

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNDE LİPİT METABOLİZMASININ KANSER
KÖK HÜCRE DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI VE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'IN POTANSİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Elif YAŞAR**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Eylül 2024
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİNDE LİPİT METABOLİZMASININ KANSER
KÖK HÜCRE DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI VE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'IN POTANSİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Elif YAŞAR**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2023-13268 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2024
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Elif YAŞAR

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Meme Kanserinde Lipit Metabolizmasının Kansер Kök Hücre Düzeyinde Araştırılması ve Dokosaheksaenoik Asit (DHA)’ın Potansiyel Etkilerinin İncelenmesi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Elif YAŞAR

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ

Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KABUL ve ONAY SAYFASI

Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ danışmanlığında **Elif YAŞAR** tarafından hazırlanan “**Meme Kanseriinde Lipit Metabolizmasının Kanseri Kök Hücre Düzeyinde Araştırılması ve Dokosaheksaenoik Asit (DHA)’in Potansiyel Etkilerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

02/09/2024

JÜRİ:

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Gökçen DİNÇ

Üye : Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

ONAY

Bu tezin kabulü Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../ 2024

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimim sürecinde bana yeni bakış açıları kazandıran, akademik yolculuğumun başlangıcında bana fırsatlar sunan ve rehberlik eden aynı zamanda bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren saygıdeğer ve kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ'a

Tez deneylerim sürecinde her aşamada destek olan ve bilimsel bakış açımı geliştirmemde büyük katkıları olan değerli hocam Dr. M. Burak ACAR'a

Yüksek lisans eğitimim sürecinde en büyük destekçim olan, bilgi birikimi ve deneyimlerini benimle paylaşarak akademik gelişimime katkıda bulunan aynı zamanda bu süreçte karşılaştığım zorlukları aşamamda bana rehberlik eden ve her daim yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Medine DOĞAN SARIKAYA'ya

Yüksek lisans sürecim boyunca manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve bu süreçteki yardımlarıyla bana güç veren sevgili ekip arkadaşım Nilhan ÖZTÜRK'e

Tez yazım sürecinde yardımlarıyla yanımda olan Melisa ALBAYRAK ve desteklerinden dolayı tüm SY LAB ekibine,

Yüksek lisans tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi BAP birimine,

Yüksek lisans eğitimim sırasında BİDEB 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi olarak destek sağlayan TÜBİTAK'a

Aldığım her kararda yanımda olan, bana duyduğu güvenle beni cesaretlendiren babam Pirağa YAŞAR'a manevi desteğiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren sevgili annem Emine YAŞAR'a ve aileme

en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Elif YAŞAR

Kayseri, Eylül 2024

MEME KANSERİNDE LİPİT METABOLİZMASININ KANSER KÖK HÜCRE DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI VE DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'IN POTANSİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Elif YAŞAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2024

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ

ÖZET

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türlerinden biridir ve klinik tedavi yaklaşımlarına rağmen yüksek mortalite oranlarına neden olmaktadır. Meme kanseri kök hücreleri (MKKH'ler), hastalığın tedaviye direnç ve nüks potansiyeli gibi zorlukları nedeniyle önemli bir araştırma konusudur. Bu hücrelerin metabolik özellikleri ve yenilenme süreçleri, kanserin ilerlemesi ve tedaviye yanıtları üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. MKKH'lerin metabolik özelliklerinin anlaşılması, yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. De novo lipogenez (DNL) süreci, meme kanseri hücrelerinde enerji ve yapı taşları sağlayarak kanserin büyümesini desteklemektedir. Bu süreçte yağ asidi sentaz (FASN) enzimi lipogenez ile ilişkili yolların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayarak kanserin ilerlemesinde etkili olabilir. Bu çalışmanın amacı, meme kanseri kök hücrelerinde FASN'nin metabolik yeniden programlama sürecindeki rolünü ve dokosaheksaenoik asidin (DHA) bu süreçte olan etkilerini araştırmaktır. Özellikle FASN enziminin ve lipogenez ile ilgili sinyal yollarının MKKH'lerin tedaviye direnç ve nüks potansiyeli üzerindeki etkilerini incelemeyi hedeflemektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda, meme kanserinin Luminal A alt tipini temsil eden MCF 7 ve TN meme kanseri alt tipini temsil eden MDA MB 231 parental kanser hücreleri kullanılarak bu hücrelerden Manyetik ile Aktive Edilmiş Hücre Ayırımı (MACS) yöntemi ile CD44⁺ ve CD24⁻ belirteçlerine göre MKKH'ler izole edilmiştir. İzole edilen MKKH'lere ve parental kanser hücrelerine IC50 konsantrasyonunda DHA uygulanmıştır. DHA uygulamasının etkileri; hücrelerin klonojenik kapasitesi, p-AKT ve p-NFκB seviyeleri, apoptoz oranları, FASN gen ekspresyonu (Rt-qPCR yöntemi ile) ve protein düzeyindeki FASN seviyeleri (flow sitometri ile) analiz edilerek değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, DHA'nın MKKH'lerde FASN seviyelerini önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. DHA uygulaması MKKH'lerin klonojenik kapasitesinde, AKT ve NFκB fosforilasyonunda azalmaya ve apoptoz oranlarında artışa yol açmaktadır. Bu bulgular, FASN'nin MKKH'leri hedefleyen terapilerde potansiyel olarak kullanılabileceğini ve DHA'nın bu süreçleri modüle etme yeteneğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dokosaheksaenoik Asit (DHA); Kanser Kök Hücresi; Lipit Metabolizması; Meme Kanseri; Yağ Asidi Sentaz (FASN)

INVESTIGATION OF LIPID METABOLISM IN BREAST CANCER AT THE CANCER STEM CELL LEVEL AND EXAMINING THE POTENTIAL EFFECTS OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA)

Elif YAŞAR

Erciyes University, Institute of Health Sciences
Stem Cell Sciences Department
Master Thesis, September 2024
Advisor: Dr. Lecturer Member Seçil YILMAZ

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common cancer types among women and, despite clinical treatment approaches, continues to result in high mortality rates. Breast cancer stem cells (BCSCs) are a significant research focus due to their role in treatment resistance and potential for recurrence. The metabolic properties and renewal processes of BCSCs play a decisive role in cancer progression and response to treatment. Understanding the metabolic characteristics of BCSCs is crucial for developing new therapeutic strategies. The process of de novo lipogenesis (DNL) supports the growth of breast cancer by providing energy and building blocks for the cells. In this process, the enzyme fatty acid synthase (FASN) plays a central role in regulating lipogenesis-related pathways and may significantly contribute to cancer progression. The aim of this study is to investigate the role of FASN in the metabolic reprogramming of BCSCs and the effects of docosahexaenoic acid (DHA) on this process. Specifically, this study aims to examine the impact of FASN and lipogenesis-related signaling pathways on the treatment resistance and recurrence potential of BCSCs. In this study, BCSCs were isolated from the Luminal A subtype breast cancer cell line MCF-7 and the TN breast cancer subtype cell line MDA-MB-231, which represent different breast cancer subtypes. BCSCs were isolated using the Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) method based on CD44+ and CD24- markers. Isolated BCSCs and parental cancer cells were treated with DHA at the IC50 concentration. The effects of DHA treatment were evaluated by analyzing the cells' clonogenic capacity, p-AKT and p-NFκB levels, apoptosis rates, FASN gene expression (using the Rt-qPCR method), and FASN protein levels (using flow cytometry). The results of the study demonstrate that DHA significantly inhibits FASN levels in BCSCs. DHA treatment leads to a reduction in clonogenic capacity, AKT and NFκB phosphorylation, and an increase in apoptosis rates in BCSCs. These findings suggest that FASN could be potentially targeted in therapies aimed at BCSCs and highlight the ability of DHA to modulate these processes.

Keywords: Breast Cancer; Cancer Stem Cells; Docosahexaenoic Acid (DHA); Fatty Acid Synthase (FASN); Lipid Metabolism

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Meme Kanseri	5
2.2.1. Meme Kanserinde Heterojenite	8
2.3. Kök Hücre	10
2.3.1. Kanser Kök Hücresi	12
2.4. Kanserde Hücresel Metabolizma.....	16
2.4.1. Lipit Metabolizması.....	17
2.4.1.1. De novo lipogenez.....	18
2.4.1.2. FASN'nin Yapısal Organizasyonu.....	20
2.4.1.3. FASN'nin İşlevi	21
2.4.2. Kanser Kök Hücresinde Lipit Metabolizması	22
2.5. Kanserde Lipit Sinyal Yolakları.....	26
2.5.1. NF-kB Sinyal Yolağı ve Kanserdeki Rolü	27
2.5.1.1. Meme Kanserinde Nf-kB Sinyal Yolağı	28
2.5.2. Akt/PKB Sinyal Yolağı ve Kanserdeki Rolü.....	30
2.5.2.1.Meme Kanserinde AKT Sinyal Yolağı	31
2.6. Diyet Yağ Asitleri	32
2.6.1. Dokosaheksaenoik Asit.....	33

2.6.1.1. Meme Kanseriinde DHA'nın Etkileri	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Gereçler	37
3.2. Yöntem	39
3.2.1. Hücre Kültürü	40
3.2.1.1. Kanseri Hücrelerinin Kültürü	40
3.2.1.2. Kanseri Kök Hücrelerinin Kültürü	41
3.2.2. MCF 7 ve MDA MB 231 hücre hatlarında CD44 ⁺ /CD24 ⁻ belirteçleri kullanılarak Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ile Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyonu	42
3.2.3. Bovine Serum Albumin'e (BSA) Bağlı DHA'nın Hazırlanması	43
3.2.4. Hücre Canlılığının Tetrazolium Compound, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2 Yl)-5-(3-CarboxymethylPhenyl)-2-(4-Sulfonyl)-2H-Tetrazolium, Inner Salt (MTS) ile Değerlendirilmesi.....	44
3.2.5. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanseri Hücreleri ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanseri Kök Hücrelerinde FASN Seviyelerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi.....	44
3.2.6. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanseri Hücreleri ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanseri Kök Hücrelerinde p-NFκB ve p-AKT Seviyelerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi	45
3.2.7. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanseri Hücreleri ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanseri Kök Hücrelerinde Apoptoz Oranlarının Flow Sitometri ile Belirlenmesi.....	46
3.2.8. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanseri Hücreleri ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanseri Kök Hücrelerinde Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi.....	47

3.2.9. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF-7, MDA-MB-231 Kanser Hücrelerinde ve MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA-MB-231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanser Kök Hücrelerinde FASN Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	48
3.2.9.1. Ribonükleik Asit (RNA) izolasyonu	48
3.2.9.2. RNA Miktarının Tayin Edilmesi.....	48
3.2.9.3. cDNA Eldesi	49
3.2.9.4. Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi	49
3.3. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	51
4.2. MCF 7, MDA MB 231 Hücrelerinden CD44 ⁺ CD24 ⁻ Meme Kanser Kök Hücrelerinin Manyetik ile Aktive Edilmiş Hücre Ayrımı (MACS) Yöntemi ile İzolasyon Sonuçları	52
4.3. Hücre Canlılığının Tetrazolium Compound, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2 Yl)-5- (3-Carboxymethyl Phenyl)-2-(4-Sulfonyl)-2H-Tetrazolium, Inner Salt (MTS) ile Değerlendirilmesi	52
4.4. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanser Hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanser Kök Hücrelerinde Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi..	53
4.5. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Kanser Hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanser Kök Hücrelerinde FASN Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	56
4.6. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF-7, MDA-MB-231 Kanser Hücrelerinde ve MCF-7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA-MB-231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanser Kök Hücrelerinde Apoptoz Oranlarının Flow Sitometri ile Belirlenmesi	58
4.7. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231, MCF 7 CD44 ⁺ CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Hücrelerinde FASN, p-AKT, p-NFκB Seviyelerinin Flow Sitometri Analizi	62
4.7.1. FASN	62
4.7.2. p-AKT.....	66
4.7.3. p-NFκB	69

5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	73
6. KAYNAKÇA	86
EKLER	
ÖZGEÇMİş	



KISALTMALAR ve SİMGELER

μM	:Mikromolar
μL	:Mikrolitre
ABC	:ATP Bağlayıcı Kaset
ACC	:Asetil-CoA Karboksilaz
ACLY	:ATP-Sitrat Liyaz
ACP	:Asil Taşıyıcı Protein
ADP-riboz	:Adenozin Difosfat Riboz
AF	:Amniyotik Sıvı
ALA	:Alfa-Linolenik Asit
ALDH1	:Aldehid Dehidrogenaz 1
AMPK	:AMP-Activated Protein Kinase
ATP	:Adenozin Trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
CD	: Cluster Differentiation
cDNA	:Complementary DNA
Ct	:Cycle Threshold
ÇDYA	:Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
DAG	:Diaçilgliserol
DCIS	:Ductal Karsinoma In Situ
DH	:Dehidraz
DHA	:Dokosaheksaenoik asit
dk	:Dakika
DMEM	:Dulbecco'nun Modifiye Besi Ortamı
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DNL	:De Novo Lipogenez
DPBS	:Dulbecco'nun Fosfatlanmış Tuz Tamponu
EDTA	:Etilendiamin tetra asetik asit
EKH	:Embriyonik Kök Hücre
EMT	:Epitelyal-mezenkimal geçiş
EPA	:Eikosapentaenoik asit

ER	:Östrojen Reseptörü
ENR	:Enoil redüktaz
ESA	:Epitelyal spesifik antijen
FABP5	:Yağ asidi bağlayıcı protein 5
FACS	:Fluorescent-Activated Cell Sorting
FAO	:Yağ asidi oksidasyonunu
FASN	:Yağ asidi sentaz
FBS	:Fetal bovine serum
FITC	:Floresan izotiyosiyanat
GKH	:Glioma kök hücreleri
GLUT1/4	:Glukoz Taşıyıcı Tip 1/4
GPI	:Gliserofosfatidilinositol
HER2	:İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
iPKH	:İndüklenmiş pluripotent kök hücre
IC50	:Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
IDC	:Invaziv Duktal Karsinoma
IL-1	:İnterlökin 1
ILC	:Invaziv Lobüler Karsinom
Ki67	:Yüksek Proliferatif İndeksi
KKH	:Kanser Kök Hücre
KR	:Ketoasil Redüktaz
KS	:Ketoasil sentaz
LA	:Linoleik asit
LCIS	:Lobüler Karsinoma In Situ
LD	:Lipit damlacıkları
LPA	:Lisofatidik asit
MACS	:Magnetic-Activated Cell Sorting
MAT	:Malonil/asetiltransferaz
MCF7	:Michigan Cancer Foundation-7
MCF-10A	:Michigan Cancer Foundation-10A
MDA MB 231	:MD Anderson-Metastatic Breast-231
MKKH	:Meme Kanser Kök Hücre

mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
mRNA	:Mesajcı Ribonükleik Asit
mTORC1	:Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1
MTS	:Tetrazolium Compound, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2Yl)-2-(4 Sulfonyl)-2H-Tetrazolium, Inner Salt
N ₂	: Azot
NADPH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NHEJ	:Homolog olmayan uç birleştirme
NIK	:NF-κB-induced kinase
Nrf2	:Nükleer faktör benzeri 2 transkripsiyon faktörü
Nf-κB	:Nükleer Faktör Kappa-Hafif Zincir Arttırıcısı
OA-519	:Onkojenik antijen-519
OXPHOS	:Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon
p-AKT	:Phosphorylated AKT
PARP1	:Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K	:Fosfoinositid 3-kinaz
PIP3	:Fosfatidilinositol-3,4,5- trisfosfat
PKB	:Akt protein kinaz B
PKH	:Pluripotent Kök Hücre
p-NFκB	: Phosphorylated Nuclear Factor Kappa B
PPAR _γ	:Peroksizom Proliferatörüyle Aktifleşen Reseptör-γ
PR	:Progesteron Reseptörü
p-SREBP-1	:Phosphorylated Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
RNA	:Ribonükleik Asit
Rpm	:Revolutions Per Minute
RPMI-1640	:Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	: Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCD/1	:Stearoyl-CoA Desaturaz/1
S1P	:Sfingozin-1-fosfat
SREBP1c	:Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c

TAG	: Triaçilgliserol
TCA	:Trikarboksilik asit
TE	:Tiyoesteraz
TLR4	:Toll-Benzeri Reseptör 4
TME	:Tümör mikro ortamı
TN	:Triple Negatif
TNFa	:Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UC	:Göbek kordonu
UZÇDYA	:Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asiti
YA	:Yağ asiti
YAO	:Yağ asidi oksidasyonu

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar	37
Tablo 3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler	37
Tablo 3.3. Deney Grupları.....	44



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Kanserin ayırt edici özellikleri.	4
Şekil 2.2.	Meme kanserinin moleküler alt tipleri	6
Şekil 2.3.	Tümör heterojenite modelleri.....	9
Şekil 2.4.	Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	11
Şekil 2.5.	Meme kanseri kök hücre belirteçleri.....	15
Şekil 2.6.	De novo lipogenez.....	19
Şekil 2.7.	FASN'nin yapısal organizasyonu	20
Şekil 2.8.	Kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinde metabolik adaptasyon..	24
Şekil 2.9.	Meme Kanseri Hücrelerinde De Novo Lipogenez ve DHA'nın Metabolik Yollara Etkisi.....	36
Şekil 3.1.	Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerin şematik gösterimi.....	40
Şekil 4.1.	MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücre hatları ve.....	51
Şekil 4.2.	MCF 7, MDA MB 231 hücre hatlarından izole edilen CD44 ⁺ /CD24 ⁻ meme kanser kök hücre oranları. MCF 7, MDA MB 231, parental kanser hücre popülasyonlarından sırasıyla %4, %6 oranında CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH elde edildi.....	52
Şekil 4.3.	MCF 7 ve MDA MB 231 hücre hatlarında DHA için belirlenen IC50 konsantrasyonu grafikleri. MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde GraphPad Prism 9.0.0 istatistiksel yazılımı kullanılarak DHA için IC50 konsantrasyonu sırasıyla 138.5 µM ve 305.7 µM olarak belirlendi.....	53
Şekil 4.4.	DHA ile muamele edilen ve edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde oluşan kolonilerin görüntüleri.....	54
Şekil 4.5.	DHA ile muamele edilen ve edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde oluşan koloni sayılarının istatistiksel analizi.	55
Şekil 4.6.	MCF 7 parental kanser hücresinde, MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'de; MDA MB 231 parental kanser hücresi ve MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'de FASN geni relatif ekspresyon seviyeleri.	57
Şekil 4.7.	MCF 7 parental kanser hücresinde, MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'de;.....	58

Şekil 4.8.	DHA ile muamele edilen MCF 7	59
Şekil 4.9.	DHA ile muamele edilen MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	60
Şekil 4.10.	DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	61
Şekil 4.11.	DHA ile muamele edilen MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi..	62
Şekil 4.12.	MCF7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında FASN seviyelerinin flow sitometri ve istatistiksel analizi.....	63
Şekil 4.13.	DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	64
Şekil 4.14.	DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	65
Şekil 4.15.	DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	67
Şekil 4.16.	DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-AKT oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	68
Şekil 4.17.	DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-AKT oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (.....	69
Şekil 4.18.	DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.	70

- Şekil 4.19.** DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. 71
- Şekil 4.20.** DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi.. 72



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türlerinden biridir ve klinik tedavi yaklaşımlarına rağmen yüksek mortalite oranlarına neden olmaktadır (Misganaw ve ark., 2023). Konvansiyonel tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, bu hastalıkla ilişkili yüksek mortalite oranları, meme kanserinin biyolojik karmaşıklığını ve tedaviye dirençli alt grupların varlığını ortaya koymaktadır. Bu alt gruplardan biri olan meme kanseri kök hücreleri (MKKH'ler), kanserin tekrar nüks etme ve metastaz yapma potansiyeline sahip hücreler olarak kabul edilmektedir (Zhang ve ark., 2020). MKKH'lerin bu özellikleri, geleneksel tedavi yaklaşımlarına karşı dirençli olmalarından kaynaklanmaktadır (Zhang ve ark., 2023). Bu nedenle, MKKH'lerin biyolojisini anlamak ve bu hücreleri hedefleyen yeni tedavi stratejileri geliştirmek, meme kanserinin başarılı bir şekilde tedavi edilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

Meme kanser kök hücrelerinin metabolik özellikleri, bu hücrelerin kanserin ilerlemesi üzerindeki rollerini anlamak açısından kilit bir unsurdur. Kanser kök hücreleri, artan enerji ve biyosentetik gereksinimlerini karşılamak için metabolik yollarını yeniden programlayarak kendilerine avantaj sağlarlar (Chae ve ark., 2018; Röhrig ve Schulze, 2016). Bu yeniden programlama sürecinde de novo lipogenez (DNL), kanser hücrelerinin enerji ve yapı taşları üretmek için önemli bir metabolik süreçtir (Kinlaw ve ark., 2016). Bu süreç, glukoz veya glutamin metabolizması yoluyla elde edilen piruvatın mitokondride asetil-CoA'ya dönüştürülmesi ve sitrata çevrilmesiyle başlamaktadır. Bu süreçte yağ asidi sentaz (FASN), malonil-CoA'yı palmitata dönüştürür ve kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu lipidleri sağlayarak DNL'de merkezi bir rol oynar. (Wang ve ark., 2022a). Ayrıca, Akt/NFκB yolları aracılığıyla SREBP'nin aktivasyonu, lipogenezin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Leavens ve ark., 2009; Ricoult ve ark., 2016). Bu süreçler, kanserin

ilerlemesi ve tedaviye direnç mekanizmalarının oluşmasında önemli bir yer tutmaktadır. Ancak, FASN'nin MKKH'lerdeki spesifik rolü ve bu proteinin inhibisyonunun kanser tedavisine etkileri konusundaki bilgiler halen sınırlıdır. Dokosaheksaenoik asit, uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinden biri olup, anti-inflamatuar ve anti-kanserojenik özellikleri ile bilinmektedir (Kang ve Liu, 2013). DHA'nın, çeşitli kanser türlerinde etkileri araştırılmış olsa da MKKH'ler ve FASN üzerindeki spesifik etkileri tam olarak araştırılmamıştır. DHA'nın, özellikle MKKH'lerdeki lipid metabolizmasını nasıl etkilediği, bu hücrelerin tedaviye yanıtı ve potansiyel olarak terapötik hedefler üzerindeki rolü hakkında literatürde yeterli veri bulunmamaktadır.

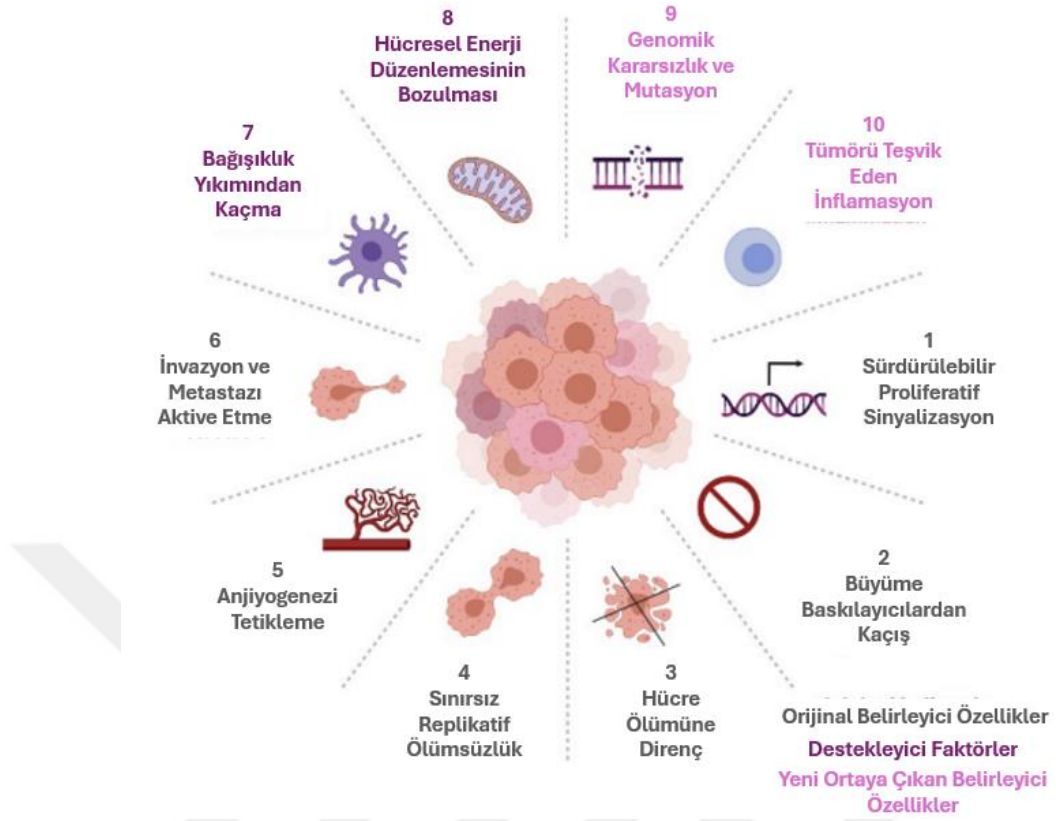
Bu çalışma, farklı alt tipteki meme kanserlerinde özellikle parental kanser hücrelerine kıyasla MKKH'lerdeki FASN'nin rolünü ve DHA'nın bu süreçler üzerindeki modülatör etkilerini inceleyerek, literatürdeki bu önemli boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır. Özellikle FASN'nin inhibisyonu yoluyla MKKH'lerin tedaviye yanıtının artırılabilmesi ve DHA'nın bu süreçte potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği hipotezi üzerinde durulmaktadır. Bu amaçla meme kanseri Luminal A alt tipini temsil eden MCF 7 ve TN meme kanseri alt tipini temsil eden MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve her iki parental kanser hücresinden MACS yöntemi ile CD44⁺ ve CD24⁻ belirteçlerine göre MKKH'ler izole edilmiştir. İzole edilen MKKH'lere ve parental kanser hücrelerine IC50 konsantrasyonunda DHA uygulanmıştır. Ardından DHA uygulanan ve uygulanmayan deney gruplarında hücrelerin klonojenik kapasitesi; FASN, p-AKT, p-NFκB, apoptoz oranları flow sitometri ile FASN gen ekspresyonu Rt-qPCR yöntemi belirlenmiştir.

Bu tez çalışması ile MKKH'lerin metabolik yeniden programlamasında FASN'nin ve DHA'nın rolüne yönelik yeni bulgular elde edilmesi, meme kanseri tedavisinde yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, anormal hücre büyümesi ve proliferatif modeller ile karakterize edilen bir hastalık grubunu kapsamaktadır. Bu anormal hücreler geliştikçe, sürekli proliferatif sinyallemeyi ve büyümeyi baskılayan faktörlerden kaçmayı mümkün kılan genetik mutasyonlar geçirmektedirler (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bununla birlikte kanser genellikle hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğraması ve işlevsiz hale gelmesiyle başlamaktadır. Mutasyona uğradığında onkogenler aktive olur ve hücrelere kontrolsüz hücre büyümesini tetikleme yeteneği kazandırmaktadır (Croce, 2008). Bunun aksine, tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar normal hücrelerin hücre büyümesini düzenlemek için gereken Deoksiribonükleik asit (DNA) onarımını yapamayacak hale gelmesine neden olabilmektedir (Macleod, 2000). Onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunun aynı anda meydana gelmesi tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Wang ve Wong, 1997). Kanser, bir hücrenin kötü huylu bir duruma dönüşmesiyle ortaya çıkar ve Hanahan ve Weinberg tarafından 2000 yılında tanımlanan bu süreçler "Kanserin Belirleyici Özellikleri" olarak karakterize edilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kanserin ayırt edici özellikleri Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Kanserın ayırt edici özellikleri (Berger, 2021’den düzenlenmiştir). Altı orijinal belirleyici özellik şunları içermektedir: (1) hücrelerin büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterli hale gelmesi ve sürekli proliferasyona yol açması, (2) büyüme-inhibisyon sinyallerine duyarlılığın kaybı, (3) apoptoz direnci, (4) sınırsız replikasyon, (5) tümöre yeni kan damarları sağlayan anjiyogenezi ve (6) tümörün çevre dokulara invazyonuyla aktivasyon ve metastaz. İltihaplanma ve kanser arasındaki yeni kanıtların ortaya çıkmasıyla, ek belirleyici özelliklerin eklenmesi gerektiği açık hale gelmektedir. Bunlar: (7) bağışıklık gözetiminden kaçma ve yok olma, (8) hücresel metabolizmanın yeniden programlanması, kanser hücrelerinin çevresindeki mikroçevreye tümör progresyonunu tetikleyen çeşitli büyüme sinyalleri sağlaması sonucu oluşmaktadır. Ayrıca, (9) genomik kararsızlık ve mutasyonlar ile (10) tümör-promoter iltihaplanma da eklenmiştir. Bunlar, listedeki tüm belirleyici özelliklerin kazanılmasına yol açan, sözde etkinleştirici özelliklerdir.

Kanser genel olarak benzedikleri ve dolayısıyla türedikleri hücre tipine göre sınıflandırılmaktadır. Örneğin; epitelyal hücre kökenli kanserler karsinomları, bağ dokusu kökenli kanserler sarkomları, hematopoetik kökenliler lenfoma veya lösemi, germ hattı hücreleri germ hattı tümörlerini ve embriyonik hücreler blastomaları oluşturmaktadır (Golub ve ark., 1999). İyi huylu tümörler kaynak doku içinde kalan ve genellikle yaşamı tehdit etmeyen tümörler iken kötü huylu tümörler

yaşamı tehdit ederek çevredeki dokuları invaze edebilir ve primer tümörden ayrılarak vücudun uzak bölgelerine hareket edebilmektedir (Croce, 2008).

