



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KETOJENİK DİYETİN GATOR1 YOLAĞINA ETKİSİ

Dr. ASLI CAN ARABACI

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2024



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KETOJENİK DİYETİN GATOR1 YOLAĞINA ETKİSİ

Dr. ASLI CAN ARABACI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. DİLŞAD TÜRKDOĞAN

İSTANBUL 2024

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Dilşad TÜRKDOĞAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın metodolojisini gerçekleştiren Prof. Dr. Elif Damla ARISAN hocamıza ve ekibinde yer alan Eren YÜKSELOĞLU, İlayda SÖNMEZ ve Azize Simay TÜRÜTOĞLU'na teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın materyalini sağlayan ve kullanımına izin veren Dr. Şeyda KARABULUT'a çok teşekkür ediyorum.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları kliniğindeki eğitimime katkısı olan tüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çok sevdiğim kıymetli eşim, çalışma arkadaşım Dr. Mehmet Burak ARABACI'ya her zaman yanımda olduğu, asistanlık ve tez sürecimde beni her zaman desteklediği için çok teşekkür ediyorum.

Asistanlık eğitimim boyunca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim çok sevdiğim eş kıdemlerime çok teşekkür ederim.

Canım annem, babam, ablam Eda ve canım yeğenim Asya'ya her zaman yanımda oldukları ve beni destekledikleri için sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu tezin yapımını ve yürütülmesini Marmara Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi desteklemiştir.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Ketojenik diyet (KD) ve kalori kısıtlaması (KK) epilepsi hastalarında medikal tedaviye alternatif olarak uygulanan bir tedavi şeklidir. Her iki yöntemin epilepsi üzerindeki nöbet durdurucu etki mekanizması net aydınlatılamamıştır. KD ve KK'nin nöbet durdurucu etki mekanizmalarından en çok araştırma konusu olan yolaklardan bir tanesi memeli rapamisin hedefi (mTOR) yolağıdır. Bu sebeple mevcut çalışmanın inceleme konusu, farklı yağ asitleriyle oluşturulmuş ketojenik diyetin ve uygulanan kalori kısıtlamalarının mTOR sinyal yolağı üzerinde olan etkisini, mTOR'u inhibe edici etkiye sahip Rag 1'e yönelik GAP aktivitesi (GATOR) protein kompleksi ifadesinde meydana gelen değişimler ile açıklamaktır.

Gereç ve Yöntem: Dr. Şeyda KARABULUT'un Prof. Dr. Dilşad TÜRDOĞAN danışmanlığında 2019 yılında yapmış olduğu Ketojenik Diyet ve Kalori Kısıtlı Diyetin Anti-inflamatuar Etkilerinin İncelenmesi isimli tez çalışmasında 50 adet Winstar dişi sıçan (6 haftalık), 7 alt gruba ayrılmış ve 7 hafta boyunca farklı beslenme koşullarına maruz bırakılmıştır. Tüm ele alınan deney gruplarında ketojenik diyet (KD) etkinliğini doğrulamak için serum beta-hidroksibütirat seviyeleri ölçülmüştür. 7 haftanın sonunda her bir alt grupta 3 sıçana karaciğer biyopsisi yapılmıştır. Örnekler hemen dondurularak işlem yapılana kadar -80°C'de bekletilmiştir. Bu tez kapsamında temel amaçların doğrulanmasına yönelik önceki tezde kullanılan farklı diyet uygulamaları yapılan sıçan örnekleri kullanılmıştır. Farklı diyet modifikasyonları uygulanan farelerin karaciğer biyopsi preparatlarında mTOR ve GATOR yolağına ait proteinlerin ekspresyonu incelenmiştir.

Bulgular: Ketojenik diyet-zeytinyağı, ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı, kalorisi kısıtlı ketojenik diyet-zeytinyağı, kalorisi kısıtlı ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı, kalori kısıtlaması ve standart diyet beslenme gruplarında mTOR sinyal yolağında adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve GATOR1 kompleks proteinlerinin karşılaştırılmalı olarak irdelenmesi amacıyla farklı protein örnekleri seçilerek hedefler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Ketojenik diyet-zeytin yağı ve ketojenik diyet- hurma çekirdeği yağı beslenme gruplarında, özellikle hurma çekirdeği yağı uygulanan grupta mTOR ifadesinde azalma ile birlikte p-AMPK thr172 fosforilasyonu gözlenmiştir. Benzeri şekilde sadece kalori kısıtlaması yapılan grupta ketojenik diyet- hurma çekirdeği yağı uygulanan gruba göre mTOR fosforilasyonundaki artış ile beraber p-AMPK seviyesindeki artış görülmüştür. Standart diyet grubu ile karşılaştırdığımızda ketojenik diyet-zeytinyağı ve ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı gruplarında özellikle zeytinyağı uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere p-mTOR ifadesinde artış görülmüştür. GATOR1 kompleksinin üyesi ve mTOR inhibisyonundan sorumlu olan NPRL2 hurma çekirdeği yağı uygulanan ketojenik örneklerde artarken, kalori azaltımında NPRL2 değişimi diğer örneklerde farklılık göstermemektedir. Kontrol grubunda ise NPRL2 ifadesi görülmemiştir. RagC ve pACC örneklerinin birleştirilen protein örneklerinde ifade düzeylerinin belirlenmesi ve GATOR kompleks sinyal yolağında hedef proteinlerin değerlendirilmesi amacıyla beslenme gruplarına LPS ile indüklenmiş standart diyet grubu örnekleri eklenmiştir. Sadece kalori azalması yapılan örnek grubunda ve LPS ile indüklenmiş standart diyet grubunda RagC fosforilasyonu ve pACC ifadesi artmış olarak görülmüştür. Standart diyet grubu ile diğer tüm diyet grupları karşılaştırıldığında GATOR2 belirteci ve mTOR üzerinde aktive edici etkiye sahip olan olan WDR59 ve Mios proteinlerinin ifadesinde artış görülmüştür.

Sonuçlar: Elde ettiğimiz bulgularda ketojenik diyetle mTOR ifadesinde azalma ve pAMPK artışı olması hipotezimizle uyumlu sonuçlanmıştır. p-AMPK ifadesinin artışı olduğu durumlarda mTOR ifadesindeki azalma beklenirken, p-AMPK ifadesindeki artışa eşlik eden p-mTOR artışı, mTOR üzerinde AMPK dışında farklı faktörlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. NPRL2 ifadesinde artış olması kalori kısıtlaması ve ketojenik diyet uygulamasında mTOR'u inhibe edici etkisi olan GATOR1

yolağında artışı göstererek hipotezimizi desteklemektedir. Kalori kısıtlaması grubunda gözlenen pACC ifadesindeki artış mTOR ifadesindeki artış ile açıklanabilir. Standart diyet grubu dışında diğer gruplarda GATOR2 belirteci olan WDR59 ve Mios ifadesinde artış görülmesi GATOR yolağına etki eden başka mekanizmaların da olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ketojenik diyet, kalori kısıtlaması, mTOR, GATOR, AMPK



ABSTRACT

Introduction and Aim: Ketogenic diet (KD) and calorie restriction (CR) are treatment methods applied as alternatives to medical therapy in epilepsy patients. The seizure-suppressing mechanisms of both methods on epilepsy have not been clearly elucidated. One of the most researched pathways regarding the seizure-suppressing mechanisms of KD and CR is the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Therefore, the aim of the present study is to examine the effects of a ketogenic diet prepared with different fatty acids and the applied calorie restrictions on the mTOR signaling pathway, explained through changes in the expression of the GATOR protein complex, which has GAP activity toward Rag 1 and inhibitory effects on mTOR.

Materials and Methods: In the thesis study titled Examination of the Anti-inflammatory Effects of Ketogenic Diet and Calorie-Restricted Diet, conducted by Dr. Şeyda KARABULUT under the supervision of Prof. Dr. Dilşad TÜRDOĞAN in 2019, 50 female Wistar rats (6 weeks old) were divided into 7 subgroups and subjected to different dietary conditions for 7 weeks. Serum beta-hydroxybutyrate levels were measured in all experimental groups to confirm the effectiveness of the ketogenic diet (KD). At the end of the 7 weeks, liver biopsies were performed on 3 rats from each subgroup. The samples were immediately frozen and stored at -80°C until further processing. In this thesis, the liver biopsy samples from rats subjected to different dietary interventions in the previous study were used to verify the primary objectives. The expression of proteins related to the mTOR and GATOR pathways was examined in liver biopsy preparations from the mice subjected to different diet modifications.

Findings: In the ketogenic diet-olive oil, ketogenic diet-palm oil, calorie-restricted ketogenic diet-olive oil, calorie-restricted ketogenic diet-palm oil, calorie restriction, and standard diet groups, different protein samples were selected to comparatively examine AMPK and GATOR1 complex proteins in the mTOR signaling pathway,

and the targets were repeated at least three times. In the ketogenic diet-olive oil and ketogenic diet-palm oil groups, particularly in the group treated with palm oil, a decrease in mTOR expression was observed along with p-AMPK Thr172 phosphorylation. Similarly, in the group subjected solely to calorie restriction, an increase in mTOR phosphorylation and p-AMPK levels was observed compared to the ketogenic diet-palm oil group. When compared to the standard diet group, an increase in p-mTOR expression was observed in the ketogenic diet-olive oil and ketogenic diet-palm oil groups, with a more pronounced effect in the olive oil group. NPRL2, a member of the GATOR1 complex and responsible for mTOR inhibition, increased in ketogenic diet-palm oil samples but showed no significant changes in calorie-restricted samples. NPRL2 expression was absent in the control group. To determine the expression levels of RagC and pACC in combined protein samples and evaluate target proteins in the GATOR complex signaling pathway, standard diet group samples induced with LPS were included in the dietary groups. Increased RagC phosphorylation and pACC expression were observed in the calorie-restricted group and the LPS-induced standard diet group. When the standard diet group was compared with all other diet groups, an increase was observed in the expression of WDR59 and Mios proteins, which are GATOR2 markers and have an activating effect on mTOR.

Conclusions: The findings indicate that the decrease in mTOR expression and the increase in p-AMPK levels in the ketogenic diet are consistent with our hypothesis. While a decrease in mTOR expression is expected in cases of increased p-AMPK expression, the observed concurrent increase in both p-AMPK and p-mTOR suggests that factors other than AMPK also influence mTOR. The increase in NPRL2 expression supports our hypothesis by indicating an enhancement in the GATOR1 pathway, which inhibits mTOR, during calorie restriction and ketogenic diet interventions. The observed increase in pACC expression in the calorie restriction group can be explained by the increase in mTOR expression. The increase in the expression of WDR59 and Mios, which are GATOR2 markers, in groups other than

the standard diet group suggests the involvement of other mechanisms affecting the GATOR pathway.

Keywords: Ketogenic diet, calorie restriction, mTOR, GATOR, AMPK



İÇİNDEKİLER

Sayfalar

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Epilepsi	2
2.1.1 Epilepsi Tanımı ve Sınıflandırılması	2
2.1.2 Epilepsi Etiyolojisi ve Epidemiyoloji	3
2.1.3 Epilepsi Tedavisi	4
2.1.3.1 Farmakolojik Tedavi	4
2.1.3.2 Cerrahi Tedavi	5
2.1.3.3 Sinir Uyarımı	5
2.1.4 Epilepsi Patogenezi	6
2.2 mTOR Yolağı	8
2.2.1 mTORC1 Aktivasyonu.....	9
2.2.1.1 Akt.....	12

2.2.1.2 AMPK	13
2.2.1.3 TSC2	14
2.2.1.4 Ragulator	15
2.2.1.5 Rag-GTPaz ve Rheb Proteini	16
2.3 GATOR Kompleksi	17
2.3.1 GATOR Kompleksi Etki Mekanizması	17
2.3.2 GATOR Kompleksi ve Epilepsi	19
2.4 Ketojenik Diyet	20
2.4.1 Ketojenik Diyet Tipleri	22
2.4.2 Ketojenik Diyetin Nöbet Tedavi Edici Etki Mekanizması	22
2.5 Kalori Kısıtlaması	23
2.5.1 Kalori Kısıtlaması Etki Mekanizması	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1 İn Vivo Deneyler	26
3.2 Protein İzolasyonu	27
3.3 İmmunoblotlama	28
3.4 Verilerin Değerlendirilmesi	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	36
7. KAYNAKÇA	38
8. EKLER.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. mTORC1 ve mTORC2

Şekil 2. mTORC1 Aktivasyonu

Şekil 3. Rag Kompleksi, vATPaz

Şekil 4. mTOR Sinyal Yolağı

Şekil 5. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

Şekil 6. Ragulator, Rag kompleksi, Rheb proteini

Şekil 7. GATOR Kompleksi

Şekil 8. Bradford analizi sonuçları ve western blot yükleme konsantrasyon hesapları

Şekil 9. mTOR sinyal yolağında AMPK ve GATOR1 kompleks proteinlerinin karşılaştırılması olarak irdelenmesi

Şekil 10. RagC ve pACC örneklerinin birleştirilen protein örneklerinde ifade düzeylerinin belirlenmesi

Şekil 11. GATOR Kompleks sinyal yolağında değişen proteinlerin hedef proteinler açısından değerlendirilmesi

KISALTMALAR

2DG: 2deoksiglukoz

4E-BP: Ökaryotik başlama faktörü 4E bağlayıcı protein

ACC: Asetil koa karboksilaz

ADK: Adenozin kinaz

ADP: Adenozin difosfat

AEİ: Antiepileptik ilaç

Akt: Protein kinaz B

AMPA: A-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit

AMPK: Adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein kinaz

ATP: Adenozin trifosfat

Ca: Kalsiyum

CRISPR: Düzenli aralıklı palindromik tekrar kümeleri

DEPDC5: 5 içeren DEP alanı

FFEVF: Değişken odaklı ailesel fokal epilepsi

FKD: Fokal kortikal displazi

GABA: Gaba amino butirik asit

GAP: GTPaz aktive edici protein

GATOR: Rag 1'e yönelik GAP aktivitesi

GDP: Guanozin difosfat

GTP: Guanozin trifosfat

HME: Hemimegalensefali

ILAE: Uluslararası Epilepsi Derneği

K-ATP: ATP'ye duyarlı potasyum kanalı

KCNQ: Potasyum voltaj kapılı kanal

KD: Ketojenik diyet

KDHY: Ketojenik diyet hurma çekirdeği yağı

KDZY: Ketojenik diyet zeytinyağı

KK: Kalori kısıtlaması

KK-KDHY: Kalorisi kısıtlı ketojenik diyet hurma çekirdeği yağı

KK-KDZY: Kalorisi kısıtlı ketojenik diyet zeytinyağı

LFD: Düşük yağlı diyet

LGIT: Düşük glisemik indeks diyeti

LPS: Lipopolisakkarit

MAD: Modifiye atkins diyeti

MCT: Orta zincirli trigliserid

mSIN1: Protein kinaz ile etkileşen protein 1

mTOR: Memeli Rapamisin Hedefi

Na: Sodyum

NMDA: N-metil-D-aspartat

NPRL2: Azot permeaz düzenleyici 2 benzeri protein

p70S6K: Ribozomal protein S6 kinaz B1

PI3K: Fosfoinozotid-3-kinaz

Rheb: Beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu

RAG: Rekombinasyon aktive edici gen

RICTOR: Rapamisine duyarsız memeli rapamisin hedefi

S6K1: Ribozomal s6 protein kinaz

SAM: S-adenosilmetionin

SCN1A: Sodyum voltaj kapılı kanal alfa alt birimi 1

Ser/Thr: Serin/Treonin

TSC: Tüberoz skleroz kompleksi

v-ATPaz: Vakuolar H⁺-adenozin trifosfataz

VGLUT2: Vezikuler glutamat taşıyıcı

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, beyinden gelen anormal elektrik boşalmalarının tekrarlayan nöbetlere neden olduğu kronik bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Klasik epilepsi tedavisi farmakolojik, cerrahi ve vagus sinir uyarımından oluşur (1,2).

