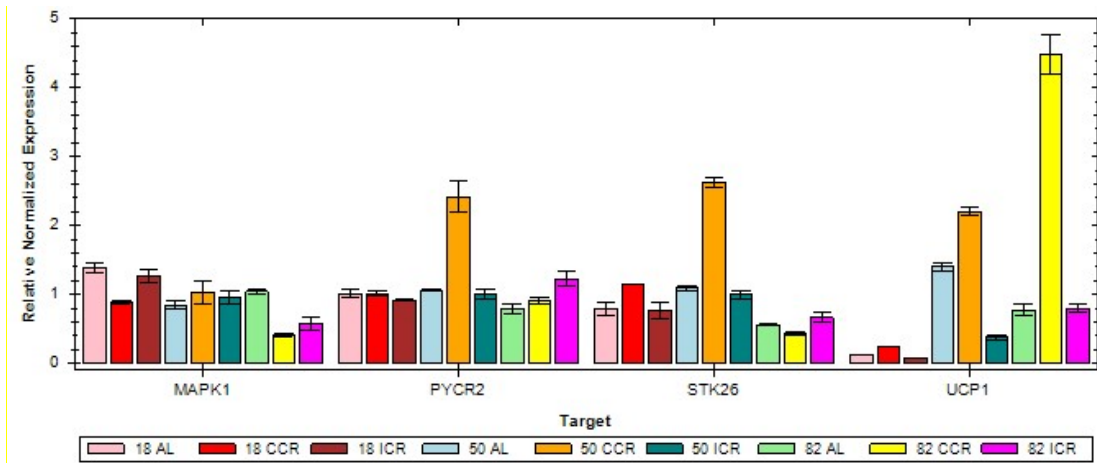
Şekil 4.24 UCP1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



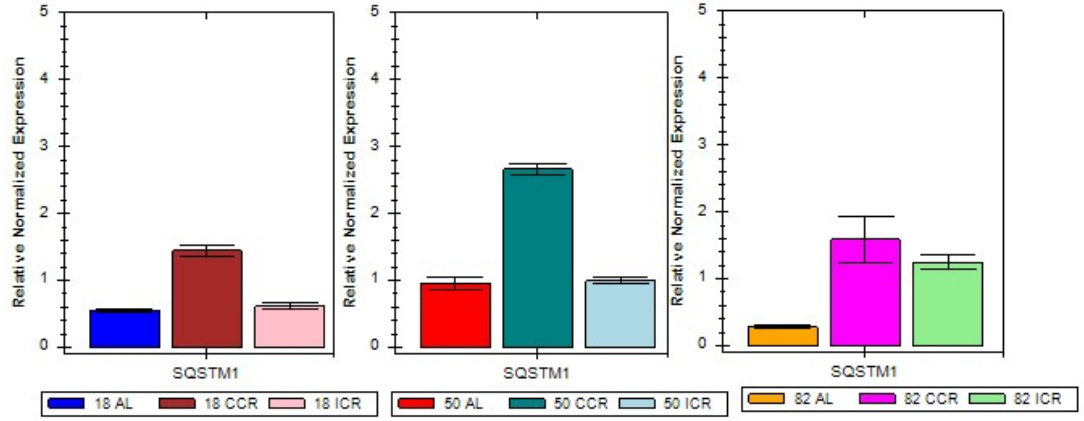
Şekil 4.25 MAPK1, PYCR2, STK26 ve UCP1 genlerine ait erime eğrisi grafiği



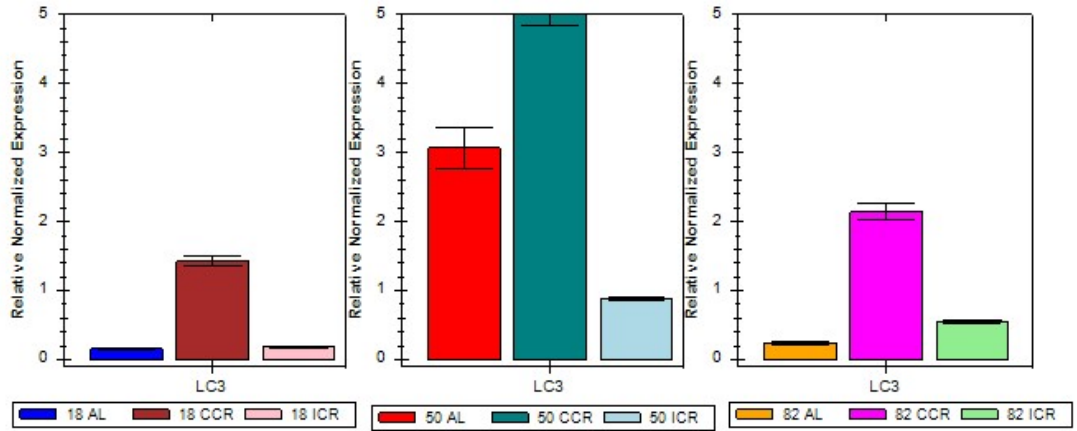
Şekil 4.26 MAPK1, PYCR2, STK26 ve UCP1 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi



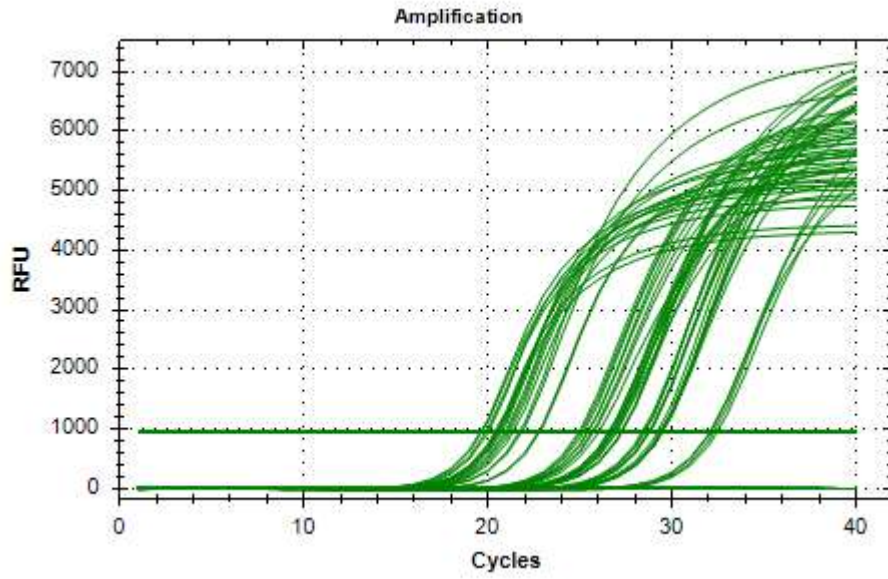
Şekil 4.27 MAPK1, PYCR2, STK26 ve UCP1 genlerine ait ekspresyon karşılaştırmaları