Günümüzde kanser dünya çapında giderek daha önemli bir erken ölüm nedeni haline gelmektedir (Frick ve ark., 2023). 2022 yılında dünya çapında 20 milyon yeni kanser vakası teşhis edilmiş ve yaklaşık 9.7 milyonunun ölüm ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (Bray ve ark., 2024). Kanser çeşitleri arasında en sık teşhis edilen kanser türü meme kanseri iken bunu akciğer, prostat, kolon ve mide kanseri takip etmektedir. Akciğer kanseri erkeklerde, meme kanseri ise kadınlar da en sık görülen kanser türü olmakla birlikte meme kanseri kadınlarda ölümlerin önde gelen bir nedenidir (Sung ve ark., 2021). Kanser bu artan boyutu, aileler, topluluklar ve sağlık sistemleri üzerinde büyük fiziksel, duygusal ve mali baskılar yaratarak dünya genelinde önemli bir sağlık ve ekonomik yük oluşturmaktadır (Carrera ve ark., 2018). Düşük ve orta gelirli ülkeler bu yükü yönetmekte zorlanmakta, bu da birçok hastanın zamanında ve etkili tedaviye ulaşmamasına neden olmaktadır. Nüfus artışı ve yaşlanmanın yanı sıra toplumsal, ekonomik ve yaşam tarzı değişiklikleri de önümüzdeki yıllarda kanserin yaygınlığını ve profilini daha da artıracaktır (Thun ve ark., 2010).

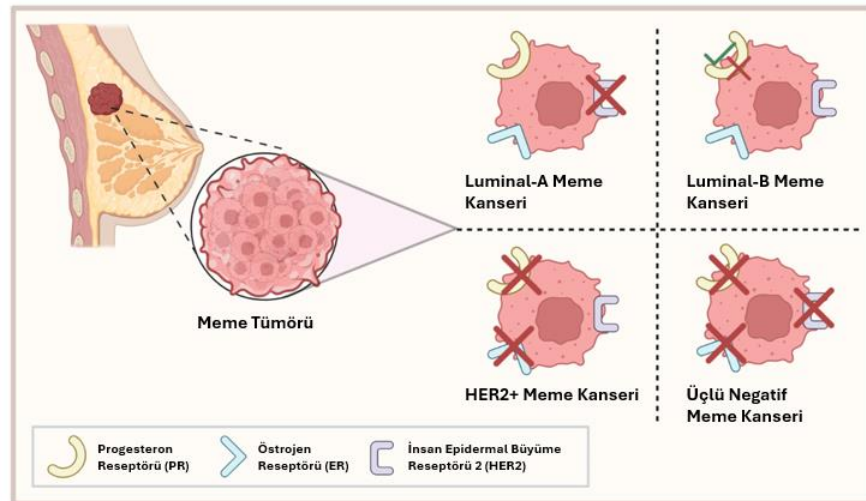
2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, yüksek mortalite ve morbidite oranı nedeniyle kadınlar arasında önde gelen bir sağlık sorunudur (Misganaw ve ark., 2023). 2022 verilerine göre tahmini 2,3 milyon vakayla dünyada en sık teşhis edilen ikinci kanser olmakla birlikte kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Bray ve ark., 2024). Büyüme ve ilerleme için kadın cinsiyet hormonlarına bağımlı olması nedeniyle meme kanseri çoğunlukla kadınlarda teşhis edilir ancak erkeklerde de görülebilmekte ve erkeklerde görülen meme kanseri oranı tüm meme kanserlerinin yüzde birinden azını oluşturmaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

Meme kanserleri histolojik sınıflandırmaya göre genelde invaziv olan ve invaziv olmayan meme karsinomu olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. İnvaziv olmayan meme kanserleri duktal karsinoma in situ (DCIS: Ductal Carcinoma In Situ) veya lobüler karsinoma in situ (LCIS) olarak bilinmekle birlikte DCIS en yaygın olanıdır (Chan ve ark., 2010; Makki, 2015). Duktal karsinoma in situ, duktal hücre

yüzeyindeki epitelyal hücrelerden oluşur ve premalign olarak tanımlanmaktadır (Sharma ve ark., 2010). Duktal karsinoma in situ sınıflandırmaya göre farklı prognozlara sahip düşük, orta ve yüksek dereceli olarak 3 ayrı kategoriye ayrılmaktadır (Hüsemann ve ark., 2008). İnvaziv olmayan DCIS hayatı tehdit edici değildir ancak yüksek dereceli DCIS, daha invaziv kanser tanısı örnekleriyle ilişkilidir ve öncü lezyon olarak sınıflandırılmaktadır (Chan ve ark., 2010). Meme dokusunun epitelyal bölümlerinden stromaya yayılan tümörler histopatolojik analizlerle invaziv karsinom olarak sınıflandırılmakla birlikte meme kanseri vakalarının yarısından fazlası, invaziv duktal (IDC) veya invaziv lobüler karsinomlardır (ILC) (Makki, 2015).

Meme kanseri tümörleri arasındaki histopatolojik ayrıma ek olarak, meme kanseri hücrelerinin moleküler sınıflandırması, tümör büyümesine ve gelişimine neden olan hücreler hakkında daha fazla bilgi sağlamaktadır. Moleküler sınıflandırmaya göre meme kanserinin dört ana moleküler alt tipi; Luminal A, Luminal B, HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) ile zenginleştirilmiş ve bazal benzeri veya üçlü negatif (Triple Negative; TN) meme kanseridir (Network CGA, 2012). Meme kanserinin dört ana moleküler alt tipi Şekil 2.2’de gösterilmektedir. Bu sınıflandırma sisteminin temeli, hormonal reseptörlerin hücre yüzeyindeki ekspresyonuna ve hücrenin içsel çoğalma durumuna bağlıdır.



Şekil 2.2. Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Kirkby ve ark., 2023’ten düzenlenmiştir). Meme kanseri moleküler sınıflandırmaya göre; Luminal A, Luminal B, HER2+ ve üçlü negatif meme kanseri olarak sınıflandırılmaktadır.

Luminal A meme kanseri hücreleri, östrojen ve progesteron reseptörlerini (ER ve PR) eksprese eden farklı bir fenotipe sahiptir ve HER2'den yoksundur (Holliday ve Speirs, 2011). Östrojen ve PR hormonlarına ek olarak yüksek proliferatif indeksi (Ki67) olan ve/veya HER2 eksprese eden meme kanseri hücreleri Luminal B alt tipi olarak sınıflandırılmaktadır (Cheang ve ark., 2009). Hem Luminal A hem de B alt tipleri ER pozitif (ER+) olduğundan, hormon tedavisi özellikle adjuvan ortamda hastaların tedavisinde oldukça etkili olmakla birlikte daha iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Holliday ve Speirs, 2011; Tran ve ark., 2011; Zardavas ve ark., 2015). İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ile zenginleştirilmiş meme kanseri alt tipinde ise artan proliferasyonla birlikte, hücreler metastaz yapma ve çevre dokulara daha kolay yayılma eğilimi göstererek luminal meme kanserlerine göre hasta prognozunun daha kötü olması ile birlikte hem ER hem de PR ifadesinin bulunmaması, bu hücrelerin hedeflenen hormon tedavisine yanıt vermemesine neden olmaktadır (Holliday ve Speirs, 2011).

Tedavi edilmesi en zor ve en agresif meme kanseri alt tipi, yukarıda bahsedilen meme kanseri alt tiplerinde bulunan hücre yüzeyi reseptörlerinden yoksun olan TN meme kanseri alt tipidir (Shao ve ark., 2017). Üçlü negatif meme kanseri hastaları metastaza oldukça yatkındır ve bu da kötü prognozla sonuçlanmaktadır (Anders ve Carey, 2008). Bazı TN meme kanserleri başlangıçta geleneksel kemoterapiye yanıt vermesine rağmen, TN meme kanserinin ayırt edici özelliği ilk teşhisten sonraki 3 yıl içinde uzak nüks olasılığının yüksek olmasıdır (Collignon ve ark., 2016). Östrojen reseptörü, PR veya HER2'yi hedef alan endokrin tedavi stratejileri TN alt tipi üzerinde etkisiz olduğundan proliferasyon, büyüme ve migrasyonda rol oynayan yollar potansiyel hedefler olarak araştırılmaya devam edilmektedir (Christensen ve ark., 2017).

Meme kanserinin tedavisinde ilerleme kaydedilmiş olsa da hâlâ bu hastalıktan ölen çok sayıda kadın vardır. Bu kısmen tanı aşamasından ve aynı zamanda meme kanseri alt tipinden kaynaklanmaktadır. Farklı alt tiplere yönelik tedavi seçeneklerinin etkinliği büyük ölçüde farklılık göstermektedir ve bu nedenle tüm alt tipler için optimal tedavilerin planlanması önemlidir. Meme kanseri klinik, histolojik ve genetik olarak heterojen bir hastalık olması dolayısıyla bu heterojenitenin aydınlatılması,

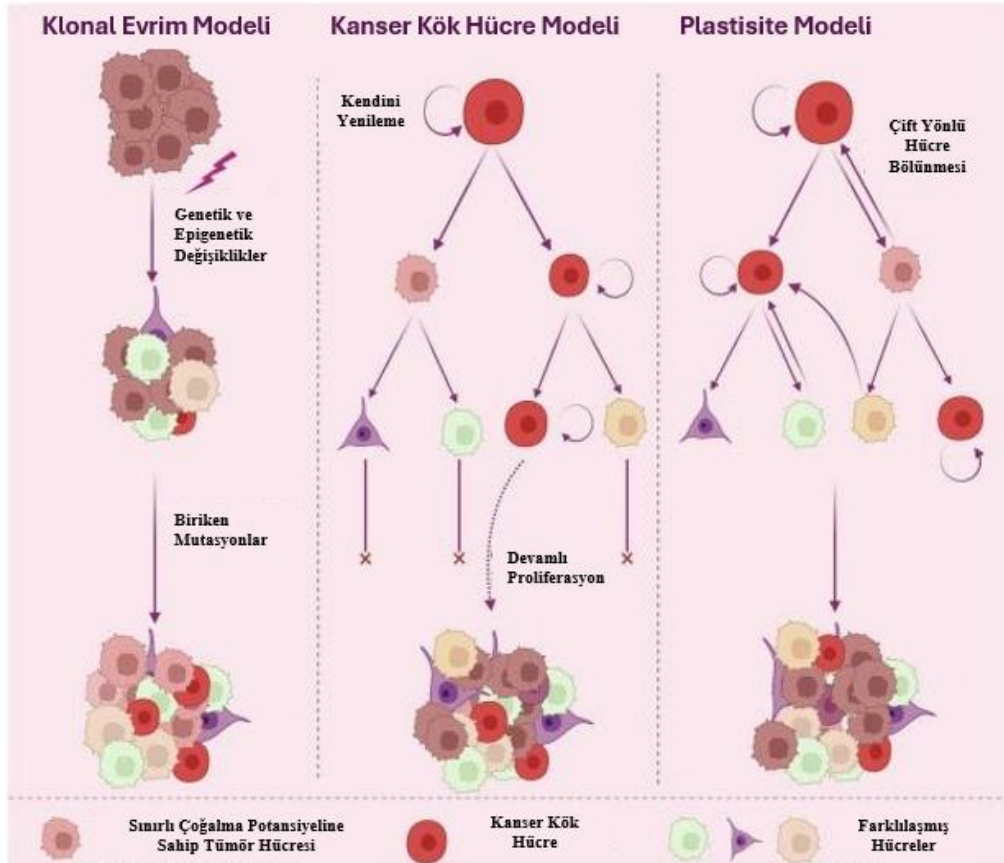
hastalığın prognozu ve gelişimini doğru bir şekilde tahmin etmek ve tedavi planlarını belirlemek için önemlidir.

2.2.1. Meme Kanseri Heterojenite

Meme tümörlerini sınıflandırmaya yönelik girişimler, hastalığın heterojen doğası nedeniyle duraksamaktadır. Meme kanseri meme epitel hücrelerindeki çeşitli farklı genetik değişikliklerin neden olabileceği, hastalarda bireysel olarak farklı belirtilere yol açabilen oldukça heterojen bir hastalıktır (Lüönd ve ark., 2021). Tümörler arası heterojenliği oluşturan hastadan hastaya oluşan farklılıklar, hastalığın prognozunu ve tedavi seçeneklerini büyük ölçüde etkilemektedir (Ellis ve Perou, 2013). Kanser hastaları arasında olduğu kadar tümör içinde de yüksek derecede çeşitlilik vardır ve tüm bu faktörler agresiflik, prognoz ve terapötik yanıtta farklılıklara katkıda bulunarak tedaviyi karmaşık hale getirmektedir (Martelotto ve ark, 2014). Tek bir tümör kitlesi içinde heterojen bir tümör hücresi havuzu bulunması tümör içi heterojeniteyi temsil etmektedir ve tümör içinde veya bir tümör ile metastatik tümör arasındaki farklı kanser hücresi alt popülasyonlarının varlığı olarak tanımlanmaktadır (Ellsworth ve ark., 2017). Bu hücreler genetik ve morfolojik çeşitlilik göstererek farklı boyutlarda olabilir, farklı oranlarda çoğalabilir, farklı metastaz yeteneklerine sahip olabilir ve ilaca duyarlılıkları farklılık gösterebilmektedir (Turashvili ve Brogi, 2017).

Tümör içi heterojenliğin geliştiği mekanizmalar üç farklı teoriyle açıklanmaktadır: kanser kök hücre (KKH) hipotezi, klonal evrim modeli ve plastisite modeli Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Warrier ve ark., 2023). Bunlardan ilk olarak öne sürülen model olan klonal evrim teorisi, Peter Nowell tarafından yaklaşık kırk yıl önce ortaya atılarak kanserin, çoğu neoplazmin tek bir köken hücresinden kaynaklandığı ve tümör ilerlemesinin, daha agresif alt klonların sıralı seçimine izin veren orijinal klon içindeki mutasyonların adım adım edinilmesinden kaynaklandığı evrimsel bir süreç olduğunu öne sürmektedir (Nowell, 1976). Diğer bir teori olan KKH teorisi alt klonların tümör oluşturma potansiyeline sahip olduğu klonal evrimden farklı olarak, tümörün yalnızca küçük alt popülasyonlarının (KKH'lerin) kendi kendini yenileme yeteneğine sahip olduğunu ve bir tümöre yol açma potansiyeline sahip olduğunu öne sürer; tümörün geri kalanının fenotipik olarak sınırlı çoğalma ve tümör oluşturma

potansiyeli olan çeşitli hücrelerden oluştuğunu savunmaktadır (Cabrera ve ark., 2015). Plastisite modeli ise tümör hiyerarşisinin dinamik olduğunu bu nedenle kanser hücrelerinin içsel ve dışsal uyaranlara bağlı olarak kök hücre olan ve olmayan durumlar arasında geçiş yapabileceğini ve böylece heterojen tümör popülasyonuna yol açabileceğini savunmaktadır (Correnti ve ark., 2022).



Şekil 2.3. Tümör heterojenite modelleri (Warrier ve ark., 2023'ten düzenlenmiştir). Klonal evrim modeli, kanser hücrelerinin zamanla genetik değişiklikler geçirdiğini ve bu değişiklikler sonucunda farklı klonlar oluşturduğunu öne sürmektedir. Kanser kök hücre modeli, tümörlerin belirli bir alt popülasyonunun, kök hücre benzeri özellikler taşıyan hücreler tarafından yönetildiğini öne süren bir teoridir. Plastisite modeli, kanser hücrelerinin çevresel faktörlere yanıt vererek fenotipik değişiklikler yapabilme yeteneğini vurgular. Bu modelde, KKH'lerin esnekliği ve farklı hücreler arasında geçiş yapabilme yetenekleri ön plana çıkmaktadır.

Tümör içi heterojenitenin ortaya çıkmasını sağlayan modellerin belirlenmesi, KKH'ler ile kök hücrelerin paylaştığı ortak mekanizmaların aydınlığa kavuşturulması hastalığın ilerlemesinin ve tedavi planlamasının daha iyi tahmin edilmesine olanak sağlayabilir.

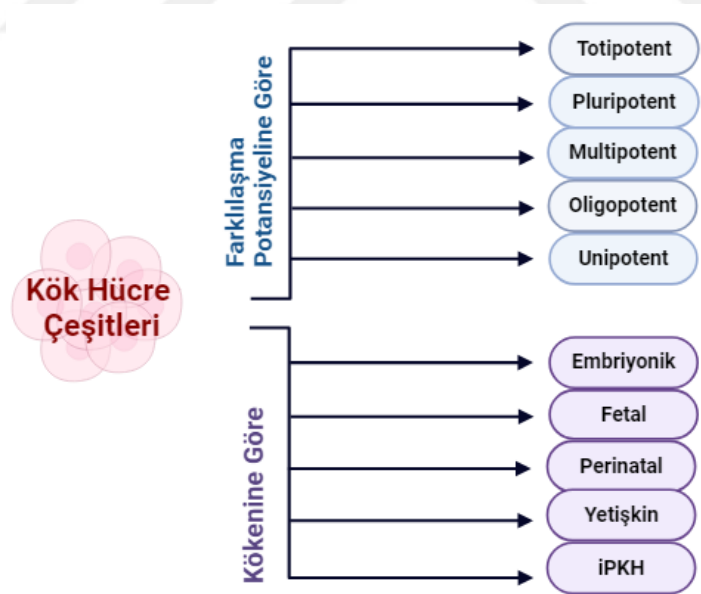
2.3. Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileme kapasitesine sahip, farklılaşmamış hücreler olmakla birlikte çeşitli uyaranlar verildiğinde bu hücreler çok sayıda farklı hücre soyuna farklılaşabilmektedir (Kalra ve Tomar, 2014). Kendini yenileme, kök hücrelerin daha fazla kök hücre oluşturmak için bölündüğü ve kök hücre havuzunun yaşam boyunca devam ettiği süreçtir. Böylece farklılaşmamış durumun sürdürülmesiyle bölünerek kök hücrelerin popülasyonda korunmasını sağlamaktadır (He ve ark., 2009). Farklılaşma; bir kök hücreden daha özel bir hücre oluşturmak, bir organizmanın gelişimi sırasında yeni özel hücreler üretmek ve yetişkinlerde kaybolan hücreleri yenilemek için meydana gelmektedir (Biehl ve Russell., 2009). Kök hücreler simetrik hücre bölünmesini gerçekleştirerek ana hücreyle aynı özellikleri sergileyen yavru kök hücreleri oluştururken asimetrik hücre bölünmesi ile bir kök hücre ve bir progenitör hücre oluşturmaktadır (López-Lázaro, 2015). Böylece, kendini yenilemeyi farklılaşma ile dengeleyerek, asimetrik bölünmeler kök ve progenitör hücre havuzunu korurken, çeşitli fonksiyonel hücrelerin oluşmasına da olanak tanımaktadır (Gómez-López ve ark., 2014).

Kök hücreler gelişim potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılmaktadır (Wagers ve Weissman, 2004). Kök hücrelerin sınıflandırılması Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Totipotent kök hücreler tüm organizmanın hücrelerine bölünebilme ve farklılaşma yeteneğine sahip olmakla birlikte hücrelerin hem embriyo hem de embriyo dışı yapılar oluşturmaya olanak tanımaktadır (Zakrzewski ve ark., 2019). Herhangi bir organizmadaki tüm hücre tiplerini üretme potansiyeline sahip olan hücreler pluripotent kök hücreler (PKH'ler) olarak tanımlanmaktadır ancak PKH'ler plasenta gibi ekstra embriyonik yapıları oluşturmamaktadır (Hanna ve ark., 2010). Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) ve embriyoların epiblast katmanından türetilen uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPKH) buna örnektir. Multipotent ve unipotent kök hücreler ise sınırlı kendini yenileme kapasitesine sahiptirler ve bu hücreler belirli bir doku tipine veya hücre soyuna farklılaşabilmektedir (Kalra ve Tomar., 2014). Multipotent kök hücreler PKH'lere göre daha dar bir farklılaşma yeteneğine sahiptir, ancak spesifik hücre soylarının farklı hücrelerine dönüşebilmektedir (Singh ve ark., 2016). Oligopotent kök hücreler sadece birkaç hücreye farklılaşma yeteneğine sahipken unipotent kök

hücreler, en dar farklılaşma yeteneği ile yalnızca bir hücre tipi oluşturabilmektedir (Casado-Díaz, 2022; Zakrzewski ve ark., 2019).

Kök hücreler kökenlerine göre embriyonik, fetal, perinatal, yetişkin ve iPKH olmak üzere 5 farklı gruba sınıflandırılmaktadır (Barzegar ve ark., 2019). Genellikle EKH olarak adlandırılan kök hücreler, yaklaşık beş günlük gelişimden sonra bir blastosistin iç hücre kütesinde bulunan pluripotent karakterdeki kök hücrelerdir (Shaikh ve ark., 2023). Fetal kök hücreler, fetal dokulardan izole edilen ve vücudun çeşitli organ sistemlerine farklılaşabilen hücre tipleridir (O'Donoghue ve Fisk, 2004). Perinatal (bebek) kök hücreler, doğumda amniyotik sıvı (AF: Amniotic Fluid), göbek kordonları (UC: Umbilical Cord) ve plasenta membranları gibi embriyo dışı yapılardan elde edilen hücrelerdir (Abbaspanah ve ark., 2018). Yetişkin kök hücreler olgun dokuda yerleşik olarak bulunan kök hücreler olarak bilinmekte ve multipotent ya da unipotent özellikte olabilmektedir (Kolios ve Moodley, 2013). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ise spesifik transkripsiyon faktörlerinin indüksiyonu ile farklılaşmış somatik ve germ hücrelerinden yeniden programlanan EKH benzeri hücrelerdir (Ye ve ark., 2013).



Şekil 2.4. Kök hücrelerin sınıflandırılması. Kök hücreler farklılaşma potansiyeline ve kökenine göre ikiye ayrılmaktadır. Farklılaşma potansiyeline göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılırken kökenine göre; embriyonik, fetal, perinatal, yetişkin ve indüklenmiş pluripotent kök hücre olarak sınıflandırılmaktadır. iPKH: indüklenmiş pluripotent kök hücre.

Kanserin hiyerarşik hücresel organizasyonu içinde kanser gelişimini, sürdürülmesini ve organizasyonunu kanser hücrelerinin bir alt kümesi tarafından yönlendirilen kök benzeri özellikler gösteren, normal doku hiyerarşilerinde kök hücrelerin rolünü taklit eden bir kanser hücresi popülasyonunun bulunduğu savunulmaktadır (Reya ve ark., 2001; Dick, 2003). Bu nedenle KKH'nin biyolojik özelliklerinin, normal doku kök hücreleriyle yani normal dokuların gelişiminden ve korunmasından sorumlu hücrelerle benzerliğine dayanmaktadır.

2.3.1. Kanser Kök Hücresi

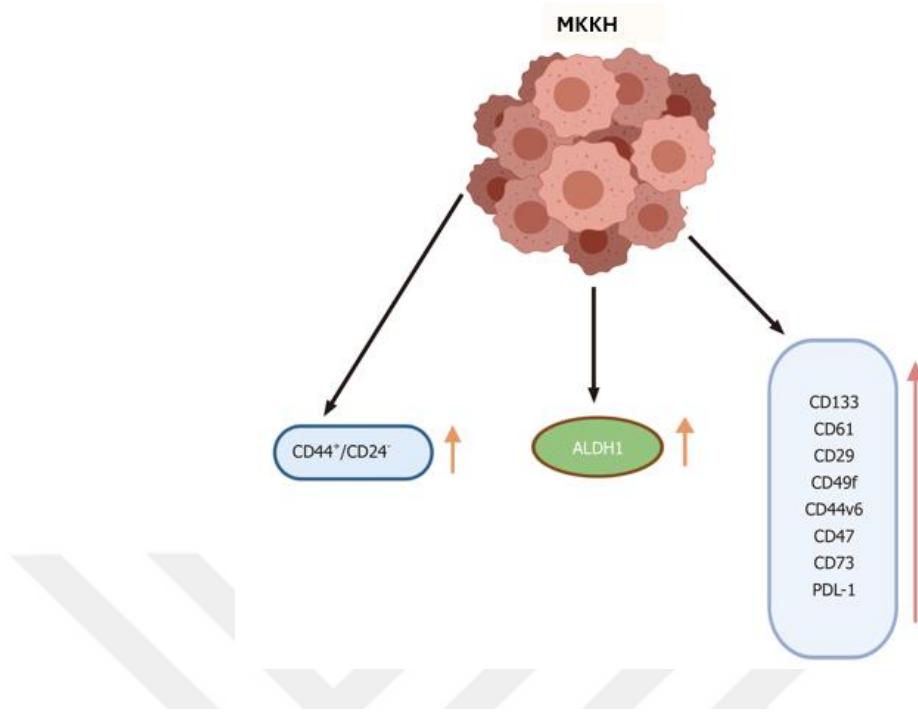
Kanser kök hücreler kendini yenileme, farklılaşma ve kanserdeki farklı hücre tiplerine yol açma yetenekleri de dahil olmak üzere çeşitli kök hücre özelliklerini gösteren tümörlerin içindeki küçük bir hücre alt kümesini temsil etmektedir (Visvader ve Lindeman, 2008). Kanser kök hücreler asimetrik hücre bölünmesiyle daha fazla kök hücre ile birlikte farklılaşan hücreler üretir ve böylece kök hücre kimliğini korurken diğer taraftan hücre bölünmesi ve mitotik sonrası farklılaşmaya maruz kalmaktadır (Yu ve ark., 2012a). Bu hücreler, normal kendini yenileme sürecini düzenleyen genlerin ve sinyal yollarının bozulmasıyla düzensiz kendini yenileme mekanizmaları sergiler, böylece tümör içindeki hücrelerin çoğalmasını sağlamaktadır (Borah ve ark., 2015; Jordan ve ark., 2006). Bununla birlikte KKH'ler genetik mutasyonlar kazanarak, çoklu ilaca dirençli ATP (adenozin trifosfat) bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerini eksprese ederek pro-apoptotik ve anti-apoptotik sinyaller arasındaki dengeyi bozar. Aynı zamanda güçlü DNA tamir mekanizmalarına sahip olmaları nedeniyle hücre ölümü mekanizmalarına direnç göstermektedir (Castelli ve ark., 2021). Kanser kök hücrelerin bir diğer özelliği minimum bazal metabolik aktivite ile karakterize edilen, uygun koşullar sağlanana kadar bölünmeyi durdurup uyku halinde kalmalarıdır. Geleneksel kemoterapiler çoğunlukla çoğalan kanser hücrelerini hedeflerken, hareketsiz durum KKH'lerin kemoterapötik ilaçların veya radyasyonun genotoksik etkilerinden kaçmasını sağlayarak tümörün tekrarlamasına veya metastaza neden olmaktadır (Chen ve ark., 2021).

Kanser kök hücre modeli, KKH'lerin tümörün başlatılmasından, metastatik yayılmadan ve tedavi direncinden nihai olarak sorumlu olan farklı bir tümör hücresi

popülasyonunu temsil ettiğini ileri sürmektedir (Dontu, 2008). Kanser kök hücre modelinin uygulanabilirliği ilk olarak, lösemi başlatan hücrelerin normal bir kök hücreden beklenen farklılaşma, çoğalma ve kendini yenileme kapasitelerine sahip olduğunun gösterildiği akut miyeloid lösemi modelinde gösterilmiştir (Lapidot ve ark., 1994). Solid tümörlerde KKH'lerin ilk tanımlanması, 2003 yılında CD44 (Cluster Differentiation) ve CD24 belirteçleri kullanılarak meme kanserinde Al-Hajj ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Al-Hajj ve ark., 2003). İlerleyen zamanlarda ise beyin, kolon, pankreas, akciğer, karaciğer, prostat ve birçok kanser türünde farklı yüzey belirteçleri ile de kanser kök hücreler tanımlanmıştır (Baccelli ve Trumpp, 2012). CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, epitelyal spesifik antijen (ESA) ve aldehit dehidrojenaz1 (ALDH1) gibi hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonu, farklı tümörlerden KKH'leri izole etmek için kullanılmıştır (Akbarzadeh ve ark., 2019; Al-Hajj ve ark., 2003; Ginestier ve ark., 2007; Singh ve ark., 2003).

Kanser kök hücreler hücre yüzeyi belirteçlerinin yüksek ekspresyonuna veya KKH'lerin işlevsel yönlerine bağlı olan farklı yöntemler ile tanımlanabilmekte ve izole edilebilmektedir (Tsochantaridis ve ark., 2023). Kanser kök hücrelerin tanımlanması ve izole edilmesi için uygun KKH yüzey belirteçleri ile floresansla aktifleşen hücre ayrımı (FACS) veya manyetik aktifleşen hücre ayrımı (MACS) yöntemleri potansiyel KKH'leri izole etmek için kullanılan en yaygın yöntemlerdir (Ghanbari ve ark., 2016). Floresansla aktifleşen hücre ayrımı, seçilen yüzey proteinlerini veya hücre içi belirteçleri doğrudan veya dolaylı boyama yoluyla hedef alan floresan etiketli antikolar kullanarak hücreleri ayırabilen bir hücre izolasyon yöntemidir (Akbarzadeh ve ark., 2019). Manyetik aktifleşen hücre ayrımı ise hedef hücrelerdeki spesifik proteinleri bağlamak için manyetik boncuklara konjuge edilmiş antikoların kullanımına dayalı bir izolasyon yöntemidir (Hu ve ark., 2016). Yaygın olarak kullanılan diğer yöntemler ise; ABC taşıyıcılarının yüksek ekspresyonuna, yüksek ALDH1 ekspresyonuna, KKH'lerin kendi kendini yenilemesi ve çoğalması dahil olmak üzere KKH'lerin kendine özgü özelliklerine dayanarak Hoechst 33342 ile yan popülasyon hücre izolasyonuna, ALDEFLUOR yöntemine ve sferoid oluşumuna dayanmaktadır (Akbarzadeh ve ark., 2019). Bu yöntemler, KKH'leri kanser hücre hatlarından ve meme kanseri de dahil olmak üzere farklı tümör dokularından izole etmek için yaygın olarak uygulanmıştır.