Ketojenik diyet (KD) ve kalori kısıtlaması (KK) uygulamasının nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklardaki etkisi yıllardır araştırma konusu olmuştur. Her iki yöntem de medikal tedaviye alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (3).

Epilepsi patogenezinde rol oynayan en önemli yollardan biri memeli rapamisin hedefi (mTOR) yolağıdır. Literatürde ketojenik diyet, kalori kısıtlaması ve farklı diyet modifikasyonlarının mTOR yolağı ile etki mekanizmasını inceleyen çalışmalar mevcuttur. Ancak ketojenik diyet ve kalori kısıtlaması uygulamasının epilepsi patogenezinde yer alan, mTOR yolağının bir alt yolağı olan, Rag 1'e yönelik GAP aktivitesi (GATOR) yolağı ile ilişkisini inceleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızın amacı farklı yağ asitleriyle oluşturulmuş ketojenik diyetin ve kalori kısıtlamasının mTOR yolağını inhibe edici etkiye sahip olan GATOR1 sinyal yolağına etkisinin araştırılmasıdır. İleriye yönelik bir diğer hedefi ise ilaca dirençli epilepsi hastalarının tedavisinde kullanılabilecek aday bir sinyal yolağına farklı diyetlerin etkisini göstererek nöbet tedavisi için kullanımını öne sürmektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Epilepsi

2.1.1 Epilepsi Tanımı ve Sınıflandırılması

Nöbetler, beynin belirli bir nöron hücresi popülasyonunun anormal aşırı veya eş zamanlı aktivitesine bağlı geçici belirtiler ve işaretler olarak tanımlanmaktadır. Epilepsi ise, tekrar eden, tetiklenmemiş nöbetlere karşı sürekli bir eğilim gösteren ve bu durumun nörobiyolojik, bilişsel, psikolojik ve sosyal sonuçlarıyla karakterize edilen kronik bir beyin bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Epilepsi tanısı, en az iki tetiklenmemiş nöbetin yirmi dört saatten daha uzun aralıklarla gerçekleşmesini gerektirir (4,5).

Uluslararası Epilepsi Derneği (ILAE) tarafından 2014 yılında yapılan epilepsi tanımlaması:

- (1) 24 saatten fazla ara ile meydana gelen en az iki provoke edilmemiş, (veya refleks) nöbetin olması;
- (2) Bir provoke edilmemiş, (veya refleks) nöbet ve sonraki 10 yıl içinde gerçekleşen iki provoke edilmemiş, nöbetten sonra en az %60 oranda benzer başka nöbet olasılığı;
- (3) Bir epilepsi sendrom tanısı alma şeklindedir (6).

Günümüze kadar pek çok farklı epilepsi sınıflandırılması yapılmıştır. Son sınıflandırma, ILAE tarafından 2017 yılında yapılmıştır. Yeni epilepsilerin sınıflandırılması, farklı klinik ortamlar için epilepsinin sınıflandırılmasını sağlamak amacıyla tasarlanmış çok seviyeli bir sınıflamadır. ILAE'nin mevcut

sınıflandırmasında, epilepsinin klinik özellikleri nöbetler, epilepsiler ve epilepsi sendromları olarak üç seviyeye ayrılmıştır. Her seviyede etiyoloji ve komorbiditelerin dikkate alınmasına vurgu yapılmıştır (5).

2.1.2 Epilepsi Etiyolojisi ve Epidemiyoloji

Hastanın ilk epileptik nöbetiyle başvurmasından itibaren, klinisyenin hastanın epilepsinin etiyolojisini belirlemeyi hedeflemesi gerekir. Tedavi açısından önemli olan çeşitli etiyolojik gruplar tanımlanmıştır. Genellikle yapılan ilk araştırma, mümkünse santral sinir sisteminin manyetik rezonans görüntülemesidir; bu, klinisyenin hastanın epilepsisi için yapısal bir etiyoloji olup olmadığını belirlemesine olanak tanır. Etiyolojik gruplar yapısal, genetik, enfeksiyöz, metabolik ve immün olmak üzere sıralanırken, bilinmeyen bir grup da bulunmaktadır (5,7).

Epilepsinin insidansı, bir sistematik inceleme ve meta analiz sonucunda, 100,000 kişi-yıl için 61,4 olarak belirlenmiştir. Düşük/orta gelirli ülkelerde insidans, yüksek gelirli ülkelere göre daha yüksektir (8).

Epilepsinin prevalansı, ülkeler arasında yerel risk ve etiyolojik faktörlerin dağılımına, tanı anındaki nöbet sayısına ve sadece aktif epilepsiyi (aktif prevalans) mı yoksa remisyon halindeki vakaları da (yaşam boyu prevalans) mı dikkate alındığına bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. Fiest ve arkadaşlarının çalışmasında, genel yaşam boyu epilepsi prevalansı 1,000 nüfus için 7,6 olarak bulunmuştur (8).

2.1.3 Epilepsi tedavisi

Klasik epilepsi tedavisi farmakolojik, cerrahi ve vagus sinir uyarımından oluşur (1,2).

2.1.3.1 Farmakolojik Tedavi

Antiepileptik ilaçlar (AEİ'ler), nöbet aktivitesinin başlamasını veya yayılmasını durdurur veya önler. AEİ'ler, ana etki mekanizmalarına göre gruplandırılabilir. Bu mekanizmalar arasında sodyum (Na) bağımlı aksiyon potansiyellerinin inhibisyonu (fenitoin, karbamazepin, lamotrijin, topiramet), voltaj kapılı kalsiyum (Ca^{2+}) kanallarının inhibisyonu (fenitoin), glutamatın blokajı (lamotrijin), Gaba amino butirik asit (GABA) artışı (benzodiazepinler ve barbitüratlar), GABA geri alım inhibisyonu (valproik asit, gabapentin, tiagabin) ve potasyum kanallarının açılması (ezogabin) bulunmaktadır. Absans nöbetleri için kullanılan etosuksimid ve valproik asidin, talamik nöronlardaki T-tipi Ca^{2+} kanallarını inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir (7).

2.1.3.2 Cerrahi Tedavi

Mevcut AEİ'ler, bireylerin yaklaşık %80'inde etkili olabilir; geriye kalan %20'si ise ilaca dirençli epilepsi olarak değerlendirilir. Bu hastalar, nöbet kontrolünü sağlamak için sınırlı bir beyin bölgesinin çıkarılması veya bağlantısının kesilmesinden fayda görebilir. Cerrahi müdahale türleri, gelişimsel anormallikler, tümörler, vasküler malformasyonlar veya travma nedeniyle oluşan lezyonal epilepsiler için rezeksiyon prosedürlerini içerir (7).

2.1.3.3 Sinir Uyarımı

Cerrahi tedavinin mümkün olmadığı veya cerrahi tedavinin başarısız olduğu ilaca dirençli epilepsi hastaları için ek tedavi seçeneğidir. Periferik sinirlere veya belirli beyin bölgelerine uygulanan elektriksel uyarı aracılığıyla, potansiyel nöbet oluşumunu veya yayılmasını engeller. En yaygın kullanılan iki sinir uyarı tekniği vagus sinir uyarımı ve talamusun ön nükleusuna yerleştirilen elektrotlarla yapılan derin beyin uyarımıdır (7).

2.1.4 Epilepsi Patogenezi

Epileptogenezden sorumlu hücresel mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Tüm epilepsi nöbetlerinde aynı mekanizmadan söz edilmemekle birlikte hepsinde artmış nöronal uyarılabilirlik mevcuttur (9).

Beyinde uyarılma ve inhibisyon arasındaki dengesizlik epileptogenezde önemli bir rol oynamaktadır. Glutamat, merkezi sinir sistemindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir ve memeli beynindeki en bol bulunan amino asittir. Glutamat; öğrenme, bellek, biliş ve duygular gibi sayısız süreç için gereklidir. GABA beyindeki ana inhibe edici nörotransmitterdir ve glutamat ile dengede olmalıdır. Aşırı glutamat ve/veya yetersiz GABA, merkezi sinir sisteminde aşırı uyarılmaya neden olarak nöbetlere yol açabilir. Epilepside glutamaterjik mekanizmalardaki potansiyel düzensizlikler arasında nöronal, glial ve/veya nöronal-glial etkileşimlerin disfonksiyonu bulunur. Özellikle, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin genetik mutasyonları ve A-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptörlerinin anormal ifadesi, epilepsinin fizyolojik süreçlerini etkileyen etmenler olarak düşünülmektedir (10).

Adenosin ve glisin, epileptik beyinde homeostazlarının etkilendiği bilinen iki önemli metabolittir. Adenosin, esasen adenosin A1 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla, beynin endojen antikonvülsanı olarak çalışır (11,12).

Hipokampal formasyonda glisin, presinaptik ve postsinaptik glisin reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olarak zıt etkiler gösterebilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, düşük glisin konsantrasyonlarının pro-konvülsif etkiler yarattığı, oysa daha yüksek glisin konsantrasyonlarının tekrarlayan epileptiform deşarjları azalttığı gösterilmiştir (12).

Moleküler genetik, birçok epilepsi geninde epilepsiye neden olan mutasyonların tanımlanmasına yol açmıştır. Epilepside en yaygın mutasyona uğrayan gen SCN1A'dır; bu gen, şiddetli miyoklonik epilepsiye ve ayrıca ateşli nöbetlerle birlikte görülen genetik epilepsi olarak bilinen daha hafif bir fenotipe yol açmaktadır. Potasyum kanal genleri KCNQ2 ve KCNQ3'teki mutasyonlar da çeşitli epilepsi fenotiplerine neden olmaktadır (9,13).

Epilepsi patogenezinde mTOR yolağının da rol aldığı düşünülmektedir ve yapılan pek çok çalışma bunu kanıtlar niteliktedir.

mTOR sinyalinin anormal aktivasyonu, kortikal beyin gelişimini değiştirir ve epilepsi ile ilişkilidir. mTOR sinyal yolunun aşırı aktivasyonu, kortikal gelişim bozuklukları alt tiplerinde tespit edilmiştir ve bu bozukluklar topluca 'mTORopatiler' olarak adlandırılmaktadır. mTOR düzenleyici genlerindeki mutasyonlar (örneğin, TSC1, TSC2, DEPDC5), tüberoz skleroz kompleksi (TSC), hemimegalensefali (HME; bir beyin yarım küresinin dramatik büyümesi ile ilişkili beyin malformasyonu) ve fokal kortikal displazi gibi epilepsi ile yüksek oranda ilişkili birkaç kortikal gelişim malformasyonu ile ilişkilendirilmiştir. mTOR inhibitörleri, klinik denemelerde mTORopatiler olarak adlandırılan TSC ve fokal kortikal displazi gibi hastalıklarda nöbetlerin tedavisinde etkinlik göstermiştir (14).