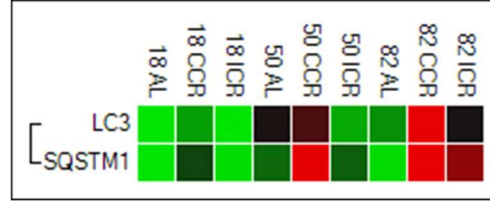
Şekil 4.28 SQSTM1 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



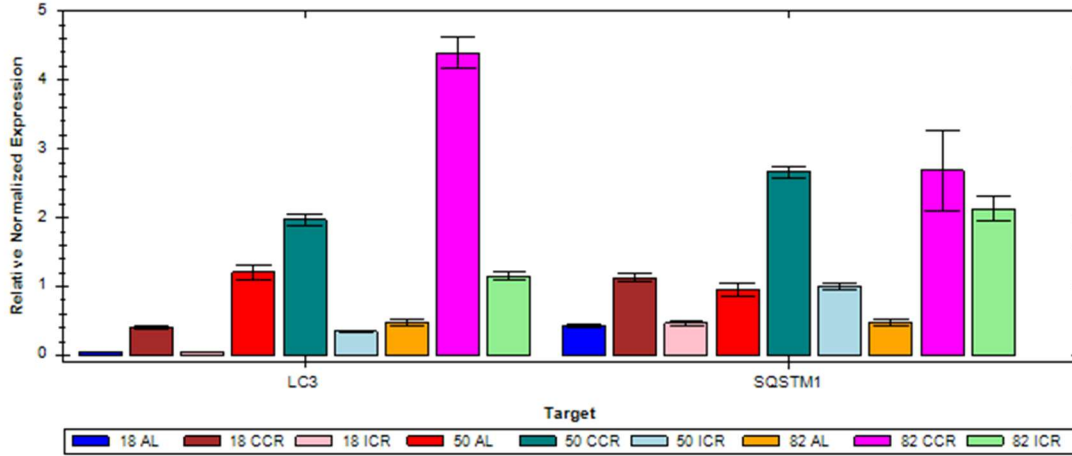
Şekil 4.29 LC3 geninin 3 farklı hafta ve beslenme tipindeki ekspresyonları



Şekil 4.30 SQSTM1 ve LC3 genlerine ait erime eğrisi grafiği



Şekil 4.31 SQSTM1 ve LC3 genlerine ait kümeleme (Clustergram) analizi



Şekil 4.32 SQSTM1 ve LC3 genlerine ait ekspresyon karşılaştırmaları

18. Hafta sonuçlarına göre;

ADIDOQ, RGS14 ve NONO genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyeleri en fazla iken, ICR'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. En düşük ekspresyon seviyesi ise AL'de görülmüştür.

CD36 geni için ICR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AL'de ICR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. En düşük ekspresyon seviyesi ise CCR'de görülmüştür.

CFL1, GPX3, PRDX3, MGST1, NEIL3 ve STK26 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyeleri en fazla iken, ICR'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. AL ve ICR'de ise nispeten değerler birbirine eşit olmakla beraber AL'de daha fazla ekspresyon görülmüştür.

CAR3, CASP3, SQSTM1 ve LC3 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyeleri en fazla iken, ICR'de CCR'ye daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. AL ve ICR'de ise nispeten değerler birbirine eşit olmakla beraber ICR'de daha fazla ekspresyon görülmüştür.

UCP1 geni için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyeleri en fazla iken, AL'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. En düşük ekspresyon seviyesi ise ICR'de görülmüştür.

MAPK1 geni için AL beslenme tipi ile ICR beslenme tipindeki ekspresyonlarda nispeten değerler birbirine eşit olmakla birlikte AL'de daha fazla görülmüştür. ICR'de AL'ye göre daha az ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. En düşük ekspresyon seviyesi ise CCR'de görülmüştür.

PYCR2 geni için ise CCR ve AL beslenme tiplerinde ekspresyon seviyeleri yaklaşık olarak eşit görülmüş olup ICR'de nispeten daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür.

50. Hafta sonuçlarına göre;

ADIPOQ, CAR3, GPX3, PRDX3, MGST1, NONO, UCP1, NEIL3 ve LC3 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AL'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. En düşük ekspresyon seviyesi ise ICR'de görülmüştür. CD36, CFL1 ve SQSTM1 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi daha fazla iken, ICR'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. En düşük ekspresyon seviyesi ise AL'de görülmüştür.

RGS14, CASP3, PYCR2 ve STK26 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyeleri en fazla iken, ICR'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. AL ve ICR'de ise nispeten değerler birbirine eşit olmakla beraber AL'de daha fazla ekspresyon görülmüştür.

MAPK1 geni için 3 beslenme tipinde de değerler eşit olmakla birlikte, sıralama CCR>ICR>AL şeklindedir.

82. Hafta sonuçlarına göre;

ADIPOQ, CAR3, GPX3, PRDX3, SQSTM1 ve LC3 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, ICR'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. En düşük ekspresyon seviyesi ise AL'de görülmüştür.

CFL1, RGS14, NONO, NEIL3 ve CASP3 genleri için ICR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, ICR'de CCR'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. En düşük ekspresyon seviyesi ise AL'de görülmüştür.

MGST1, CD36 ve UCP1 genleri için CCR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AL ve ICR'de göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. AL ve ICR'de ise yaklaşık olarak eşit ekspresyon gözlemlenmiş olup sıralama ICR>AL şeklindedir.

MAPK1 geni için AL beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, ICR'de AL'ye göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. En düşük ekspresyon seviyesi ise CCR'de gözlemlenmiştir.

STK26 geni için ICR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi ve AL beslenme tipindeki ekspresyon seviyelerindeki değerler nispeten eşit olmakla birlikte sıralama ICR>AL şeklindedir. En düşük ekspresyon seviyesi ise CCR'de tespit edilmiştir.

PYCR2 geni için ICR beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AL ve ICR'de göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. AL ve CCR'de ise yaklaşık olarak eşit ekspresyon gözlemlenmiş olup sıralama CCR>AL şeklindedir.

4.2 ÖNERİLER

Otofaji, hücre içinde fonksiyonunu yitirmiş ya da artık işe yaramayan hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal aktivite ile yıkımını sağlayan evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır [123]. Yapılan çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres koşullarına adapte olmasını ve homeostazın korunmasında etkili olduğu gösterilmiştir [124]. Kalori kısıtlamasının kanser mekanizmasında tümör baskılayıcı bir rolünün olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada beslenmedeki kısıtlamanın yaşam süresini uzattığını ve tümör baskılayıcı rolünün olduğu sonucuna ulaşılmıştır [125].