Memedeki birçok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyelini koruyarak tümör heterojenliğini sürdürebilen KKH'ler meme kanseri kök hücreleri (MKKH) olarak adlandırılmaktadır (Shah ve Allegrucci, 2012). Heterojen bir hastalık olan meme kanserinin farklı alt tiplerinde farklı tedavi yanıtlarına ve hastalığa özgü sonuçlara neden olan çeşitli MKKH alt tipleri ve oranları taşıdığı tümör dokularında, hayvan modellerinde ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Bugüne kadar MKKH fenotiplerinin tanımlanması için en yaygın kullanılan biyobelirteçler CD24, CD44 ve ALDH1'dir ancak KKH yüzey belirteçlerinin ekspresyonu meme kanseri tümör alt tipine göre değişkenlik gösterebilmektedir (de Beça ve ark., 2012). Meme kanserinde yaygın olarak kullanılan KKH belirteçleri Şekil 2.5'te gösterilmiştir. CD44, hücre-hücre etkileşimlerinde, hücre adhezyonunda, migrasyonunda ve metastazında iyi tanımlanmış rollere sahip bir hücre yüzeyi glikoproteinidir (Basakran, 2015). CD24 P-selektin'e bağlanan glikosilasyon bölgelerine sahip, gliserofosfatidilinositol'e (GPI) bağlı küçük bir membran glikoproteindir ve CD24 ekspresyonunun meme kanserinde prognoz için aday bir belirteç olduğu da öne sürülmektedir (Pirruccello ve LeBien, 1986; Kristiansen ve ark., 2003). Bununla birlikte CD44+/CD24- hücreleri meme kanseri kök/progenitör hücre özellikleriyle ilişkilendirilmektedir (Lü ve ark., 2011). Aldehid Dehidrogenaz ise normal kök hücre fonksiyonunun korunmasında rol oynamaktadır (Marcato ve ark., 2011).



Şekil 2.5. Meme kanseri kök hücre belirteçleri (Khan ve ark., 2021'den düzenlenmiştir). Meme kanseri kök hücreleri, çeşitli hücre yüzeyi belirteçlerinin artan veya değiştirilmiş ekspresyonuna dayanarak kanserden ve normal hücrelerden ayırt edilebilir. Bu proteinler, MKKH'lerin gelişmesinden ve hayatta kalmasından sorumlu olan çeşitli işlevlere sahiptir ve kanser kök hücrelerini tümörün büyük kısmından izole etmek için kullanılabilir.

Meme kanseri kök hücreleri nüks, metastaz, anjiyogenez ve terapötik direnç dahil olmak üzere kanserin davranışlarıyla ilişkilendirilmektedir (Zhang ve ark., 2020). Tümör ilerledikçe, MKKH'lerin invazyon ve çoğalmayı sürdürmek için durum değiştirmesi MKKH'lerde epitelyal veya mezenkimal durum arasındaki plastisitenin sabit bir durumdan ziyade geçici bir davranış olduğunu göstermektedir (Kong ve ark., 2020). Bu hücrelerin sergilediği plastisitenin, KKH özelliklerine katkıda bulunan birincil faktörlerden biri olduğuna inanılmaktadır (Warrier ve ark., 2023). Bununla birlikte KKH'lerin farklılaşmış tümör hücrelerinden farklı bir metabolik fenotipe sahip olduğu ve bu spesifik metabolik aktivitelerin doğrudan KKH dönüşüm sürecine katıldığı veya tümörün ilerlemesini sağlayan biyolojik süreçleri desteklediği bilinmektedir (Chae ve ark., 2018).

Mevcut meme kanseri tedavileri ile primer tümörlerin ortadan kaldırılmasında ve hayatta kalma süresinin uzatılmasında önemli ölçüde ilerleme kaydedilse de MKKH'leri etkili bir şekilde ortadan kaldırmak zordur (Zhang ve ark., 2023). Bu

nedenle mevcut kanser araştırmalarında kanser hücresi ve KKH metabolizmasının, KKH'lerin metabolik plastisite mekanizmalarının araştırılması KKH metabolizmasının hedeflenmesi nüks ve metastaz riskini azaltmak için etkili tedavi stratejileri sağlayabilir.

2.4. Kanserde Hücresel Metabolizma

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, hücresel yapı taşları için makromoleküllerin artan sentezini sağlamak için yüksek enerji talebiyle sıkı bir şekilde ilişkili bir süreçtir (Oliveira ve ark., 2021). Kanser hücresi, bozulan hücre içi sinyal yollarının modülasyonunun doğrudan bir sonucu olarak onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları, birden fazla hücre içi sinyal yolunu değiştirebilir ve bunun sonucunda tümör oluşumu sürecini kolaylaştırmak için hücresel metabolizmasını değiştirebilir (Vogelstein ve Kinzler, 2004). Değişen sinyal yolları hücrelerin yalnızca kanser hücresi metabolizmasına uyum sağlamasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bu metabolik değişikliklerin birçoğu malign dönüşüm için de gereklidir (DeBerardinis ve ark., 2008).

Tümör hücreleri, zorlu mikro ortamlara uyum sağlamalarına ve hayatta kalmalarına olanak tanıyan metabolik plastisiteye sahiptirler. Bu nedenle yeterli oksijen seviyelerinin varlığında bile, esas olarak glikolize dayanan artan glikoz alımını desteklemek için metabolik gereksinimlerinde değişiklik gösterirler ve kanser hücresi metabolizmasını mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan (OXPHOS) uzaklaştıran aerobik glikolize doğru yönelten bu yeniden programlama, Warburg etkisi olarak bilinmektedir (Danhier ve ark., 2017). Warburg, kanser hücrelerindeki metabolik modifikasyonların, kanser dönüşümünü başlatan ilk biyokimyasal olay olan mitokondrinin işlevsizliğinden kaynaklandığını öne sürmüştür (Liberti ve Locasale, 2016). Bu değişimi açıklayan teoriler, kanser hücrelerinin yüksek proliferasyon hızını desteklemek ve çevreleriyle rekabet edebilmek için hücresel biyokütleyi artırma ve ATP'yi büyük ölçüde üretme acil ihtiyaçlarından kaynaklanmaktadır (Liberti ve Locasale, 2016). Warburg etkisini bozmanın tümör gelişimini ve kanser hücresi hayatta kalmasını durdurmanın bir yolu olarak araştırılması, bazı pre-klinik başarılar elde edilmesini sağlamıştır (O'Neill ve ark., 2019; Saunier ve ark., 2017). Ancak glikolizin karsinogeneizde önemli bir rol oynadığı yaygın olarak kabul

edilirken, birden fazla hücre içi yolu birbirine bağladığı için mitokondri giderek artan bir şekilde anahtar organel ve tüm aşamalarda önemli bir aracı olarak kabul edilmektedir (Porporato ve ark., 2018). Bu hücre içi yolların eşzamanlı olarak aktif olması, kanser hücrelerindeki metabolik plastisiteyi ve her ikisini de hedeflemenin önemini artırmıştır (Jia ve ark., 2019). Bu nedenle daha karmaşık biyokimyasal ve moleküler analizlerin geliştirilmesi ile birlikte tümörleri karakterize eden genetik bozukluklar ile metabolik yeniden programlama arasındaki çift yönlü ilişki aydınlatılmıştır (Mancini ve ark., 2018). Son on yılda, biyolojik bir örnekteki küçük moleküllerin ayrıntılı profilini çıkarmaya çalışan metabolomik, kanserdeki metabolik heterojeniteyi karakterize etmek için önemli yeni bir araştırma aracı olmuştur (Fan ve ark., 2020). Metabolomik yoluyla ortaya çıkan kanıtlar, düzensiz lipid metabolizması da dahil olmak üzere kanserin ilerlemesinde metabolik yeniden programlamanın önemli bir rol oynadığını ileri sürmektedir (Röhrig ve Schulze, 2016).

2.4.1. Lipit Metabolizması

Glikoz, glutamin ve keton cisimciklerinin ötesinde lipitler, kanser hücrelerinde metabolizması yoğun olarak etkilenen bir besin sınıfını temsil etmektedir (Germain ve ark., 2020). Yaşam için gerekli olan önemli bir besin maddesi olan lipitler, insan vücudunun ihtiyaç duyduğu enerjiyi ve esansiyel yağ asitlerini sağlayan yağlar için genel bir terimdir. Lipitler; yağ asitleri (YA), fosfolipitler, sfingolipitler, trigliseritler, kolesterol ve kolesterol esterleri dahil olmak üzere binlerce farklı molekül türünden oluşmaktadır (DeBose-Boyd, 2017). Lipitler, biyolojik membranların bileşenleridirler, enerji metabolizmasında ve depolanmasında kullanılmakla birlikte sinyal molekülleri olarak önemli rollere sahiptirler (Röhrig ve Schulze, 2016). Lipit metabolizmasındaki değişiklikler, hücresel fonksiyon için kritik olan membran bileşimini ve geçirgenliğini değiştirebilmektedir. Ayrıca hücre büyümesini, proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozu, motiliteyi, inflamasyonu, hayatta kalmayı ve membran homeostazını kontrol eden çeşitli sinyal yollarını düzenlemeye yardımcı olan sinyal molekülleri olarak görev yapabilen birçok biyolojik ara ürün üretmektedir (Fu ve ark., 2020).

Lipit metabolizması, lipit alımını, de novo lipogenezi (DNL), taşınmasını ve bozunmasını içeren karmaşık bir dizi moleküler süreci ifade etmekle birlikte lipit

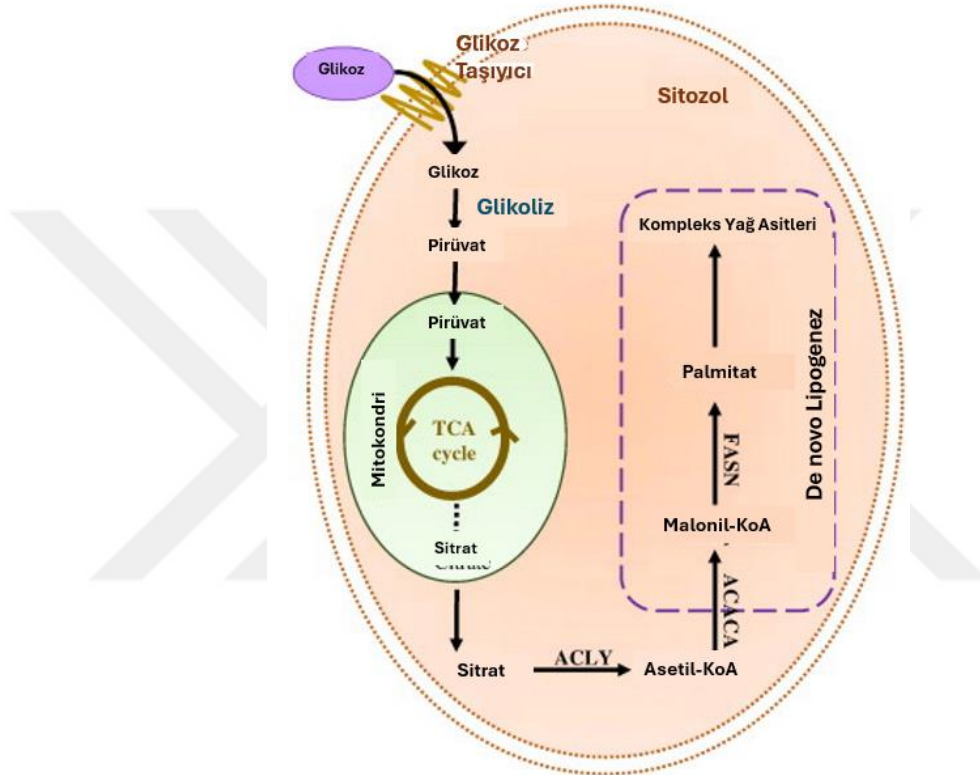
metabolizmasının düzensizliği, membran kompozisyonunu, gen ekspresyonunu, sinyal yolu aktivitesini ve aşağı yöndeki hücre fonksiyonları değiştirebilir ve dolayısıyla çeşitli hastalık süreçlerinin başlatılmasını ve ilerlemesini doğrudan etkileyebilmektedir (Harayama ve Riezman, 2018). Lipit metabolizması, malign fenotipe dönüşen hücrelerde sıklıkla büyük ölçüde değişerek normal hücreler için ana lipit kaynağı, YA'ların ekzojen alımıyken kanser hücreleri, birçok farklı bağlamda gerekli olan yüksek YA talebiyle başa çıkmak için lipojenik yolu aşırı aktive etmektedir (Koundouros ve Poulogiannis, 2020). Tümör hücreleri, enerji üretimi ve lipit birikimi için DNL'yi, YA alımını ve YA oksidasyonunu (YAO) artırabilmektedir (Munir ve ark., 2019). Hızlı hücre büyümesini sürdürmek için kanser hücrelerinin DNL'ye bağımlı hale gelmesi tümörün ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Zaidi ve ark, 2013).

Meme kanseri hücreleri, artan büyüme ve çoğalma gereksinimlerini sürdürebilmek için lipit metabolizmalarını da yeniden düzenlerler ve enerji talebi ile hücre membranı sentezini karşılamak için DNL'yi artırmaktadır (Kinlaw ve ark., 2016). Farklı meme kanseri türlerinde düzensiz lipit metabolizması karakteristiktir. Epitelyal benzeri meme kanseri hücrelerinin DNL'ye daha fazla bağlı olduğu bulunurken, mezenkimal benzeri meme kanseri hücrelerinin daha yüksek triaçilgliserol (TAG) sentez seviyelerine ve lipit damlacıkları (LD) içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir; bu da farklı meme kanseri alt tiplerinde "köklülük" ile ilişkilendirilmektedir (Giudetti ve ark., 2019; Hershey ve ark., 2019).

2.4.1.1. De novo lipogenez

De novo lipogenez (DNL) veya de novo YA sentezi esas olarak karbonhidrat kaynaklarından üretilen piruvatın yağ asitlerine dönüştürüldüğü metabolik bir süreçtir ve bu süreç Şekil 2.6'da gösterilmektedir (Simeone ve ark., 2021). Lipojenik yolla modüle edilen karbonların glikozdan yağ asitlerine dönüşümü, koordineli bir dizi enzimatik reaksiyonu içermektedir. Bu reaksiyon serisinin ilk adımı sitratın, ATP-sitrat liyaz (ACLY) tarafından asetil-CoA'ya dönüştürülmesidir (Ameer ve ark., 2014). Elde edilen asetil-CoA, asetil-CoA karboksilaz (ACC) ile malonil-CoA'ya karboksillenir, yağ asidi sentaz (FASN) daha sonra uzun zincirli yağ asitlerini üretmek için asetil-CoA'dan gelen karbonların ikili olarak eklenmesiyle

malonil-CoA'yı uzatır (Wang ve ark., 2022a). Karbon zincirinin uzatılması ve/veya desatürazlar (örneğin SCD) yoluyla desatürasyonu ile palmitattan çeşitli yağ asitleri üretilir (Collins ve ark., 2011). Yağ asidi sentaz, palmitat sentezinde anahtar hız sınırlayıcı enzim olmakla birlikte DNL'nin ana ürünü palmitat olsa da bir dizi reaksiyonun ardından palmitat daha karmaşık yağ asitlerine dönüştürülmektedir (Alves-Bezerra ve Cohen, 2017; Ameer ve ark., 2014).



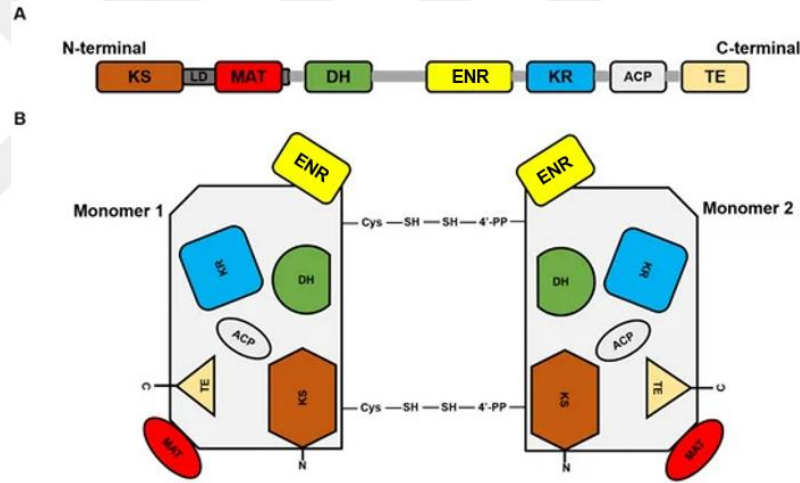
Şekil 2.6. De novo lipogenez (Ameer ve ark., 2014'ten düzenlenmiştir). De novo lipogenez sürecinde şu adımlar gerçekleşir: Glukoz, glikoliz yoluyla piruvata ve ardından mitokondride asetil-CoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA, sitrat olarak sitoplazmaya taşınır ve burada yeniden asetil-CoA'ya çevrilerek Asetil-CoA, yağ asidi sentaz (FASN) enzimi ile uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürülerek üretilen yağ asitleri, gliserol ile birleşerek trigliseritleri oluşturur. Bu trigliseritler enerji depolamak veya hücre zarlarının yapımında kullanılmak üzere hücre içinde depolanır.

De novo lipogenez kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmekte ve DNL'de görev alan anahtar enzimlerin aşırı ekspresyonu (FASN gibi) hem primer hem de ilerlemiş hastalıkların karakteristik bir özelliği olmakla birlikte tedaviye dirençte önemli bir rol oynayabilmektedir (Lounis ve ark., 2020; Mounier ve ark., 2014).

2.4.1.2. FASN'nin Yapısal Organizasyonu

Yağ asidi sentazın memeliler ve mantarlarda bulunan tip I ve arkebakteriler ve öbakterilerde bulunan tip II olarak iki sınıfı tanımlanmıştır: Tip I FASN büyük, çok işlevli bir polipeptittir ve tek işlevli enzimlerle karakterize edilen tip II FASN'den farklıdır (Chirala ve Wakil, 2004).

Memeli FASN'leri, N-terminal bölümündeki üç katalitik alanın (-ketoasil sentaz (KS), malonil/asetiltransferaz (MAT) ve dehidraz (DH) bir çekirdek bölgeyle ayrılır (etki alanları arası olarak bilinir)), dört C-terminal alanından (enoil redüktaz (ENR), -ketoasil redüktaz (KR), asil taşıyıcı protein (ACP) ve tiyoesteraz (TE)) yaklaşık 600 kalıntılı bir çekirdek bölge ile ayrıldığı iki özdeş çok işlevli polipeptitten oluşmaktadır (Chirala ve ark., 2001; Smith, 1994). Yağ asidi sentazın yapısal organizasyonu Şekil 2.7'de gösterilmektedir.



Şekil 2.7. FASN'nin yapısal organizasyonu (Fhu ve Ali, 2020'den düzenlenmiştir). (A) FAS kompleksinin bir monomerindeki modüler yapıların sıralı düzeni N-terminalden C-terminale doğru şunlardır: KS , MAT, DH, ENR, KR, ACP, ve TE. LD, bağlayıcı domain olarak işlev görmektedir. (B) FAS kompleksinin iki monomerinden oluşan dimerik yapısını göstermektedir. Monomer 1 ve Monomer 2 arasındaki bağlantı, sistein (Cys) ve fosfopantetein (4'-PP) üzerinden sağlanmaktadır. Bu dimerik yapı, yağ asidi biyosentezi sırasında yağ asidi zincirlerinin sentezlenmesi için gerekli olan tüm enzimatik aktiviteleri barındırmaktadır.

Yağ asidi sentaz de novo yağ asidi biyosentezi için gerekli tüm enzimleri, iki reaksiyon odacığı etrafında kovalent olarak bağlanmış halde içermektedir. Yağ asidi sentazın üç boyutlu yapısı büyük ölçüde tanımlanmış olsa da reaksiyon ara ürünlerinin uzak katalitik bölgeler arasında nasıl aktarılabildiği belirsizdir (Brignole

ve ark., 2009). Memeli FASN yapısına ve işlev mekanizmasına olan ilgi, bu proteinin obezite ve kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olduğunun anlaşılmasıyla artmıştır, çünkü FASN inhibitörleri iştah baskılayıcılar olarak etkili olup çeşitli kanser hücre tiplerini seçici olarak hedef alabilmektedir (Kuhajda ve ark., 1994; Loftus ve ark., 2000).

2.4.1.3. FASN'nin İşlevi

Yağ asidi sentaz ilk olarak meme kanserinde onkojenik antijen-519 (OA-519) olarak keşfedilmiştir (Epstein ve ark., 1995). Normal dokuda FASN genellikle düşük seviyelerde eksprese edilmektedir (Shih ve Davidson, 2009). Bunun istisnaları olarak karaciğer, yağ dokusu, beyin, meme bezleri, endometriyum gibi lipogenezin önemli bir süreç olduğu yetişkin organlarında yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir (Jia ve ark., 2020). Bununla birlikte FASN'nin hemen hemen her kanser türünde yaygın olarak aşırı eksprese edildiği ve kanserin ilerlemesi ile ilişkili olduğu ayrıca prostat, oral, yumurtalık, glioma, meme gibi çeşitli kanser türlerinde kötü prognoz ve azalmış genel sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Agostini ve ark., 2014; De Schrijver ve ark., 2003; Grube ve ark., 2014; Kuhajda, 2006; Li ve ark., 2014; Menendez ve Lupu, 2007; Veigel ve ark., 2015).

Yağ asidi sentazın kanserde aşırı ekspresyonuna katkıda bulunan ana faktörlerden biri, büyüme faktörleri ve büyüme faktörü sinyallemedeki artıştır (Menendez ve Lupu, 2007). Ayrıca FASN transkripsiyonu diyetdeki karbonhidratlar, amino asitler, glukagon ve insülin ile uyarılabilmektedir (Wong ve Sul, 2010). Bununla birlikte, FASN ekspresyonu meme bezleri gibi hormona duyarlı hücrelerde prolaktin, kortizol ve progesteron gibi çeşitli hormonlar tarafından da uyarılabilmektedir (Lupu ve Menendez, 2006). Yağ asidi sentazın aşırı ekspresyonunun, özellikle HER2'nin aşırı ekspresyonu olan meme kanserinde tümör büyümesine katkıda bulunabileceğini gösterilmekle birlikte FASN ekspresyonu ile prognostik indeksler arasındaki ilişki tam bulunamamasına rağmen, aşırı ekspresyonunun patolojik alt tip ve lokasyona bağlı olarak meme tümörlerinin prognozu üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir (Liu ve ark., 2023).

Meme kanserinde FASN, hormondan bağımsız SKBR3 ve hormona bağımlı MCF 7 ve ZR 75 1 hücreleri dahil olmak üzere çeşitli meme kanseri hücre hatlarında yüksek

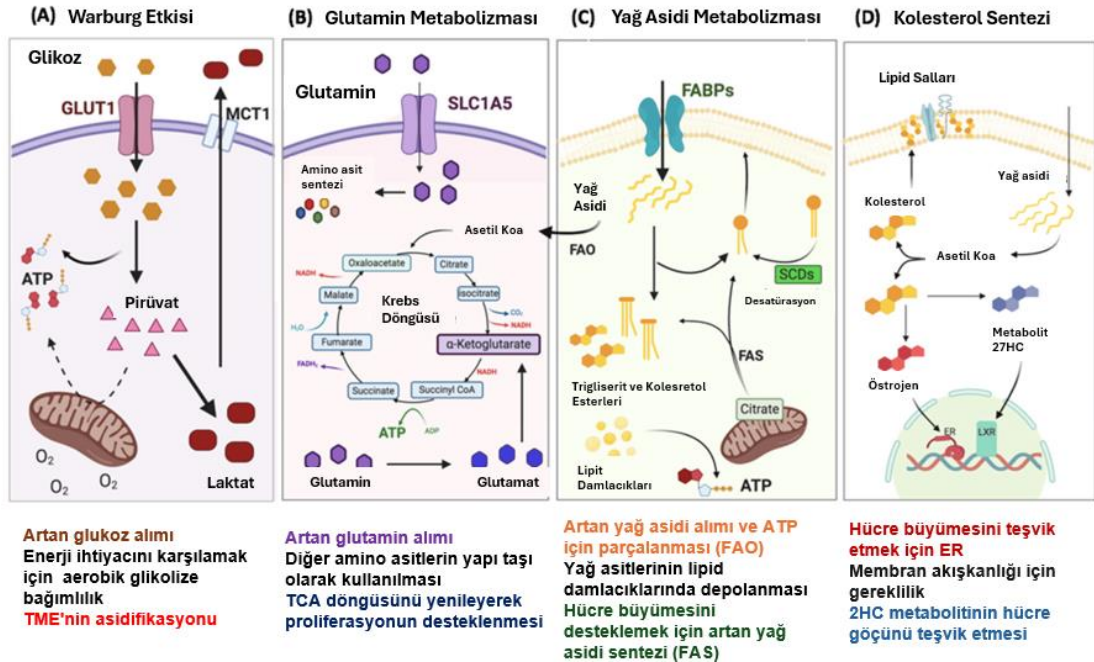
düzeyde eksprese edilmektedir (Chuang ve ark., 2011; Kuhajda, 2008; Wang ve ark., 2011). Hormondan bağımsız ve hormona bağımlı hücre hatları arasında hormondan bağımsız meme kanseri hücresi olan SKBR3 hormona bağımlı meme kanseri hücrelerine kıyasla daha yüksek (~2,5 kat) FASN seviyelerini eksprese etmektedir (Kuhajda ve ark., 2000; Wang ve ark., 2004). Hormona bağımlı ve hormondan bağımsız hücre hatları arasındaki FASN ekspresyonu farklılıklarının yanı sıra FASN seviyeleri de birbirini takip eden her tümör aşamasında artmaktadır (Kuhajda ve ark., 2000). Bununla birlikte meme karsinomlarındaki KKH'lerin metabolik altyapısı tartışmalı ve az çalışılmış olmaya devam ederken, KKH benzeri hücrelerin FASN dahil olmak üzere birçok lipojenik enzimi önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde eksprese etmektedir (Liu ve ark., 2022). Meme kanseri kök hücre alt popülasyonlarında, ACC'nin ve FASN'nin yüksek ekspresyon seviyeleri, artan hücre sağkalımı ve dolayısıyla pre-malign lezyonların oluşumu ile ilişkilendirilmektedir (Li ve ark., 2013).

Yağ asidi sentazın tedaviye dirençli KKH'leri ortadan kaldırmaya yönelik güçlü ancak şimdiye kadar büyük ölçüde keşfedilmemiş bir hedefi temsil edip etmediği daha kapsamlı bir şekilde araştırılmalı ve KKH'lerde lipit metabolizmasının yeniden programlanmasının altında yatan mekanizmaların anlaşılmasının yanı sıra KKH'ler ile KKH olmayan hücreler arasındaki lipit metabolizmasındaki farklılıkların belirlenmesi, kanserin mevcut klinik tedavisinin iyileştirilmesi için oldukça önemli bir terapötik hedefler sağlayabilir (Yi ve ark., 2018).

2.4.2. Kanser Kök Hücresinde Lipit Metabolizması

Tümör hücreleri ve KKH'ler normal hücrelerle karşılaştırıldığında bazı ortak metabolik özellikleri paylaşıyorlar da KKH'lerin metabolik durumunun kök olmayan kanser hücrelerinden biraz farklı olduğu öne sürülmektedir (Liu ve ark., 2013). Kanser hücrelerinin aksine KKH'ler hem glikoliz hem de OXPHOS'u kullanabildikleri için heterojen metabolik özelliklere sahiptirler. Glikoliz ve OXPHOS tek başına kanser kök hücre metabolizmasını doğru bir şekilde açıklayamaz çünkü metabolik yol karmaşık bir şekilde iç içe geçmiştir (Sancho ve ark., 2016). Son çalışmalar, normal kök hücrelere benzer şekilde KKH'lerin mitokondriyal solunum ve glikoliz gibi metabolik değişikliklere uğradığını ve bu

geçişin KKH'lerin işlevi için kritik olduğunu ileri sürmektedir (Zou ve ark., 2016). Bununla birlikte, esas olarak glikolitik veya mitokondriyal solunumu kullanan KKH'lerin metabolik fonotipine ilişkin sonuçlar çelişkilidir. Bu tür çelişkili sonuçların olası bir nedeni, KKH'lerin metabolik fenotipinin çevreye ve hücresel sinyal yoluna bağlı olarak OXPHOS ve glikolitik fenotipler arasındaki geçişin esnekliğidir (Chae ve Kim, 2018). Kanseri kök hücrelerin çeşitli metabolik fenotiplere sahip olmasına neden olan bir diğer faktör, kanser hücrelerindeki farklı sinyal bağlamları ve onkogenik mutasyonlardır (De Francesco ve ark., 2018). Bununla birlikte, tümörlerde KKH'lerin bir alt popülasyonu (heterojenlik) mevcuttur ve bu durum farklı genetik değişikliklerle farklı metabolik modeller sergileyebilmektedir (Peiris-Pagès ve ark., 2016). Farklı dokulardaki farklı kanser türleri, önemli ölçüde farklı mikro ortamlarda (farklı oksijen gereksinimi ve glikoz konsantrasyonları) bulunabilir dolayısıyla her bir KKH, farklı ortam koşullarına uyum sağlamak için farklı bir metabolik fenotip gösterebilmektedir (Lee ve ark., 2018). Kanseri hücreleri ve KKH'lerindeki metabolik adaptasyon Şekil 2.8'de gösterilmektedir. KKH'lerin metabolik olarak hedeflenmesi kemo-direnç ve tümör nüksetmesinden sorumlu olan KKH'lerin ortadan kaldırılmasına yönelik kanser tedavisini ele almak için çok önemli ve yeni ortaya çıkan bir alan haline gelmektedir. Kanseri kök hücrelerde metabolik yeniden programlamanın rolünün ve bu metabolik plastisiteyi düzenleyen altta yatan ayrıntılı mekanizmaların açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Böylece KKH metabolizmasının hedeflenmesi, nüks ve metastaz riskini azaltacak yeni tedaviler sağlayabilir (Pascual ve ark., 2017).