2.2 mTOR Yolağı

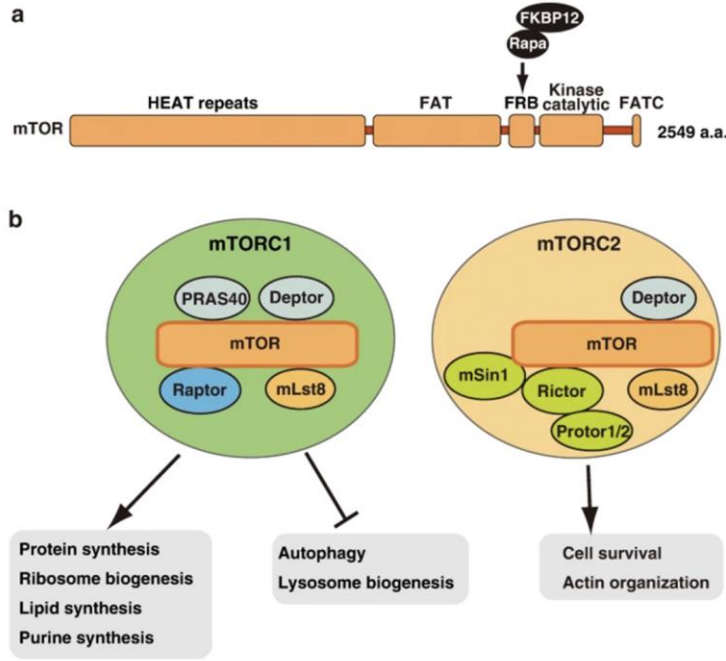
Memeli rapamisin hedefi (mTOR) yolağı protein sentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonunu da içeren pek çok hücresele fonksiyonda rol oynayan, besin mevcudiyetini ve hücre büyümesini dengelemek için bir ATP ve amino asit sensörü olarak işlev gören bir serin/treonin (Ser/Thr) protein kinazdır. TOR kinazları besin, enerji sinyalleri, büyüme faktörleri ve hücresele streslerin durumuna yanıt olarak hücre büyümesi için gerekli sinyalleri düzenleyici olarak işlev görür (15–17).

mTOR, diğer proteinler ile etkileşime geçerek 2 farklı kompleks oluşturur. Bunlar mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) olarak adlandırılır. mTORC1 bilinen altı protein içeren büyük bir komplekstir. Bileşenleri, mTOR, sec-13 protein 8 (mLST-8) mTOR etkileşimli proteini içeren DEP alanı (DEPTOR), mTOR'un düzenleyici ilişkili proteini (Raptor), protein açısından zengin Akt substrat 40 (PRAS40) ve Tti1/Tel2 dir (15–19).

mTORC1, özellikle amino asitler olmak üzere besin bulunabilirliği durumunda aktive edilir ve besin bol olduğunda büyümeyi teşvik etmek için protein sentezini ve parçalanmasını koordine eder. Protein sentezini teşvik etmek için S6K1 ve 4E-BP1'i fosforile eder. Fosforile edilmiş 4E-BP1, aktif mTOR sinyalinin bir belirteci olarak kabul edilmiştir (20–22).

mTORC2, mTOR, mLST8, rapamisine duyarsız memeli rapamisin hedefi (RICTOR) ve memeli stresle aktive olan protein kinaz ile etkileşen protein 1 (mSIN1) bileşenlerinden oluşur(23).

mTORC2 büyüme faktörleri, örneğin insulin ve insulin benzeri büyüme faktörleri tarafından uyarılır ve hücre hayatta kalımı için gerekli olan stres tepkilerini düzenler. Ayrıca, mTORC2 aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. mTORC2, insulin reseptörü tarafından aktive edilen Protein Kinaz B'yi (Akt) fosforile eder. İnsülin sinyalleşmesi ve Akt ise mTORC1 fonksiyonu düzenler, bu da mTORC1 ve mTORC2 aktivitesi arasında bağlantı sağlar (21,22,24,25).

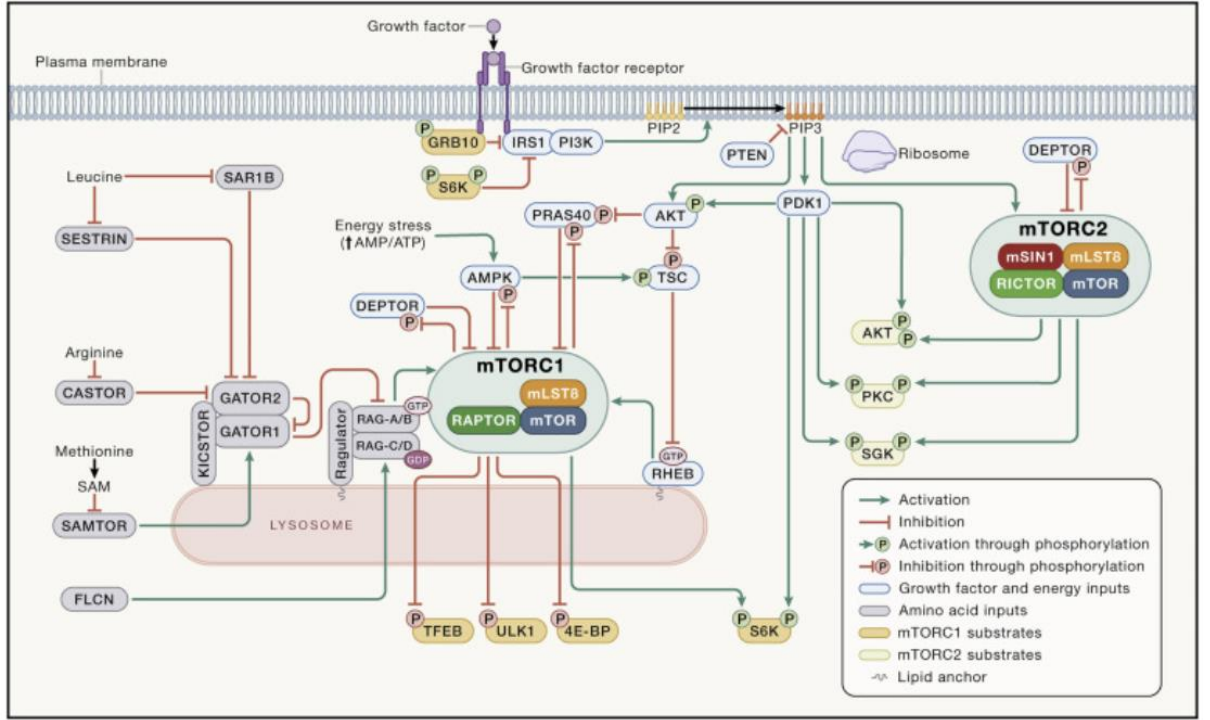


Şekil 1. mTORC1 ve mTORC2 (17).

2.2.1 mTORC1 Aktivasyonu

mTORC1 aktivitesi, beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu (Rheb) ve rekombinasyon aktive edici genler (Rag) gibi çeşitli GTPazlar tarafından kontrol edilmektedir ve amino asit varlığı durumunda aktive olur (15–17,26).

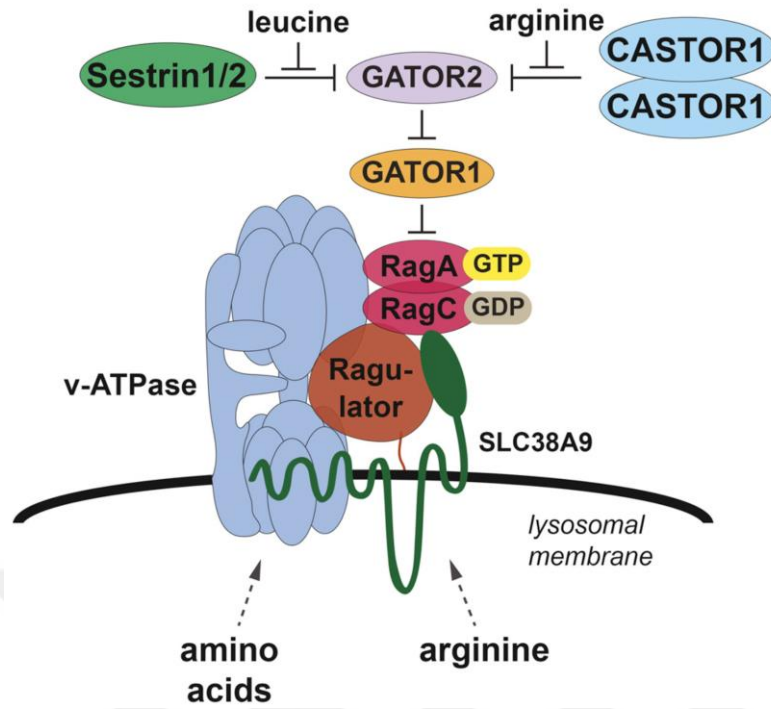
mTORC1, insülin ve diğer büyüme faktörlerine yanıt olarak Akt tarafından aktifleştirilir. Akt, Rheb’i inhibe eden TSC2’yi inhibe ederek mTORC1 aktivasyonu yapar. mTORC1 aktivitesi AMPK tarafından baskılanır (20,27).



Şekil 2. mTORC1 Aktivasyonu (28).

Besin mevcudiyeti, mTORC1 tarafından küçük GTPazlar Rag-A, Rag-B, Rag-C ve Rag-D aracılığıyla algılanır (28–30).

Rag'lar, Rag-A veya Rag-B'nin ve Rag-C veya Rag-D ile birleştiği heterodimerler oluşturur. Rag'ların aktif konfigürasyonu, GTP bağlanmış Rag-A veya Rag-B (Rag-A/Rag-BGTP) ve GDP bağlanmış Rag-C veya Rag-D (Rag-C/RAG-DGDP) şeklindedir. Bu konfigürasyon, mTORC1'i lizozoma çeker; burada mTORC1, Rheb ile karşılaşır ve aktive olur. Rag'lar, lizozomun yüzeyinde beş LAMTOR proteininden (LAMTOR 1–5) oluşan pentamerik bir kompleks olan Ragulator ile bağlanır. Rag-C/Rag-D, GTPaz aktivasyon proteinine (GAP) sahip olan folikulin (FLCN) ve folikulin ile etkileşime giren proteinlerden (FNIP1 veya FNIP2) oluşan folikulin kompleksi tarafından aktive edilir (31–35).



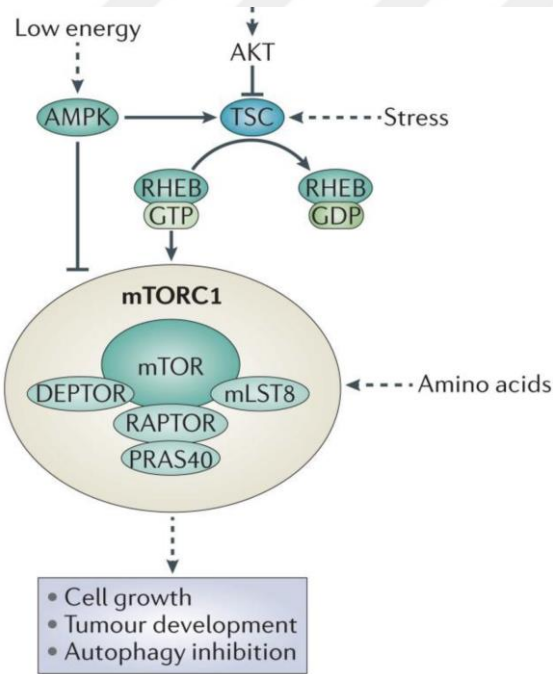
Şekil 3. Rag Kompleksi, vATPaz (36).

Rag-A/B, GATOR1'in inhibe edilmesiyle aktive olur; GATOR1, üç proteinden oluşan bir komplekstir. GATOR1, amino asit sensörleri Sestrin2 ve Castor1 tarafından negatif olarak kontrol edilen beş proteinden oluşan GATOR2 tarafından inhibe edilir. Açlık koşullarında Sestrin2 ve Castor1, GATOR2'ye bağlanarak onun GATOR1'i inhibe etmesini engeller. Arjinin stimülasyonu sonrasında, arjinin Castor1'e bağlanır. Castor1, GATOR2'yi serbest bırakarak GATOR1'i inhibe eder ve böylece Rag-A/Rag-B aktivasyonuna (bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla) ve sonrasında mTORC1'in lizozoma çekilmesine izin verir. Sestrin2, lösine yanıt olarak Castor1'e benzer bir işlevi yerine getirir(35–39).

Amino asitler, mTORC1'in lizozomal yüzeye, yani mTORC1 aktivasyonunun gerçekleştiği yere taşınmasında görev alan GTPazları aktive eder. Vakuolar H⁺-adenozin trifosfatın (v-ATPaz), amino asitlerin mTORC1'i aktive etmesi için gerekli olduğu bilinmektedir. v-ATPaz, amino asitlerin mTORC1'e sinyal iletimi için gereklidir ve amino asitler ile Rag GTPazlarının nükleotid yüklenmesi arasında işlev görür. Yoldaki konumu ve Rag-Ragulator kompleksiyle olan amino asit duyarlı etkileşimleri sebebiyle amino asit algılama mekanizmasının temel bir bileşenlerindedir (35,40,41).

2.2.1.1 Akt

Serin/treonin protein kinazı Akt, Fosfoinozotid-3-kinaz (PI3K) sinyal yolağının ana aşağı akış molekülü olarak hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, hücre göçü ve hücre hayatta kalması gibi çeşitli hücresel işlevlerin düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Üç farklı tipe sahiptir. Akt1, birçok dokuda yaygın olarak ifade edilirken, Akt2 esas olarak insülin duyarlı dokularda ve diğer dokularda düşük seviyelerde ifade edilir. Akt3 ise yalnızca beyin ve testiste ifade edilmektedir. mTORC1, Akt'nin aşağı akış molekülüdür ve fosforile edilmiş Akt tarafından aktive edilir. mTORC2 ise Akt'yi fosforile ederek tamamen aktive eder. Akt/TSC1–TSC2 sinyal yolu mTOR aktivitesi, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonunu düzenleyebilir (21,42–44).



Şekil 4. mTOR Sinyal Yolağı (34).

2.2.1.2 AMPK

Hücre büyümesinin temel biyolojik süreci, büyük ölçüde çevrenin besin durumuyla belirlenir. Bu nedenle, tüm ökaryotlar büyüme ve gelişimi sürekli değişen kaynak koşullarına uyarlamak için birden fazla besin algılama yolu kullanır. mTOR ve AMPK, büyük besin algılayıcıları olarak enerji homeostazının ana düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. AMPK kompleksi katalitik bir α -alt birimi (izotipler $\alpha 1$ ve $\alpha 2$) ile düzenleyici β ($\beta 1$, $\beta 2$) ve γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) alt birimlerinden oluşan bir $\alpha\beta\gamma$ heterotrimerdir. Bu kompleks, artan hücresel AMP/ATP ve ADP/ATP oranları sonucu fizyolojik ve patolojik süreçlere yanıt olarak aktive edilebilir (45).

AMPK aktivitesi, treonin 172'nin (Thr172) fosforilasyonu ile 100 katından fazla artırılır (46).