Bölümümüz bünyesinde yapılan daha önceki bir çalışmadan elde edilen RNA-seq verileri, bu deneylerde referans olarak kullanılmıştır. Söz konusu RNA-seq çalışmasında kullanılan örneklerin RNA'ları, bu çalışmadaki fareler ile aynı protokolle ve aynı yerde yetiştirilmiş olup, 17./18. haftalarda sakrifiye edilmiş farelerin timüs dokularından elde edilmiştir. Bahsi geçen RNA-seq verilerinde, $p<0,05$ istatistiksel önem derecesinde toplamda 6091 “farklı oranda ekspresse olmuş gen (DEG)” tespit edilmiştir. Beslenme tipleri arasındaki dağılım incelendiğinde, 2281 tanesinin AL-CCR arasında, 2825 tanesinin CCR-ICR arasında, 445 tanesinin AL-ICR arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bu veriler, bu çalışmada tarama havuzu olarak kullanılmıştır [55].

Bu çalışmada seçilmiş olan 17 gen, RNA-seq datalarında tespit edilen DEGs havuzunda aranmıştır ve ekspresyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı olan değişiklikler olduğu saptanmıştır. Buna göre, ADIPOQ, CAR3, CD36, CFL1, GPX3, PRDX3, NEIL3,

MGST1, RGS14, NONO, CASP3, MAPK1, PYCR2, STK26, UCP1, SQSTM1 ve LC3 genleri için 18. Haftada AL-CCR beslenme tipleri arasında ekspresyon farklılıkları görülmektedir.

Kalori kısıtlamasının ve besin stresinin otofaji ve oksidatif stres mekanizmalarında genlerin regülasyonunu değiştirdiği bir çok hücrel mekanizma bildirilmiştir [3].

Adipoz dokuya özgü bir plazma proteini olan adiponektinin (ADIPOQ), vasküler duvarın hücrel bileşenleri üzerinde antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (OMIM: 605441). ADIPOQ/adiponektinin meme kanserinde otofajik hücre ölümünü indüklediğini ve ADIPOQ/adiponektin aracılı sitotoksik otofajide STK11/LKB1-AMPK-ULK1 ekseninin bütünleyici rolü için in vitro ve in vivo kanıtlar sağladığı bildirilmiştir [126]. Yapılan RT-PCR sonuçlarında; 18. haftada ADIPOQ geninin ekspresyonunun CCR ile beslenmiş farelerde AL ve ICR ile beslenmiş farelere göre daha fazla olduğu tespit edildi ve ICR’de ise AL’ye göre daha fazla ekspresyon tespit edilmiştir. Aynı genin 50. haftadaki RT-PCR’da ölçülen ekspresyon sonuçlarında da CCR ile beslenmiş farelerde ekspresyonun AL ve ICR’ye göre daha fazla olduğu tespit edildi ve AL’de ise ICR’ye göre nispeten daha fazla ekspresyon tespit edildi. 80. hafta sonuçlarında da 18. Haftaya benzer sonuçlar elde edilmiştir. (Şekil 4.3). 18. Haftada çıkan RT-PCR sonuçlarımız ile RNA-Seq Sonuçları eşleşmektedir (Tablo 3.5). Söz konusu veriler sonucunda CCR beslenme tipinin ADIPOQ geninin ekspresyonunu arttırmış olup meme kanseri oluşumu beklenen 82. haftada artması da otofajinin indüklediğini göstermektedir. ICR beslenme tipinde ise AL’ye göre daha fazla ekspresyon gözlenmesi de ICR’de AL’ye göre otofajinin daha fazla indüklediğini göstermiştir.

Bir nukleus pulposus fenotipik markerı olan Karbonik Anhidraz III’ün (CAR3) ekspresyonunun hipoksiye vb. hücrel streslere duyarlı olduğu ve hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu bildirilmiştir [14]. RT-PCR’da incelenen diğer bir gen olan CAR3 geninin 18. hafta için tespit edilen sonuçlarında, CCR ile beslenmiş farelerde AL ve ICR ile beslenmiş farelere göre daha fazla olduğu tespit edildi ve ICR’de ise AL’ye göre değerler yaklaşık olarak eşit olup ICR’de nispeten daha fazla ekspresyon tespit edilmiştir. Aynı genin 50. haftadaki RT-PCR’da ölçülen ekspresyon sonuçlarında da CCR ile beslenmiş farelerde ekspresyonun AL ve ICR’ye göre daha fazla olduğu tespit edildi ve AL’de ise ICR’ye göre daha fazla ekspresyon tespit edildi 82. Haftada ise CCR beslenme

tipinde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlenirken en düşük AL’de gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).18. hafta RT-PCR sonuçları AL ve CCR ile beslenmiş farelerde RNA-seq verileri ile eşleşmiştir (Tablo 3.5). 18., 50. ve 82. haftalarda CCR ile beslenen farelerde bu genin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Meme kanseri oluşumunun beklendiği 82. Haftada CCR beslenme tipinde ekspresyonun artması, CCR’nin tümör baskılayıcı özelliğini desteklemektedir. Bu da kanserde CCR beslenme tipinin ICR ve AL’ye göre daha fazla oksidatif strese karşı rol oynadığını göstermiş olup ICR’nin de AL’ye oranla daha aktif rol oynadığını düşündürmektedir.

Kaspaz-3 (CASP3) ve/veya diğer kaspaz proteinlerinin fonksiyonlarının kaybı, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasını sağlamaktadır [11]. RT-PCR’da incelenen diğer bir gen olan CASP3 geninin 18. hafta için tespit edilen sonuçlarında, CCR ile beslenmiş farelerde AL ve ICR ile beslenmiş farelere göre daha fazla olduğu tespit edildi ve ICR’de ise AL’ye göre değerler yaklaşık olarak eşit olup ICR’de nispeten daha fazla ekspresyon tespit edilmiştir. Aynı genin 50. haftadaki RT-PCR’da ölçülen ekspresyon sonuçlarında da CCR ile beslenmiş farelerde ekspresyonun AL ve ICR’ye göre daha fazla olduğu tespit edildi ve AL ve ICR’de ise yaklaşık olarak eşit ekspresyon tespit edilmiştir. 82. Haftada ise ICR beslenme tipinde ekspresyonun belirgin bir şekilde yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlenirken en düşük AL’de gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).18. hafta RT-PCR sonuçları AL ve CCR ile beslenmiş farelerde RNA-seq verileri ile eşleşmiştir (Tablo 3.5). Meme kanseri oluşumunun beklendiği 82. Haftada ICR beslenme tipinde ekspresyonun artması, ICR’nin kaspaz aracılığı apoptoz mekanizmasını tetiklediğini düşündürmektedir.