Şekil 2.8. Kansere hücreleri ve kanser kök hücrelerinde metabolik adaptasyon. (El-Sahli ve Wang, 2020'den düzenlenmiştir). (A) Kansere hücreleri, yeterli oksijen kaynağı olsa bile ATP üretimi için OXPHOS yerine glikolize güvenerek Warburg etkisini veya aerobik glikolizi benimseme eğilimindedir. Ortaya çıkan pirüvat laktata dönüştürülür ve hücrenin dışına salınır ve burada tümör mikro ortamını (TME) asitleştirerek bağışıklık baskılayıcı bir ortam yaratır. (B) Kansere hücreleri ayrıca hücre büyümesi için anabolik süreçler (nükleotid ve diğer amino asit sentezi gibi) ve Krebs (trikarboksilik asit (TCA)) döngüsünü yenilemek için glutamine olan bağımlılıklarını değiştirir. Glutamin ayrıca, kemoterapiye dirençte etkili olan glutatyonun sentezinde de önemlidir. (C) Hem yağ asidi oksidasyonu hem de yağ asidi sentezi (FAS), enerji için glikolizi desteklemek ve hızlı hücre çoğalması ve büyümesi için membran materyalleri sağlamak amacıyla meme kanserinde yukarı düzenlenir. (D) Kansere hücreleri ayrıca zar kompozisyonları ve büyüme ve yayılmayı teşvik eden sinyaller için kolesterol sentezine bağımlıdır.

Kansere kök hücreleri, glukoz metabolizmasının yanı sıra amino asit, nükleotid ve lipidlerin biyosentezi için gerekli olan karbon ve amino nitrojeni sağlayan glutamine de dayanmaktadır (Cluntun ve ark., 2017). Bununla birlikte lipid ve kolesterolle ilişkili yollardaki değişikliklerin de KKH'lerin canlılığını devam ettirmeleri için gerekli olduğu vurgulanmaktadır (Mancini ve ark., 2018). Lipitler hücre ve organel zarlarının temel bileşenleridir ve YA'lar KKH'lerin canlılığını sürdürmeleri için gereklidir (Folmes ve ark., 2013). Bununla birlikte, glikolitik ara maddeler KKH'ler tarafından kendini yenilemeyi, büyümeyi artırmak amacıyla DNL için kullanılabilir (Corominas-Faja ve ark., 2014). Hem lipid katabolizması hem de

anabolizmasındaki değişiklikler, kanser gelişimi sırasında köklenmenin kazanılmasıyla ilişkili olmakla birlikte lipit metabolizması sadece enerji üretimini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda biyosentetik yollarda ve redoks homeostazisinde de önemli bir rol oynamaktadır (Yi ve ark., 2018). Proteomik ve metabolomikteki son gelişmeler, KKH'lerin kaderini belirlemede lipit metabolizmasının rolünü daha iyi açıklığa kavuşturmaktadır (Brandi ve ark., 2017). Birçok çalışma çeşitli KKH'lerde daha yüksek hücre içi lipit birikimini göstermiştir; bu esas olarak DNL aktivitesinden kaynaklanmakla birlikte DNL'in temel düzenleyicilerinin çoğunluğu aynı zamanda KKH'ler için de oldukça önemlidir (Clémot ve ark., 2020; Li ve ark., 2020).

De novo lipogenez, LD ve FAO oluşumunu içeren süreçtir ve lipit metabolizmasının yeniden programlanması, KKH oluşumu ve köklülüğün korunmasında rol oynamaktadır. Örneğin, glioma kök hücreleri (GKH), farklılaşmış glioma hücrelerine göre daha az glikoliz kullanır ancak daha yüksek düzeyde ATP üretimi sağlamaktadır (Vlashi ve ark., 2011). Önemli bir lipojenik enzim FASN, hastalardan elde edilen GKH'lerde aşırı eksprese edilir, ancak serum kaynaklı farklılaşma ile dramatik bir şekilde azalır; bu, gelişmiş DNL'nin, GKH'lerin farklılaşmamış durumunun korunmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir (Yasumoto ve ark., 2016). Proteomik ve metabolomik analizleri kullanan başka bir çalışmada pankreas KKH'lerinin parental kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek glikoliz seviyelerine ve artan DNL aktivitesine sahip olduğunu, ancak mitokondriyal OXPHOS seviyelerini azalttığını göstermekle birlikte Panc1 KKH'lerinin cerulenin ile inhibisyonunun parental kök olmayan kanser hücrelerine göre daha duyarlı olduğu gösterilmektedir (Brandi ve ark., 2017). In situ duktal karsinomaya yol açan MCF10A hücrelerinden izole edilen MKKH'ler (CD24⁻ CD44⁺ ESA⁺), kök olmayan kanser hücrelerine kıyasla ACLY, ACC ve FASN gibi lipojenik genler daha yüksek ekspresyon seviyeleri sergilemektedir. Bu lipojenik genlerin yukarı regülasyonu, MCF10A kök benzeri hücrelerde hücre canlılığını ve çoğalmasını desteklemektedir (Pandey ve ark., 2013).

Tümör oluşumu, kemoterapi direnci ve metastazdaki metabolik yeniden programlamanın önemi göz önüne alındığında, daha fazla çalışma meme kanseri onkogenezi, KKH yolları ve metabolik adaptasyon arasındaki bağlantıyı

araştırmaktadır. Ortaya çıkan kanıtlar, KKH'lerin kök hücre benzeri ve kendini yenileyen doğasını koruyan yolların, aynı zamanda metabolik yeniden programlama ve metastazda da rol oynadığını göstermektedir. Kanseri kök hücrelerinin metabolik esnekliği nedeniyle, tek bir lipid metabolik yolunu hedef alarak bu hücreleri ortadan kaldırmak zordur. Bu nedenle MKKH'lerin içsel hücresel yağ asidi metabolik özelliklerinin anlaşılması ve KKH popülasyonunu ortadan kaldırmak için lipid metabolizmasında rol oynayan sinyal yollarının hedeflenmesi, meme kanseri hastaları için daha etkili tedaviler geliştirmeye olanak sağlayabilir.

2.5. Kanserde Lipit Sinyal Yolları

Kanser hücrelerinde DNL'deki önemli artışlar, hücre sinyal yolları üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. FASN'nin hücre sinyalini etkilemesinin en yaygın yollarından biri protein asilasyonu sürecidir ve kanserde hücre sinyal olaylarını etkileyen protein asilasyonunda önemli rol oynamaktadır (Corn ve ark., 2020; Röhrig ve Schulze 2016). Kanser hücrelerinde artan yağ asidi üretimi aynı zamanda kanser sinyal yollarının süreçlerine doğrudan katılan lipid moleküllerinin üretiminin artmasına da yol açabilmektedir (Fu ve ark., 2020). Kanserin ilerlemesine aracılık etmede rol oynayan bazı sinyal lipidleri arasında sfingozin-1-fosfat (S1P) ve lisofatidik asit (LPA) ile diaçilgliserol (DAG) ve fosfatidilinositol-3,4,5- trisfosfat (PIP3) gibi ikinci haberci moleküller yer almaktadır (Griner ve Kazanietz, 2007; Park ve ark., 2012; Pyne ve Pyne, 2010; Vanhaesebroeck ve ark., 2012). Kanser hücrelerinde görülen de novo yağ asidi sentezindeki artışla hücrede yağ asitlerinin bolluğu ortaya çıkar; bu da yüksek dereceli lipidlerin, bu lipid sinyal moleküllerine hızlı bir şekilde yeniden şekillenmesine ve yeniden programlanmasına olanak tanımaktadır (Corn ve ark., 2020). Bu nedenle lipidler hem hücredeki proteinlerin asetilasyonu hem de doğrudan lipid sinyal molekülleri yoluyla kanser hücrelerinin büyümesine, hayatta kalmasına, çoğalmasına ve anjiyogenezinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Röhrig ve Schulze 2016).

Lipit sinyalleme, metabolizma, büyüme, farklılaşma, migrasyon ve apoptoz dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenlemektedir. Bu yollar, hücreler arasında ve içinde iletişim kurmak için sinyal habercileri olarak görev yapan fosfolipitler, sfingolipitler ve eikosanoidler gibi lipid sinyal moleküllerinin

aktivasyonunu ve düzenlenmesini içermektedir (Wymann ve Schneider, 2008). Düzensiz bir lipid metabolizması, onkogenezin desteklenmesinde önemli bir rol oynamakla birlikte AKT, Nükleer Faktör Kappa-Hafif Zincir Arttırıcısı (NF- κ B) gibi birçok onkojenik sinyal yolları, tümörün ilerlemesini yönlendirmek için lipid metabolizmasıyla kesişmektedir (Gupta ve ark., 2024). Metabolik süreçler düzenlenmediğinde, hücrel sinyal iletim yollarında değişiklik; gerekli enerjiyi, yapı taşlarını ve redoks potansiyellerini sağlayarak kontrolsüz kanser hücresi büyümesini mümkün kılmaktadır (Khan ve ark., 2024). Bu nedenle, lipid metabolizması ile ilişkili onkojenik sinyal yollarını hedeflemek, kanser insidansını azaltmak ve sağkalımı desteklemek için etkili bir terapötik yaklaşım olabilir.

2.5.1. NF- κ B Sinyal Yolağı ve Kanserdeki Rolü

Nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı, inflamatuvar sinyal yollarına aracılık etmede önemli bir rol oynayan bir grup transkripsiyon faktörünü içermektedir. NF- κ B sinyal yolağının düzensizliği bağışıklık sisteminin bozulması ve kanserle ilişkili olduğundan; NF- κ B sinyal yolağı tümör oluşumu, onkolojik süreç ve terapötiklerin geliştirilmesi için önemli bir yere sahiptir (Harrington ve Annunziata, 2019; Mitchell ve ark., 2016).

NF- κ B sinyal yolu, çeşitli farklı uyarılarla etkinleştirilmesi ve birçok düzenleme noktasına sahip olması açısından oldukça karmaşıktır (Zinatizadeh ve ark., 2020). Hem inflamasyonda hem de kanserde, NF- κ B'nin transkripsiyonel aktivitesi önemli fonksiyonlar üstlenir ve patolojik rolleri, NF- κ B tarafından düzenlenen genlerin hem inflamasyona hem de kansere neden olmasından dolayı iç içe geçmiştir (Park ve Hong., 2016). Bu nedenle, NF- κ B ile kanser arasındaki ilişki çok yönlüdür. NF- κ B sinyallemesinin kanserdeki önemli rolleri arasında hücre proliferasyonunun kontrolü, DNA hasar yanıtı, apoptoz ve hücrenin hayatta kalması ile ilişkili genlerin düzenlenmesi yer almakla birlikte NF- κ B'nin anjiyogenez ve metastaz gibi süreçleri teşvik ederek tümör ilerlemesine katkı sağladığına inanılmaktadır (Zhang ve ark., 2021).

Çoğu kanser türünde, NF- κ B'nin aktivasyonu artar ve NF- κ B aktivasyonundaki bu artış genellikle tümör mikroçevresindeki tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) ve interlekin 1 (IL-1)'in artması gibi NF- κ B yolunun artan uyarılarına bağlıdır (Ben-

Neriah ve Karin, 2011; DiDonato ve ark., 2012). Kanser kök hücrelerinde ise NF- κ B yolunun işlevleri karmaşıktır. NF- κ B çeşitli KKH'lerde (lösemi, glioblastoma, prostat, yumurtalık, meme, pankreas ve kolon kanseri dahil) yapısal olarak aktive edilir ve inflamasyona, hücre çoğalmasına, hayatta kalmasına, aracılık eder (Vazquez-Santillan ve ark., 2015).- Ayrıca NF- κ B, kök hücre ile ilişkili transkripsiyonel faktörlerin ve genlerin ekspresyonuna aracılık ederek KKH'lerin kendi kendini yenilemesini, çoğalmasını ve metastazını teşvik etmek için tek başına çalışabilir veya diğer sinyal yollarıyla sinerji oluşturabilmektedir (Rinkenbaugh ve Baldwin, 2016). Ayrıca yeni araştırmalar, NF- κ B'nin glikoliz, glutaminoliz, OXPHOS ve diğer metabolik yolları etkileyen metabolik programları kontrol ederek tümör hücrelerinin besin eksikliği olan mikro ortamlara tepkisi için gerekli olduğunu, NF- κ B'ye bağımlı adaptif mekanizmanın özünde lipid metabolizmasının düzenlenmesi ile bağlantılı olup NF- κ B aktivasyonunun birçok onkojenik sinyal yolunu modüle ederek lipid metabolizmasını uyarıp metabolik stres altında kanser hücresinin hayatta kalmasında hayati bir rol oynadığını göstermektedir (Capece ve ark., 2021) .

2.5.1.1. Meme Kanserinde Nf- κ B Sinyal Yolağı

Nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı aktivasyonunun meme kanseri gelişimini ve ilerlemesini yönlendirmekle birlikte özellikle agresif ER negatif ve HER2 pozitif meme kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wu ve Kral, 2005). Tek başına ve/veya diğer sinyal yollarıyla birlikte NF κ B sinyalinin yukarı regülasyonu, anjiyojenik neovaskülarizasyonu, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) teşvik eder, kanser hücresi "köklülüğünü" arttırmakla birlikte kemo-direnç, radyo-direnç ve endokrin direncine yol açarak bunların hepsi erken relaps, hastalığın ilerlemesi ve genel sağkalımın azalmasına yol açan invaziv fenotiplerle ilişkilendirilmektedir (Shostak ve Chariot, 2011; Yu ve ark., 2012b; Zhou ve ark., 2005). Klinik çalışmalarda, meme kanserlerinde NF κ B'nin yapısal aktivasyonunun, artan tümör boyutu, akciğer ve beyin bölgelerine metastaz ve HER2 onkoproteininin aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Sarkar ve ark., 2013). Meme kanserlerinin üçte birinde aşırı eksprese edilen HER2, KKH popülasyonunun önemli bir modülatörüdür (Freudenberg ve ark., 2009). İnsan epidermal büyüme reseptörü 2

NFκB'yi kanonik yol yoluyla aktive ettiğinden NFκB MKKH'lerin artmasında rol oynamaktadır (Merkhofer ve ark., 2009). Ayrıca NFκB baskılanması, HER2'ye bağımlı tümörlerde CD44+ hücrelerin oranını büyük ölçüde azaltmıştır; bu da NFκB'nin progenitör hücre popülasyonunun devamlılığı ve çoğalmasından sorumlu olduğunu göstermektedir (Liu ve ark., 2010). Bununla birlikte, yüksek NF-κB-induced kinase (NIK) seviyeleri MKKH'lerin kendini yenilemesini ve metastazını düzenlemek için kanonik olmayan NF-κB yolunun aktivasyonunu da indükler (Vazquez-Santillan ve ark., 2017). Bu nedenle, NF-κB yolunu hedef alan tedaviler, KKH'lerin çoğalmasını ve metastazını engellemek için kullanılabilir.

NF-κB meme kanseri metabolizmasında rol oynayarak lipid metabolizmasının yeniden programlanmasını etkileyebilmektedir. NF-κB'nin inhibisyonu, hücrelerde lipid birikiminin azalmasına yol açarak NF-κB'nin lipid metabolizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Wu ve ark., 2017). Yağ asitleri TLR4 sinyalleşmesinin aktivasyonu yoluyla NF-κB aktivitesini indüklemektedir (Lee ve ark., 2001). Ayrıca yağ asidi bağlayıcı protein 5 (FABP5), NF-κB'nin indüksiyonu yoluyla meme kanseri hücrelerinin tümör oluşumunun atmasına sebep olmaktadır (Senga ve ark., 2018). SCD1 enzimi doymuş FA'ları Δ9-tekli doymamış FA'lara dönüştürmekten sorumludur ve bu FA'ların yumurtalık KKH'lerindeki NF-κB aktivitesi için gerekli olduğu vurgulanmaktadır (Li ve ark., 2017; Tracz-Gaszewska ve Dobrzyn, 2019). De novo lipogenezde önemli bir rol oynayan FASN ile ilaç direnci arasında ortaya çıkarılan ilişkiyle eş zamanlı olarak yapılan çalışmalar, FASN ve DNA onarımı arasındaki ilişkide NF-κB'nin spesifik bir rolünü göstererek: FASN'nin, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) DNA onarım aktivitesini artırarak DNA çift sarmal kırılmalarının onarımını yukarı doğru düzenleyebildiği ve bunun, poli (ADP-riboz) polimeraz 1'in (PARP1) ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Wu ve ark. 2014). Meme kanseri hücrelerinde FASN ekspresyonu yüksek olduğunda FASN, SP1 ekspresyonunda bir artışa neden olurken aynı zamanda NF-κB/p65 ekspresyonunu da baskılamasıyla SP1'in PARP1'in ifadesini ve aktivitesini yukarı düzenlemesine olanak tanıyarak PARP1 ve DNA onarımında yer alan diğer proteinlerin de görevlendirilmesine böylece NHEJ DNA onarımı ile doksorubisin ve diğer DNA'ya zarar veren ajanlarla

kemoterapötik tedavi varlığında meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasına olanak tanımaktadır (Wu ve ark., 2016).

NF- κ B'nin mekanizmaları ve işlevleri hakkında hala birçok bilinmeyen var olmakla birlikte NF- κ B'nin meme kanseri hücrelerinin ve KKH'lerin lipid metabolizmasında rol oynadığı mekanizmaları açıklamak için daha fazla kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.5.2. Akt/PKB Sinyal Yolağı ve Kanserdeki Rolü

En iyi bilinen lipid sinyal yollarından biri fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT sinyal yolağıdır ve bu yol, büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı sinyaller tarafından etkinleştirilmektedir (Hoxhaj ve Manning, 2020). Akt protein kinaz B (PKB); üç izoformdan oluşan (Akt1, Akt2, Akt3) hücre boyutu, hücre döngüsünün ilerlemesi, glukoz metabolizmasının düzenlenmesi, genom stabilitesi, transkripsiyon, protein sentezi ve neovaskularizasyon gibi hücresel işlevlerde önemli bir role sahip bir serin/treonin kinazdır (Bellacosa ve ark., 2005; Fresno Vara ve ark., 2004). Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolu, çeşitli kanser türlerinde önemli bir sinyal yoludur (Lawrence ve ark., 2014). Hücrenin hayatta kalması, metastaz ve metabolizma dahil olmak üzere kanserin ayırt edici özelliklerini kontrol ederek tümör ortamında önemli roller oynamakla birlikte Akt'ın fosforilasyonu, apoptoz, hücre büyümesi ve çoğalmada yer alan farklı protein hedeflerinden oluşan bir zincirin aktivasyonu ile sonuçlanır ve bunların tümü tümör oluşumunu teşvik etmektedir (He ve ark., 2021).

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), farklı genler tarafından kodlanan düzenleyici ve katalitik bir alt birimden oluşan bir heterodimerik lipid kinazdır. PI3K aktivasyonunun birincil sonucu, membranda ikinci haberci Fosfatidilinositol (3,4,5) P3'ün (PIP3) üretilmesidir; bu da daha sonra aşağı yönde bir serin/treonin kinaz olan Akt'yi alır ve aktive eder (Vivanco ve Sawyers, 2002). Akt aktivasyonu, plazma membranına translokasyonu ve Tr308 ve Ser473'te fosforilasyonu gerektiren ikili düzenleyici bir mekanizmadır. Bu mekanizma nedeniyle Akt, anti-apoptotik bir sinyal molekülü olarak işlev görmektedir (Bai ve ark., 2009).

AKT'nin metabolik açıdan rollerine bakıldığında AKT, GLUT1/4'ü stabilize ederek glikoz alımını uyarır ve Rapamisin'in Mekanistik Hedef Kompleksi 1'e (mTORC1)

bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla DNL'yi ve anabolik metabolizmayı tetiklemektedir (Makinoshima ve ark., 2015; Ricoult ve ark., 2016). AKT'nin aktivasyonu, DNL'de anabolizma için karbon kaynakları sağlamak üzere metabolik ara maddelerin taşınması ve lipogenezi beslemek için anabolik metabolizma ve özellikle FASN tarafından katalize edilen asetil-CoA ve malonil-CoA'nın yoğunlaşma reaksiyonu için önemli bir kofaktör olan ikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) formundaki indirgeyici eşdeğerlerin sentezini içeren iki temel sürece katkıda bulunmaktadır (Cui ve ark., 2017; Ward ve Thompson, 2012). Örneğin AKT, ACLY'yi doğrudan fosforile edip aktive edebilir, böylece asetil-CoA sentezini artırabilir ya da nükleer faktör benzeri 2 transkripsiyon faktörünü (Nrf2) aktive eder ve dolaylı olarak NADPH sentezinde yer alan genlerin transkripsiyonuna yol açarak NADPH üretimini teşvik etmektedir (Berwick ve ark., 2002; Mitsuishi ve ark., 2012). AKT sinyali, glikolizden elde edilen metabolik ürünlerin yağ asidi senteziyle birleştirilmesinde kritik bir rol oynayan SREBP1c transkripsiyon faktörünü aktive ederek DNL'nin arttırmasına katkıda bulunmaktadır (Leavens ve ark., 2009; Ricoult ve ark., 2016). Bununla birlikte AKT'nin aşağısında mTORC1 de, DNL'yi teşvik etmek için SREBP izoformlarının aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Düvel ve ark., 2010; Porstmann ve ark., 2008). SREBP ve lipid sentezinin indüksiyonunun hem AKT'ye hem de mTORC1'e bağlı olduğu gösterilmektedir (Wang ve ark., 2015). Bununla birlikte AKT yağ asidi sentezi sürecinde lipid metabolizmasında görev alan, ATP-sitrat liyaza bir fosfat grubu ekleyebilir, bu da kolesterol ve yağ asitlerinin üretiminde rol oynayan çeşitli genlerin aktivasyonunu tetiklemektedir (Manning ve Cantlet, 2007).

2.5.2.1.Meme Kanserinde AKT Sinyal Yolağı

AKT, meme kanserinin patogeneğinde önemli rol oynayan son derece karmaşık bir hücre içi sinyal yolu olmakla birlikte bu sinyal yolunda meydana gelen mutasyonlar, AKT'nin aşırı aktivasyonuna neden olur ve bu da hücre büyümesi, hayatta kalması ve çoğalmasından ve meme tümör hücrelerinin protein sentezinden sorumlu hedef moleküllerin aktivasyonuna yol açmaktadır (Miricescu ve ark., 2020). HER2 ile zenginleştirilmiş meme kanserleri, PI3K sinyalleşmesinin hiperaktivasyonu ile yakından ilişkilidir; tümörlerin %80'inden fazlası, Ser473 ve Tr308 üzerinde

AKT'nin artan fosforilasyonunu sergilemektedir (Kruger ve ark., 2018). Meme kanseri hastalarında aktiveştirilmiş Akt'nin saptanması aynı zamanda uzak metastazların eşlik ettiği daha yüksek nüks olasılığı ile kötü prognozla da ilişkilendirilmektedir (Pérez-Tenorio ve Stål, 2002). PI3K-Akt sinyal yolu, meme kanseri hücrelerinde KKH benzeri fenotipi, hayatta kalmayı ve EMT özelliklerini korumak için gerekli olan unsurları içermekle birlikte Akt'ye bağlı elementler KKH proliferasyonu ve fenotipinin korunmasında oldukça önemlidir (Rivas ve ark., 2018).

AKT izoformları, tümör büyümesinde ve meme kanserinin metastazında farklı ve hatta karşıt roller oynamaktadır (Basu ve Lambring, 2021). AKT1, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasından ve hayatta kalmasından sorumludur, ancak anti-metastatik etkiye sahiptir (Kempska ve ark., 2023). Öte yandan, AKT2'nin aşırı ekspresyonu meme kanseri hücrelerinde hareketliliği ve göçü teşvik eder, ikincisi metastaz oluşumunun artmasına neden olur (Chin ve Toker, 2011; Irie ve ark., 2005; Yoeli-Lerner ve ark., 2005;). Ancak AKT3'ün işlevsel rolü en az incelenmiş ve bu nedenle yeterince anlaşılmamıştır (Grottke ve ark., 2016). Bununla birlikte AKT izoformlarının meme kanseri hücrelerinin köklülük karakterini korumada farklı işlevleri vardır (Riggio ve ark., 2017; Wadhwa ve ark., 2020). AKT izoformlarının farklı etkileri, farklı hücresel sinyallemeye modellerine ve belirli izoforma özgü AKT substratlarına dayanmaktadır. AKT izoformlarının tümör büyümesi ve metastaz üzerindeki etkisi tümör evresine, meme kanseri alt tipine, mutasyonlara ve muhtemelen hala bilinmeyen etkileyici faktörlere bağlı olduğundan, çeşitli izoformların onkogen veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılması doğru değildir (Hinz ve Jücker, 2019).

2.6. Diyet Yağ Asitleri

Yağ asitleri vücuttaki ana enerji kaynağıdır, bir hidrokarbon zinciri ve bir terminal karboksilik grubu içerir ve zincir uzunluğuna ve doymamışlık derecesine göre sınıflandırılmaktadır. Diyet yağ asitlerinden, özellikle uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (UZÇDYA), memelilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan organik bileşiklerdir (Abiri ve Vafa, 2018; Echeverría ve ark., 2016). Hem linoleik asit (C18:2 n-6, LA) hem de alfa-linolenik asit (C18:3 n-3, ALA), memelilerin bunları

sentezlemek için gerekli tüm desatürasyon enzimlerine sahip olmaması nedeniyle esansiyel yağ asitleridir (Valenzuela ve Videla, 2011).

Omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), lipid metabolizmasının düzenlenmesinde; lipojenik ve glikojenik kapasitenin azalmasına yol açan transkripsiyon faktörü SREB1c'nin ekspresyonunun aşağı regülasyonu ve yağ asitleri oksidasyonunu destekleyen PPAR'ın yukarı regülasyonu yoluyla rol oynamaktadır (Geng ve ark., 2018). PPAR'lar, embriyonik ve fetal gelişimde temel bir rol oynamanın yanı sıra, enerji homeostazı, adipogenez, inflamatuvar yanıtlar veya oksidatif stres ile bağlantılı lipid ve glukoz metabolizması dahil olmak üzere çeşitli metabolik ve hücrel süreçleri düzenlediği bilinen bir grup transkripsiyon faktörünü oluşturmaktadır (Echeverría ve ark., 2016). Omega-3 ÇDYA'lar tarafından PPAR aktivasyonu ve bunun sonucunda gen transkripsiyonunun desteklenmesi, kardiyovasküler, metabolik, nörodejeneratif patolojiler, inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde temel bir rol oynamaktadır (Geng ve ark., 2018; Li ve ark., 2005).

Diyet yağ asitlerinin, özellikle ÇDYA'lar, karaciğerde ve yağ dokusunda FASN ekspresyonunu aşağı doğru düzenlemektedir (Moon ve ark., 2002). n-3 ve n-6 ÇDYA'lar hepatositlerde SREBP-1c ve FASN mesajcı ribonükleik asit (mRNA) seviyelerini azaltmaktadır (Howell ve ark., 2009; Xu ve ark., 2001). Steroller ve leptin hormonu da FASN'yi transkripsiyonel olarak baskılar ve ÇDYA'larla birlikte bu araçlar hücrel lipogenezi kontrol altında tutarak FASN ekspresyonu ÇDYA'lar tarafından düzenlenmektedir (Menendez ve Lupu, 2007). Diyetteki n-3 ÇDYA'lar hücre zarı fosfolipitlerinin bileşimini değiştirerek, çok sayıda reseptörün, transkripsiyon faktörünün ve lipitin ekspresyonunu ve fonksiyonunu modüle ederek anti-karsinojenik bir etkiler gösterebilmektedir (Liu ve Ma, 2014).

2.6.1. Dokosaheksaenoik Asit

Dokosaheksaenoik asit, uzun zincirli yüksek oranda doymamış bir omega-3 yağ asididir. 6 çift bağ içeren açıl zincirinde 22 karbon vardır. Kimyasal olarak, karboksil veya alfa karbonu 1 numara olarak sayıldığında, 4, 7, 10, 13, 16 ve 19 sayıları açıl zincirindeki çift bağ taşıyan karbon atomlarına atıfta bulunarak, all-cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksaenoik asit olarak tanımlanabilmektedir (Calder, 2016).