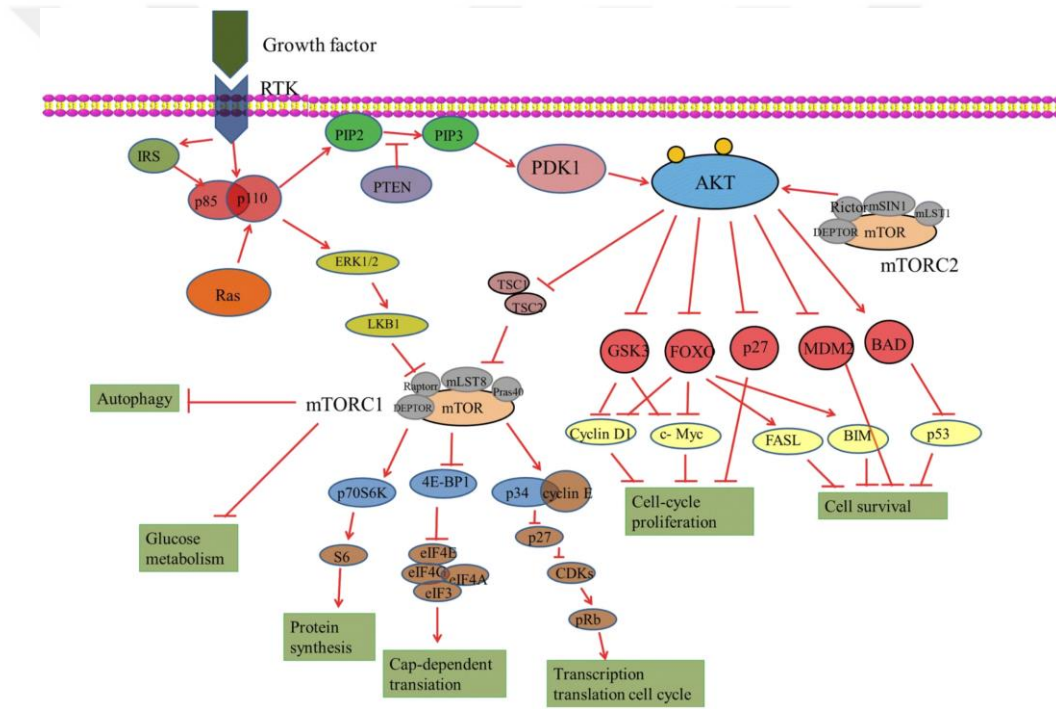
AMPK, hem Raptor'u (mTORC1 kompleksinin bir bileşeni) hem de TSC2'yi (mTOR'un yukarı akış düzenleyicisi) fosforile ederek mTOR'u inhibe eder ve böylece S6K1'i azaltır ve birçok anabolik süreci azaltır(20,22,47).

AMPK aktivasyonu mTOR yolağındaki Akt, mTOR, ribozomal protein S6 ve 4E-BP gibi birçok önemli proteinin fosforilasyonunu azaltır (22,48).

mTORC1'ün $\alpha 1$ -Ser347/ $\alpha 2$ -Ser345'i doğrudan fosforile ederek AMPK aktivasyonu ve sinyalini baskıladığı bilinmektedir. mTORC1 sinyalinin inhibisyonu AMPK aktivasyonuna yol açtığı gözlenmiştir (45).

2.2.1.3 TSC2

TSC2, GTPaz aktivitesine sahiptir ve mTORC1 aktivasyonu için gerekli olan küçük GTPaz Rheb'i inhibe eder, böylece mTORC1 aktivasyonunu önler. TSC2 Akt tarafından fosforile edilerek inhibe edilir. Ayrıca, TSC2, AMPK fosforilasyonu ile doğrudan aktive edilebilir ve Akt, AMPK'yı inhibe ederek TSC2'yi tamamen inhibe edip mTOR'u aktive edebilir (21,44,49–51).



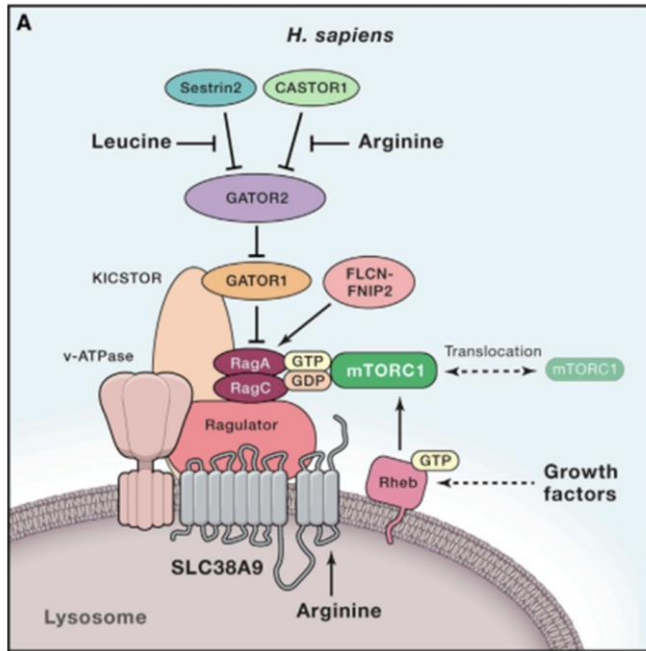
Şekil 5. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı (21).

2.2.1.4 Ragulator

Ragulator, Rag GTPazları ve v-ATPazlar, amino asit tanımlama yolunun bir parçasıdır ve mTORC1'in lizozom yüzeyine lokalizasyonu için gereklidir.

Ragulator ve v-ATPazlar lizozom yüzeyinde bulunur. Rag GTPazları doğrudan lizozoma bağlanamaz çünkü lipid çift tabakasına bağlanmak için gerekli olan proteinlere sahip değildirler, bu nedenle Rag GTPazları bunun yerine Ragulator'a bağlanmalıdır. Ragulator, v-ATPaz aracılığıyla yüzeye bağlıdır (15–17,26).

Ragulator; LAMTOR 1, LAMTOR 2, LAMTOR 3, LAMTOR 4 ve LAMTOR 5 isimli beş farklı alt üniteden oluşan kristalleşmiş bir yapıdır. Komplekste iki set zorunlu heterodimer bulunur. LAMTOR 2/3, doğrudan LAMTOR 4/5'in üstünde bulunur. LAMTOR 1 diğer alt ünitelerle aynı yapıya sahip değildir. LAMTOR 1, iki heterodimerin çoğunu çevreler, yapısal destek sağlar ve heterodimerleri yerinde tutar. Amino asitler mevcut olduğunda, alt üniteler katlanır ve konumlandırılır, bu da Rag-GTPaz'ların Ragulator'da bulunan LAMTOR 2/3 üzerindeki ana bağlanma yerine bağlanmalarına izin verir (15–17,26,52).



Şekil 6. Ragulator, Rag kompleksi, Rheb proteini (53).

2.2.1.5 Rag-GTPaz ve Rheb Proteini

Rag-GTPazlar Rag A/B ve Rag C/D olmak üzere iki set heterodimerden oluşur. Rag-GTPaz'lar Ragulator'a bağlanmadan önce, Rag A/B'nin guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) aracılığıyla GTP ile bağlı olması ve RAG C/D'nin GDP ile bağlı olması gerekir. Rag-GTPazlar bir kez Ragulator komplekse bağlandığında, mTORC1 lizozom yüzeyine taşınabilir. Lizozom yüzeyinde Rheb ilk olarak GEF'ler aracılığıyla GTP'ye bağlanır, mTORC1 daha sonra Rheb'e bağlanır (15–17,26,39,52,54,55).

Amino asitlerin varlığı Rag GTPazlarının aktif nükleotit bağlı durumlarına, yani RagA/B'nin GTP bağlı formuna ve RagC/D'nin GDP bağlı formuna geçmesine neden olur. Aktif Rag GTPazları, Raptor'a bağlanabilir ve böylece mTORC1'i lizozomal yüzeye çeker. Son olarak, mTORC1'in Rheb ile birleşmesi mTORC1'in aktivasyonuna yol açar. Bu iki aşamalı aktivasyon mekanizması mTORC1'in hem Rag hem de Rheb GTPazlarının aktive olduğu durumlarda aktive olmasını sağlar. Bunun aksine amino asit yoksunluğu Rag GTPazlarını etkin olmayan durumlarına, yani GDP bağlı RagA/B ve GTP bağlı RagC/D'ye dönüştürür, bu da mTORC1'in lizozomal yüzeyden serbest bırakılmasına ve mTORC1'in devre dışı bırakılmasına yol açar (39,52,54–56).

2.3 GATOR Kompleksi

GATOR kompleksi GATOR1 ve GATOR2 adını verdiğimiz iki alt kompleksten oluşur ve Rag heterodimerlerinin aktivasyon durumunu kontrol eder. GATOR1 kompleksi DEPDC5, NPRL2 ve NPRL3'ü; GATOR2 kompleksi Mios, WDR24, WDR59, Seh1L, Sec13'ü içerir (57).

2.3.1 GATOR Kompleksi Etki Mekanizması

GATOR1, RagA ve RagB için GTPaz aktive edici protein (GAP) aktivitesine sahiptir. GATOR1 Ragları inhibe ederken ve GATOR2 Ragları aktive etmektedir (56,58).

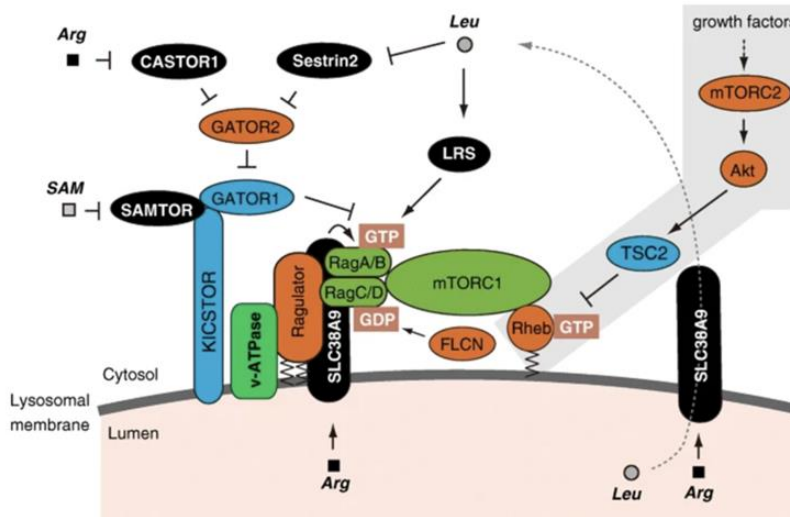
mTORC1'in Rag GTPazları aracılığıyla amino asit algılama ile ilişkilendirilen bileşenleri Ragulator, v-ATPaz, SLC38A9, KICSTOR, FLCN–FNIP, GATOR kompleksleri (GATOR1 ve GATOR2), lösün sensörü Sestrin2, arjinin sensörü CASTOR1 ve S-adenosilmetionin (SAM) sensörü SAMTOR'dur (59).

Amino asit yokluğunda, GATOR1 RagA/B için GAP aktivitesi gösterir. Aktif olmayan Rag GTPazları TSC ve FLCN–FNIP'i lizozomal yüzeyde toplar; burada TSC'nin GAP aktivitesi Rheb'in aktive edilmesini engeller. Sestrin2 ve CASTOR1, GATOR2 ile etkileşime girer ve GATOR2'nin GATOR1'i inhibe etmesini önler. Böylece mTORC1 aktive edilmemiş olur (59).

Lösün ve arjinin, sırasıyla Sestrin2 ve CASTOR1'e bağlanarak GATOR2 aktivitesini kontrol eden başlıca amino asitlerdir. Lösünün yokluğunda, Sestrin2 GATOR2'ye bağlanır ve onu inhibe eder; bu da GATOR1'in aktivasyonuna, Rag GTP hidrolizine ve mTORC1'in inhibisyonuna yol açar. Lösün mevcut olduğunda, Sestrin2'ye bağlanır ve onun GATOR2 ile etkileşimini bozar, bu da GATOR1'in inhibisyonuna ve mTORC1'in aktivasyonuna neden olur. Benzer şekilde, arjinin CASTOR1'e bağlanır ve GATOR2 ile mTORC1 sinyalini aktive eder (57).

Amino asit varlığında, follikülin ve ilişkili proteinleri (FLCN–FNIP) RagC/D için bir GAP görevi görür ve GATOR2, RagA/B için GATOR1'in GAP aktivitesini inhibe eder. mTORC1'in lizozomda aktive edilmesi için v-ATPaz ve SLC38A9 (arginin sensörü) gereklidir. Aktif Rag GTPaz heterodimeri mTORC1 ile etkileşime girer ve ardından Rheb tarafından aktive edilmesini teşvik ederek onu lizozoma toplar (59).

KICSTOR, lizozomlara lokalize olur ve GATOR1'i lizozomal yüzeye bağlayıp çekmekte önemli bir rol oynar; GATOR2 ile etkileşime girmez. Ayrıca, GATOR1'in Rag GTPazları ile ve GATOR2 ile etkileşimi için de gereklidir. KICSTOR kompleksinin birkaç bileşenindeki mutasyonlar, aşırı aktif mTORC1 sinyali ile ilişkili nörolojik hastalıklarla bağlantılıdır. Bu nedenle, KICSTOR, mTORC1 sinyalini negatif olarak düzenleyen bir lizozom ilişkili faktör olarak görev yapar. KICSTOR, amino asit veya glukoz yetersizliği sırasında mTORC1 sinyalini inhibe etmek için gereklidir (60).



Şekil 7. GATOR Kompleksi (17).

2.3.2 GATOR Kompleksi ve Epilepsi

GATOR kompleks proteinini kodlayan genlerdeki mutasyonlar fokal epilepsilerdeki en yaygın anormalliklerden biridir. Bu mutasyonlar arasında DEPDC5 genini etkileyen mutasyonlar, farklı otozomal dominant kalıtmıli epilepsi tipleriyle ilişkilendirilmiştir. Rapamisin ve yapısal analogları, örneğin everolimus, doğrudan mTOR'u inhibe eder. Hadzsiev ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada şu an 18 yaşında olan ve 7 yaşında nöromotor gerileme ve epileptik nöbetleri başlayan WES analizinde DEPDC5 geninde mutasyon saptanan ve fenotipi lezyonsuz DEPDC5 ile ilişkili epileptik ensefalopati ile uyumlu olan bir hastaya everolimus tedavisi başlanmıştır. Everolimus tedavisi sonrasında EEG bulgularında düzelme görülmesine de nöbet sıklığının belirgin azaldığı saptanmıştır. Bu çalışma mTOR inhibitörlerinin bu mutasyona sahip hastalarda bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir (61).