RT-PCR’ da ekspresyon seviyesi ölçülen bir diğer gen CD36, bağışıklık sisteminde en çok makrofajlarda incelenmiştir. Literatürde doğuştan gelen B tipi hücreler tarafından da yüksek oranda ifade edildiği, CD36’nın bu hücrelerde makro-otofaji/otofajiye sebep olduğu ve yokluğunda humoral bağışıklık tepkisinin bozulduğu bildirilmiştir [7]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada ICR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken AL ve CCR’deki değerler birbirine yakın olup CCR ile beslenmiş farelerde nispeten daha az gözlenmiştir. Bu durum RNA-seq verileriyle tutarsızlık göstermektedir. 50. haftada da CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi görülürken, AL ve ICR ile beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir. 82. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde CCR beslenme

tipinde ekspresyon ise belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.5). Bu durum CCR beslenme tipinde otofajinin indüklendiğini ve tümör supresör görevini desteklemektedir. 18. haftada CCR beslenme tipindeki farelerde ekspresyon seviyesinin artması asıl beklenen sonuçtur. Bu gen için 18. haftaya ait örneklerin tekrar RT-PCR ile çalışılması gerekmektedir.

RT-PCR’ da ekspresyon seviyesi ölçülen bir diğer gen CFL1 geni, otofajiyi indükleyen bir protein olan Cofilin 1 proteinini üretmektedir [5]. CFL-1 geninin 18. hafta için tespit edilen sonuçlarında, CCR ile beslenmiş farelerde AL ve ICR ile beslenmiş farelere göre daha fazla olduğu tespit edildi ve ICR’de ise AL’ye göre değerler yaklaşık olarak eşit olup AL’de nispeten daha fazla ekspresyon tespit edilmiştir. Aynı genin 50. haftadaki RT-PCR’da ölçülen ekspresyon sonuçlarında da CCR ile beslenmiş farelerde ekspresyonun AL ve ICR’ye göre daha fazla olduğu tespit edilmiş olup AL ve ICR’de ise yaklaşık olarak eşit ekspresyon tespit edilmiştir. 82. Haftada ise ICR beslenme tipinde ekspresyonun belirgin bir şekilde yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlenirken en düşük AL’de gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). 18. hafta RT-PCR sonuçları AL ve CCR ile beslenmiş farelerde RNA-seq verileri ile eşleşmiştir (Tablo 3.5). Meme kanseri oluşumunun beklendiği 82. Haftada ICR beslenme tipinde ekspresyonun artması, ICR’nin CFL1- ilişkili otofaji yolağını aktivelediğini göstermektedir.

RT-PCR’ da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen GPX3, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunun azaltılmasına neden olan ve tümör baskılayıcı olarak görev alan bir proteini üretir [13]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. 50. haftada da ekspresyon seviyeleri CCR>AL>ICR şeklindedir. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde ise CCR ile beslenen farelerde AL ile beslenen farelerine göre GPX3 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Tümör oluşumunun başlaması beklenen 80. haftalarda tümör baskılayıcı bir genin seviyesinin artması beklenen bir sonuçtur. 82. Haftada ICR’nin de AL’ye göre yüksek olması ICR’nin de AL’ye göre daha fazla tümör baskılayıcı özelliği olduğunu düşündürmektedir.

RT-PCR’ da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen PRDX3’ün reaktif oksijen türlerinden biri olan H₂O₂’yi ortadan kaldıran bir enzim olduğu, oksidatif stresi etkili bir şekilde

inhibe edip hücrel hasarı hafifletebileceği bildirmiştir [127]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiş olup AL ve ICR beslenme tiplerindeki farelerde ise nispeten eşit bir ekspresyon tespit edilmiştir (Şekil 4.7). 50. haftada da CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL beslenme tipindekiler ICR'ye göre daha fazladır. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde CCR ile beslenen farelerde PRDX3 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir. Ekspresyon sıralaması CCR>ICR>AL şeklindedir (Şekil 4.11). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR beslenme tiplerindeki fareler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Bu durum CCR beslenme tipinin oksidatif stresi azaltabileceğini düşündürmektedir. 82. Haftada ICR'nin de AL'ye göre yüksek olması ICR'nin de AL'ye göre oksidatif strese daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

RT-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen MGST1'in hücrede bir peroksidaz olarak görev aldığı ve yaşlanmaya bağlı oksidatif hasara karşı koruma sağladığı belirtilmiştir [128]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiş olup ICR ve AL'nin ise nispeten eşit ekspresyonlara sahip olduğu saptanmıştır. 50. haftada da CCR ile beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, ICR ile beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri en düşük değerdedir. 82. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde CCR ile beslenen farelerde ICR ve AL ile beslenen farelere göre MGST1 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir ve AL ile ICR ekspresyonları ise eşittir (Şekil 4.12). Bu durum CCR'nin tümör baskılama özelliğini desteklemiştir. RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5).

RT-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen olan MAPK1; otofajinin indüksiyonu için önemli bir yol oynayan proteindir [18]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada AL ve ICR ile beslenmiş farelerde değerler birbirine yakın olmakla birlikte AL'deki ekspresyon daha fazladır.. 50. haftada ise 3 beslenme tipindeki değerler birbirine çok yakın ike sıralama CCR>ICR>AL şeklindedir.. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde AL ile beslenen farelerde ekspresyon diğerlerine göre daha yüksektir (Şekil 4.23). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları birbirleriyle eşleşmemiştir (Tablo 3.5). Bu gen için örneklerin yeni primerler ile ve steril bir ortamda tekrar RT-PCR ile çalışılması gerekmektedir.

RT-PCR’da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen olan RGS14; RGS protein ailesinin bir parçasıdır ve sinaptik plastisite, hücre bölünmesi ve fagositoz gibi çeşitli biyolojik işlemlerde yer aldığı belirtilmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada RGS proteinlerinin, birkaç farklı türde stres direncini ve uzun ömürlülüğü düzenlemede önemli roller oynadığını göstermiştir [22]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde belirgin bir şekilde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. 50. haftada da CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL beslenenlerde ve ICR ile beslenmiş farelerde nispeten benzer ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde ICR bireylerde CCR farelere göre ekspresyon belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.16). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda oksidatif stresi azaltan bir rol oynadığı düşünülen RGS14 geninin seviyesinin artması beklenen bir sonuçtur ve bu durum ICR’de bu gen üzerinde hücre döngüsünü düzenlemede etkin bir rol oynadığını düşündürmüştür.

RT-PCR’da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen NONO, DNA çift ipliğinin bozulmasının onarımı için kritik bir rol oynamaktadır [24]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. 50. haftada da CCR’de ekspresyon seviyesi en yüksekken en düşük ICR’dır. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde ICR ile beslenen bireylerde NONO ekspresyonu daha yüksektir (Şekil 4.17). En düşük ise AL beslenme tipine aittir. Tümör oluşumunun başlaması beklenen bu haftalarda tümör baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Bu sonuç ICR’nin de DNA hasar tamirinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

RT-PCR’da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen olan PYCR2’nin susturulması fibroblastlarda oksidatif strese aşırı duyarlılığa neden olduğu bildirmiştir [10]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada AL ve CCR ile beslenmiş farelerde eşit ekspresyon seviyesi tespit edilmişken ICR ile beslenen farelerde ise nispeten düşük ekspresyon seviyesi görülmüştür. 50. haftada da CCR beslenmiş fareler en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve ICR ile beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir.

82. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde ICR ile beslenen farelerde AL ve CCR ile beslenen farelere göre nispeten az bir şekilde yükseklik görülmüştür (şekil 4.24). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR fareler için tutarlılık göstermemiştir (Tablo 3.5). 82. Hafta sonuçlarına göre ICR'nin de oksşdatşf strese karşu önemli bir rol oynadığını düşündürtmektedir. 18. Hafta sonuçları RNA-seq datasıyla eşleşmediğinden daha steril ve optimize şartlarda yeniden RT-PCR yapmak gerektiği düşünülmektedir.

RT-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen STK26, otofagozom oluşumunu teşvik eden bir gendir [8]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken, ICR ve AL beslenmiş bireylerde benzer ekspresyon gözlenmiştir. Bu durum CCR'nin bilinen otofaji indükleme özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da benzer şekilde CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve ICR beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri daha düşük ve yakın değerlerdedir. 82. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede ICR farelerde CCR ve AL farelere göre STK26 ekspresyonu düşük bir farkla daha yüksektir (şekil 4.25). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR fareler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Özellikle bu gen üzerinde kanserde ICR beslenme tipinin otofajiyi indüklemeye etkin rol oynadığı düşünülmüştür.

RT-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer bir gen olan UCP1 geninin oksidatif hasarının seviyesini düşürdüğü ve mr uzattığı bildirilmiştir [19,20]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiş olup ICR'de ise en düşük ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. 50. haftada CCR ile beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, ICR ile beslenmiş farelerde ise en düşük ekspresyon seviyeleri gözlenmiştir. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede CCR ile beslenen bireylerde ICR ve AL ile beslenen farelere göre UCP1 geninin ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir ve AL ile ICR ekspresyonları ise eşit gözlenmiştir (şekil 4.26). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları ile tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Bulgularımıza göre tümör oluşumunun beklendiği 82. haftada CCR beslenmenin ekspresyonun artması beklenen bir durumdur.

NEIL3 ekspresyonunun aktivasyonunun, hücrelerin oksidatif veya inflamatuvar stres ile ilişkili mutajenik DNA hasarının onarılmasına yardımcı olduğunu gösterilmiştir [9]. RT-

PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken, ICR ve AL beslenmiş bireylerde benzer ekspresyon gözlenmiştir. RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları, AL ve CCR fareler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). 50. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL'de ise ICR'ye göredaha yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. 82. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde ICR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi görülmüştür. CCR'de ise AL'ye göre daha yüksek ekspresyon seviyesi görülmüştür (Şekil 4.25). Özellikle bu gen üzerinde kanserde ICR beslenme tipinin otofajiyi indüklemeye etkin rol oynadığı düşünülmüştür.

RT-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen SQSTM1 proteini otofaji marker proteinidir [25]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken AL ve ICR'de ekspresyon seviyeleri yaklaşık olarak eşittir. 50. haftada da CCR ile beslenmiş fareler en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken ICR ve AL'nin ise ekspresyon seviyeleri eşittir. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde CCR ile beslenen farelerin ekspresyonu en fazla iken, ICR ile beslenen farelerde SQSTM1 ekspresyonu onu takip eder biçimdedir (Şekil 4.30). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları ile tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda otofaji marker geninin ekspresyon seviyesinin seviyesinin artması bu gen üzerinden bakılarak CCR beslenme tipinin otofajiyi indüklediği söylenebilir.

RT-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen son gen LC3 proteini diğer bir otofaji marker proteinidir [27]. RT-PCR sonuçlarına göre 18. haftada CCR ile beslenmiş farelerde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken AL ve ICR'de ekspresyon seviyeleri yaklaşık olarak eşittir. 50. haftada da CCR ile beslenmiş fareler en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken ICR'de ise AL'ye göre daha yüksek ekspresyon seviyesi görülmüştür. 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde CCR ile beslenen farelerin ekspresyonu belirgin bir şekilde en fazla iken, AL ile beslenen farelerde ekspresyon en düşük seviyededir (Şekil 4.31). RNA-seq verileri ve 18. hafta RT-PCR sonuçları ile tutarlılık göstermiştir (Tablo 3.5). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda otofaji marker geninin ekspresyon seviyesinin seviyesinin artması bu gen üzerinden bakılarak CCR beslenme tipinin otofajiyi indüklediği söylenebilir.

Sonularımızıya dayanarak, yaşamın erken evresinde belirlenen genlerin özelinde Kronik Kalori Kısıtlaması (CCR)’nın otofaji ve oksidatif stres mekanizmalarının regülasyonunda daha baskın olduğu söylenebilir. Kanserin başlamasıyla birlikte bazı genlerde CCR daha aktif rol oynamışken bazı genler ise ICR’de daha aktif rol oynamaktadır. Bulgularımıza göre AL, ICR ve CCR şeklinde beslenen farelerin timuslarında belirgin bir şekilde gen ekspresyon farklılıkları meydana gelmiştir. Bu sonuçlar kalori kısıtlaması çalışmalarında, bağışıklık sistemi, oksidatif stres, otofaji ve kanser gelişim araştırmaları için yeni ipuçları sağlayacaktır.



- [1] Kristan DM. Chronic calorie restriction increases susceptibility of laboratory mice (*Mus musculus*) to a primary intestinal parasite infection. *Aging Cell* 2007;6:817–25. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00345.x>.
- [2] Poetschke HL. Effects of calorie restriction on thymocyte growth, death and maturation. *Carcinogenesis* 2000;21:1959–64. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.11.1959>.
- [3] Dixit VD. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. *Journal of Leukocyte Biology* 2008;84:882–92. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108028>.
- [4] Jung S-E, Shin K-J, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Reports* 2017;50:546–53. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.11.175>.
- [5] Wang H-J, Chen S-F, Lo W-Y. Identification of Cofilin-1 Induces G0/G1 Arrest and Autophagy in Angiotensin-(1-7)-treated Human Aortic Endothelial Cells from iTRAQ Quantitative Proteomics. *Scientific Reports* 2016;6:35372. <https://doi.org/10.1038/srep35372>.
- [6] Li Y, Yang P, Zhao L, Chen Y, Zhang X, Zeng S, et al. CD36 plays a negative role in the regulation of lipophagy in hepatocytes through an AMPK-dependent pathway. *Journal of Lipid Research* 2019;60:844–55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M090969>.
- [7] He C, Wang S, Zhou C, He M, Wang J, Ladds M, et al. CD36 and LC3B initiated autophagy in B cells regulates the humoral immune response. *Autophagy* 2021;17:3577–91. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1885183>.
- [8] Huang T, Kim CK, Alvarez AA, Pangen RP, Wan X, Song X, et al. MST4 Phosphorylation of ATG4B Regulates Autophagic Activity, Tumorigenicity, and Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* 2017;32:840–855.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.005>.
- [9] Fleming AM, Zhu J, Howpay Manage SA, Burrows CJ. Human *NEIL3* Gene Expression Regulated by Epigenetic-Like Oxidative DNA Modification. *Journal of the American Chemical Society* 2019;141:11036–49. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b01847>.