Omega-3 ÇDYA olan DHA'nın sağlık açısından birçok olumlu etkisi gösterilmekle birlikte kanserin önlenmesinde veya kanser tedavisinde potansiyel bir rol oynayabileceği vurgulanmaktadır (D'Eliseo ve Velotti, 2016). Dokosaheksaenoik asit kanser huresi proliferasyonunu inhibe ederek bazı kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (Song ve Kim, 2016). Ayrıca DHA çeşitli kanser hücrelerinde oksidatif stresi, DNA eklenti oluşumunu ve DNA hasarını indükleyerek çeşitli kanser trlrine karşı seçici sitotoksiste gösterirken normal hücrelere karşı göstermemektedir (Zajdel ve ark., 2015; Zhelev ve ark., 2016). Dokosaheksaenoik asitin hcrezel zarlara dahil edilmesi, oksidatif stresin indüklenmesi, siklooksijenaz-2, Nf-κB, mitojenle aktifleşen protein kinazlar ve peroksizom proliferatryle aktifleşen reseptör-γ (PPARγ) dahil olmak üzere hcrezel sinyal yollarının etkileşimi yoluyla ve in vitro çalışmalarda antikanser ilaçların duyarlılığını artırma yeteneği ile kanser tedavisini olumlu şekilde modüle etmektedir (D'Eliseo ve Velotti, 2016; Siddiqui ve ark., 2011).

Dokosaheksaenoik asit, biyolojik membranların membran organizasyonu, iyon geçirgenliği, elastikiyet ve eikosanoid oluşumu dahil olmak üzere fiziksel özelliklerinde önemli değişiklikler yapabilmektedir (Stillwell ve Wassal, 2003). Dokosaheksaenoik asitin mitokondriyal fosfolipit kompozisyonunu değiştirebildiği ve temel i zar proteinleri ile kanallarının aktivitesini değiştirebildiği bilinmektedir; bu da, mitokondriyal biyoenerjetik fonksiyonun azalmasına yol açabilmektedir (Stanley ve ark., 2012). Bununla birlikte DHA kanser hücrelerinde çeşitli metabolik yolların modlatr olarak görev yapabilmektedir (D'Alessandro ve ark., 2011). Dokosaheksaenoik asit hücrelerde lipit metabolizmasında görev alan p-SREBP-1, m-SREBP-1 ve FASN ekspresyonunda ve fosforile AKT (p-Akt)/akt ekspresyonlarında önemli bir azalmaya neden olmaktadır (Huang ve ark., 2017). Ayrıca DHA olgunlaşmamış SREBP-1c'nin (nSREBP-1c) zar içinde kontrollü bir şekilde parçalanmasını (RIP) engelleyerek nSREBP-1c seviyelerini azaltmaktadır. Bu etki, AMP-activated protein kinase (AMPK) aktivasyonu yoluyla ve mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibisyonu ile gerçekleşmektedir (Deng ve ark., 2015).

2.6.1.1. Meme Kanserinde DHA'nın Etkileri

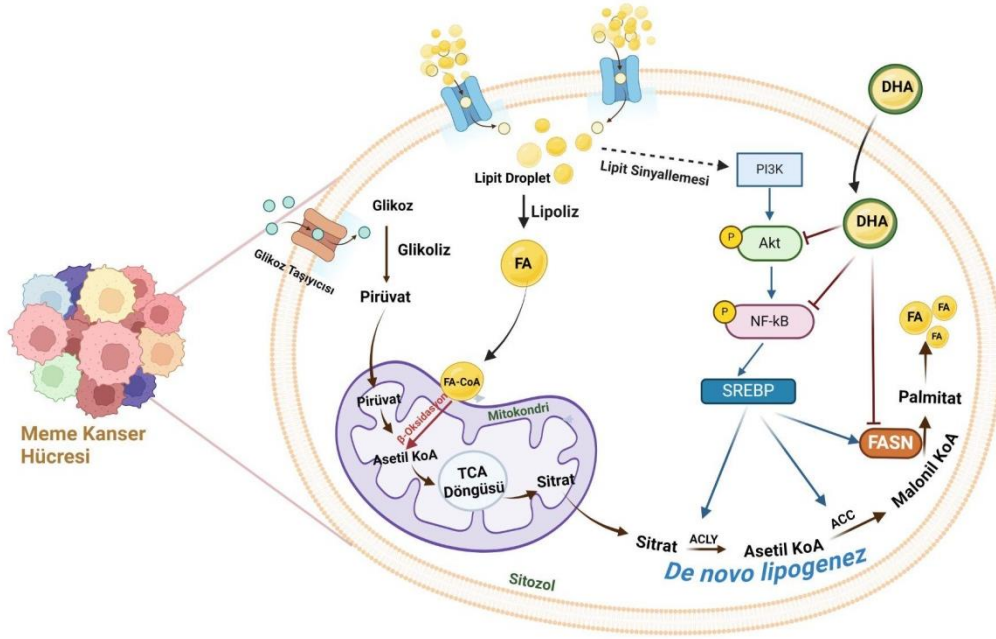
Diyetteki çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) meme kanseri malignitesinin patofizyolojisinde anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. ω -3 ÇDYA'lar tarafından oluşturulan sitotoksik ortamın, meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Bougnoux ve ark., 2009; Bougnoux ve ark., 2010). Son zamanlarda zamanda yapılan bir çalışmada, DHA'nın meme kanseri hücre hatlarında biyoenerjetik fonksiyonlarını metabolik yeniden programlanmasını azalttığını, kanser hücrelerinin metabolik fenotipinden bağımsız olarak DHA'nın biyoenerjetik profili değiştirebildiğini ve MCF-10A hücre hattında hiçbir etki gözlenmediğinden, malign hücre hatlarını seçici olarak hedeflediği gösterilmiştir (Mouradian ve ark., 2015) .

n -3 ÇDYA'ların Akt ekspresyonunu modüle ettiği ya da fosforilasyonunu aşağı regüle etmek için Akt ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (DeGraffenried ve ark., 2003; Ravacci ve ark., 2013). Akt, aktivasyon için plazma membranına translokasyon gerektirdiğinden, n -3 ÇDYA'nın tümör hücre membranındaki zenginleşmesinin, aktivasyon için membrana alınan Akt'nin fosforilasyonunu etkilemektedir (Schley ve ark., 2005). Bununla birlikte *in vitro* olarak DHA uygulamasının, HER-2'yi aşırı eksprese eden hücrelerde lipit yapısını bozarak, HER-2 aktivitesini ve bunun aşağı yöndeki sinyal moleküllerini (Akt ve FAS, vb.) inhibe etmede etkili olduğu ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Ravacci ve ark., 2013).

Diyetteki PUFA ve metabolitleri, gen ekspresyonunu etkileyerek veya hücre proliferasyonu, farklılaşma apoptozu ve metastazın kontrolünde rol oynayan sinyal transdüksiyon moleküllerini aktive ederek anti-kanser veya tümör teşvik edici etkilerinden bazılarını gösterebilir. Ancak DHA'nın bu koruyucu etkilerinin altında yatan spesifik mekanizmaların daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Tez çalışması kapsamında, meme kanserini ve meme kanseri kök hücrelerinde (MKKH) de novo lipogenezin (DNL) metabolik yeniden programlama sürecindeki rolü ve DHA'nın (Dokosaheksaenoik Asit) bu sürece olan etkileri incelenmiştir. Meme kanseri hücrelerinde glukoz veya glutamin metabolizması yoluyla elde edilen piruvatın mitokondride asetil-CoA'ya dönüştürülmesi ve sitrata çevrilmesi de novo

lipogenez sürecini başlatmaktadır. Bu süreçte, yağ asidi sentaz (FASN) enzimi, malonil-CoA'yı palmitata dönüştürerek kanser hücrelerinin lipid ihtiyacını karşılamaktadır. Ayrıca, PI3K/Akt/NFκB yolları aracılığıyla SREBP'nin aktivasyonu, lipogenezin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. MKKH'lerin, tedaviye direnç ve nüks potansiyelleri nedeniyle hedeflenmesi zor hücreler olduğu göz önüne alındığında, FASN ve de novo lipogenez yolunun MKKH'leri hedefleyen terapilerde potansiyel olarak kullanılabileceği hipotez edilmektedir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Meme Kanseri Hücrelerinde De Novo Lipogenez ve DHA'nın Metabolik Yollara Etkisi

Bu bağlamda meme kanseri Luminal A alt tipini temsil eden MCF 7 ve TN meme kanseri alt tipini temsil eden MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve her iki parental kanser hücrelerinden MACS yöntemi ile CD44⁺ ve CD24⁻ belirteçlerine göre MKKH'ler izole edilmiştir. İzole edilen MKKH'lere ve parental kanser hücrelerine IC50 konsantrasyonunda DHA uygulanmıştır. Ardından DHA uygulanan ve uygulanmayan deney gruplarında hücrelerin klonojenik kapasitesi; p-AKT, fosforile NFκB (p-NFκB), apoptoz oranları flow sitometri yöntemi ile FASN gen ekspresyonu Rt-qPCR yöntemi ile ardından protein düzeyinde FASN seviyesi flow sitometri ile belirlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Bu tez çalışması kapsamındaki tüm deney basamakları Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Kök Hücre Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez deneylerinde kullanılan tüm cihazlara ait bilgiler Tablo 3.1’de; sarf ve kimyasal malzemelere ait bilgiler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Marka
Karbondiyoksit (CO ₂) İnkübatörü	Panasonic
Su Banyosu (37 °C)	Memmert
Santrifüj Cihazı	Heitch-Rotina
Laminar Flow Kabini (Sınıf II Biyogüvenlik Kabini)	Telstar
İnverted Mikroskop	Leica
+4°C Soğutucu Buzdolabı	Siemens
-20°C Derin Dondurucu Buzdolabı	Siemens
-80°C Derin Dondurucu Buzdolabı	Panasonic
Vorteks	Heidolph
Flow Sitometri Cihazı	BD Biosciences
MidiMACS Separator aleti	Miltenyi Biotec

Tablo 3.1. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar (Devam)

MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Buz Makinesi	Scotman
Spektrofotometre	Shimadzu- Biotech
Thermal cycler	Qiagen
Light Cyclor 480 II	Roche

Tablo 3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler

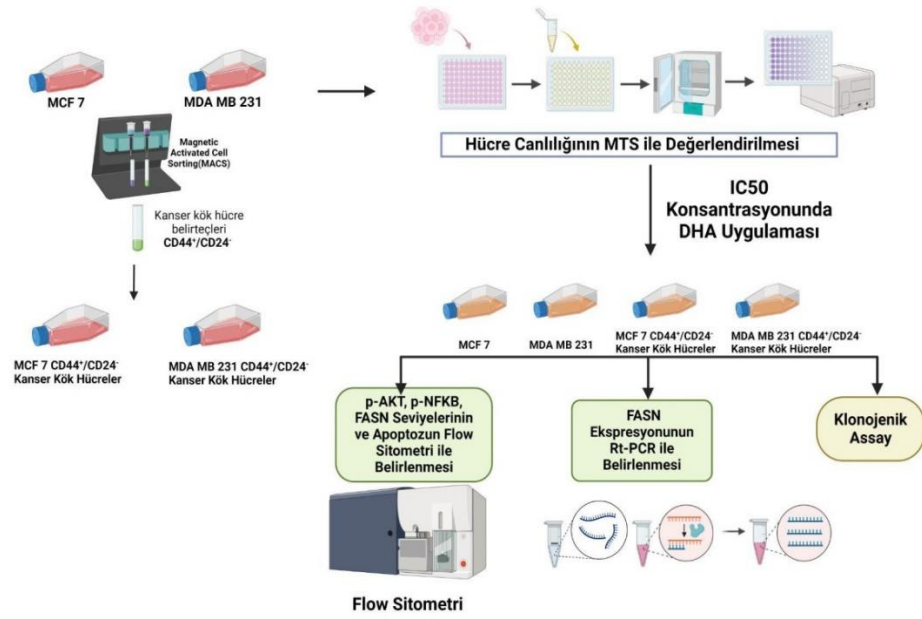
Sarf ve Kimyasal Malzemeler	Marka
100 mm steril round petri	Sarstedt
T25 ve T75 Flask	Sarstedt
6 ve 24 Well Plate	Sarstedt
15 ve 50 mL Tüp	Corning
2 mL Criyo vial	Corning
2 ml RNA filtreli tüp	Qiagen RNeasy mini kit
LD Kolon	Miltenyi Biotec
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Biological Industries
Trypsin-EDTA	Biological Industries
L-Glutamine	Stem Cell Technologies
Penisilin-Streptomisin	Thermo Fisher Scientific
Amfoterisin B	Sigma-Aldrich
FBS	Thermo Fisher Scientific
DMEM	Thermo Fisher Scientific
RPMI-1640	Biological Industries
Hücre Boyama Tamponu	Biolegend
MACS® BSA stok solüsyonu	Miltenyi Biotec
autoMACS® durulama solüsyonu	Miltenyi Biotec
Transkripsiyon Faktörü Boyama Tampon Seti	Miltenyi
Anexin-V- FITC	Miltenyi Biotec
Annexin-V Binding Buffer	Miltenyi Biotec
Rneasy Mini Kit	Qiagen
RT ² First Strand Kit	Qiagen

Tablo 3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler (Devam)

qPCR Primer Assay	Qiagen
%70 Etanol	Emsure
SYBR Green qPCR Mastermix	Qiagen
CD24 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec
CD44 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Cell Signaling Buffer Set A	Miltenyi Biotec
NaOH	EMSURE®
HEPES	Sartorius

3.2. Yöntem

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler Şekil 3.1’de şematize edilerek verilmiştir. Bu tez çalışmasında insan meme kanser modeli olarak üçlü negatif meme kanserini temsil eden MDA MB 231 hücre hattı ile luminal A meme kanserini temsil eden MCF 7 hücre hattı kullanılmıştır. İki hücre hattı da hücre kültürü ile çoğaltıldı ve ardından MACS yöntemi ile CD44⁺/CD24⁻ hücreler izole edildi. İzolasyonun ardından DHA için IC50 değeri Tetrazolium Compound, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2 Yl)-5-(3-CarboxymethylPhenyl)-2-(4-Sulfonyl)-2H-Tetrazolium, Inner Salt (MTS) ile belirlenip uygun doz ile hücreler muamele edildi. Dokosaheksaenoik asit ile muamele edilen ve edilmeyen gruplarda koloni oluşturma kapasiteleri klonojenik assay ile değerlendirildi. Apoptoz, p-NFκB, p-AKT ve FASN oranları flow sitometri ile belirlendi. Son olarak FASN gen ekspresyonu düzeyleri RT-qPCR ile belirlendi.



Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerin şematik gösterimi.

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Kanser Hücrelerinin Kültürü

Deneyler steril ortam şartlarının sağlanması için laminar flow kabini (Telstar) içerisinde yapıldı. -80°C derin dondurucu buzdolabında vial içerisinde muhafaza edilen MCF 7, MDA MB 231 hücreleri hızlıca çözündürülüp ardından yıkama için çözündürülen hücreler her hücre hattına göre etiketlenen tüplerin içerisine alınarak 1:5 oranında kendi besi ortamları ile resüspanse edildi. Daha sonra MCF 7 hücreleri 300g 5 dakika (dk); MDA MB 231 hücreleri 1500 rpm 5 dk santrifüjlendi. Dondurma ortamında bulunan dimetil sülfoksit (DMSO; Serva, #39757.02; Serva, #39757.02)'in zararlı etkisinden hücreleri korumak için santrifüj sonrası hücre pelleti üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırılıp hücreler üzerine besi ortamları ilave edilerek tripan mavisi ile canlı hücre sayımı yapıldı. Ardından hücreler sayısına göre uygun kültür kaplarına ekilerek, MCF 7 hücre hattı Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (2 mM L-glutamin, %1 penisilin/ streptomisin, %1 amfoterisin, %10

fetal bovin serum (FBS) içeren), MDA MB 231 hücre hattı ise Dulbecco'nun Modifiye Eagle's (DMEM) besiyerinde (2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin, %1 amfoterisin, %10 fetal bovin serum (FBS) içeren) kültüre edildi. İki hücre hattı için de; hücrelerin haftada 2 veya 3 defa besiyerleri tazelenmiş ve % 5 CO₂, 37°C de inkübe edildi. %70 oranında konfluens olduğunda hücreler pasajlandı. Pasaj için, besiyeri aspire edildikten sonra hücreleri kültür kabının yüzeyinden ayırmak için %0,25 Tripsin EDTA ile hücrenin tipine bağlı olarak 37 -C'lik %5 CO₂ içeren inkübatörde 1-5 dakika bekletildi. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden kalktığı mikroskopta gözlemlendikten sonra, tripsini inaktive etmek için kültür kabına eklenen tripsin miktarının 2 katı kadar FBS'li uygun besiyerleri eklenip resüspanse edildi. Süspanse hale gelen MCF 7 hücre hattı 5 dakika 300xg'de, MDA MB 231 hücre hattı ise 5 dakika 1500 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp hücre peleti besiyeri içinde yeniden süspanse edilerek, tripan mavisini ile hücre sayımı yapıldıktan sonra her iki hücre hattı da uygun besiyerleri içerisinde kültür kabına ekimi yapıldı. Deneyler için yeterli hücre sayısı elde edilene kadar hücreler çoğaltıldı.

3.2.1.2. Kanser Kök Hücrelerinin Kültürü

MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri RPMI (2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/ streptomisin, %1 amfoterisin içeren) ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri ise DMEM besiyerinde (2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin, %1 amfoterisin içeren) kültüre edildi. Hücrelerin haftada 2 veya 3 defa besiyerleri tazelenip % 5 CO₂, 37°C de inkübe edildi. %70 oranında konfluens olduğunda hücreler pasajlandı. Pasaj için besiyeri aspire edilip hücreleri kültür kabının yüzeyinden ayırmak için %0,25 Tripsin EDTA eklenerek 5 dakika %5 CO₂ 37 °C'de inkübe edildikten sonra tripsini inaktive etmek için kültür kabına eklenen tripsin miktarının 2 katı kadar taze besiyeri eklendi. Süspanse hale gelen MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri 300xg'de 5 dakika, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp hücre peleti besiyeri içinde yeniden süspanse edilerek hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler uygun besiyeri ile kültür kabına ekimi yapıldı ve deneyler için yeterli sayıda hücre elde edilene kadar çoğaltıldı.

3.2.2. MCF 7 ve MDA MB 231 hücre hatlarında CD44⁺/CD24⁻ belirteçleri kullanılarak Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ile Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu

MCF 7 ve MDA MB 231 meme kanseri hücre hatlarından kanser kök hücreleri CD44⁺/CD24⁻ belirteçleri kullanılarak MACS ile izole edildi. İzolasyon işlemine başlamadan önce kullanılacak olan MACS tamponu taze bir şekilde hazırlandı ve uygulama boyunca buz içerisinde muhafaza edildi. MACS Tamponu; MACS® BSA (bovine serum albumin) stok solüsyonunu (Miltenyi Biotec, #130-091-376) 1:20 oranında autoMACS® durulama solüsyonu (Miltenyi Biotec, #130-091-222) ile seyreltilerek hazırlandı. Her iki hücre hattı içinde aynı işlemler yapılarak kanser kök hücre izolasyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayısı 1×10^7 'ye ulaşana kadar hücreler kültüre edildi. Kültürde %70 konfluense ulaşan hücreler tripsinize edilerek kültür kabının yüzeyinden ayrıldı. Tripan mavisi ile hücre sayımı yapılarak 1×10^7 hücre ayrı bir falkona alındı. Hücre süspansiyonu 300xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından 10^7 hücre için 40 µL MACS tampon solüsyonu içerisinde resüspanse edilip üzerine 10 µL CD24-Biotin (Miltenyi Biotec, #130-095-951) eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra 15 dakika 2-8°C'de inkübe edildi. Inkübasyon tamamlandıktan sonra 1 mL MACS tampon solüsyonu ile hücreler yıkandı ve 300xg'de santrifüjlendi. Süpernatant atılıp 80 µL MACS tampon solüsyonu içerisinde hücreler resüspanse edildikten sonra üzerine 20 µL Anti-Biotin Microbeads (Miltenyi Biotec, #130-095-951) eklenip 2-8°C'de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücreleri yıkamak için 1.5 mL tampon solüsyonu eklendi ve ardından 300xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 500 µL MACS tampon solüsyonu eklenerek yeniden süspanse edildi. Ardından manyetik ayırma aşamasına geçilerek MidiMACS™ Separatör (Miltenyi Biotec, #130-042-302), MultiStanda (Miltenyi Biotec, #130-042-303) yerleştirildi. Separatöre LD kolon (Miltenyi Biotec, #130-042-401) yerleştirildikten sonra kolonu yıkamak için 3 mL MACS tampon solüsyonu kolondan geçirildi. Ardından hücre süspansiyonu da kolondan geçirilip sonrasında 3 defa 3mL MACS tampon solüsyonu kolondan geçirilerek CD24⁻ hücreler kolonun altındaki falkonda toplandı. Hücre sayımı tripan mavisi ile yapıldı. CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin seçilimi CD24⁻ hücre popülasyonunun

içinden yapıldı. CD24⁻ hücreleri 300xg'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine 10⁷ hücre için 80 µL tampon solüsyonu eklenerek yeniden süspanse edildi ve 20 µL CD44 MicroBeads (Miltenyi Biotec, #130-095-194) eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra karanlıkta 4-8°C'de 15 dakika inkübe edildi. Hücreleri yıkamak için 10⁷ hücre başına 1 mL tampon solüsyonu eklenip 300xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp hücre pelleti üzerine 500 µL tampon solüsyonu eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi. Bundan sonra manyetik ayırma aşamasına geçilerek gerekli manyetik alan oluşturulduktan sonra LD kolonu yıkamak için 3 mL MACS tampon solüsyonu kolondan geçirildi. Tampon solüsyonu tamamen geçtikten sonra hücre süspansiyonu geçirildi ve 3 defa 3 mL tampon kolondan geçirilerek kolon yıkanadı. Kolon manyetik alandan uzaklaştırılarak CD44⁺/CD24⁻ hücreler yeni bir falkon tüpüne alındı. İzole edilen MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri uygun besiyeri ve kültür kapları içerisinde sonraki deneysel aşamalar için kültüre edilmiştir.

3.2.3. Bovine Serum Albumin'e (BSA) Bağlı DHA'nın Hazırlanması

Dokosaheksaenoik asitin hücre kültüründe kullanılabilmesi için BSA'ya bağlı 1mM stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bovine Serum Albumin (BSA), DHA'yı oksidatif strese karşı koruyarak hücre zarları tarafından daha kolay alınmasını sağlayıp biyolojik etkisini artırmaktadır. Ayrıca stok çözeltisi hazırlanırken DHA kolayca okside olabileceğinden tüm süreç karanlık bir ortamda N₂ gazı altında gerçekleştirilmiştir.

50 ml'de 1mM stok bovine serum albumine bağlı DHA'nın hazırlanması için 17,42 µl CIS-4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik Asit (Sigma, #D2534-1G) 50 ml'lik falkona alındı. Üzerine 250 µl 0,2 N NaOH (EMSURE®, #1310-73-2) eklendikten sonra solüsyon pH'sini stabil hale getirmek için 50 ml 25 mM HEPES (Sartorius, #03-025-1C, pH 7,0) tamponu eklendi. Ardından 1,1 g yağ asidi içermeyen BSA (Sigma, #A8806-5G) eklendi. Bovine serum albumin tamamen çözülene kadar kuvvetli bir şekilde vortekslendi. Ardından falkon şisesi oda sıcaklığında 120 rpm'de 5 saat boyunca orbital çalkalayıcıda bekletildi. Son olarak BSA'ya bağlı DHA çözeltisi 0,22 µm'lik filtreden geçirilip 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı ve parafilm ile sarılarak stok çözeltisi -20°C'de saklandı.

3.2.4. Hücre Canlılığının Tetrazolium Compound, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2 YI)-5-(3-CarboxymethylPhenyl)-2-(4-Sulfonyl)-2H-Tetrazolium, Inner Salt (MTS) ile Değerlendirilmesi

MCF 7, MDA MB 231 kanser hücrelerinde DHA için IC50 konsantrasyonu MTS içeren CellTiter 96 Aqueous one solution Cell Proliferation Assay kiti (Promega corp., WI) kullanılarak üreticinin protokolüne göre belirlenmiştir.

MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarında kuyucuk başına 3×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonrasında besi yeri tamamen aspire edildi ve MCF 7 hücre hattı 24 saat (0-200 μ M konsantrasyon aralığında) MDA MB 231 hücre hattı ise 48 saat boyunca DHA ile (0-400 μ M konsantrasyon aralığında) muamele edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 20 μ l MTS solüsyonu (Promega, #G3582) eklendi ve karanlıkta 3 saat inkübe edildi. Süre sonunda absorbans, kültürdeki canlı hücre sayısı ELISA okuyucu/reader kullanılarak 490 nm'de belirlendi.

3.2.5. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanser Hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinde FASN Seviyelerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi

Tez çalışmasında her deney grubunda; hücre kültürü ile elde edilen 1×10^6 hücre kullanılarak deney gruplarında FASN ekspresyonunun Alexa Fluor® 488 Anti-Fatty Acid Synthase antibody (Abcam, #EPR7466) antikorı kullanılarak Flow Sitometri ile belirlenmiştir. Oluşturulan deney grupları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Deney Grupları

	Parental Kanser Hücre Grubu	Meme Kanser Kök Hücre Grubu
DHA	MCF 7, MDA MB 231	MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻
KONTROL	MCF 7, MDA MB 231	MCF 7 CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , MDA MB 231 CD44 ⁺ /CD24 ⁻

Yağ asidi sentaz seviyelerinin hem parental hem de kanser kök hücrelerinde belirlenmesi için hücre içi boyama protokolü gerçekleştirildi. Bu süreçte kullanılan solüsyonlar hücre içi boyama işlemine başlamadan önce taze bir şekilde hazırlanarak uygulama boyunca buz üzerinde muhafaza edildi. Fiksasyon/Permeabilizasyon solüsyonu; transkripsiyon faktörü boyama tampon setinde (Transcription Factor Staining Buffer Set, Miltenyi, #130-122-981) bulunan Fiksasyon/Permeabilizasyon Solüsyonu 1, Fiksasyon/Permeabilizasyon Solüsyonu 2 ile 1:4 oranında seyreltilerek hazırlandı. Permeabilizasyon tamponu ise distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlandı. MCF 7 ve MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ hücreler 138.5 uM DHA konsantrasyonunda besiyeri ile 24 saat MDA-MB-231 ve MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻ hücreleri 305.7 uM DHA içeren besiyeri ile 48 saat muamele edildi.

Dokosaheksaenoik asit ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelere pasajlama protokolü uygulanarak tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Ardından 2 ml MACS buffer içerisinde resüspanse edilip hücre sayısı belirlendi ve 300xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL Fiksasyon/Permeabilizasyon solüsyonunda resüspanse edilip 4 °C buzdolabında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1 mL MACS Buffer ile yıkama yapıp 4 °C'de 300 g 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 1 mL Permeabilizasyon solüsyonu eklendi ve 4 °C'de 300xg 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüm deney gruplarındaki tüplere 99 µL Permeabilizasyon Tamponu eklenerek hücreler resüspanse edildi ve üzerine 1 µL Alexa Fluor® 488 Anti-Fatty Acid Synthase antibody (Abcam, # EPR7466) eklendi. 4 °C buzdolabında karanlıkta 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1 mL Permeabilizasyon Tamponu eklenerek resüspanse edildi ve 4 °C'de 300 g 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant tamamen uzaklaştırılıp pellet üzerine 500 µL MACS tamponu eklenerek resüspanse edildi ve BD FACSAria III Cell Sorter (San Jose, CA, ABD) cihazında ölçüm yapıldı.

3.2.6. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanser Hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinde p-NFκB ve p-AKT Seviyelerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi

p-NFκB ve p-AKT fosfo-proteinlerin hücre içi analizi hem parental hem de kanser kök hücrelerinde Cell Signaling Buffer Set A (Miltenyi, #130-100-827) kiti kullanılarak flow sitometri cihazı ile belirlendi. Kitin içerisinde bulunan Permeabilization Buffer A kullanımdan önce -20°C’de bekletildi. MCF 7 ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ hücreler 138.5 uM DHA konsantrasyonunda besiyeri ile 24 saat MDA MB 231 ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ hücreleri 305.7 uM DHA içeren besiyeri ile 48 saat muamele edildi.

Dokosaheksaenoik asit ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelere pasajlama protokolü uygulanarak tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Daha sonra 10⁶ hücre için 1 mL MACS tampon solüsyonu içerisinde yeniden süspanse edilip fiksasyon için 250 µL Inside Fix ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 5 dakika 500×g’de santrifüjlenip süpernatant atıldı. 10⁶ hücre için 1mL permeabilizasyon tampon A solüsyonu yavaşça eklendi ve buz içerisinde 30 dakika bekletilerek hücreler permeabilize edildi. 3 mL MACS tampon solüsyonu ile hücreler yıkanıp 500×g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 4 mL tampon solüsyonu ile hücreler tekrar yıkanıp 500×g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp 98 µL MACS tampon solüsyonu içinde hücreler yeniden süspanse edilip 1 µL NFκB p65 pS529 Antibody (Miltenyi, #130-120-252) ve 1 µL AKT pS473 Antibody (Miltenyi, #130-105-343) antikoru eklendi. Ardından karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 1 mL MACS tampon solüsyonu eklenerek hücreler yıkanadı. 500×g’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra analiz için uygun miktarda tampon solüsyonunda hücre pelleti yeniden süspanse edilip BD FACSAria III Cell Sorter (SanJose, CA, ABD) cihazında ölçüm yapıldı.