Baldassari ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada literatür taranarak ve mevcut çalışmada incelenen vakalar da birleştirilerek GATOR1 yolağı genlerinde mutasyon saptanan 183 hastanın klinik özellikleri incelenmiştir. GATOR1-mTORC1 yolağının genleri (DEPDC5, NPRL2 ve NPRL3) fokal epilepsilerde en sık mutasyona uğrayan genlerdir ve bunların içinde DEPDC5 geni önemli ölçüde dikkat çekmiştir (tüm vakaların %85'inde). GATOR1 ile ilişkili epilepsi fenotipinin çoğunlukla uyku ilişkili hiperomotor epilepsiden oluştuğu ve tüm vakaların %25'ini oluşturduğu görülmüştür. Diğer fokal epilepsiler (frontal, temporal, frontotemporal, oksipital, parietal, sentrotemporal epilepsiler dahil) vakaların %54'ünde (172/183) tanımlanmıştır. Ailevi değişken odaklı fokal epilepsi ise tüm vakaların %9'unu (16/183) oluşturmuştur. Infantil spazmlar da GATOR1 fenotip spektrumunun bir parçasıdır ve bildirilen tüm GATOR1 mutasyonlu hastaların %6,6'sında (12/183) görülmüştür. Şu anda mevcut olan rapamisin gibi mTORC1 inhibitörleri epilepsi tedavisinde umut verici ilaçlardır (62).

GATOR1 genlerindeki mutasyonlar Tübero Skleroz Kompleksi'ne (TSC) benzeyen hasta fenotiplerine yol açar. Tübero Skleroz Kompleksi, TSC1 ve TSC2 genlerindeki mutasyonlar tarafından oluşturulan bir hastalıktır. Bu genler mTORC1

sinyalini negatif olarak düzenleyen Tüberöz Skleroz Kompleksini oluşturan proteinleri kodlar. GATOR1, besin açlığı koşullarında mTORC1'i baskılar; ancak TSC protein kompleksi, sınırlı büyüme faktörü bulunabilirliği sırasında mTORC1 aktivitesini Rheb proteini üzerinden engeller. GATOR1 kompleks ve TSC genlerindeki mutasyonların her ikisi de epilepsi, beyin malformasyonları, otistik özellikler ve zihinsel engelle ilişkilidir. Ancak, bu fenotiplere yol açan patobiyolojik mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır(63).

DEPDC5, NPRL2 ve NPRL3 GATOR kompleksine ait proteinlerdir ve mutasyonları özellikle Değişken Odaklı Ailesel Fokal Epilepsi (FFEVF) ile ilişkilidir (61,62,64). Hughes ve arkadaşları DEPDC5'nin işlevini daha fazla incelemek için farelerde CRISPR teknolojisi kullanılarak DEPDC5 fonksiyon kaybı oluşturmuştur. DEPDC5 allel kaybı olan farelerde mTORC1 hiperaktivasyonu saptanmıştır. Bu çalışma mTORC1 hiperaktivasyonunun muhtemel bir patojenik mekanizma olduğunu göstermekte ve DEPDC5 mutasyonlu hastaların tedavisinde mTORC1 inhibitörlerinin potansiyel faydasına işaret etmektedir (63).

2.4 Ketojenik Diyet

Ketojenik diyet (KD), yüksek yağ, yeterli protein ve düşük karbonhidrat içeriği ile karakterize edilir ve epilepsi hastalığının yönetiminde antiepileptik ajan olarak hem yetişkin hem de çocuklar üzerinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Dr.Wilder, 1921 yılında yüksek yağlı diyetin ketonemiye yol açarak nöbetleri kontrol altına alabileceğini söylemiş ve bu diyete ketojenik diyet adını vermiştir (65). Günümüzde ise medikal tedaviye dirençli epilepsilerde alternatif bir yöntem olarak ya da tedaviye ek olan tamamlayıcı bir tedavi türü olarak kullanılmaktadır. Randomize kontrollü çalışmalar, ilaca dirençli epilepsi hastalarının KD yapanların, KD yapmayanlara kıyasla 3-4 ay sonra önemli ölçüde daha az nöbet geçirdiğini göstermiştir.

Antiepileptik etkisinin yanı sıra, KD'nin hastalığı değiştirici ve antiepileptojenik özellikleri olduğu da gösterilmiştir (66–69).

TSC mutasyonu olan ve olmayan epilepsi hastaları ile yapılan bir çalışmada KD uygulamasının epilepsi hastalarında nöbet sıklığını azalttığını göstermiştir. TSC mutasyonu olan hastalarda KD yanıtında olmayan hastalara göre anlamlı bir fark görülmemiştir (70).

Adenozin kinaz (ADK) ekspresyonunun artması ve adenozin seviyesinde azalma nöbet aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Ketojenik diyetin ADK seviyelerinde azalma ve adenozin seviyesinde artmaya sebep olarak nöbet aktivitesini azalttığını gösterilmiştir (71).

Önerilen birçok hipotezden biri, KD'nin mTOR yolağını inhibe ettiğidir. Yapılan bir çalışmada ketojenik diyet ve standart diyet uygulanan farelerin karaciğer ve beyin dokusu incelenmiş olup ketojenik diyet uygulayan farelerin hipokampus ve karaciğer dokusunda mTOR yolak aktivasyonunun belirteçleri olan pS6 ve pAkt'ın ekspresyonunun azaldığı, aynı zamanda ketojenik diyet uygulanan farelerin karaciğer dokusunda pAMPK düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (72).Singh ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ketojenik diyet uygulanan farelerin hipokampus dokusu incelendiğinde mTOR inhibisyonu ile ilişkili olan p-S6 düzeyinde azalma saptanmıştır (73).

2.4.1 Ketojenik Diyet Tipleri

KD uzun zincirli yağ asitleri (LCT) veya orta zincirli yağ asitlerine (MCT) dayalı olmak üzere 2'ye ayrılabilir. Klasik KD'de yağlar LCT'dir ve başlıca standart yiyeceklerden sağlanır. Protein büyüme için gerekenin en az miktarında verilir ve karbonhidratlar kısıtlanır. MCT'ler oktanoik ve dekanoik asitler hücre içine daha kolay taşındıkları için LCT'lerden daha ketojeniktirler. Bu ketojenik potansiyelleri nedeniyle MCT diyetinde daha az total yağ gerekir, böylece daha fazla karbonhidrat ve protein eklenebilir (74,75).

- 1.Klasik KD
- 2.Orta zincirli trigliserid diyeti (MCT)
- 3.Modifiye atkins diyeti (MAD)
- 4.Düşük glisemik indeks diyeti (LGIT)

Yapılan çalışmalar LCT ve MCT uygulanan hastalarda her iki diyet arasında etkinlik tolerasyonu açısından önemli bir fark olmadığını göstermiştir (76).

2.4.2 Ketojenik Diyetin Nöbet Tedavi Edici Etki Mekanizması

Ketojenik diyetin (KD) etki mekanizması hala net anlaşılamamıştır. Ketojenik diyetle beyin enerji kaynağı olarak glukozu değil, yağ asitlerinin yıkımı ile oluşan ketonu kullanır. Bu anaerobik aktivite, epileptik nöbetlerin azalmasında önemli bir unsur oluşturur. Beyinde ketozis sebebiyle aspartat seviyesini azaltarak GABA seviyesini artırmasının da nöbetleri durdurmada etkili olduğu düşünülmektedir (77,78).

Ketojenik diyet uygulamasında oluşan asetoasetat VGLUT2 üzerinden glutamat salınmasını inhibe eder (79). Ketojenik diyet uygulamasında oluşan beta hidroksi bütirat beyindeki GABA ve GABA/glutamat oranını artırır (80). Ketozis durumu, ketojenik diyet tarafından indüklenen astrosit metabolizmasını daha aktif hale getirir. Bu yüksek astroit aktivitesi, glutamatın glutamine dönüşümünün artmasına yol açar. Ardından, glutamin GABA'ya dönüşür. GABA, beyindeki başlıca inhibitör nörotransmitterdir. Böylece uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamat miktarı azalır, inhibe edici bir nörotransmitter olan GABA miktarı artar (81).

Glukoz analogu olan 2-deoksiglukoz (2DG), glukoz alımını azaltarak ve fosfoglukoizomeraz için yarışarak glikolizi inhibe eder. Ketojenik diyet sırasında gözlemlenen glukoz seviyelerindeki azalma ve keton cisimciği metabolizmasındaki artış, glikolizin azalmasıyla ilişkilidir. 2DG nöbet ilerlemesini yavaşlatabilir. Yapılan çalışmalar 2DG'nin antikonvülsan ve antiepileptik özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (79,82).

Ketojenik diyet uygulamasında hücredeki ATP azalmaktadır. Bunun sonucu olarak K-ATP kanalları aktive olarak açılmaktadır ve hiperpolarizasyona sebep olarak nöronal uyarılabilirliği azaltmaktadır (79,83,84).

2.5 Kalori Kısıtlaması

Kalori kısıtlaması (KK), genellikle temel besin ihtiyaçlarından ödün vermeden, ad libitum beslenmeye kıyasla kalorik alımda %20-40 oranında bir azalma olarak tanımlanır (22).

Açlığın antiepileptik etkileri antik çağlardan itibaren bilinmektedir ve KK tıp tarihinde epilepsi tedavisinde kullanılan ilk tedavi şeklidir. Kalori kısıtlamasının epilepsili hastalarında nöbet sıklığını azalttığı gösterilmiştir. Günümüzde KK uygulamasının sadece epilepsi üzerinde değil aynı zamanda diğer nörolojik hastalıklarda da faydalı olabileceği düşünülmektedir (85,86).

KK'nın yaşlanma, yaşam süresi ve nöroprotektif etkilerini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. KK uygulamasının, yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan ve kalıcı öğrenme ve bellek ile ilgili olan uzun vadeli potansiyasyondaki kayıpları azalttığı gösterilmiştir (87,88).

Yapılan bir hayvan çalışmasında KK uygulanan farelerin serbest beslenen farelere göre hipokampal nöronlarının dejenerasyonlara daha dirençli hale geldiği ve unutkanın daha az olduğu saptanmıştır (89). Lee ve arkadaşları KK uygulamasının nörodejenerasyonu azaltmasına ek olarak nörotrofik faktör uyarımını da artırdığı gösterilmiştir (90).

KK uygulamasının farklı canlı türlerinde yaşlanmaya bağlı hastalıkları azalttığı ve yaşam süresini artırdığı gösterilmiştir (91,92).

2.5.1 Kalori Kısıtlaması Etki Mekanizması

Kalori kısıtlamasının faydalarının altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Ancak bu mekanizmaları açıklamaya yönelik birçok çalışma yürütülmektedir. Yapılan çalışmalarda KK uygulamasının nükleer faktör kappa B (NF-KB), TNF-a ve interlökin sentezini azalttığı ve antiinflamatuvar etkisinin olduğu gösterilmiştir (93,94). Aynı zamanda oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (95).

Etki ettiği moleküler sinyal yolları arasında insülin/insülin benzeri büyüme faktörü sinyal yolağı, mTOR yolağı, adozin monofosfat ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) sinyal yolağı bulunmaktadır (96).

Memelilerde, kalori kısıtlamasının mTOR yolağını baskıladığı gösterilmiştir. Farelere mTOR inhibitörü olan rapamisin uygulanmasının farklı fare türlerinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (20). mTOR'un yaşam süresini uzatmasındaki rolünü destekleyen bir bulgu da mTOR sinyal yolunun aşağı yönlü bir bileşeni olan ribozomal S6 protein kinaz 1'in (S6K1) silinmesinin yaşam süresini artırması ve yaşa bağlı patolojilere; örneğin kemik, bağışıklık ve motor fonksiyon bozuklukları ve

insülin duyarlılığının kaybına karşı direnç sağlamasıdır. S6K1'in silinmesi, KK'de görülen gen ekspresyonu kalıplarına benzer kalıplar oluşturmuştur. Metabolik açıdan bakıldığında, S6K1 eksikliği olan fareler, obezite ve metabolik hastalıklardan korunmakta ve bu durum, daha yüksek mitokondriyal biyogenezle ilişkilendirilmektedir (20,22,97,98).

Kalori kısıtlaması altında mTOR yolağı inhibe olur, mTOR inhibisyonu ökaryotik başlama faktörü 4E bağlayıcı proteinin (4E-BP) hipofosforile duruma geçmesine sebep olur, hipofosforile 4E-BP translasyonel baskılayıcı olarak hareket eder. Translasyonel baskılayıcı 4E-BP, kalori kısıtlamasında mRNA translasyonundaki değişiklikleri düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır (22,99).

Kalori kısıtlamasının bir başka etki mekanizması AMPK aktivasyonu ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalar kalori kısıtlaması uygulamasının AMPK aktivasyonunu artırdığını göstermiştir (100).

AMPK genellikle ATP sentezinin tehlikeye girdiği durumlarda; örneğin hipoksi, iskemik durumlar, düşük besin bulunabilirliği veya egzersiz ya da açlık sırasında ATP tüketiminin hızlandığı durumlarda aktive olur. Sonuç olarak, AMPK aktivasyonu ATP üretmek için katabolik süreçleri uyarır ve hücrenin acil hayatta kalması için gerekli olmayan ATP tüketen anabolik süreçleri inhibe eder. AMPK aktivasyonu, mTOR inhibisyonu için en iyi tanımlanmış hücre içi tetikleyicidir (20,22).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Prof. Dr. Dilşad Türkdoğan'ın danışmanlığında yapılan Dr. Şeyda Karabulut'un 2019 yılında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Ketojenik Diyet ve Kalori Kısıtlı Diyetin Anti-inflamatuvar Etkilerinin İncelenmesi isimli uzmanlık tezinde kullanılan farelerin karaciğer biyopsi preparatları kullanılmıştır (101). Farklı diyet modifikasyonları uygulanan farelerin karaciğer biyopsi preparatlarında GATOR yolağına ait proteinlerin ekspresyonu incelenmiştir.

3.1 In vivo deneyler

Dr. Şeyda Karabulut'un 2019 yılında Prof. Dr. Dilşad Türkdoğan'ın danışmanlığında yapmış olduğu tez çalışmasında 50 adet Winstar dişi sıçan (6 haftalık), 7 alt gruba ayrılmış ve 7 hafta boyunca farklı beslenme koşullarına maruz bırakılmıştır. Tüm ele alınan deney gruplarında ketojenik diyet (KD) etkinliğini doğrulamak için serum beta-hidroksibütirat seviyeleri ölçülmüştür. 7 haftanın sonunda her bir alt grupta 3 sıçana karaciğer biyopsisi yapılmıştır. Örnekler hemen dondurularak işlem yapılana kadar -80°C'de bekletilmiştir. Bu tez kapsamında temel amaçların doğrulanmasına yönelik önceki tezde kullanılan farklı diyet uygulamaları yapılan sıçan örnekleri kullanılmıştır (101).