- [10] Kuo M-L, Lee MB-E, Tang M, den Besten W, Hu S, Sweredoski MJ, et al. PYCR1 and PYCR2 Interact and Collaborate with RRM2B to Protect Cells from Overt Oxidative Stress. *Scientific Reports* 2016;6:18846. <https://doi.org/10.1038/srep18846>.
- [11] Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun A-M, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002;21:8843–51. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206044>.
- [12] Chang C, Worley BL, Phaëton R, Hempel N. Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers* 2020;12:2197. <https://doi.org/10.3390/cancers12082197>.
- [13] An BC, Choi Y-D, Oh I-J, Kim JH, Park J-I, Lee S. GPx3-mediated redox signaling arrests the cell cycle and acts as a tumor suppressor in lung cancer cell lines. *PLOS ONE* 2018;13:e0204170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204170>.
- [14] Silagi ES, Batista P, Shapiro IM, Risbud M v. Expression of Carbonic Anhydrase III, a Nucleus Pulposus Phenotypic Marker, is Hypoxia-responsive and Confers Protection from Oxidative Stress-induced Cell Death. *Scientific Reports* 2018;8:4856. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23196-7>.
- [15] Peskin A v., Low FM, Paton LN, Maghzal GJ, Hampton MB, Winterbourn CC. The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H₂O₂ Is Not Reflected in Its Reaction with Other Oxidants and Thiol Reagents. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:11885–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700339200>.
- [16] Hu W, Dang X-B, Wang G, Li S, Zhang Y-L. Peroxiredoxin-3 attenuates traumatic neuronal injury through preservation of mitochondrial function. *Neurochemistry International* 2018;114:120–6. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.004>.
- [17] Maeda A, Crabb JW, Palczewski K. Microsomal Glutathione S -Transferase 1 in the Retinal Pigment Epithelium: Protection against Oxidative Stress and a Potential Role in Aging . *Biochemistry* 2005;44:480–9. <https://doi.org/10.1021/bi048016f>.
- [18] Zhao Y, Li X, Ma K, Yang J, Zhou J, Fu W, et al. The axis of MAPK1/3-XBP1u-FOXO1 controls autophagic dynamics in cancer cells. *Autophagy* 2013;9:794–6. <https://doi.org/10.4161/auto.23918>.
- [19] Stier A, Bize P, Habbold C, Bouillaud F, Massemin S, Criscuolo F. Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: a case study using UCP1

- knock-out mice. *Journal of Experimental Biology* 2013. <https://doi.org/10.1242/jeb.092700>.
- [20] Ortega-Molina A, Efeyan A, Lopez-Guadamillas E, Muñoz-Martin M, Gómez-López G, Cañamero M, et al. Pten Positively Regulates Brown Adipose Function, Energy Expenditure, and Longevity. *Cell Metabolism* 2012;15:382–94. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.001>.
- [21] Li Y, Tang X, Li X, Dai H, Miao R, Cai J, et al. Regulator of G protein signalling 14 attenuates cardiac remodelling through the MEK–ERK1/2 signalling pathway. *Basic Research in Cardiology* 2016;111:47. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0566-1>.
- [22] Lin Y-R, Parikh H, Park Y. Loco signaling pathway in longevity. *Small GTPases* 2011;2:158–61. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.3.16390>.
- [23] Schiffner S, Zimara N, Schmid R, Bosserhoff A-K. p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma. *Carcinogenesis* 2011;32:1176–82. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr103>.
- [24] Li S, Li Z, Shu F-J, Xiong H, Phillips AC, Dynan WS. Double-strand break repair deficiency in NONO knockout murine embryonic fibroblasts and compensation by spontaneous upregulation of the PSPC1 paralog. *Nucleic Acids Research* 2014;42:9771–80. <https://doi.org/10.1093/nar/gku650>.
- [25] He J-P, Hou P-P, Chen Q-T, Wang W-J, Sun X-Y, Yang P-B, et al. Flightless-I Blocks p62-Mediated Recognition of LC3 to Impede Selective Autophagy and Promote Breast Cancer Progression. *Cancer Research* 2018;78:4853–64. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3835>.
- [26] Sukserree S, Mildner M, Rossiter H, Pammer J, Zhang C-F, Watanapokasin R, et al. Autophagy in the Thymic Epithelium Is Dispensable for the Development of Self-Tolerance in a Novel Mouse Model. *PLoS ONE* 2012;7:e38933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038933>.
- [27] Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF, Dönmez-Altuntaş H, Özkul Y, et al. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2018;144:415–30. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2557-5>.
- [28] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in

- GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015;136:E359–86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- [29] Çiçekdal MB. ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE PREVENTIVE EFFECTS OF CALORIE RESTRICTION FOR BREAST CANCER DEVELOPMENT IN MMTV-TGF- α MICE. n.d.
- [30] Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Menopausal Review* 2015;3:196–202. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>.
- [31] James FR, Wootton S, Jackson A, Wiseman M, Copson ER, Cutress RI. Obesity in breast cancer – What is the risk factor? *European Journal of Cancer* 2015;51:705–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.01.057>.
- [32] Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics* 2003;33:238–44. <https://doi.org/10.1038/ng1107>.
- [33] Dobbins M, Decorby K, Choi BCK. The Association between Obesity and Cancer Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies from 1985 to 2011. *ISRN Preventive Medicine* 2013;2013:1–16. <https://doi.org/10.5402/2013/680536>.
- [34] de Pergola G, Silvestris F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Journal of Obesity* 2013;2013:1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/291546>.
- [35] Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *International Journal of Cancer* 2001;91:421–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999::aid-ijc1053>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999::aid-ijc1053>3.0.co;2-t).
- [36] Kruk J. Overweight, Obesity, Oxidative Stress and the Risk of Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014;15:9579–86. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.22.9579>.
- [37] Simpson ER, Brown KA. Obesity and breast cancer: role of inflammation and aromatase. *Journal of Molecular Endocrinology* 2013;51:T51–9. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0217>.
- [38] International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, Weight Control and Physical Activity, IARC Handbook of Cancer Prevention, Vol 6. Lyon, France: IARC Publications. 2002 n.d.
- [39] Matthews S, Thompson H. The Obesity-Breast Cancer Conundrum: An Analysis of the Issues. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17:989. <https://doi.org/10.3390/ijms17060989>.