3.2.7. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanser Hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinde Apoptoz Oranlarının Flow Sitometri ile Belirlenmesi

Apoptotik hücreler, Annexin V floresan izotiyosiyanit (FITC) Apoptosis Detection Kit (Miltenyi, #130-092-052) kullanılarak flow sitometri cihazında ile analiz edildi. Deney sırasında kullanılan Binding Buffer solüsyonu kitin içerisinde bulunan 20x

Binding Buffer Stok solüsyonunun 250 µL'si 4.750 ul steril distile su içerisinde seyreltilerek hazırlandı.

MCF 7 ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ hücreler 138.5 µM DHA konsantrasyonunda besiyeri ile 24 saat MDA MB 231 ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ hücreleri 305.7 µM DHA içeren besiyeri ile 48 saat muamele edildi. Sürenin sonunda DHA ile muamele edilen ve edilmeyen MCF 7, MDA-MB-231 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri süspanse hale getirildi. 1 mL Binding Buffer solüsyonu eklenip hücre sayısı belirlendi ve 300xg 10 dakika santrifüjlendi. 10⁶ hücre 100 µL Binding Buffer içinde resüspanse edilip 10 µL Annexin V- FITC eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1 mL Binding Buffer ile yıkama yapıp 300xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 500 µL Binding Buffer solüsyonu içerisinde resüspanse edilip 5 µL 7-AAD eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. Ardından BD FACSAria III Cell Sorter (SanJose, CA, ABD) cihazında analiz edildi.

3.2.8. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanser Hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinde Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücrelerinin DHA uygulaması ile koloni oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi için 6 kuyucuklu kültür kaplarına uygun besiyerleri ile 1x10³ hücre/kuyucuk ekildi. 24 saat sonunda tüm kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi. Ardından MCF 7 ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinin besiyeri 138.5 µM DHA konsantrasyonunda besiyeri MDA MB 231 ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinin besiyeri 305.7 µM DHA içeren besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 10 gün boyunca 37 °C, %5 CO₂'de inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin bulunduğu ortamdaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp 1 mL DPBS ile iki defa tüm kuyucuklardaki hücreler yıkandı. %4 Paraformaldehit ile 10 dakika inkübe edildi. Ardından fiksasyon solüsyonu ortamdan uzaklaştırılıp 3 defa DPBS ile yıkama yapıldı. Hücreler 500 µL %0.5 kristal violet ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe

edildi. Bu işlemten sonra kuyucuklar distile su ile dikkatli bir şekilde yıkanıp koloniler mikroskop altında sayıldı.

3.2.9. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF-7, MDA-MB-231 Kanseri Hücrelerinde ve MCF-7 CD44⁺/CD24⁻, MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻ Kanseri Kök Hücrelerinde FASN Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

3.2.9.1. Ribonükleik Asit (RNA) izolasyonu

MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri DHA ve kontrol gruplarında 10⁷ hücre elde edilene kadar kültürde çoğaltıldı. Ardından tek hücre süspansiyonu haline getirilip 10⁷ her deney grubu için ayrı eppendorf tüplere alınıp santrifüjlendi. Ardından RNA izolasyon aşamasına geçildi. Pelletler üzerine 600 µl Buffer RTL (Qiagen RNeasy mini kit, #74104) eklenip pipetaj yapıp vortexlendi. Üzerine 1:1 oranında %70'lik ethanol (Emsure, #1.00983.2511) eklenerek pipetaj yapıldı. 700 µl'lik hacim alınıp filtreli ve kapaklı 2 mL'lik spin kolonlarına (Qiagen RNeasy mini kit, #74104) aktarılıp kapakları yavaşça kapatıldı ve 15 saniye 8000xg'de santrifüjlendi. Altta oluşan süzüntü atıldı. Ardından spin kolonlara 700 µL Buffer RW1 (Qiagen RNeasy mini kit #74104) eklenip 15 saniye 8000xg'de santrifüjlendi ve altta oluşan süzüntü atıldı. Spin kolona 500 µL Buffer RPE (Qiagen RNeasy mini kit #74104) eklenip 15 saniye 8000xg'de santrifüjlenip altta oluşan süzüntü atıldı.. Tekrar 500 µL Buffer RPE eklenip 2 dakika 8000xg'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası spin kolon yeni toplama tüpüne alındı ve Buffer RPE'nin iyice uzaklaştırılması için 1 dakika son hızda santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri tekrar değiştirilerek 1,5 mL'lik tüpler içine spin kolonlar yerleştirildi. Üzerine 40 µL RNase Free Water (Qiagen RNeasy mini kit #74104) eklenip 1 dakika 8000xg de santrifüj yapılarak elde edilen süzüntüde RNA elüsyonları elde edildi.

3.2.9.2. RNA Miktarının Tayin Edilmesi

İzole edilen RNA'nın miktar tayini ve saflık derecesinin belirlenmesi için BioSpec-nano (Shimadzu Biotech) spektrofotometre cihazı kullanıldı. Ölçümler 260 nm ve 280 nm dalga boylarında gerçekleştirildi. Ölçüm sonrası, A₂₆₀ X dilüsyon faktörü (60) X 40 µg/ml = X µg/ml RNA formülü kullanılarak her bir örnekteki toplam RNA

miktarı hesaplandı ve A260/A280 oranı kullanılarak RNA'nın saflık derecesi belirlendi.

3.2.9.3. cDNA Eldesi

Complementary DNA (cDNA) eldesi, Qiagen RT2 First Strand cDNA sentez kiti (#330404) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm deneysel süreçler buz üzerinde yapıldı. -20°C'de muhafaza edilen kitin içinde solüsyonlar oda sıcaklığında çözdürüldü. Her deney grubundan izole edilen RNA, 1 µL'de 100 ng olacak şekilde ayarlandı. Nükleaz free water ve Buffer GE eklenerek toplam hacim 10 µL'ye tamamlandı ve karışım 42°C'de 5 dakika inkübe edildi (Labcycle, Qiagen). Ardından, 5x Buffer BC3 (4 µL), Control P2 (1 µL), RE3 Reverse Transcriptase Mix (2 µL) ve nükleaz free water (3 µL) eklenerek toplam 10 µL'lik bir miks hazırlandı. Bu miks, önceki basamaktan gelen 10 µL ile karıştırılarak toplam hacim 20 µL olacak şekilde pipetaj yapıldı. Thermal Cycler (Labcycle, Qiagen) cihazında 5 dakika 42°C'de ve ardından 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen ürünler 40 µL nükleaz free water ile seyreltilip konsantrasyonları dengelendi.

3.2.9.4. Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

Gen ekspresyonu, FASN hedef geni ile GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) referans geni kullanılarak gerçekleştirildi. Bu iki gen (FASN, GAPDH) için ayrı ayrı iki master mix hazırlandı. Master Mix (Qiagen RT² SYBR Green qPCR mastermix, #330550) eldesi için; 6,25 µL SYBR Green Master Mix, 0,5 µL Primerler [FASN #330001, GAPDH (Qiagen, #3730540)]ve 3,25 µL RNAase free water eklenerek toplam hacim 10 µL'ye ayarlandı. Ardından, hazırlanan karışımlar vortekslenerek 96 kuyucuklu PCR plakasına aktarıldı. Her bir kuyucuğa tüm deney gruplarından elde edilen cDNA'lardan 2,5 µL eklenerek homojen dağılım sağlandı ve toplam hacim 12,5 µL'ye tamamlandı. PCR plakası PCR analiz cihazına (Light Cycler 480 II, Roche) yerleştirildi. Real-Time PCR aşamasında cDNA'nın çift zincirli yapısını ayırmak için 95°C'de 10 dakika bekletildi. 15 saniye 95°C'de denatürasyon aşaması gerçekleştirildi ve 1 dakika 60°C'de primerler hedef bölgesindeki DNA'nın iki ucuna bağlandı. Bu işlem 45 kez tekrarlanarak hedef bölgedeki DNA kopya sayıları artırıldı. Sonuç olarak, FASN geni için mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, farklı hücre hatları, deney ve kontrol gruplarına göre gruplandırıldı. Analiz için çeşitli istatistiksel yöntemler kullanıldı. Flow Sitometri ile elde edilen sonuçlar FlowJo V10 yazılımı kullanılarak analiz edildi. İki grup arasındaki istatistiksel farklılıklar Student t testi kullanılarak, birden fazla grup arasındaki istatistiksel farklılıkları belirlemek için Tukey testi ile tek yönlü ANOVA kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc. ABD) istatistiksel yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. FASN gen ifadesini analiz etmek için RT-PCR yöntemi kullanılarak analiz edilen genler farklı örneklerin reaksiyona girdiği, ışımların başlangıç noktası olan Ct (Cycle Threshold) sayesinde bir standart eğri oluşturularak göreceli kantifikasyon (relative quantification) hesaplandı. Her bir örneğin Ct değerinde meydana gelen standart sapmalar Microsoft Office Excel (sürüm 2019) programıyla hesaplandı. ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ hesaplamada kullanılan formüller aşağıdaki gibidir;

$$\Delta CT = CT_{\text{ÖrnekGen (FASN)}} - CT_{\text{ReferansGen (GAPDH)}},$$

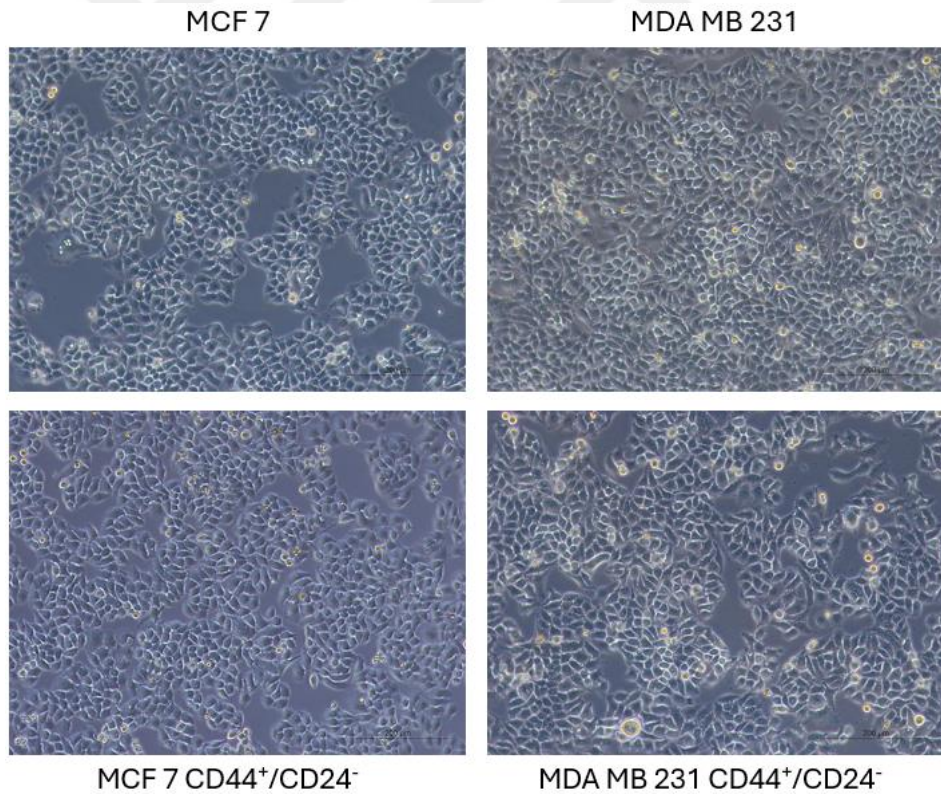
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Deney Grubu}} - \Delta CT_{\text{Kontrol Grubu}},$$

Çalışma sonucunda ilgili genlerin relatif ifade seviyeleri arasındaki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Karşılaştırılan gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü ANOVA ve Student t testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

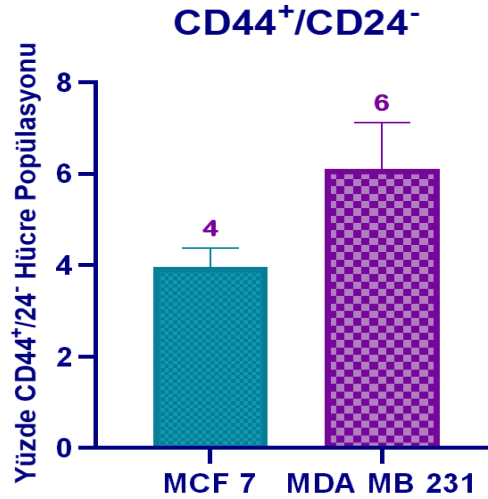
Bu tez çalışmasında kullanılan, luminal A meme kanserini temsil eden MCF 7 hücre hattı; en agresif meme kanser alt tipi olan üçlü negatif meme kanserini temsil eden MDA MB 231 hücre hattı ve bu hücre hatlarından CD44⁺ ve CD24⁻ belirteçlerine göre MACS yöntemi ile izole edilen MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücrelerine ait hücrelerin görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücre hatları ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücrelerine ait hücre kültür görüntüleri. Görüntüler Leica inverted ışık mikroskopunda 10x objektifinde kaydedilmiştir.

4.2. MCF 7, MDA MB 231 Hücrelerinden CD44⁺CD24⁻ Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Manyetik ile Aktive Edilmiş Hücre Ayrımı (MACS) Yöntemi ile İzolasyon Sonuçları

Tez çalışması kapsamında kullanılan MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücrelerinden MACS yöntemi ile CD44⁺CD24⁻ belirteçlerine göre MKKH'ler izole edildi. MACS yöntemi ile MKKH'lerin izolasyonu için başlangıç hücre sayısı 20×10^6 olarak belirlendi. İzolasyon sonrası elde edilen canlı MKKH sayısı tripan mavisi ile belirlendi. MCF 7 parental kanser hücre hattından ortalama %4; MDA-MB-231 parental kanser hücre hattından ortalama %6 oranında CD44⁺CD24⁻ MKKH elde edildi.

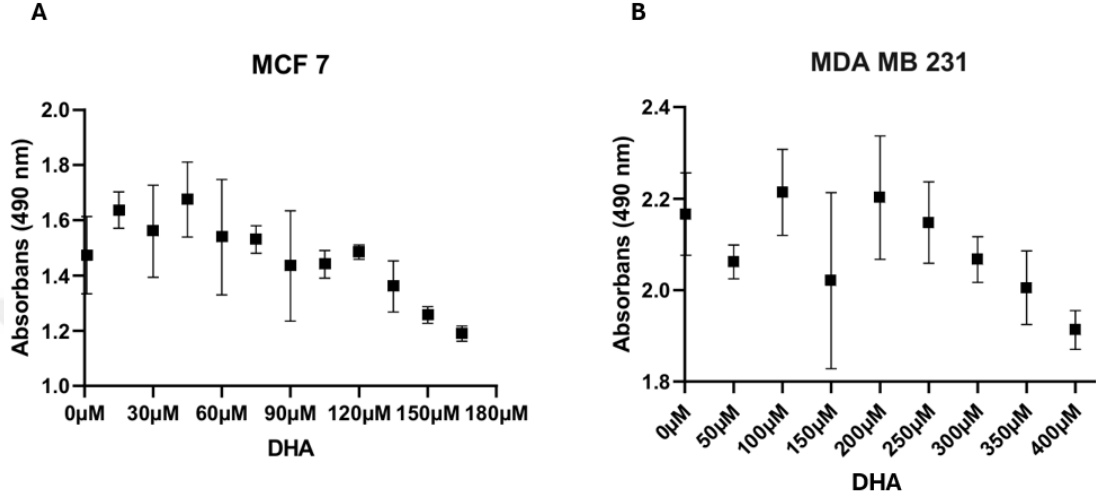


Şekil 4.2. MCF 7, MDA MB 231 hücre hatlarından izole edilen CD44⁺/CD24⁻ meme kanser kök hücre oranları. MCF 7, MDA MB 231, parental kanser hücre popülasyonlarından sırasıyla %4, %6 oranında CD44⁺/CD24⁻ MKKH elde edildi.

4.3. Hücre Canlılığının Tetrazolium Compound, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2 Yl)-5-(3-Carboxymethyl Phenyl)-2-(4-Sulfonyl)-2H-Tetrazolium, Inner Salt (MTS) ile Değerlendirilmesi

MCF 7 parental kanser hücre hattında 24 saat (0-200 μ M konsantrasyon aralığında) DHA uygulamasının ardından kültürdeki canlı hücre sayısı ELISA okuyucu kullanılarak 490 nm'de ölçüldü. Ardından GraphPad Prism 9.0.0 istatistiksel yazılımı kullanılarak IC50 konsantrasyonu 138.5 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.3A). MDA

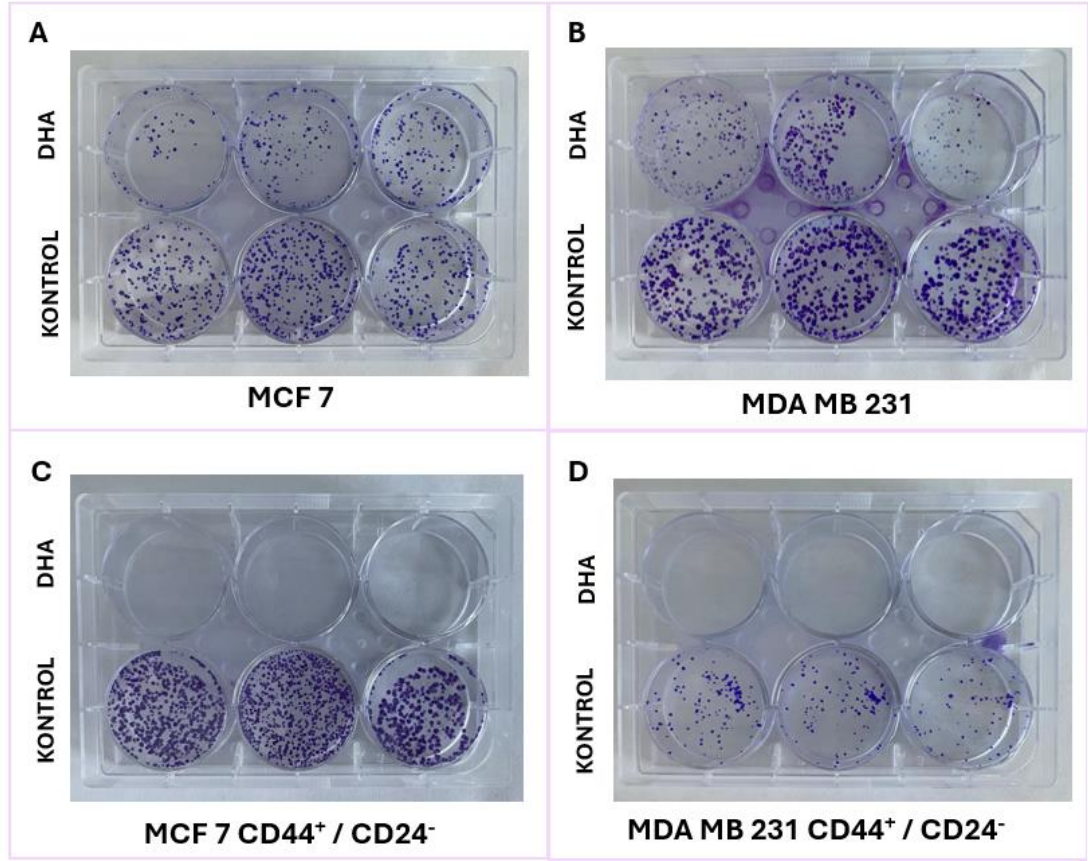
MB 231 parental kanser hücre hattı ise 48 saat boyunca DHA ile (0-400 μ M konsantrasyon aralığında) muamele edildi. Kültürdeki canlı hücre sayısı ELISA okuyucu kullanılarak 490 nm'de ölçüldü ve GraphPad Prism 9.0.0 istatistiksel yazılımı kullanılarak IC50 konsantrasyonu 305.7 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.3B).



Şekil 4.3. MCF 7 ve MDA MB 231 hücre hatlarında DHA için belirlenen IC50 konsantrasyonu grafikleri. MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde GraphPad Prism 9.0.0 istatistiksel yazılımı kullanılarak DHA için IC50 konsantrasyonu sırasıyla 138.5 μ M ve 305.7 μ M olarak belirlendi.

4.4. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Parental Kanser Hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinde Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

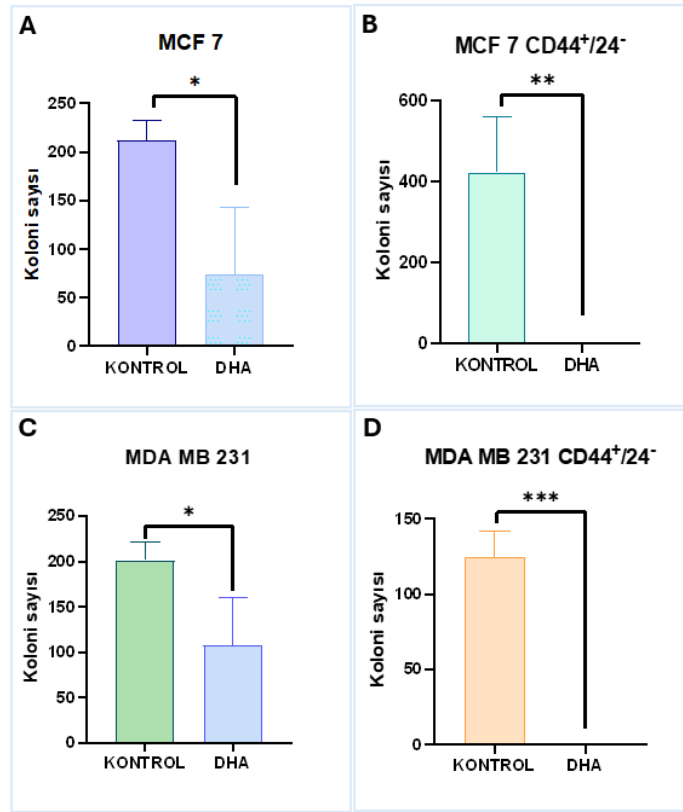
MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 138.5 μ M; MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler ise 305.7 μ M DHA ile 10 gün boyunca muamele edildi ve 10 günün sonunda deney ve kontrol gruplarında hücreler fikse edilip kristal viyole ile boyandıktan sonra koloniler sayıldı. MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde oluşan koloni görüntüleri Şekil 4.4A-D'de verilmiştir.



Şekil 4.4. DHA ile muamele edilen ve edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde oluşan kolonilerin görüntüleri (A) MCF 7 parental kanser hücresinde DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda oluşan koloni görüntüleri. (B) MDA MB 231 parental kanser hücresinde DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda oluşan koloni görüntüleri. (C) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda oluşan koloni görüntüleri. (D) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda oluşan koloni görüntüleri.

MCF 7 parental kanser hücrelerinde DHA ile muamele edilen deney gruplarında ortalama 74 koloni oluşurken kontrol gruplarında ortalama 212 koloni oluştu. DHA ile muamele edilen grupta koloni oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (*p<0.05) (Şekil 4.5A). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH grubunda DHA ile muamele edilen deney grubunda hiç koloni oluşumu gözlemlenmez iken kontrol grubunda ortalama 422 koloni sayıldı. DHA ile muamele edilen grupta koloni oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır (**p<0.05) (Şekil 4.5B). MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 305.7 µM DHA ile 10 gün boyunca muamele edildi. On günün sonunda

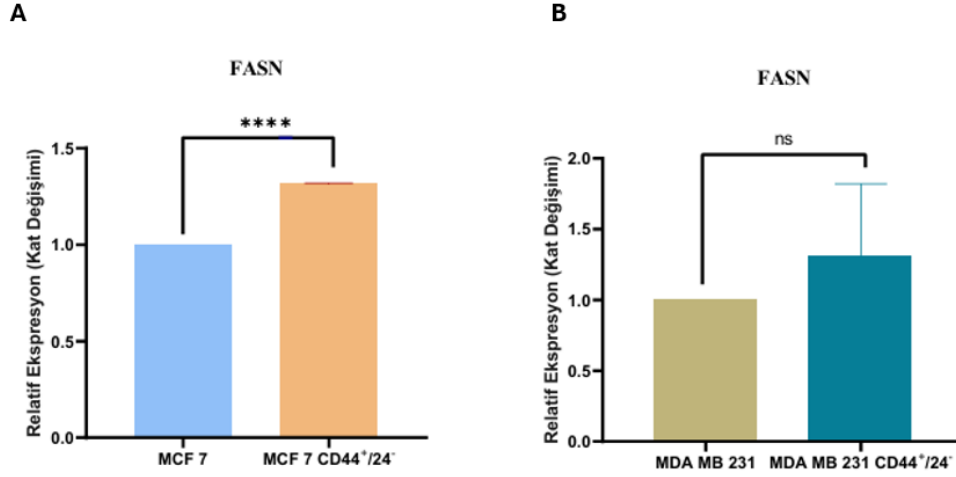
deney ve kontrol gruplarında hücreler fikse edilip kristal viyole ile boyandı ve sayım yapıldı. MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ortalama olarak deney grubunda 107, kontrol grubunda ise 201 koloni sayıldı. İstatistiksel olarak DHA ile muamele edilen grupta koloni oluşumu anlamlı bir şekilde azalmıştır (* $p<0.05$) (Şekil 4.5C). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde ise deney grubundan koloni oluşumu gözlenlenmezken kontrol grubunda ortalama 124 koloni sayıldı. DHA ile muamele edilen grupta koloni oluşumu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (** $p<0.05$) (Şekil 4.5D).



Şekil 4.5. DHA ile muamele edilen ve edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde oluşan koloni sayılarının istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücrelerinde DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda koloni sayısının karşılaştırmalı gösterimi (* $p=0.030$) (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda koloni sayısının karşılaştırmalı gösterimi (** $p=0.0058$) (C) MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda koloni sayısının karşılaştırmalı gösterimi (* $p=0.0462$) (D) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan grup ve kontrol grubunda koloni sayısının karşılaştırmalı gösterimi (** $p=0.0003$). (Tüm deneyler üç teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.)

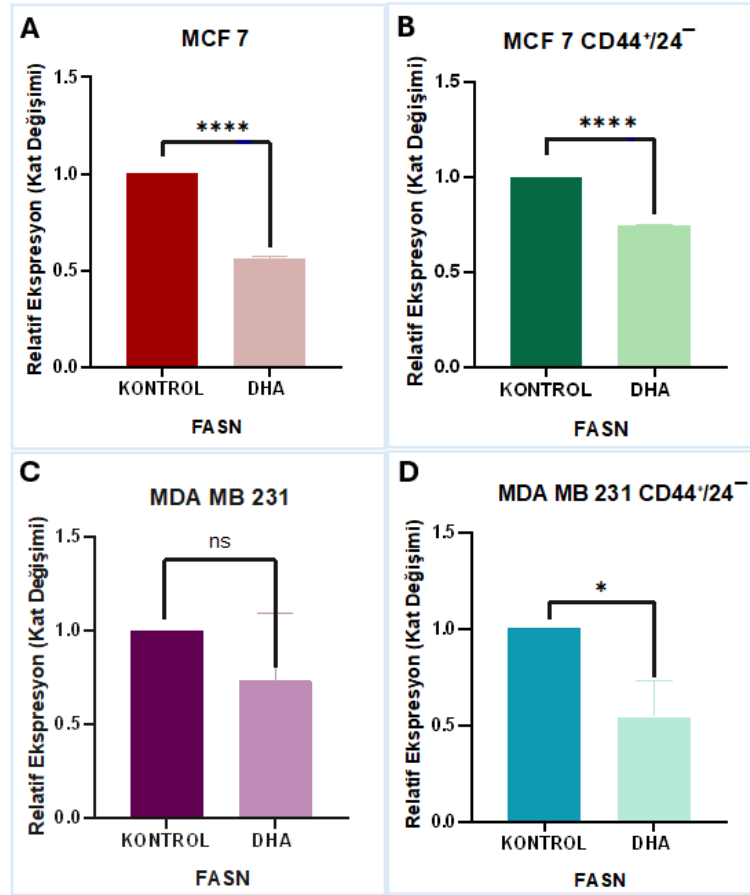
4.5. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231 Kanseri Hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MCKH'lerde FASN Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MCKH'ler 138.5 µM DHA ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra deney ve kontrol gruplarından RNA izolasyonu yapıldı. Ardından cDNA elde edilip gen ekspresyonu, FASN hedef geni ile GAPDH referans geni kullanılarak gerçekleştirildi. MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MCKH'ler 305.7 µM DHA ile 48 saat boyunca muamele edildikten sonra deney ve kontrol gruplarından RNA izolasyonu yapıldı. Ardından cDNA elde edilip gen ekspresyonu, FASN hedef geni ile GAPDH referans geni kullanılarak gerçekleştirildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplanan relatif ifade seviyelerinde; kontrol gruplarında FASN gen ekspresyonu MCF 7 parental hücrelerine kıyasla MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MCKH'lerde 1,31 kat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yukarı regülasyon göstermektedir (****p<0.0001) (Şekil 4.6A). MDA MB 231 parental kanser hücrelere kıyasla ise MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MCKH'lerde 1,24 kat yukarı regüle olmaktadır (p=0.4095) (Şekil 4.6B). Her iki meme kanseri alt tipinde de MCKH'lerde FASN gen ekspresyonu artış göstermekle birlikte MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MCKH'lerde istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.6. MCF 7 parental kanser hücresinde, MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de; MDA MB 231 parental kanser hücresi ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de FASN geni relatif ekspresyon seviyeleri. (A) MCF 7 parental kanser hücresine kıyasla MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de FASN gen ekspresyonunun kat değişimi (****p<0.0001). (B) MDA MB 231 parental kanser hücresine kıyasla MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’lerde FASN gen ekspresyonunun kat değişimi (p=0.4095).