Örnek grupları:

- A-** Ketojenik diyet-zeytinyağı (KDZY)
- B-** Ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı (KDHY)
- C-** Kalorisi kısıtlı ketojenik diyet-zeytinyağı (KK-KDZY) (günlük toplamın %70'i kalori)
- D-** Kalorisi kısıtlı ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı (KK-KDHY) (günlük toplamın %70'i kalori)
- E-** Kalori kısıtlaması (KK) (günlük toplamın %70'i kalori)
- F-** LPS ile indüklenmiş standart diyet
- G-** Standart diyet

3.2 Protein İzolasyonu

Bekletilen örneklerden taze protein izolasyonu işlemi gerçekleştirildi. Önceden hazırlanmış -80°C 'de saklanan karaciğer homojenatları çözüldü ve yapılan tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Üretici firmanın önerdiği şekilde 100 μL M-PER solüsyonu (Thermo Scientific / Lot No: VI311347), 20 μL örnek üzerine eklenerek, 5-10 dk arasında buz üzerinde inkübe edildi. 4°C 'de, 14000 rpm'de, 10 dk boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve total protein miktarını içeren süpernatant fazı toplanıp yeni mikrofüj tüplerine aktarıldı. Bu mikrofüj tüplerinde bulunan proteinler yapılacak diğer analizler için -20°C 'de muhafaza edildi. Total protein konsantrasyonu Bradford analizi ile belirlendi. Bradford analizi, konsantrasyonu bilinmeyen protein miktarlarını saptamak için sık kullanılan etkin bir yöntemdir. 100 μL Bradford solüsyonu (BioShop / Lot No: 9C59314), 2 μL miktarındaki örnekler üzerine karanlık bir ortamda eklendi. Örnekler oda ısısında, karanlık bir ortamda shaker üzerine yerleştirilip, 10 dk boyunca inkübe edildikten sonra elde edilen kolorimetrik değişim her bir örnek için 595 nm'de alınan spektrofotometrik analiz ile

değerlendirilmiştir. Bovin serum albümin (BSA) bu analizin standart eğrisi olarak kullanıldı.

3.3 Immunoblotlama

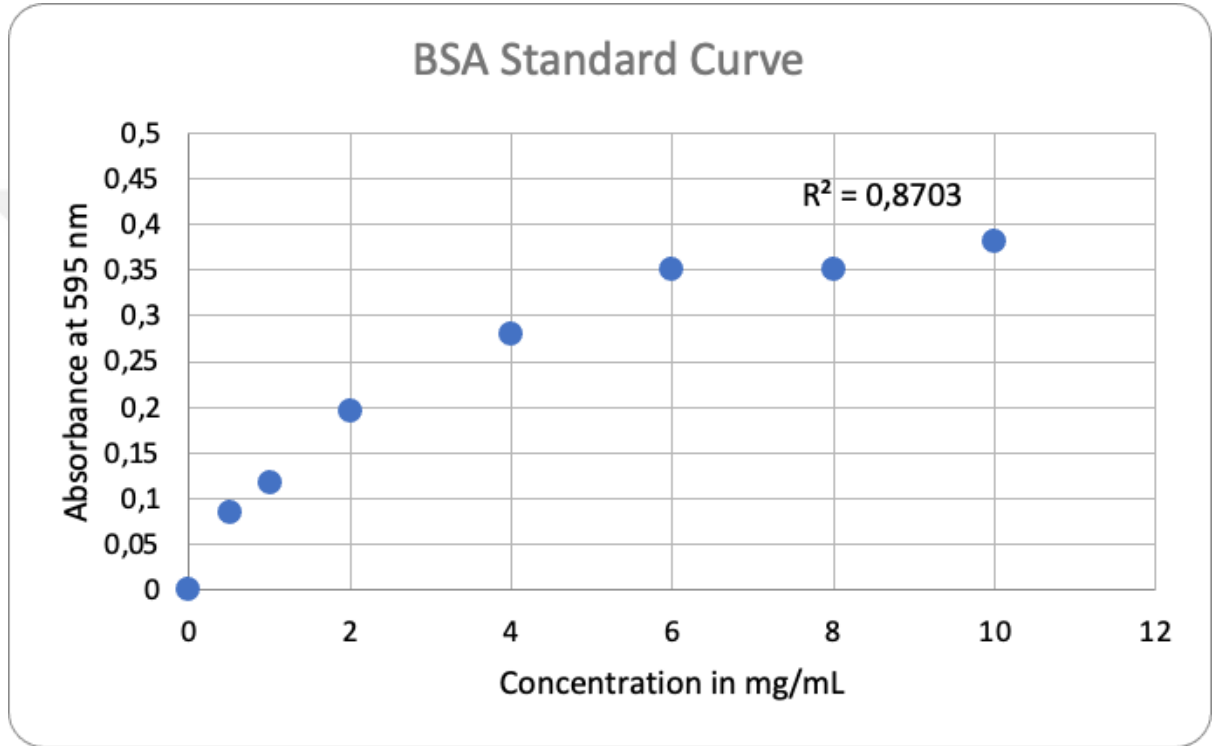
Bradford yöntemi ile (Bradford çözeltisi, Biorad) protein konsantrasyonu BSA ile elde edilen standart eğriye göre belirlendi. Hazırlanan %8-12'lik SDS-PAGE akrilamid jelle yüklenen örnekler yürütüldükten sonra PVDF membrana (Biorad) aktarılarak, tez kapsamında seçilen primer antikolar ve uygun anti-tavşan/anti-fare sekonder antikolar ile inkübe edildi. Hedef protein ekspresyonları laboratuvarımızda yapılan kemiluminans ajanları ile (kumarik asit, hidrojen peroksit ve luminol) inkübe edildikten sonra chemidoc (Biorad) ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar antikolarından arındırılan membranlarda yeniden inkübasyon ile β -aktin belirlemesinden sonra ImageJ programı ile analiz edilerek sunuldu. Normalizasyon ilaç uygulanmayan kontrol grubunun β -aktin/GAPDH seviyesine göre gerçekleştirildi.

3.4 Verilerin değerlendirilmesi

Gruplar arasındaki farklılıklar en az 3 tekrar doku ile hedef proteinler için değerlendirmeye alınmıştır. Image J ile dansitometrik analiz sonuçları kapsamında analizler "GraphPad-Prism 6" programı ile hazırlanarak sunulmuştur.

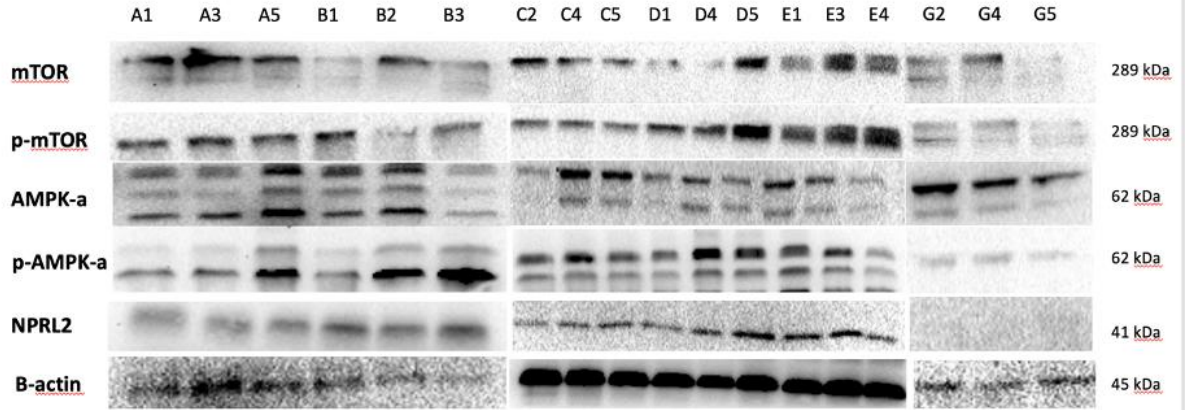
4.BULGULAR

Total protein konsantrasyonu Bradford analizi ile belirlendi. Bovin serum albümin bu analizin standart eğrisi olarak kullanılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Bradford analizi sonuçları ve western blot yükleme konsantrasyon hesapları. Tüm örneklerde 2 ayrı seferde 2 tekrarlı olarak sonuçlar alınmış ve jellere yükleme miktarı sarı ile boyanan kısımda 50 ug protein yükleme için optimize edilmiştir.

Farklı diyet modifikasyonları uygulanan farelerin karaciğer biyopsi preparatlarında GATOR 1 protein kompleksi ve mTOR sinyal yolağına ait proteinlerin ifade düzeyi incelenmiştir.



Şekil 9. mTOR sinyal yolağında AMPK ve GATOR1 kompleks proteinlerinin karşılaştırılmalı olarak irdelenmesi. Bu amaçla, A, B, C, D, E ve G gruplarından farklı protein örnekleri seçilerek hedefler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

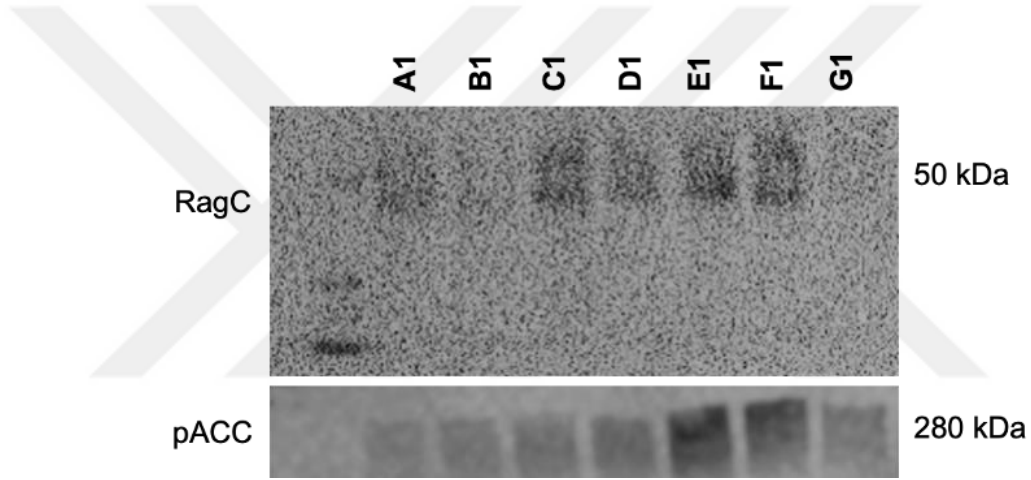
A: Ketojenik diyet-zeytinyağı (KDZY) **B:** Ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı (KDHY) **C:** Kalorisi kısıtlı ketojenik diyet-zeytinyağı (KK-KDZY) (günlük toplamın %70'i kalori) **D:** Kalorisi kısıtlı ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı (KK-KDHY) (günlük toplamın %70'i kalori) **E:** Kalori kısıtlaması (KK) (günlük toplamın %70'i kalori) **F:** LPS ile indüklenmiş standart diyet **G:** Standart diyet

Elde edilen bulgularımızda ketojenik diyet-zeytin yağı (A grubu) ve ketojenik diyet- hurma çekirdeği yağı (B grubu) beslenme gruplarında, özellikle hurma çekirdeği yağı uygulanan grupta mTOR ifadesinde azalma ile birlikte p-AMPK thr172 fosforilasyonu gözlenmiştir.

Standart diyet grubu ile karşılaştırdığımızda ketojenik diyet-zeytinyağı (A grubu) ve ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı (B grubu) gruplarında özellikle zeytinyağı uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere p-mTOR ifadesinde artış görülmüştür. Benzeri şekilde sadece kalori kısıtlaması yapılan grupta (E grubu) ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı uygulanan gruba göre mTOR fosforilasyonundaki artış ile beraber p-AMPKa seviyesindeki artış görülmüştür.

GATOR1 kompleksinin üyesi olan NPRL2 hurma çekirdeği yağı uygulanan ketojenik örneklerde artarken, kalori azaltımında NPRL2 değişimi diğer örneklerde farklılık göstermemektedir. Kontrol grubunda ise NPRL2 ifadesi görülmemiştir. GATOR1 kompleks üyesi NRPL2, p-AMPKa aktivasyonu ile benzer seyirde değişim göstermiştir.

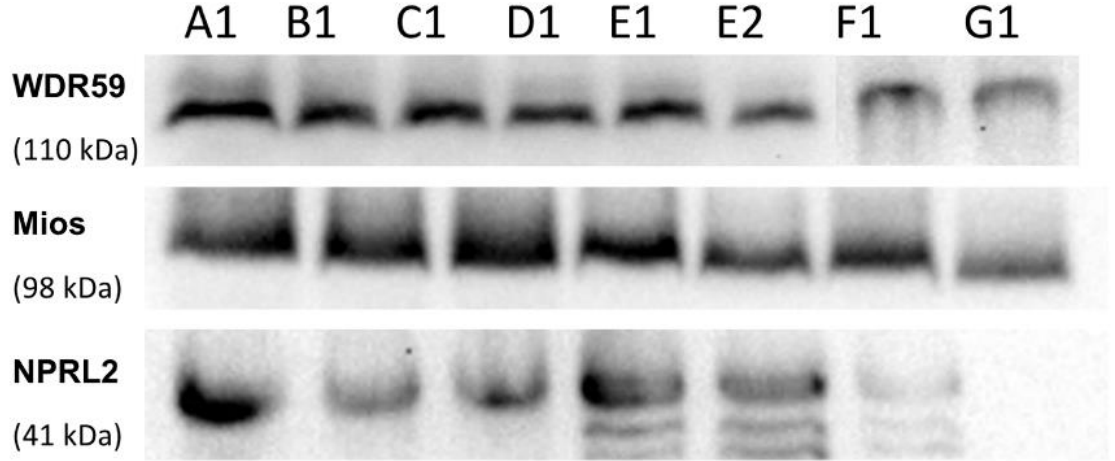
Daha kapsamlı bir araştırma için GATOR-mTOR ile ilişkili olarak mTOR ifadesindeki artışı gösteren RagC ve pACC hedefleri incelenmiştir.



Şekil 10. RagC ve pACC örneklerinin birleştirilen protein örneklerinde ifade düzeylerinin belirlenmesi. F grubu LPS ile indüklenmiş standart diyet örneklerinde pozitif kontrol örneği olarak eklenmiştir.