- [40] Nichols HB, Anderson C, White AJ, Milne GL, Sandler DP. Oxidative Stress and Breast Cancer Risk in Premenopausal Women. *Epidemiology* 2017;28:667–74. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000685>.
- [41] Cleary MP, Grossmann ME. Obesity and Breast Cancer: The Estrogen Connection. *Endocrinology* 2009;150:2537–42. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0070>.
- [42] Seiler A, Chen MA, Brown RL, Fagundes CP. Obesity, Dietary Factors, Nutrition, and Breast Cancer Risk. *Current Breast Cancer Reports* 2018;10:14–27. <https://doi.org/10.1007/s12609-018-0264-0>.
- [43] Taormina G, Mirisola MG. Calorie Restriction in Mammals and Simple Model Organisms. *BioMed Research International* 2014;2014:1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/308690>.
- [44] Hursting SD, Dunlap SM, Ford NA, Hursting MJ, Lashinger LM. Calorie restriction and cancer prevention: a mechanistic perspective. *Cancer & Metabolism* 2013;1:10. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-10>.
- [45] KRITCHEVSKY D. Caloric Restriction and Cancer. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2001;47:13–9. <https://doi.org/10.3177/jnsv.47.13>.
- [46] Tannenbaum A. The dependence of tumor formation on the composition of the calorie-restricted diet as well as on the degree of restriction. 1945. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif) 1996;12:653–4.
- [47] Weindruch R. Effect of caloric restriction on age-associated cancers. *Experimental Gerontology* 1992;27:575–81. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(92\)90012-O](https://doi.org/10.1016/0531-5565(92)90012-O).
- [48] Longo VD, Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 2010;31:89–98. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.11.004>.
- [49] Weindruch R, Walford RL. Dietary Restriction in Mice Beginning at 1 Year of Age: Effect on Life-Span and Spontaneous Cancer Incidence. *Science* 1982;215:1415–8. <https://doi.org/10.1126/science.7063854>.
- [50] Manjgaladze M, Chen S, Frame LT, Seng JE, Duffy PH, Feuers RJ, et al. Effects of caloric restriction on rodent drug and carcinogen metabolizing enzymes: implications for mutagenesis and cancer. *Mutation Research/DNAging* 1993;295:201–22. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(93\)90021-T](https://doi.org/10.1016/0921-8734(93)90021-T).
- [51] Berrigan D, Lavigne JA, Perkins SN, Nagy TR, Barrett JC, Hursting SD. Phenotypic effects of calorie restriction and insulin-like growth factor-1 treatment

- on body composition and bone mineral density of C57BL/6 mice: implications for cancer prevention. *In Vivo* (Athens, Greece) n.d.;19:667–74.
- [52] Lv M, Zhu X, Wang H, Wang F, Guan W. Roles of Caloric Restriction, Ketogenic Diet and Intermittent Fasting during Initiation, Progression and Metastasis of Cancer in Animal Models: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014;9:e115147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115147>.
- [53] Dirx MJM, Zeegers MPA, Dagnelie PC, van den Bogaard T, van den Brandt PA. Energy restriction and the risk of spontaneous mammary tumors in mice: A meta-analysis. *International Journal of Cancer* 2003;106:766–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.11277>.
- [54] DOĞAN S, ROGOZINA OP, LOKSHIN AE, GRANDE JP, CLEARY MP. Effects of chronic vs. intermittent calorie restriction on mammary tumor incidence and serum adiponectin and leptin levels in MMTV-TGF- α mice at different ages. *Oncology Letters* 2010;1:167–76. https://doi.org/10.3892/ol_00000031.
- [55] ZEHRİ ÖMEROĞLU ULU. KALORİ KISITLAMASI İLE BESLENEN FARE MEME TÜMÖRÜ VİRÜSÜ-TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-ALFA FARELERİN TİMUS DOKUSUNDAN RNA SEKANS LAMA ANALİZİ. n.d.
- [56] Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine* 2011;32:159–221. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.07.001>.
- [57] Speakman JR, Hambly C. Starving for Life: What Animal Studies Can and Cannot Tell Us about the Use of Caloric Restriction to Prolong Human Lifespan. *The Journal of Nutrition* 2007;137:1078–86. <https://doi.org/10.1093/jn/137.4.1078>.
- [58] Stekovic S, Hofer SJ, Tripolt N, Aon MA, Royer P, Pein L, et al. Alternate Day Fasting Improves Physiological and Molecular Markers of Aging in Healthy, Non-obese Humans. *Cell Metabolism* 2019;30:462-476.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.016>.
- [59] Rogozina OP, Nkhata KJ, Nagle EJ, Grande JP, Cleary MP. The protective effect of intermittent calorie restriction on mammary tumorigenesis is not compromised by consumption of a high fat diet during refeeding. *Breast Cancer Research and Treatment* 2013;138:395–406. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2464-7>.
- [60] Mizuno NK, Rogozina OP, Seppanen CM, Liao DJ, Cleary MP, Grossmann ME. Combination of Intermittent Calorie Restriction and Eicosapentaenoic Acid for

- Inhibition of Mammary Tumors. *Cancer Prevention Research* 2013;6:540–7. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0033>.
- [61] YU BP, CHEN JJ, KANG CM, CHOE M, MAENG YS, KRISTAL BS. Mitochondrial Aging and Lipoperoxidative Products. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996;786:44–56. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb39050.x>.
- [62] Pugh TD, Klopp RG, Weindruch R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys☆. *Neurobiology of Aging* 1999;20:157–65. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00043-3).
- [63] Lee C-K, Allison DB, Brand J, Weindruch R, Prolla TA. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99:14988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.232308999>.
- [64] Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* 1998;39:1529–42.
- [65] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* 2012;5:9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- [66] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 2000;18:655–73. <https://doi.org/10.1097/00004872-200018060-00002>.
- [67] Meier U, Gressner AM. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clinical Chemistry* 2004;50:1511–25. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032482>.
- [68] Fontana L, Villareal DT, Das SK, Smith SR, Meydani SN, Pittas AG, et al. Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial. *Aging Cell* 2016;15:22–7. <https://doi.org/10.1111/accel.12400>.
- [69] Ribatti D, Crivellato E, Vacca A. Miller’s seminal studies on the role of thymus in immunity. *Clinical and Experimental Immunology* 2006;144:371–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03060.x>.
- [70] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative Studies on Tissue Transplantation Immunity. III. Actively Acquired Tolerance. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences 1956;239:357–414. <https://doi.org/10.1098/rstb.1956.0006>.
- [71] Kovacic P, Jacintho J. Mechanisms of Carcinogenesis Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Current Medicinal Chemistry* 2001;8:773–96. <https://doi.org/10.2174/0929867013373084>.
- [72] Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism* 2014;2:17. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>.
- [73] Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 2002;82:47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- [74] Hornsveld M, Dansen TB. The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxidants & Redox Signaling* 2016;25:300–25. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6580>.
- [75] Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, Amil M, Casanueva FF. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radical Research* 2013;47:243–56. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.772604>.
- [76] Yin H, Xu L, Porter NA. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* 2011;111:5944–72. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.
- [77] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014;2014:1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- [78] Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:31426–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212549200>.
- [79] VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100:14247–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.2332176100>.