DHA uygulanan MCF 7 parental kanser hücresinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde FASN geni relatif ekspresyon seviyesi %44 oranında azalmıştır (****p<0.001) (Şekil 4.7A). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’lerde DHA uygulanan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla FASN geni relatif ekspresyon seviyesi %26 oranında anlamlı bir azalma göstermiştir (****p<0.001) (Şekil 4.7B). MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde DHA uygulanan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla FASN relatif gen ekspresyonu %8 oranında azalsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir (p= 0.2656) (Şekil 4.7C). DHA uygulanan MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’lerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde FASN geni relatif ekspresyon seviyesi %46 oranında azalmıştır (*p<0.0132) (Şekil 4.7D).

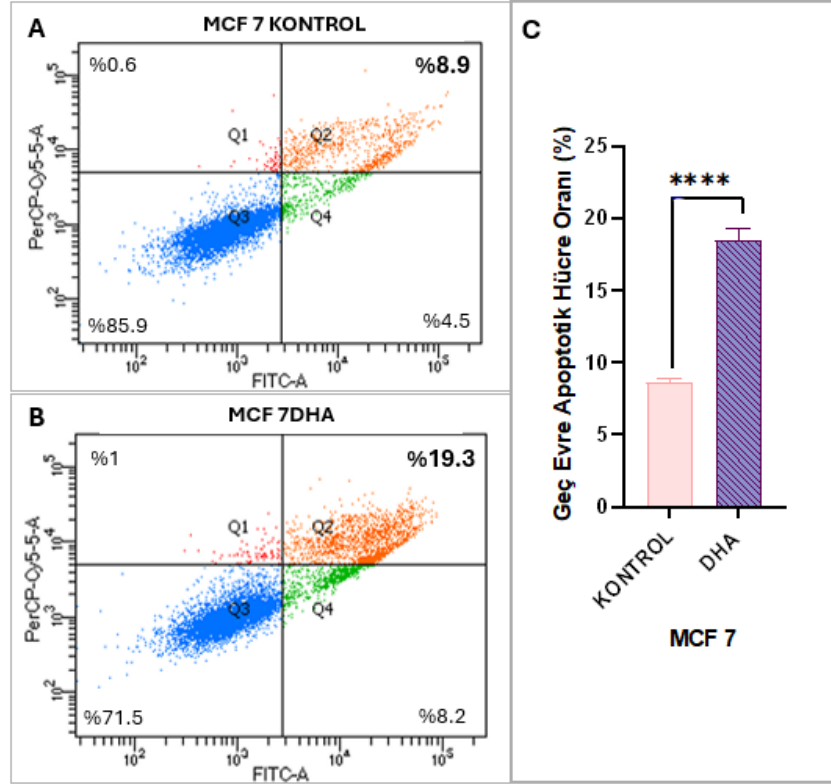


Şekil 4.7. MCF 7 parental kanser hücresinde, MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de; MDA MB 231 parental kanser hücresi ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de DHA ve kontrol gruplarında FASN geni relatif ekspresyon seviyeleri. (A) MCF 7 parental kanser hücresinde kontrol grubuna kıyasla DHA uygulanan grupta FASN gen ekspresyonunun kat değişimi (****p<0.0001). (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de kontrol grubuna kıyasla DHA uygulanan grupta FASN gen ekspresyonunun kat değişimi (****p<0.0001). (C) MDA MB 231 parental kanser hücresinde kontrol grubuna kıyasla DHA uygulanan grupta FASN gen ekspresyonunun kat değişimi (p= 0.2656). (D) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’de kontrol grubuna kıyasla DHA uygulanan grupta FASN gen ekspresyonunun kat değişimi (*p<0.0132).

4.6. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF-7, MDA-MB-231 Kanseri Hücrelerinde ve MCF-7 CD44⁺/CD24⁻, MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻ Kanseri Kök Hücrelerinde Apoptoz Oranlarının Flow Sitometri ile Belirlenmesi

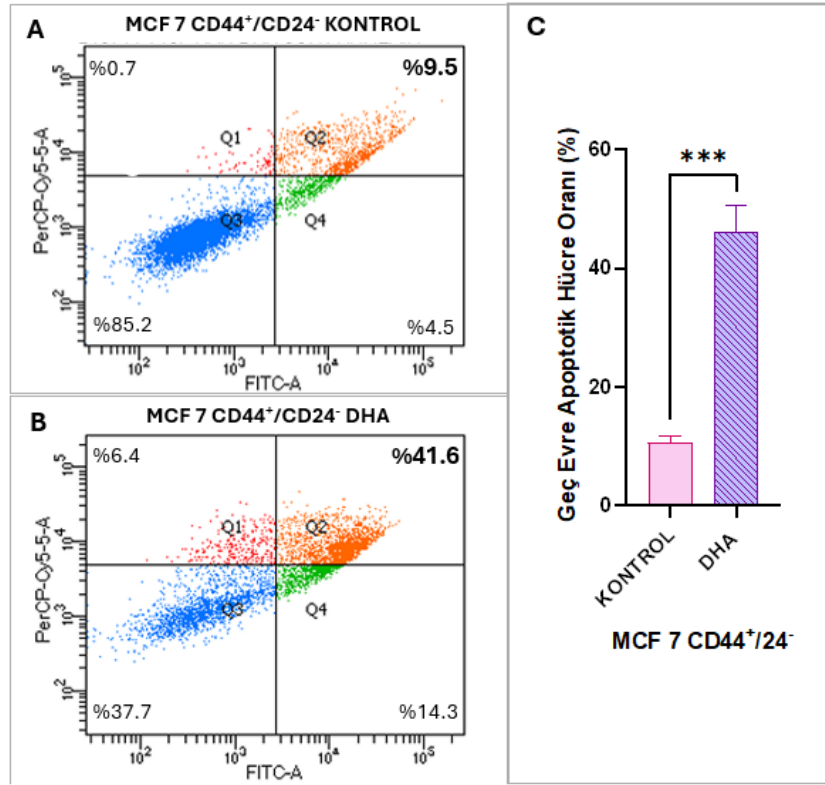
Tez çalışması kapsamında MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’ler 138. 5 µM DHA ile 24 saat boyunca; MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH’ler 305.7 µM DHA ile 48 saat

muamele edildi. Süre sonunda tüm DHA ile muamele edilen deney ve kontrol grupların apoptoz oranları flow sitometri ile belirlendi. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde geç evre apoptotik hücre oranı %19.3 iken kontrol grubunda %8.9'dur. Kontrol grubuna kıyasla apoptoz oranı istatistiksel olarak artmıştır (**** $p < 0.0001$)(Şekil 4.8A-C).



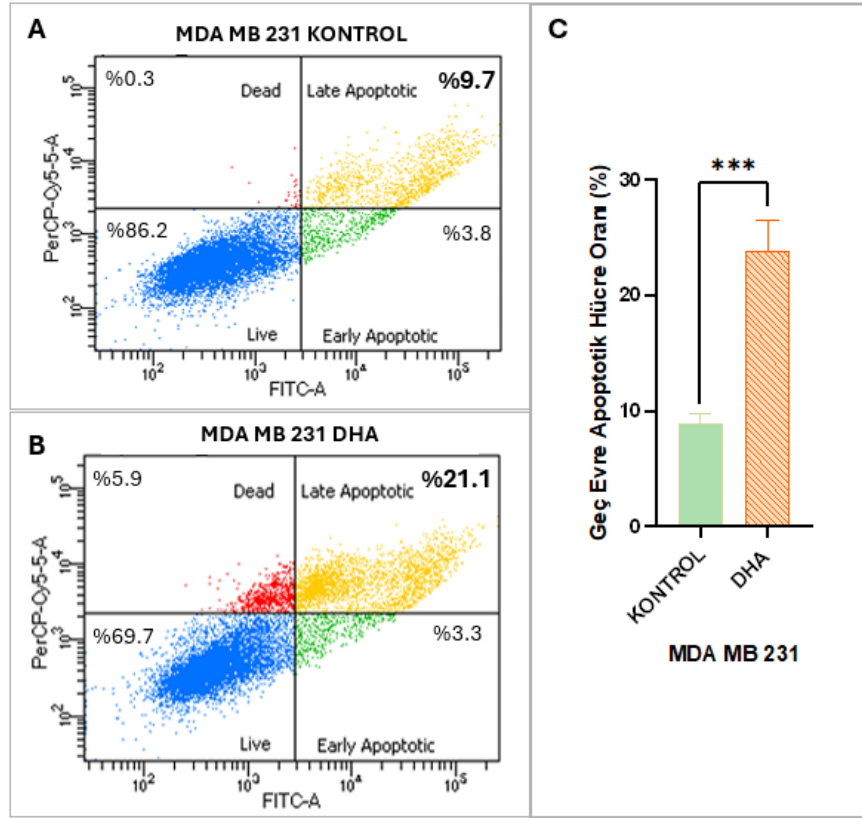
Şekil 4.8. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücrelerinde kontrol grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 parental kanser hücrelerinde DHA ile muamele edilen deney grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 parental kanser hücrelerinde DHA uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki geç evre apoptotik hücre oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (**** $p < 0.0001$).

MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA ile muamele edilen deney grubunda geç evre apoptotik hücre oranı %41.6 iken kontrol grubunda %9.5'tir. DHA ile muamele edilen deney grubunda kontrol grubuna kıyasla apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (*** $p = 0.0002$)(Şekil 4.9A-C).



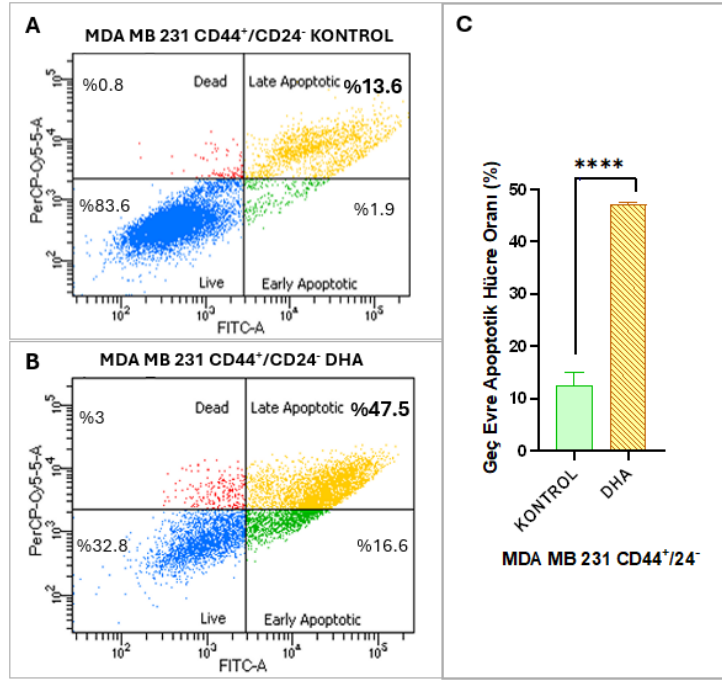
Şekil 4.9. DHA ile muamele edilen MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA ile muamele edilen deney grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki geç evre apoptotik hücre oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (**p=0.0002).

DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde geç evre apoptotik hücre oranı %21.1, kontrol grubunda ise %9.7'dir. DHA ile muamele edilen deney grubunda kontrol grubuna kıyasla apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (**p=0.0008)(Şekil 4.10A-C).



Şekil 4.10. DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde kontrol grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (B) MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde DHA ile muamele edilen deney grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (C) MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde DHA uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki geç evre apoptotik hücre oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (**p=0.0008).

MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda geç apoptotik hücre oranı %13,6 iken DHA ile muamele edilen deney grubunda geç evre apoptotik hücre oranı %47.5 olup istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (****p<0.0001) (Şekil 4.11A-C)



Şekil 4.11. DHA ile muamele edilen MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (B) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA ile muamele edilen deney grubunda geç evre apoptoz oranının flow sitometri analizi. (C) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki geç evre apoptotik hücre oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

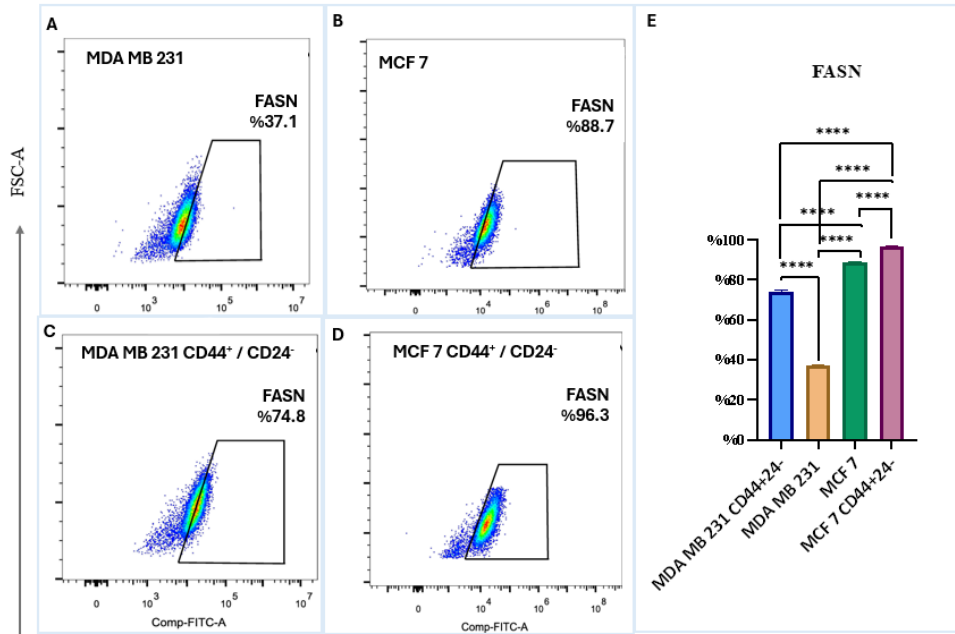
4.7. DHA ile Muamele Edilen ve Edilmeyen MCF 7, MDA MB 231, MCF 7 CD44⁺CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ Hücrelerinde FASN, p-AKT, p-NFκB Seviyelerinin Flow Sitometri Analizi

Tez çalışması kapsamında MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 138.5 µM DHA ile 24 saat boyunca; MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 305.7 µM DHA ile 48 saat muamele edildi. Süre sonunda tüm DHA ile muamele edilen deney ve kontrol gruplarında FASN, p-AKT, p-NFκB flow sitometri ile analiz edildi.

4.7.1. FASN

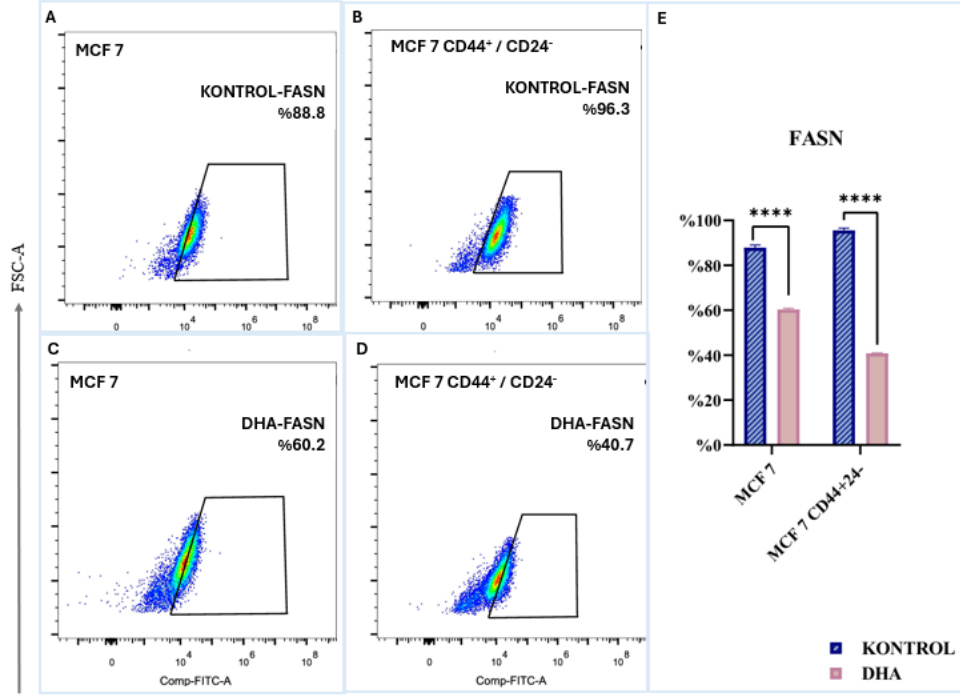
MCF7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında FASN seviyelerinin flow

sitometri analizine göre oranları sırasıyla %88.7, %37.1, %96.3, %74.8'dir (Şekil 4.12A-D). FASN seviyeleri karşılaştırıldığında MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001) (Şekil 4.12E). MCF 7 parental kanser hücresi ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH karşılaştırıldığında MKKH'lerde FASN seviyesi anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001) (Şekil 4.12E). MCF 7 parental kanser hücresinde FASN seviyesi MDA MB 231 hücre hattına ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ye kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001) (Şekil 4.12E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde MDA MB 231 parental kanser hücrelerine ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ye kıyasla FASN seviyesi istatistiksel olarak daha fazladır (****p<0.0001) (Şekil 4.12E).



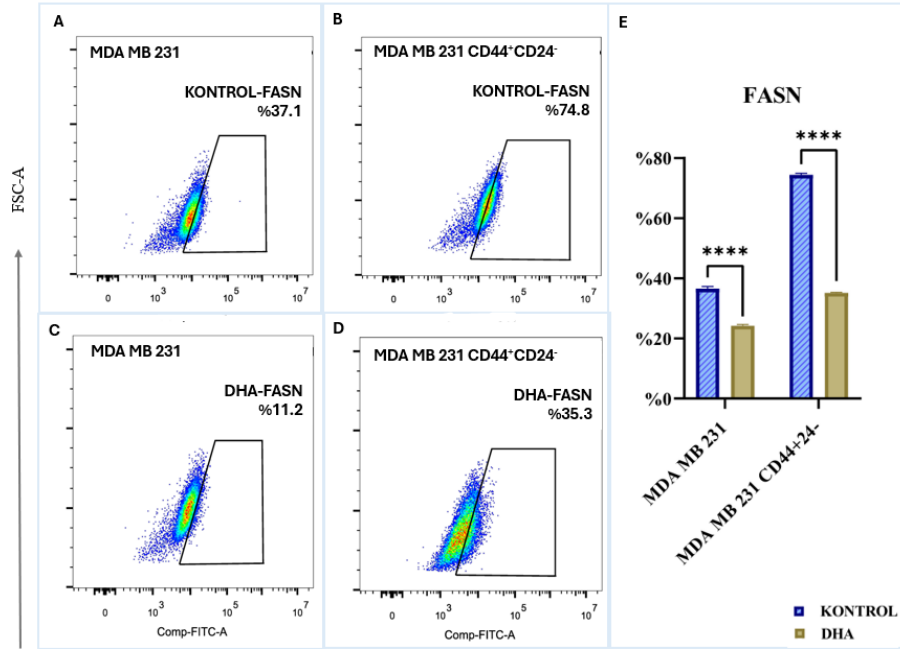
Şekil 4.12. MCF7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında FASN seviyelerinin flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MDA MB 231 parental kanser hücresi kontrol grubunda FASN seviyesinin flow sitometri analizi. (B) MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda FASN seviyesinin flow sitometri analizi. (C) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda FASN seviyesinin flow sitometri analizi. (D) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda FASN seviyesinin flow sitometri analizi. (E) MCF7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında FASN oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

Tez çalışması kapsamında MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 138.5 µM DHA ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra FASN seviyelerinin kontrol ve deney gruplarındaki flow sitometri analizine göre oranları MCF 7 ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında sırası ile %88.8 ve %96.3 DHA ile muamele edilen gruplarda ise %60.2 ve %40.7'dir (Şekil 4.13A-D). MCF 7 parental kanser hücresinde DHA uygulanan deney grubunda FASN seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.13E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda FASN seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.13E).



Şekil 4.13. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (D) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (E) MCF7 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

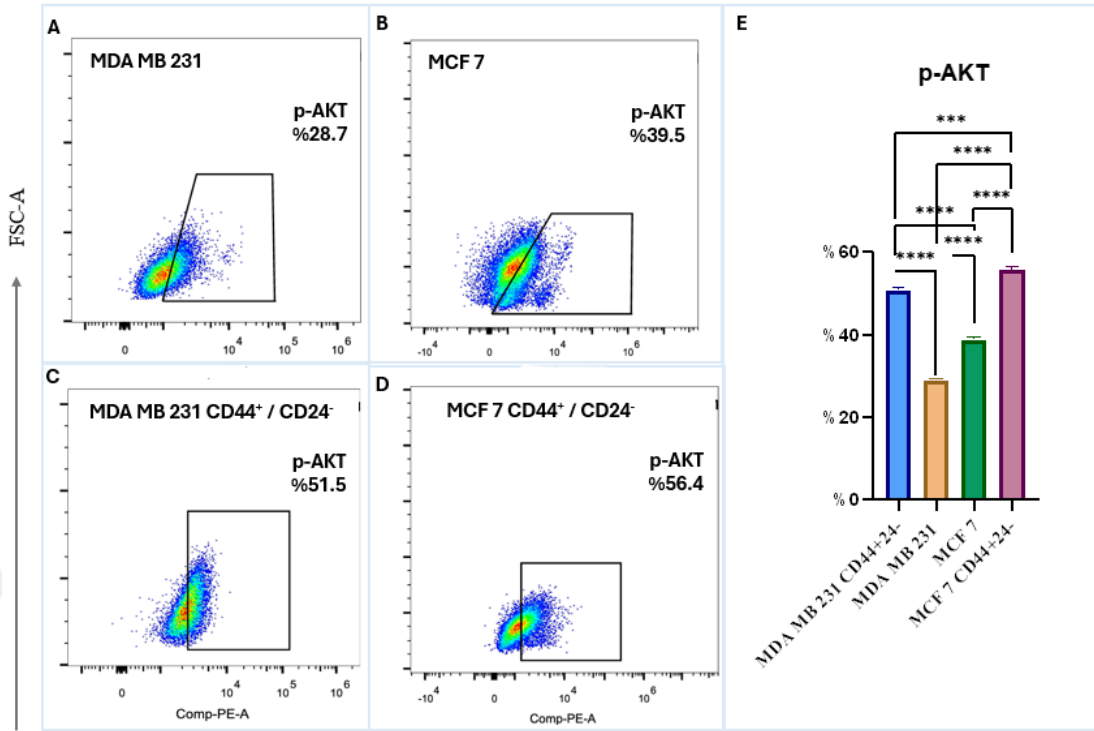
MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 305.7 µM DHA ile 48 saat muamele edildikten sonra DHA ile muamele edilen deney ve kontrol gruplarındaki FASN seviyelerinin kontrol ve deney gruplarındaki flow sitometri analizine göre oranları MDA MB 231 ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında sırası ile %37.1 ve %74.8 DHA ile muamele edilen gruplarda ise %11.2 ve %35.3'tür (Şekil 4.14A-D). MDA MB 231 parental kanser hücresinde DHA uygulanan deney grubunda FASN seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.14E). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda FASN seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.14E).



Şekil 4.14. DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MDA MB 231 parental kanser hücresi kontrol grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (B) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (C) MDA MB 231 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (D) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (E) MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

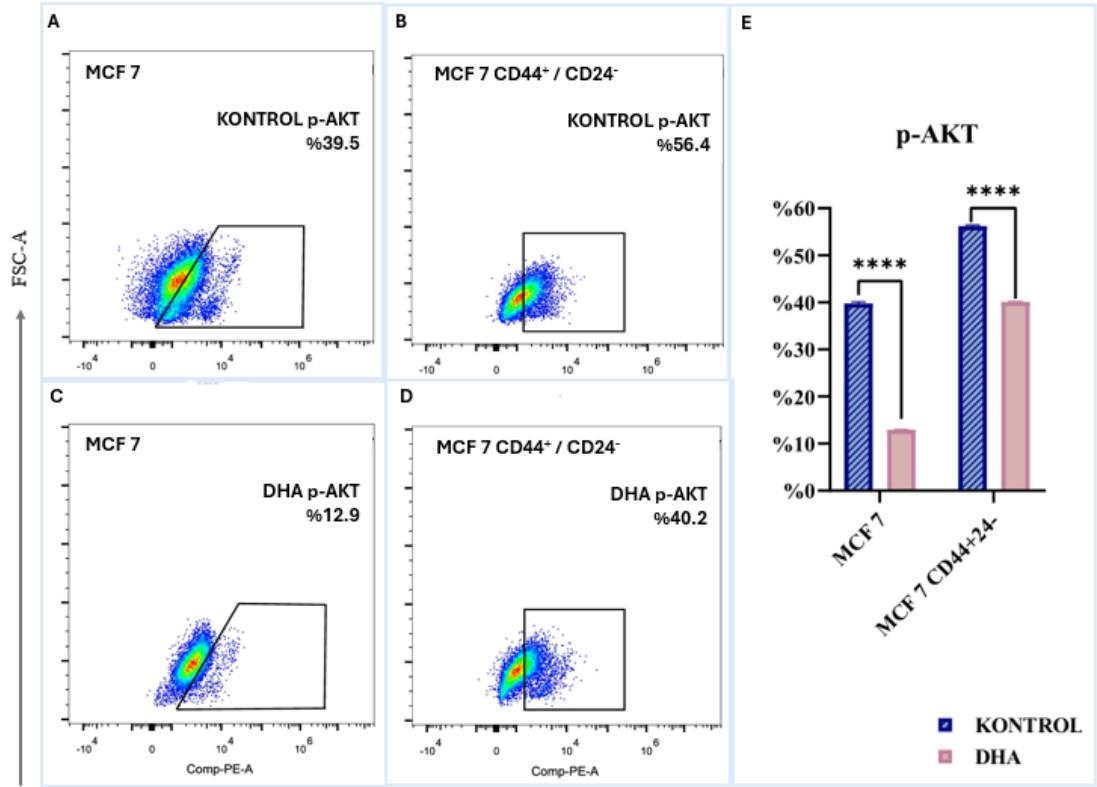
4.7.2. p-AKT

MCF7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında p-AKT seviyelerinin flow sitometri analizine göre oranları sırası ile %39.5, %28.7, %56.4, %51.5'tir (Şekil 4.15A-D). p-AKT seviyeleri karşılaştırıldığında MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001) (Şekil 4.15E). MCF 7 parental kanser hücresi ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH karşılaştırıldığında MKKH'lerde p-AKT seviyesi anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001) (Şekil 4.15E). MCF 7 parental kanser hücresinde p-AKT seviyesi MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001)(Şekil 4.15E). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de p-AKT seviyesi MCF 7 parental kanser hücrelerine kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001)(Şekil 4.15E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde p-AKT seviyesi MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ye kıyasla istatistiksel olarak daha fazladır (**p=0.0002)(Şekil 4.15E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla p-AKT seviyesi istatistiksel olarak daha fazladır (****p<0.0001)(Şekil 4.15E).



Şekil 4.15. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (D) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (E) MCF7 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında FASN oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

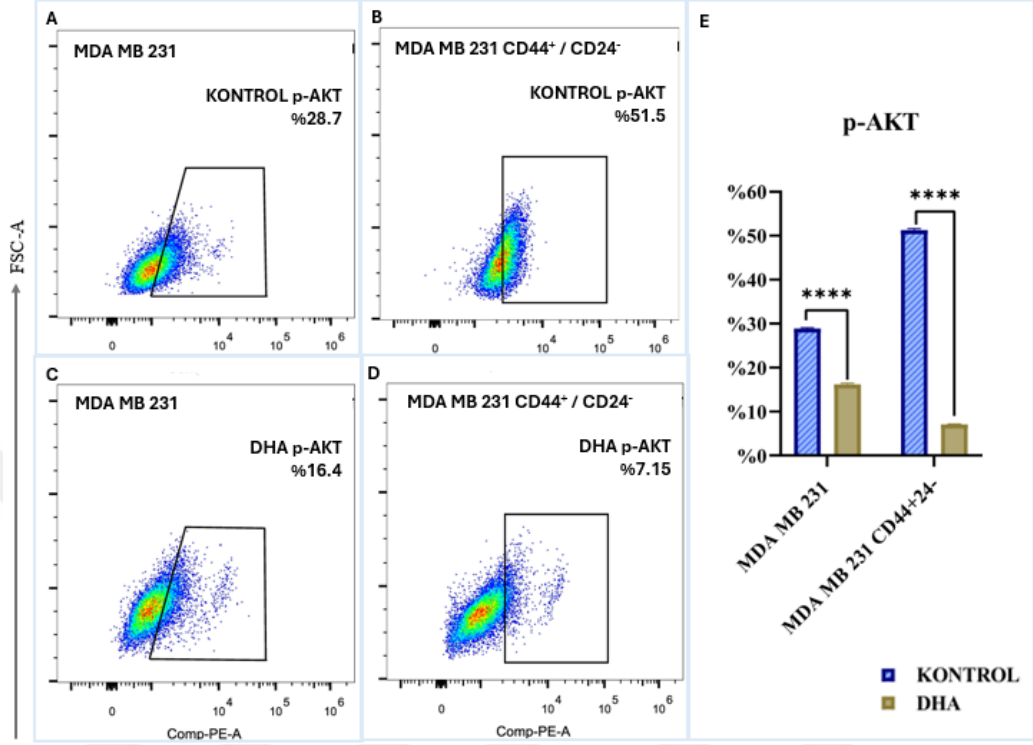
Tez çalışması kapsamında MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 138.5 μ M DHA ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra p-AKT seviyelerinin kontrol ve deney gruplarındaki flow sitometri analizine göre oranları MCF 7 ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında sırası ile %39.5 ve %56.4 DHA ile muamele edilen gruplarda ise %12.9 ve %40.2'dir (Şekil 4.16A-D). MCF 7 parental kanser hücresinde DHA uygulanan deney grubunda p-AKT seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.16E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda p-AKT seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.16E).