Çalışmamızda sadece kalori azalması yapılan örnek grubunda (E grubu) ve LPS ile indüklenmiş standart diyet grubunda (F grubu) RagC fosforilasyonu ve pACC ifadesi artmış olarak görülmüştür.

GATOR Kompleks sinyal yolağında GATOR 2 sinyal yolağına ait WDR59 ve Mios, GATOR1 sinyal yolağına ait NPRL2 ifade düzeyleri incelenmiştir.



Şekil 11. GATOR Kompleks sinyal yolağında değişen proteinlerin hedef proteinler açısından değerlendirilmesi. A. KDZY KD (zeytinyağı), B. KDHY (hurma çekirdeği yağı), C. KK-KDZY (günlük toplamın %70'i kalori), D. KK-KDHY (günlük toplamın %70'i kalori) E. KK (günlük toplamın %70'i kalori), F. LPS ile indüklenmiş standart diyet, G: Standart diyet

Standart diyet grubu ile diğer tüm diyet grupları karşılaştırıldığında GATOR2 belirteci olan WDR59 ile Mios ifadesinde ve GATOR1 belirteci olan NPRL2 ifadesinde artış görülmüştür.

5.TARTIŞMA

Ketojenik diyet, kalori kısıtlaması ve farklı diyet modifikasyonlarının mTOR ile ilişkisini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur.

McDaniel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ketojenik diyet ve standart diyet uygulanan farelerin karaciğer ve beyin dokusu incelenmiş olup ketojenik diyet uygulayan farelerin hipokampus ve karaciğer dokusunda mTOR yolak aktivasyonunun belirteçleri olan pS6 ve pAkt'ın ekspresyonunun azaldığı, aynı zamanda ketojenik diyet uygulayan farelerin karaciğer dokusunda pAMPK düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (72).

Benzer şekilde başka bir çalışmada ketojenik diyet ve standart diyet uygulanan farelerin hipokampus dokusu incelendiğinde ketojenik diyet uygulanan grupta mTOR inhibisyonu ile ilişkili olan p-S6 düzeyinde azalma saptanmıştır (73).

Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada fareler kontrol diyet, kalori kısıtlaması, orta zincirli yağ asidi içeren kalorisi kısıtlanmış KD, kalorisi kısıtlanmış yabancı KD (farklı marka tarafından temin edilen) ve kalorisi kısıtlanmış KD olarak 5 alt gruba ayrılmıştır. Orta zincirli yağ asidi içermeyen KD grubunda serum mTOR1 ifadesi daha düşük saptanmıştır. Orta zincirli yağ asidi içeren grupta AMPK ifadesi ile mTOR1 ifadesinde azalma görülmüştür (102). AMPK düzeyindeki azalma AMPK ifadesinin başka yollar tarafından da düzenlenmesi ile açıklanabilir.

Yapılan başka bir çalışmada glioblastoma tümör hücreleri ile deri altı tümör dokusu oluşturulmuş farelerde MCT yağı ile takviye edilmiş yüksek yağ, düşük karbonhidratlı bir diyet ile beslendiğinde kontrol grubuna göre mTORC1/mTORC2 genlerinin global bir şekilde düşük regülasyonu olduğu saptanmıştır (103).

Çalışmamızda ketojenik diyet uygulanan beslenme gruplarında p-AMPK ve p-mTOR ifadesinde artış, mTOR ifadesinde azalma görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgularda ketojenik diyetle mTOR ifadesinde azalma ve p-AMPK olması literatür ile benzer sonuçlanmıştır. Fosforile mTOR ifadesinde artışa mTOR üzerine birçok

farklı yolağın etkili olmasının sebep olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda hurma çekirdeği yağı kullanılan ketojenik diyet grubunda mTOR ifadesinde azalma, p-AMPK ve NPRL2 ifadesinde artış daha belirgin olarak saptanmıştır. Özellikle hurma çekirdeği yağı uygulanan grupta mTOR ifadesinde azalmanın belirgin olması bu beslenme grubunda mTOR inhibisyonun diğer gruplara göre daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

Moore ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farelerde kalori kısıtlaması (KK) rejimi ile beslenmenin kontrol grubuna kıyasla karaciğer dokusunda Akt ve mTOR'un aktivasyonunda azalmaya ve AMPK fosforilasyonunda artmaya sebep olduğu görülmüştür (104).

Kalori kısıtlaması uygulanan ve serbestçe beslenen farelerin kas dokusu incelendiğinde mTORC1 sinyal aktivitesi belirteçleri olan Akt, mTOR, p70S6K ve rpS6'nın protein translasyonu ve fosforilasyonunun azaldığı gösterilmiştir (105).

Yapılan başka bir çalışmada kalori kısıtlaması uygulanan farelerin karaciğer dokusu incelenmiş ve fosforile olmuş AMPK miktarı artmış olarak saptanmıştır (100).

Ataman ve arkadaşları kalori kısıtlaması uygulanan farelerin kas dokusunda mTORC1 yolağı alt birimlerin fosforilasyonunda azalma gözlemlemiştir (106).

Çalışmamızda da benzer şekilde kalori kısıtlaması uygulanan grupta fosforile olmuş AMPK ifadesinde artış görülmüştür. Literatürden farklı olarak kalori kısıtlaması yapılan grupta p-mTOR ifadesinde artış saptanmıştır.

Literatürde ketojenik diyet, kalori kısıtlaması ile GATOR protein kompleksi ilişkisini inceleyen bir çalışma yoktur. Fakat mTOR yolağı ve GATOR kompleksi arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma mevcuttur. GATOR 1 Rag A ve Rag B yi inaktive ederek mTORC1 inhibisyonu yapar. GATOR 2 kompleksi GATOR1 inhibisyonu yaparak mTORC1 aktivasyonuna neden olur (57,59). Buradan yola çıkarak GATOR1 kompleksi inhibisyonu durumunda mTORC1 aktivasyonundan söz edilebilir. Çalışmamızda hurma çekirdeği yağı uygulanan ketojenik diyet grubunda

GATOR 1 kompleksi üyesi NPRL2 ifadesinde artış görülmüştür. GATOR1 kompleks üyesi NRPL2, p-AMPKa aktivasyonu ile benzer seyirde değişim göstermiştir.

Literatür incelendiğinde GATOR2 yolağı aktivasyonun mTOR yolağında artışa neden olduğu görülmüştür. Lösin ve arjinin GATOR2 aktivitesini kontrol eden başlıca amino asitlerdir. Lösinin yokluğunda, GATOR2 inhibe olur ve GATOR1 aktive olarak mTORC1'in inhibisyonuna yol açar. Lösin mevcut olduğunda GATOR2 aktive olur ve bu GATOR1 inhibisyonuna ve mTORC1'in aktivasyonuna neden olur(36,37). Çalışmamızda kontrol grubu dışındaki tüm beslenme gruplarında GATOR 2 yolağına ait WDR59 ve Mios ifadesinde artış saptanmıştır. Kalori kısıtlaması durumunda amino asit yokluğu durumu olacağı düşünülerek GATOR2 inhibisyonu beklenirken çalışmamızda beklenilenden farklı kalori kısıtlaması durumunda da standart diyet grubuna göre GATOR2 ifadesinde artış görülmüştür. Bunun nedeni olarak GATOR2 aktivitesini kontrol eden başka mekanizmalar olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda büyüme faktörleri ve amino asitlerin RagC fosforilasyonunu artırdığı ve fosforile RagC nin mTORC1 aktivasyonu için gerekli olduğu görülmüştür. Guang ve arkadaşları buna ek olarak mTORC1'in de RagC'yi fosforile ettiğini göstermişlerdir (59,107). Literatüre bakıldığında mTOR ifadesinde artış olması durumunda fosforile RagC'nin artmış olması beklenir. Çalışmamızda beklendiği şekilde sadece kalori kısıtlaması durumunda p-mTOR ifadesinde artış ve RagC ifadesinde artış görülmüştür.

Çalışmamızda mTOR yolağı ile ilişkili olarak fosforile Asetil-CoA karboksilaz (ACC) ifadesi de incelenmiştir. ACC, asetil-CoA'nın karboksilasyonunu katalize eder ve bu işlem sonucunda malonil-CoA üretilir. Malonil-CoA daha sonra yağ asidi sentezaz tarafından uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin üretiminde kullanılır. Yapılan çalışmalarda mTOR sinyal yolunun translayonel düzenlemesi aracılığıyla ACC ekspresyonunu indükleyebileceği gösterilmiştir. (108) mTOR yolağı ile ilişkili olarak AMPK'nın ACC'yi fosforile ederek inhibe ettiği bilinmektedir (109). Çalışmamızda kalori kısıtlaması uygulanan grupta fosforile ACC ifadesinde artış görülmüştür. Bu duruma p-mTOR düzeyindeki artışın sebep olduğu düşünülmektedir.

6.SONUÇLAR

- 1) Ketojenik diyet-zeytin yağı ve ketojenik diyet- hurma çekirdeği yağı beslenme gruplarında, özellikle hurma çekirdeği yağı uygulanan grupta mTOR ifadesinde azalma ile birlikte p-AMPK thr172 fosforilasyonu gözlenmiştir. Benzeri şekilde sadece kalori kısıtlaması yapılan grupta ketojenik diyet- hurma çekirdeği yağı uygulanan gruba göre mTOR fosforilasyonundaki artış ile beraber p-AMPKa seviyesindeki artış görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgularda ketojenik diyetle mTOR ifadesinde azalma olması hipotezimizle uyumlu sonuçlanmıştır. p-AMPK ifadesinin artışı olduğu durumlarda mTOR ifadesindeki azalma beklenirken, p-AMPK ifadesindeki artışa eşlik eden p-mTOR artışı, mTOR üzerinde AMPK dışında farklı faktörlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir.
- 2) Standart diyet grubu ile karşılaştırdığımızda ketojenik diyet-zeytinyağı ve ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı gruplarında özellikle zeytinyağı uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere p-mTOR ifadesinde artış görülmüştür. Sadece kalori kısıtlaması yapılan grupta ketojenik diyet-hurma çekirdeği yağı grubuna göre p-mTOR artışı dikkat çekmiştir.
- 3) GATOR1 kompleksinin üyesi ve mTOR inhibisyonundan sorumlu olan NPRL2 hurma çekirdeği yağı uygulanan ketojenik örneklerde artarken, kalori azaltımında NPRL2 değişimi diğer örneklerde farklılık göstermemektedir. Kontrol grubunda ise NPRL2 ifadesi görülmemiştir. NPRL2, p-AMPKa aktivasyonu ile beklendiği şekilde benzer seyirde değişim göstermiştir. Standart diyete göre diğer tüm gruplarda NPRL 2 ifadesinde artış olması kalori kısıtlaması ve ketojenik diyet uygulamasında GATOR 1 yolağında artışı göstererek hipotezimizi desteklemektedir.

- 4) Çalışmamızda sadece kalori azalması yapılan örnek grubunda ve LPS ile indüklenmiş standart diyet grubunda RagC fosforilasyonu ve pACC ifadesi artmış olarak görülmüştür. Kalori kısıtlaması grubunda gözlenen pACC ifadesindeki artış mTOR ifadesindeki artış ile açıklanabilir.
- 5) Standart diyet grubu ile diğer tüm diyet grupları karşılaştırıldığında GATOR2 belirteci olan WDR59 ve Mios ifadesinde artış görülmüştür. Amino asit yokluğu durumunda GATOR2 kompleksi proteinlerinde azalma beklenirken ketojenik diyet ve kalori kısıtlaması yapılan gruplarda ifadesinde artış görülmesi GATOR yolağına etki eden başka mekanizmaların da olduğuna işaret etmektedir.

KAYNAKÇA

1. Ułamek-Kozioł M, Czuczwar SJ, Januszewski S, Pluta R. Ketogenic Diet and Epilepsy. *Nutrients*. 2019 Oct 18;11(10):2510.
2. Liu G. SN, PA. Epilepsy: Treatment Options. *Am Fam Physician*. 2017;96(2):87–96.
3. Raffo E FJ, FA, KE, NA. Calorie-restricted ketogenic diet increases thresholds to all patterns of pentylenetetrazol-induced seizures: critical importance of electroclinical assessment. *Epilepsia*. 2008 Feb;49(2):320–8.
4. Sarmast ST, Abdullahi AM, Jahan N. Current Classification of Seizures and Epilepsies: Scope, Limitations and Recommendations for Future Action. *Cureus*. 2020 Sep 20;
5. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. <sc>ILAE</sc> classification of the epilepsies: Position paper of the <sc>ILAE</sc> Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017 Apr 8;58(4):512–21.
6. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr 14;55(4):475–82.
7. Vera-González A. Pathophysiological Mechanisms Underlying the Etiologies of Seizures and Epilepsy. In: *Epilepsy*. Exon Publications; 2022.
8. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology*. 2017 Jan 17;88(3):296–303.
9. El Achkar CM, Olson HE, Poduri A, Pearl PL. The Genetics of the Epilepsies. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jul 26;15(7):39.
10. Sarlo GL, Holton KF. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. *Seizure*. 2021 Oct;91:213–27.
11. Gouder N, Scheurer L, Fritschy JM, Boison D. Overexpression of Adenosine Kinase in Epileptic Hippocampus Contributes to Epileptogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 2004 Jan 21;24(3):692–701.
12. Boison D. The Biochemistry and Epigenetics of Epilepsy: Focus on Adenosine and Glycine. *Front Mol Neurosci*. 2016 Apr 13;9.
13. Bambal G. ÇD. Epilepsi Oluşum Mekanizmaları. *Konuralp Tıp Dergisi* . 2011;3(3):42–5.
14. Crino PB. mTOR Signaling in Epilepsy: Insights from Malformations of Cortical Development. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Apr 1;5(4):a022442–a022442.
15. Yao Y, Jones E, Inoki K. Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells. *Biomolecules*. 2017 Jul 7;7(3):51.

16. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Apr 15;21(4):183–203.
17. Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, Maki M, Shibata H. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci.* 2020 Dec 17;27(1):87.
18. Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Mol Cell.* 2002 Sep;10(3):457–68.
19. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell.* 2002 Jul;110(2):177–89.
20. Stanfel MN, Shamieh LS, Kaeberlein M, Kennedy BK. The TOR pathway comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2009 Oct;1790(10):1067–74.
21. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. RETRACTED ARTICLE: Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* 2020 Dec 1;10(1):54.
22. Cantó C, Auwerx J. Calorie Restriction: Is AMPK a Key Sensor and Effector? *Physiology.* 2011 Aug;26(4):214–24.
23. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüeegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov 3;6(11):1122–8.
24. Dos D, Sarbassov, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Current Biology.* 2004 Jul;14(14):1296–302.
25. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüeegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov 3;6(11):1122–8.
26. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator Is a GEF for the Rag GTPases that Signal Amino Acid Levels to mTORC1. *Cell.* 2012 Sep;150(6):1196–208.
27. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003 Aug 1;17(15):1829–34.
28. Battaglioni S, Benjamin D, Wälchli M, Maier T, Hall MN. mTOR substrate phosphorylation in growth control. *Cell.* 2022 May;185(11):1814–36.
29. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol.* 2008 Aug 6;10(8):935–45.

30. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science* (1979). 2008 Jun 13;320(5882):1496–501.
31. Condon KJ, Sabatini DM. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci*. 2019 Nov 1;132(21).
32. Petit CS, Roczniak-Ferguson A, Ferguson SM. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *Journal of Cell Biology*. 2013 Sep 30;202(7):1107–22.
33. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell*. 2010 Apr;141(2):290–303.
34. Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Mar 30;14(3):133–9.
35. Betz C, Hall MN. Where is mTOR and what is it doing there? *Journal of Cell Biology*. 2013 Nov 25;203(4):563–74.
36. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, et al. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell*. 2016 Mar;165(1):153–64.
37. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* (1979). 2016 Jan;351(6268):43–8.
38. Saxton RA, Chantranupong L, Knockenhauer KE, Schwartz TU, Sabatini DM. Mechanism of arginine sensing by CASTOR1 upstream of mTORC1. *Nature*. 2016 Aug 3;536(7615):229–33.
39. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, et al. A Tumor Suppressor Complex with GAP Activity for the Rag GTPases That Signal Amino Acid Sufficiency to mTORC1. *Science* (1979). 2013 May 31;340(6136):1100–6.
40. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends Biochem Sci*. 2015 Oct;40(10):611–22.
41. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase. *Science* (1979). 2011 Nov 4;334(6056):678–83.
42. Szymonowicz K, Oeck S, Malewicz NM, Jendrossek V. New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response. *Cancers (Basel)*. 2018 Mar 18;10(3).
43. Khan MA, Jain VK, Rizwanullah Md, Ahmad J, Jain K. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. *Drug Discov Today*. 2019 Nov;24(11):2181–91.

44. Jhanwar-Uniyal M, Wainwright J V., Mohan AL, Tobias ME, Murali R, Gandhi CD, et al. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul.* 2019 May;72:51–62.
45. Ling NXY, Kaczmarek A, Hoque A, Davie E, Ngoei KRW, Morrison KR, et al. mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat Metab.* 2020 Jan 20;2(1):41–9.
46. Willows R, Sanders MJ, Xiao B, Patel BR, Martin SR, Read J, et al. Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells. *Biochemical Journal.* 2017 Sep 1;474(17):3059–73.
47. Levy T, Voeltzke K, Hruby L, Alasad K, Bas Z, Snaebjörnsson M, et al. mTORC1 regulates cell survival under glucose starvation through 4EBP1/2-mediated translational reprogramming of fatty acid metabolism. *Nat Commun.* 2024 May 14;15(1):4083.
48. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated Protein Kinase Suppresses Protein Synthesis in Rat Skeletal Muscle through Down-regulated Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Jul;277(27):23977–80.
49. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, et al. Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell.* 2014 Feb;156(4):771–85.
50. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep 12;4(9):648–57.
51. Dazert E, Hall MN. mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Dec;23(6):744–55.
52. Su MY, Morris KL, Kim DJ, Fu Y, Lawrence R, Stjepanovic G, et al. Hybrid Structure of the RagA/C-Ragulator mTORC1 Activation Complex. *Mol Cell.* 2017 Dec;68(5):835-846.e3.
53. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017 Mar;168(6):960–76.
54. Groenewoud MJ, Zwartkruis FJT. Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1. *Biochem Soc Trans.* 2013 Aug 1;41(4):951–5.
55. Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 2017 Apr;45:72–82.
56. Hesketh GG, Papazotos F, Pawling J, Rajendran D, Knight JDR, Martinez S, et al. The GATOR–Rag GTPase pathway inhibits mTORC1 activation by lysosome-derived amino acids. *Science (1979).* 2020 Oct 16;370(6514):351–6.
57. Sahu U, Ben-Sahra I. GATOR2 rings GATOR1 to speak to mTORC1. *Mol Cell.* 2023 Jan;83(1):6–8.

58. Weckhuysen S, Marsan E, Lambrecq V, Marchal C, Morin-Brureau M, An-Gourfinkel I, et al. Involvement of GATOR complex genes in familial focal epilepsies and focal cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2016 Jun;57(6):994–1003.
59. Lama-Sherpa TD, Jeong MH, Jewell JL. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases. *Biochem Soc Trans*. 2023 Apr 26;51(2):655–64.
60. Wolfson RL, Chantranupong L, Wyant GA, Gu X, Orozco JM, Shen K, et al. KICSTOR recruits GATOR1 to the lysosome and is necessary for nutrients to regulate mTORC1. *Nature*. 2017 Mar 15;543(7645):438–42.
61. Hadzsiev K, Hegyi M, Fogarasi A, Bodó-Baltavári T, Zsigmond A, Maász A, et al. Observation of a Possible Successful Treatment of DEPDC5-Related Epilepsy with mTOR Inhibitor. *Neuropediatrics*. 2023 Oct 1;54(05):344–6.
62. Baldassari S, Picard F, Verbeek NE, van Kempen M, Brilstra EH, Lesca G, et al. The landscape of epilepsy-related GATOR1 variants. *Genetics in Medicine*. 2019 Feb;21(2):398–408.
63. Hughes J, Dawson R, Tea M, McAninch D, Piltz S, Jackson D, et al. Knockout of the epilepsy gene *Depdc5* in mice causes severe embryonic dysmorphology with hyperactivity of mTORC1 signalling. *Sci Rep*. 2017 Oct 3;7(1):12618.
64. Nabbout R, Kuchenbuch M. Impact of predictive, preventive and precision medicine strategies in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2020 Dec 19;16(12):674–88.
65. Kim JM. Ketogenic diet: Old treatment, new beginning. *Clin Neurophysiol Pract*. 2017;2:161–2.
66. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, et al. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2008 Jun;7(6):500–6.
67. Wilder RM. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Proc*. 1921 Jan;2:307–8.
68. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, Ballaban-Gil KR, Christina Bergqvist AG, Blackford R, et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: Updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia Open*. 2018 Jun 21;3(2):175–92.
69. Martin-McGill KJ, Jackson CF, Bresnahan R, Levy RG, Cooper PN. Ketogenic diets for drug-resistant epilepsy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018 Nov 7;
70. Youn SE, Park S, Kim SH, Lee JS, Kim HD, Kang HC. Long-term outcomes of ketogenic diet in patients with tuberous sclerosis complex-derived epilepsy. *Epilepsy Res*. 2020 Aug;164:106348.
71. Masino SA, Li T, Theofilas P, Sandau US, Ruskin DN, Fredholm BB, et al. A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A1 receptors. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jul 1;121(7):2679–83.

72. McDaniel SS, Rensing NR, Thio LL, Yamada KA, Wong M. The ketogenic diet inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Epilepsia*. 2011 Mar;52(3):e7–11.
73. Singh A, Mettler T, Oh H, Kim D. The Ketogenic Diet Attenuates Both Hyperactivity in mTOR pathway and Astrogliosis Through Regulation of AMPK signaling in the Epileptic Brain. *The FASEB Journal*. 2018 Apr;32(S1).
74. Ünalp A. Ketogenic diet practices on childhood epilepsies. *Journal of Dr Behcet Uz Children s Hospital*. 2017;
75. Liu Y meiChristiana, Wang HS. Medium-chain Triglyceride Ketogenic Diet, An Effective Treatment for Drug-resistant Epilepsy and A Comparison with Other Ketogenic Diets. *Biomed J*. 2013;36(1):9.
76. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, et al. A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia*. 2009 May 7;50(5):1109–17.
77. D’Andrea Meira I, Romão TT, Pires do Prado HJ, Krüger LT, Pires MEP, da Conceição PO. Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. *Front Neurosci*. 2019 Jan 29;13.
78. Imdad K, Abualait T, Kanwal A, AlGhannam ZT, Bashir S, Farrukh A, et al. The Metabolic Role of Ketogenic Diets in Treating Epilepsy. *Nutrients*. 2022 Nov 29;14(23).
79. Lutas A, Yellen G. The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy. *Trends Neurosci*. 2013 Jan;36(1):32–40.
80. Qiao YN, Li L, Hu SH, Yang YX, Ma ZZ, Huang L, et al. Ketogenic diet-produced β -hydroxybutyric acid accumulates brain GABA and increases GABA/glutamate ratio to inhibit epilepsy. *Cell Discov*. 2024 Feb 13;10(1):17.
81. Yudkoff M, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I. Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. *Epilepsia*. 2008 Nov 4;49(s8):73–5.
82. Garriga-Canut M, Schoenike B, Qazi R, Bergendahl K, Daley TJ, Pfender RM, et al. 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat Neurosci*. 2006 Nov 15;9(11):1382–7.
83. Ma W, Berg J, Yellen G. Ketogenic Diet Metabolites Reduce Firing in Central Neurons by Opening K_{ATP} Channels. *The Journal of Neuroscience*. 2007 Apr 4;27(14):3618–25.
84. Kawamura M, Ruskin DN, Masino SA. Metabolic Autocrine Regulation of Neurons Involves Cooperation among Pannexin Hemichannels, Adenosine Receptors, and K_{ATP} Channels. *The Journal of Neuroscience*. 2010 Mar 17;30(11):3886–95.

85. Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev.* 2009 Mar;59(2):293–315.
86. Greene AE, Todorova MT, McGowan R, Seyfried TN. Caloric Restriction Inhibits Seizure Susceptibility in Epileptic EL Mice by Reducing Blood Glucose. *Epilepsia.* 2001 Nov 10;42(11):1371–8.
87. Hori N, Hirotsu I, Davis PJ, Carpenter DO. Long-term potentiation is lost in aged rats but preserved by calorie restriction. *Neuroreport.* 1992 Dec;3(12):1085–8.
88. Okada M, Nakanishi H, Amamoto T, Urae R, Ando S, Yazawa K, et al. How does prolonged caloric restriction ameliorate age-related impairment of long-term potentiation in the hippocampus? *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Mar 17;111(1–2):175–81.
89. Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann Neurol.* 1999 Jan;45(1):8–15.
90. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 2002 Feb;80(3):539–47.
91. Flanagan EW, Most J, Mey JT, Redman LM. Calorie Restriction and Aging in Humans. *Annu Rev Nutr.* 2020 Sep 23;40(1):105–33.
92. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science (1979).* 2010 Apr 16;328(5976):321–6.
93. Spaulding CC, Walford RL, Effros RB. Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF- α and IL-6 in C3B10RF1 mice. *Mech Ageing Dev.* 1997 Feb;93(1–3):87–94.
94. Bhattacharya A, Chandrasekar B, Rahman MM, Banu J, Kang JX, Fernandes G. Inhibition of inflammatory response in transgenic fat-1 mice on a calorie-restricted diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct;349(3):925–30.
95. Merry BJ. Oxidative stress and mitochondrial function with aging – the effects of calorie restriction. *Aging Cell.* 2004 Feb 15;3(1):7–12.
96. Lee SH, Min KJ. Caloric restriction and its mimetics. *BMB Rep.* 2013 Apr 30;46(4):181–7.
97. Selman C, Tullet JMA, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, et al. Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Signaling Regulates Mammalian Life Span. *Science (1979).* 2009 Oct 2;326(5949):140–4.
98. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature.* 2004 Sep 9;431(7005):200–5.
99. Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, Vargas MA, Kolipinski MC, Lu TA, et al. 4E-BP Extends Lifespan upon Dietary Restriction by Enhancing Mitochondrial Activity in *Drosophila*. *Cell.* 2009 Oct;139(1):149–60.

100. Jiang W, Zhu Z, Thompson HJ. Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5492–9.
101. K.Şeyda. Ketojenik Diyet ve Kalori Kısıtlı Diyetin Anti İflamatuvar Etkilerinin İncelenmesi. [İstanbul]; 2019.
102. Liu H, Huang J, Liu H, Li F, Peng Q, Liu C. Effects of ketogenic diet containing medium-chain fatty acids on serum inflammatory factor and mTOR signaling pathway in rats. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 2020 Dec 16;7(1):27.
103. Martuscello RT, Vedam-Mai V, McCarthy DJ, Schmoll ME, Jundi MA, Louviere CD, et al. A Supplemented High-Fat Low-Carbohydrate Diet for the Treatment of Glioblastoma. *Clinical Cancer Research.* 2016 May 15;22(10):2482–95.
104. Moore T, Beltran L, Carbajal S, Strom S, Traag J, Hursting SD, et al. Dietary Energy Balance Modulates Signaling through the Akt/Mammalian Target of Rapamycin Pathways in Multiple Epithelial Tissues. *Cancer Prevention Research.* 2008 Jun 1;1(1):65–76.
105. Margolis LM, Rivas DA, Berrone M, Ezzyat Y, Young AJ, McClung JP, et al. Prolonged Calorie Restriction Downregulates Skeletal Muscle mTORC1 Signaling Independent of Dietary Protein Intake and Associated microRNA Expression. *Front Physiol.* 2016 Oct 5;7.
106. Ataman M, Mittal N, Tintignac L, Schmidt A, Ham DJ, González A, et al. Calorie restriction and rapamycin distinctly mitigate aging-associated protein phosphorylation changes in mouse muscles. *Commun Biol.* 2024 Aug 10;7(1):974.
107. Yang G, Humphrey SJ, Murashige DS, Francis D, Wang QP, Cooke KC, et al. RagC phosphorylation autoregulates mTOR complex 1. *EMBO J.* 2019 Feb 1;38(3).
108. Wang Y, Yu W, Li S, Guo D, He J, Wang Y. Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases. *Front Oncol.* 2022 Mar 11;12.
109. Fang C, Pan J, Qu N, Lei Y, Han J, Zhang J, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease. *Front Physiol.* 2022 Aug 25;13.