- [80] Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, 1990, p. 407–21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H).
- [81] Kelly FJ, Mudway IS. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* 2003;25:375–96. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0024-x>.
- [82] DEAN RT, FU S, STOCKER R, DAVIES MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 1997;324:1–18. <https://doi.org/10.1042/bj3240001>.
- [83] Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 1990;9:315–25. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90006-5).
- [84] Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991;88:10540–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10540>.
- [85] Jones RHV, Hothersall JS. The Effect of Diabetes and Dietary Ascorbate Supplementation on the Oxidative Modification of Rat Lens β L Crystallin. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 1993;50:197–209. <https://doi.org/10.1006/bmmb.1993.1062>.
- [86] Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4. *Free Radical Biology and Medicine* 2001;31:1287–312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).
- [87] Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, Vucevic D, Radosavljevic TTT. Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *General Physiology and Biophysics* 2013;32:277–83. https://doi.org/10.4149/gpb_2013027.
- [88] Al-Shafei AI. Ramadan fasting ameliorates oxidative stress and improves glycemic control and lipid profile in diabetic patients. *European Journal of Nutrition* 2014;53:1475–81. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0650-y>.
- [89] BaHammam A, Pandi-Perumal S, Alzoghaibi M. The effect of Ramadan intermittent fasting on lipid peroxidation in healthy young men while controlling

- for diet and sleep: A pilot study. *Annals of Thoracic Medicine* 2016;11:43. <https://doi.org/10.4103/1817-1737.172296>.
- [90] Schloesser A, Campbell G, Glüer C-C, Rimbach G, Huebbe P. Restriction on an Energy-Dense Diet Improves Markers of Metabolic Health and Cellular Aging in Mice Through Decreasing Hepatic mTOR Activity. *Rejuvenation Research* 2015;18:30–9. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1630>.
- [91] Dutra MF, Bristot IJ, Batassini C, Cunha NB, Vizuite AFK, Souza DF de, et al. Effects of chronic caloric restriction on kidney and heart redox status and antioxidant enzyme activities in Wistar rats. *BMB Reports* 2012;45:671–6. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.11.094>.
- [92] Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 1994;32:671–83. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90011-6).
- [93] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007;12:913–22. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>.
- [94] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* 2014;224:164–75. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- [95] Starkov AA. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1147:37–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>.
- [96] Hiltermann JTN, Lapperre TS, van Bree L, Steerenberg PA, Brahim JJ, Sont JK, et al. Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: *Free Radical Biology and Medicine* 1999;27:1448–54. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00191-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00191-4).
- [97] Cadet J. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2003;531:5–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.001>.
- [98] Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* 2000;486:10–3. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9).
- [99] Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & Molecular Medicine* 1999;31:53–9. <https://doi.org/10.1038/emmm.1999.9>.

- [100] Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1987;1:358–64.
- [101] Bayr H. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* 2005;33:S498–501. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>.
- [102] Nauseef WM. The NADPH-Dependent Oxidase of Phagocytes. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1999;111:373–82. <https://doi.org/10.1111/paa.1999.111.5.373>.
- [103] Rosen H, Orman J, Rakita RM, Michel BR, VanDevanter DR. Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990;87:10048–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.10048>.
- [104] Ozolins TR, Hales BF. Oxidative stress regulates the expression and activity of transcription factor activator protein-1 in rat conceptus. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997;280:1085–93.
- [105] Brieger K, Schiavone S, Miller Jr, Krause K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly* 2012. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.
- [106] Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology* 2011;21:569–76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.008>.
- [107] Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases, 2018, p. 209–344. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006>.
- [108] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press; 2015. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- [109] Devrim Öz ARSLAN, Gözde KORKMAZ, Devrim GÖZÜAÇIK. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2011;4:184–94.
- [110] Molineaux SM. Molecular Pathways: Targeting Proteasomal Protein Degradation in Cancer: Figure 1. *Clinical Cancer Research* 2012;18:15–20. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0853>.
- [111] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 2007;9:1102–9. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>.

- [112] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 2010;90:1383–435. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>.
- [113] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 2011;18:571–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>.
- [114] Meléndez A. Autophagy in *C. elegans*. *WormBook* 2009:1–26. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.147.1>.
- [115] Yen W-L, Klionsky DJ. How to Live Long and Prosper: Autophagy, Mitochondria, and Aging. *Physiology* 2008;23:248–62. <https://doi.org/10.1152/physiol.00013.2008>.
- [116] Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001;2:211–6. <https://doi.org/10.1038/35056522>.
- [117] What is autophagy? n.d.
- [118] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;10:51–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>.
- [119] Kusuoka O, Fujiwara-Tani R, Nakashima C, Fujii K, Ohmori H, Mori T, et al. Intermittent calorie restriction enhances epithelial-mesenchymal transition through the alteration of energy metabolism in a mouse tumor model. *International Journal of Oncology* 2017. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4229>.
- [120] Barger JL, Walford RL, Weindruch R. The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Experimental Gerontology* 2003;38:1343–51. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.017>.
- [121] Ogura M, H I, S DM, Good RA. Decrease by chronic energy intake restriction of cellular proliferation in the intestinal epithelium and lymphoid organs in autoimmunity-prone mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, , 1989, p. 5918–22.
- [122] Hoch R v., Thompson DA, Baker RJ, Weigel RJ. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. *International Journal of Cancer* 1999;84:122–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990420\)84:2<122::AID-IJC5>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990420)84:2<122::AID-IJC5>3.0.CO;2-S).

- [123] Nah J, Yuan J, Jung Y-K. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: From Mechanism to Therapeutic Approach. *Molecules and Cells* 2015;38:381–9. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0034>.
- [124] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M v, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation* 2012;19:107–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- [125] Becker S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2015;131:S36–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.03.015>.
- [126] Chung SJ, Nagaraju GP, Nagalingam A, Muniraj N, Kuppusamy P, Walker A, et al. ADIPOQ/adiponectin induces cytotoxic autophagy in breast cancer cells through STK11/LKB1-mediated activation of the AMPK-ULK1 axis. *Autophagy* 2017;13:1386–403. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1332565>.
- [127] Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal* 2010;425:313–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20091541>.
- [128] Pham TNM, Jeong SY, Kim DH, Park YH, Lee JS, Lee KW, et al. Protective Mechanisms of Avocado Oil Extract Against Ototoxicity. *Nutrients* 2020;12:947. <https://doi.org/10.3390/nu12040947>.

Makaleler

1. Hanifenur MANCILAR Zehra Ömeroğlu Ulu², Nehir Özdemir Özgentürk³, (2021). Kalori kısıtlı diyetle beslenen MMTV-TGF- α farelerinde Otofaji ile ilişkili SQSTM1 Geninin Ekspresyonunun Araştırılması. *EJONS INTERNATIONAL JOURNAL ON MATHEMATICS, ENGINEERING - NATURAL SCIENCES*, 20, p. 919-928. Doi Number: <http://dx.doi.org/10.38063/ejons.546>