Şekil 4.16. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-AKT oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (D) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (E) MCF 7 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-AKT oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 305.7 µM DHA ile 48 saat muamele edildikten sonra DHA ile muamele edilen deney ve kontrol gruplarındaki p-AKT seviyelerinin kontrol ve deney gruplarındaki flow sitometri analizine göre oranları MDA MB 231 ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında sırası ile %28.7 ve 51.5 DHA ile muamele edilen gruplarda ise %16.4 ve %7.15'tir (Şekil 4.17A-D). MDA MB 231 parental kanser hücresinde DHA uygulanan deney grubunda p-AKT seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.17E). MDA MB 231

CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda p-AKT seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001) (Şekil 4.17E).

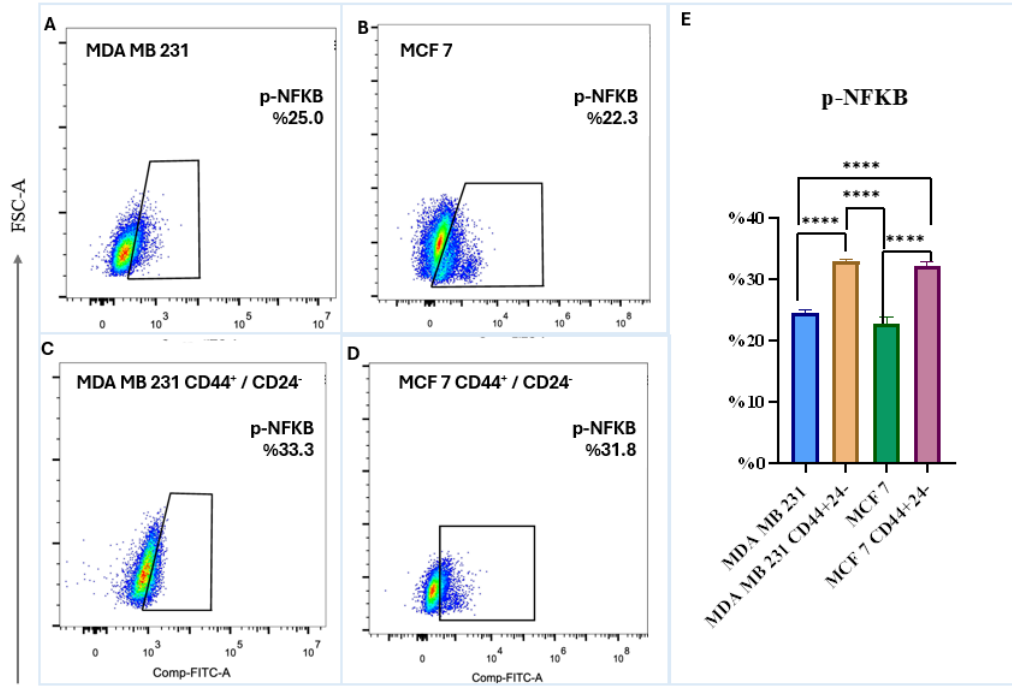


Şekil 4.17. DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-AKT oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MDA MB 231 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (B) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (C) MDA MB 231 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (D) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda p-AKT oranının flow sitometri analizi. (E) MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-AKT oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

4.7.3. p-NFκB

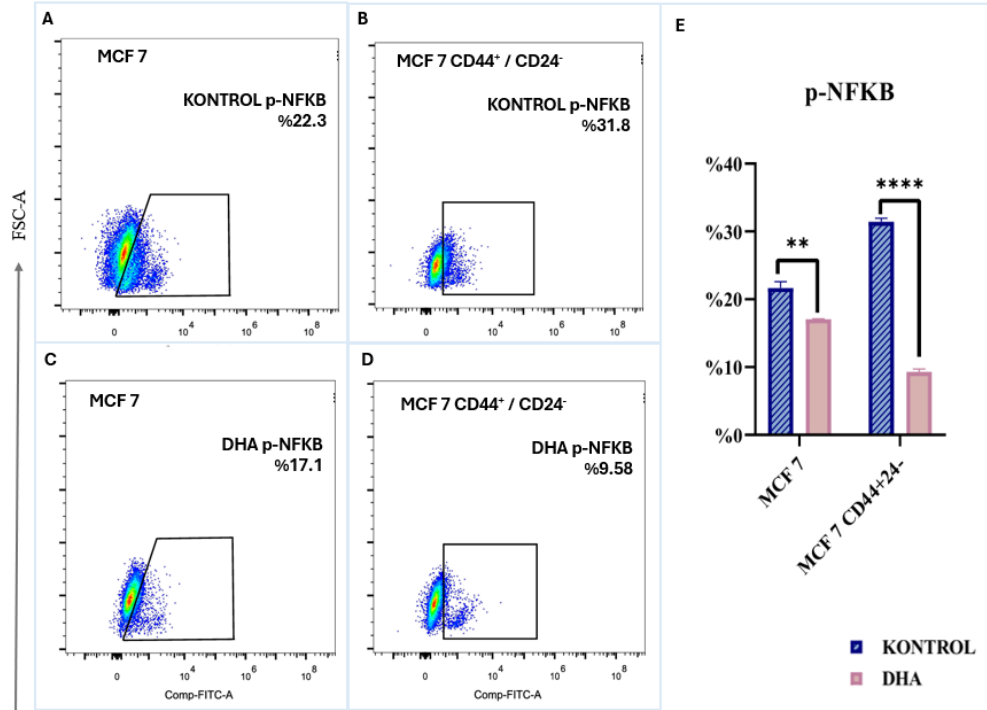
MCF7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında p-NFκB seviyelerinin flow sitometri analizine göre oranları sırası ile %22.3, %25.0, %31.8 ve %33.3'tür (Şekil 4.18A-D) p-NFκB seviyeleri karşılaştırıldığında MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de MDA MB 231 parental kanser hücresine kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001)(Şekil 4.18E). MCF 7 parental kanser hücresi ile MCF 7

CD44⁺/CD24⁻ MKKH karşılaştırıldığında MKKH'lerde p-NFκB seviyesi anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001)(Şekil 4.18E). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de p-NFκB seviyesi MCF 7 parental kanser hücresine kıyasla anlamlı olarak yüksektir (****p<0.0001)(Şekil 4.18E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de p-NFκB seviyesi MDA MB 231 parental kanser hücresine kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir (****p<0.0001)(Şekil 4.18E). MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde p-NFκB seviyeleri MCF 7 parental kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.0712). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de p-NFκB seviyesi MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lere kıyasla daha fazla olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir yoktur (p=0.6026).



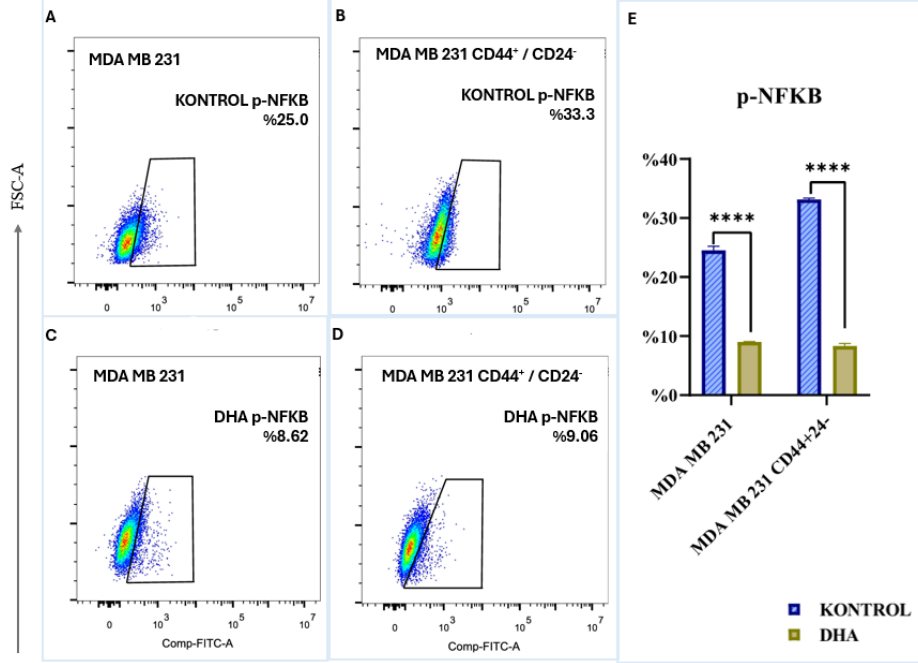
Şekil 4.18. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (D) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (E) MCF7 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

Tez çalışması kapsamında MCF 7 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 138. 5 µM DHA ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra p-NFκB seviyelerinin kontrol ve deney gruplarındaki flow sitometri analizine göre oranları MCF 7 ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında sırası ile %22.3 ve %31.8 DHA ile muamele edilen gruplarda ise %17.1 ve %9.58'dir (Şekil 4.19A-D). MCF 7 parental kanser hücresinde DHA uygulanan deney grubunda p-NFκB seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (**p=0.0047)(Şekil 4.19E). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda p-NFκB seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001)(Şekil 4.19E).



Şekil 4.19. DHA ile muamele edilen MCF 7 parental kanser hücrelerinde ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (B) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (C) MCF 7 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (D) MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda p-NFκB oranının flow sitometri analizi. (E) MCF 7 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NFκB oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler 305.7 μ M DHA ile 48 saat muamele edildikten sonra DHA ile muamele edilen deney ve kontrol gruplarındaki p-NF κ B seviyelerinin kontrol ve deney gruplarındaki flow sitometri analizine göre oranları MDA MB 231 ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol gruplarında sırası ile %25.0 ve %33.3 DHA ile muamele edilen gruplarda ise %8.82 ve %9.08'dir Şekil (4.20A-D). MDA MB 231 parental kanser hücresinde DHA uygulanan deney grubunda p-NF κ B seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001)(Şekil 4.20E). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda p-NF κ B seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (****p<0.0001)(Şekil 4.20E).



Şekil 4.20. DHA ile muamele edilen MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NF κ B oranlarının flow sitometri ve istatistiksel analizi. (A) MDA MB 231 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-NF κ B oranının flow sitometri analizi. (B) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH kontrol grubunda p-NF κ B oranının flow sitometri analizi. (C) MDA MB 231 parental kanser hücresi DHA ile muamele edilen deney grubunda FASN oranının flow sitometri analizi. (D) MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH DHA ile muamele edilen deney grubunda p-NF κ B oranının flow sitometri analizi. (E) MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde deney ve kontrol gruplarında p-NF κ B oranlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi (****p<0.0001).

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Meme kanseri en sık görülen ikinci kanser türü olup, kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır (WHO 2022, Erişim tarihi: 10 Mayıs 2024). Her ne kadar hayatta kalma oranları son yirmi yılda önemli ölçüde iyileşse de, bu hastalığın görülme sıklığı dünya çapında artmaya devam etmektedir (Hashim ve ark., 2016). Meme kanseri oluşumu, metastaz, ilaç direnci ve tümör nüksünden MKKH'lerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2020). Kanser kök hücrelerini hedef alan terapötik yaklaşımlar, aktif olarak çoğalan tümör hücrelerini öldürmeyi amaçlayan geleneksel tedavilere kıyasla daha etkili kanser tedavileri için büyük bir umut vaat etmektedir. Bu nedenle, KKH'leri hedefleyen tedaviler geliştirilmeden önce, bu hücre alt kümesinin belirlenmesi ve meme kanseri tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için KKH'lerin özellikleri ve bunların altında yatan moleküler mekanizmalarının araştırılması oldukça önemlidir.

Tamamen olgunlaşmış ve kendini yenileme ya da farklı hücre tiplerine dönüşme yeteneği olmayan dokular, kanser durumunda bu yeteneklerini yeniden kazanarak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına (proliferasyon) ve farklı fenotipik özellikler (fenotipik plastiklik) edinmesine yol açmaktadır. Bu özellikler, son zamanlarda tanınan kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir (Hanahan, 2022). Kanser son zamanlarda tanımlanan bu metabolik yeniden programlama özelliği, Warburg etkisi (artmış glikoliz/aerobik glikoliz) ve lipit düzensizliği (anormal lipogenez) gibi tümör için elverişli bir mikro çevre oluşturarak, onların hızlı büyümesini ve çoğalmasını desteklemektedir (Currie ve ark., 2013).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, KKH'nin plastik metabolik durumunun yalnızca tümör başlatma yeteneklerini yönetmekle kalmayıp aynı zamanda geleneksel tedavilere ve tümör nüksetmesine karşı dirençlerine de katkıda bulunduğunu

göstermektedir (Corominas-Faja ve ark., 2014; Peiris-Pagès ve ark., 2016). Bu nedenle, anormal kanser metabolizmasını hedeflemek, KKH'leri ortadan kaldırmak için yeni terapötik stratejiler geliştirilmesi için bir temel oluşturabilir. Şu ana kadar, özellikle kanser hücrelerinde glikoliz inhibisyonu üzerine yoğunlaşan glikoz metabolizması hedefli tedavilere birçok çaba harcanmıştır; ancak genel sonuçlar tatmin edici olmamıştır (Galluzzi ve ark., 2013). Glikoz metabolizmasının yanı sıra, lipid biyosentezinin (lipogenez) son zamanlarda KKH'lerin kendini yenileme ve hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Wang ve ark., 2022b). Bu bağlamda, endojen lipogenezi hedeflemek, heterojen kanser hücre popülasyonlarındaki KKH hücresel durumunu etkileyebilir. Ancak, KKH ile KKH olmayan hücreler arasında lipid metabolizmasında bir fark olup olmadığı hakkında çok az şey bilinmektedir. Ayrıca bugüne kadar, meme kanserinde lipid metabolizmasının rolü üzerine yapılan araştırmaların çoğunda, hastalığın heterojen doğasını dikkate alınmamış ve moleküler alt tiplerdeki lipid metabolizmasındaki değişiklikleri tanımlamaya yönelik çalışmalar oldukça azdır (Monaco, 2017). Bu bilgiler göz önüne alındığında tez çalışması kapsamında hem farklı meme kanseri alt tiplerinde hem de KKH ve parental kanser hücrelerde lipid metabolizmasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla meme kanserinin basal alt tipi TN meme kanserini temsil eden MDA MB 231 hücre hattı ve luminal A alt tipini temsil eden MCF 7 hücre hattı kullanılmıştır. Kanser kök hücrelerini izole etmek için kullanılan yaygın bir yöntem olan MACS ile literatürde sıklıkla kullanılan CD44 ve CD24 belirteçlerine göre MKKH'ler izole edilmiştir (de Beça ve ark., 2013; Ghanbari ve ark., 2016). MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lere ait hücre görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir. MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde MACS yöntemi ile izole edilen MKKH oranları sırası ile %4 ve %6 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.) Yapılan çalışmalarda MACS yöntemi ile MDA MB 231 hücre hattında %18.75, %9.97 ve >%80 oranlarında CD44⁺/CD24⁻ MKKH hücre popülasyonu izole edilirken MCF 7 hücre hattında <%10 oranında MKKH izole edildiği gösterilmiştir (Enciso-Benavides ve ark., 2021; Jang ve ark., 2012; Manupati ve ark., 2021). Çalışmamızın ve yapılan diğer çalışmalardaki sonuçların birbirinden farklılık göstermesinde laboratuvar koşullarının ve kullanılan hücrelerin pasaj

sayılarının etkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda bulduğumuz sonuçlarla paralel olarak MDA MB 231 parental kanser hücresinin MCF 7 parental kanser hücresine kıyasla nispeten daha fazla KKH popülasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Crocker, 2009).

Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek balık yağı tüketiminin meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olduğunu ve balık yağlarında bulunan n-3 ÇDYA olan DHA'nın anti-kanser etkileri olduğu göstermektedir (Zheng ve ark., 2013). n-3 ÇDYA'ların anti-proliferatif etkisi için çeşitli mekanizmalar önerilmektedir (Liu ve Ma, 2014). Bunlar arasında eikosanoid oluşumundaki değişiklikler, serbest radikaller tarafından başlatılan lipit peroksidasyonu, sitotoksik lipit damlacıklarının birikimi ve gen ekspresyonu paternlerindeki spesifik değişiklikler yer almaktadır (Deshpande ve ark., 2013; Finstad ve ark., 2000; Kacik ve ark., 2014; Liu ve Ma, 2014; Stoll, 2002). Bununla birlikte, n-3 ÇDYA'ların meme kanseri hücrelerinin büyümesini tam olarak nasıl engellediği anlaşılmamış olsa da bu yağ asitlerinin hücre zarının akışkanlığını ve yapısını değiştirebileceği öne sürülmektedir. Plazma zarının yapısal özelliklerindeki bu değişikliklerin, iyon kanalları, taşıyıcılar, reseptörler, sinyal yolları veya enzim olarak işlev gören proteinlerin aktivitesini değiştirebilmektedir (de Pablo ve Alvarez de Cienfuegos, 2000; Menéndez ve ark., 2006). Bu bağlamda DHA'nın moleküler etki mekanizmalarının daha detaylı incelenmesi amacıyla 3:1 oranında BSA ile konjuge edildikten sonra MCF7 ve MDA MB 231 parental kanser hücreleri sırasıyla (0-200 μ M) ve (0-400 μ M) konsantrasyon aralığında BSA-DHA ile sırasıyla 24 ve 48 saat boyunca muamele edilerek hücre canlılığı ölçüldü. Farklı konsantrasyon aralıklarında BSA-DHA ile muamele edilen MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde IC50 konsantrasyonu sırasıyla 138.5 μ M ve 305.7 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.3). MCF 7 parental kanser hücreleri ile kıyaslandığında MDA MB 231 parental kanser hücreleri DHA'ya karşı daha az duyarlıdır. Yapılan çalışmalara bakıldığında MCF 7 ve MDA MB 231 kanser hücre hatlarında (0-200 μ M), (0-320 μ M gibi) çeşitli konsantrasyon aralıklarında DHA uygulaması yapılarak hücre canlılığı ölçülmüş ve sırasıyla MCF 7 hücre hattı için IC50 konsantrasyonu 20,2 μ M, MDA MB 231 hücre hattı için yaklaşık olarak >200 μ M; MCF 7 hücre hattı için IC50 konsantrasyonu 200 μ M ve MDA MB 231 hücre hattı için 280 μ M için olarak belirlenmiştir (Kang ve ark., 2010; Mansara ve ark., 2015).

Çalışmalar arasında belirlenen konsantrasyonlardaki farklılıklara hücrelerin farklı laboratuvar ortamlarındaki çoğaltılma koşulları, hücre kültüründe uygulanan DHA formu, çözdürüldüğü kimyasal ve hücreye uygulama yönteminin sebep olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda görülen göreceli etkinlik farkı, muhtemelen DHA'nın kanser hücrelerine nasıl verildiğine bağlıdır; çünkü bazılarında BSA'ya bazılarında ise yağdan arındırılmış endotoksin içermeyen BSA'ya konjuge edilerek ya da etanol içinde çözünerek verilmektedir (Ewaschuk ve ark., 2012; Lee ve ark., 2014; Mansara ve ark., 2015). Etanol içinde çözünen yağ asitleri proteine bağlı değildir ve meme kanseri hücrelerine inkorporasyon için daha kolay erişilebilir, bu da sitotoksik etkiler oluşturabilmektedir (Schaffer, 2003). Ayrıca, yağ asitleri düşük çözünürlükleri nedeniyle genellikle BSA gibi albüminlerle kompleks halindeyken çalışmaktadır. Lipitlerin albüminle konjugasyonu, YA/BSA çözeltilerinin hazırlanmasında kritik bir adımdır. Ayrıca sıcaklık, zaman ve YA oranlarındaki değişiklikler, biyolojik aktiviteyi değiştirebilmektedir (Oliveira ve ark., 2015). Lipit/albümin konjugasyonu sırasında YA:BSA oranları, YA'nın kullanılabilirliğini belirler ve genellikle YA:BSA oranları 1:1 ile 3:1 arasında değişmektedir (Kleinfeld ve ark., 1996). Bununla birlikte albümin saflığı, lipit bağlanmasını ve kullanılabilirliğini doğrudan etkilediği için dikkate alınması gereken ana özelliktir. Bu nedenle kullanılan BSA'daki farklı safsızlıklar, eklenen yağ asitlerinin BSA'ya bağlanmasını modüle edebilmektedir (Oliveira ve ark., 2015; Spector, 1975). Örneğin, daha az saflaştırılmış BSA örneklerinde bulunan kontaminant sığır yağ asitleri, albüminin hidrofobik boşlukları için eklenen lipitlerle rekabet ederek bu endojen yağ asitleri kendileri biyolojik etkiler yaratabilmektedir (Saifer ve Goldman, 1961). Bu nedenle DHA'nın hücre dışı ortamda biyoyararlanımını artırmak ve hücrelere ulaşımı için ideal bir taşıma koşulu sağlamak amacıyla 3:1 oranında DHA yağ asidi içermeyen BSA ile konjuge edilmiştir. DHA'nın etkinliği ile birlikte kanser kök hücrelerin tedaviye karşı direncinin karşılaştırılması ve optimizasyonu için MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde belirlenen IC50 konsantrasyonu ile muamele edilmiştir. MCF 7, MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney gruplarında koloni oluşumu kontrol gruplarına kıyasla azalmıştır (Şekil 4.4). Aynı konsantrasyonlarda uygulanan

DHA'nın MCF 7 parental kanser hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla deney grubunda koloni oluşumunda anlamlı bir azalmaya yol açmakla birlikte MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de koloni oluşumunun azalmasında daha etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.5). Aynı şekilde MDA MB 231 parental kanser hücreleri ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulaması ile koloni oluşumu azalmakla birlikte MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA koloni oluşumunu daha etkili bir şekilde azaltmaktadır (Şekil 4.5.). Yapılan bir çalışmada 60 µM DHA, hepatoma kanser hücre hattından izole edilen EpCAM⁺CD133⁻ kanser kök hücrelerinde ve EpCAM⁺CD133⁻ parental kanser hücrelerinde sitotoksosite göstermekle birlikte parental kanser hücreleri kanser kök hücrelere kıyasla daha duyarlıdır (Yang ve ark., 2018). Kolorektal kanser hücre hattında yapılan başka bir çalışmada sferoid oluşturularak kanser kök hücre grubu izole edilmiş ve 10-70 µM konsantrasyon aralığında yapılan DHA uygulaması ile proliferasyonun azaldığı ve aynı konsantrasyon aralığında yapılan uygulamanın adherent hücrelerde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Yang ve ark., 2013). Literatürde meme kanserinde DHA'nın parental kanser hücrelerinde etkisine bakan çalışmalar mevcut olsa da meme kanserinde CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler izole edilerek parental hücrelere kıyasla DHA'nın etkileri ilk kez gösterilmiştir (Chamras ve ark., 2002; Hwang ve ark., 2017; Pizato ve ark., 2019). Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre DHA'nın MKKH'lerde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Parental kanser hücrelerinin DHA'ya daha az duyarlı olmasının sebeplerinden birinin parental kanser hücre popülasyonu içerisindeki pluripotent hücrelerin olabileceği düşünülmektedir.

Metabolik değişiklikler, kanser hücreleri ve KKH'lerin olumsuz bir çevrenin etkilerinden kaçınmasının başlıca yollarından birini temsil etmektedir. Yeniden programlanmış metabolik yollar arasında, lipid metabolizması KKH'lerin büyük ölçüde bağımlı olduğu temel bir yoldur (Visweswaran ve ark., 2020). Ancak hala kanser kök hücre ve parental kanser hücreler arasında bu yoldaki farklılıklar belirsizliğini korumaktadır (Luo ve ark., 2021). Bu doğrultuda çalışmamızda meme kanserinin farklı alt tiplerini temsil eden MDA MB 231 ve MCF 7 parental kanser hücreleri ile bu parental kanser hücrelerinden CD44⁺/CD24⁻ belirteçlerine göre izole edilen MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde ilk kez

lipit metabolizmasında anahtar bir rol oynayan FASN'nin farklı meme kanseri alt tiplerinde parental kanser hücreleri ile MKKH'ler arasındaki ekspresyon farklılıkları gösterilmiştir. FASN gen ekspresyonu MCF 7 parental hücrelerine kıyasla MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde 1,31 kat artarak anlamlı bir şekilde yukarı regülasyon göstermektedir (Şekil 4.5A). MDA MB 231 parental kanser hücrelere kıyasla ise MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde anlamlı bir artış göstermese de 1,24 kat yukarı regüle olmaktadır (Şekil 4.5B). Her iki meme kanseri alt tipinde de MKKH'lerde FASN gen ekspresyonu artış göstermekle birlikte MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu bulgular MKKH'lerinin artmış lipogenez ile karakterize anormal lipit metabolizmasına sahip olduğu fikrini desteklemektedir. DHA uygulanan MCF 7 parental kanser hücresinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde FASN geni relatif ekspresyon seviyesi %44 oranında azalmaktadır (Şekil 4.6A). MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde DHA uygulanan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla FASN geni relatif ekspresyon seviyesi %26 oranında anlamlı bir azalma göstermektedir (Şekil 4.6B). MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde DHA uygulanan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla FASN relatif gen ekspresyonu %8 oranında azalma eğilimindedir (Şekil 4.6C). DHA uygulanan MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde FASN geni relatif ekspresyon seviyesi %46 oranında azalmaktadır (Şekil 4.6D). Gen düzeyinde FASN ekspresyon seviyelerine bakmak, genin transkripyonel aktivitesini anlamak için faydalı olabilir, ancak gen düzeyindeki ekspresyon, proteinin miktarını ve işlevini doğrudan yansıtmayabilir çünkü birçok faktör (translasyonel düzenleme, post-translasyonel modifikasyonlar, vb.) protein seviyelerini etkileyebilir bu da gerçek biyolojik fonksiyonunun tam olarak yansıtılamamasına sebep olabilmektedir (Lubman ve ark., 2022). Bu nedenle, gen düzeyindeki bulduğumuz değişiklikler doğrultusunda FASN seviyelerindeki değişimler flow sitometri ile protein düzeyinde de değerlendirilmiştir. FASN seviyeleri oranları flow sitometri analizi sonuçlarına göre MCF7 ve MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde sırasıyla %88.7, %37.1, %96.3 ve %74.8'dir (Şekil 4A-D). Sonuçlar, FASN seviyelerinin MCF 7 parental kanser hücrelerinde MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla literatürde yapılan

çalışmalarla uyumlu olarak daha fazla olduğunu göstermektedir (Menendez ve ark., 2004). Östrojenler ve büyüme faktörleri gibi hormonlar, FASN ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır özellikle FASN, ER ve HER2 arasında yakın bir ilişki mevcuttur (Santolla ve ark., 2012; Yan ve ark., 2014). Bu nedenle sonuçlar literatürle uyumlu olarak ER+ olan Luminal A meme kanseri alt tipini temsil eden MCF 7 parental kanser hücresinde hormon reseptörleri negatif olan TN meme kanserini temsil eden MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla FASN düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler sırasıyla MDA MB 231 ve MCF 7 parental kanser hücreleri ile kıyaslandığında MKKH'lerde FASN düzeyleri anlamlı bir şekilde artış göstermektedir (Şekil 4E). Bu sonuçlar KKH'lerin metabolik plastisitesi nedeniyle tümör oluşumu ve metastazdaki metabolik yeniden programlamanın önemi göz önüne alındığında MKKH'lerin canlılığının sürdürülmesinde endojen yağ üretimini DNL ve bu yoldaki FASN düzeylerini artırarak yaptığını düşündürmektedir. DHA uygulaması ile FASN seviyelerinin flow sitometri analizi sonuçlarına bakıldığında; MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda FASN düzeyi %88.8 iken DHA uygulanan grupta %60.2, MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda %96.3 iken DHA uygulanan deney grubunda %40.7, MDA MB 231 parental kanser hücresinde kontrol grubunda %37.1, DHA uygulanan deney grubunda %11.2 MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de kontrol grubunda %74.8 DHA uygulanan deney grubunda ise %35.3'dür (Şekil 4.13A-D; Şekil 4.14A-D). Sonuçlara göre DHA, lipojenik yolda görev alan FASN düzeylerini kontrol grubuna kıyasla hem MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde hem de MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler ile MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde etkili bir şekilde azaltmaktadır (Şekil 4.13E; Şekil 4.14E). Dokosaheksaenoik asitin anti-inflamatuar, anti-anjiyogenik ve antiproliferatif özelliklere sahip olduğu ve bu özelliklerin tümünün antikanser etkisine katkıda bulunabileceği bilinmektedir (Kang ve Liu, 2013). Aynı zamanda DHA'nın MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde anti-kanser etkilerine odaklanan çalışmalar mevcuttur ancak bu tez çalışması, DHA'nın MKKH'deki lipogenezi aşağı regüle ederek daha farklı mekanizmalar yoluyla antikanser etki gösterebileceğini düşündürmektedir (Corsetto ve ark., 2011; Schley ve ark., 2005). Meme kanserinde

hücresinin hayatta kalmasını sağlayan sinyal iletim yolu olan fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt sinyal yolunun kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını ve kanser hücrelerinde FASN ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (Vivanco ve Sawyers, 2002; Wang ve ark., 2005). Bu bilgiler göz önüne alındığında flow sitometri analizi sonuçlarımıza göre p-AKT seviyeleri oranları MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde sırasıyla %39.5, %28.7, %56.4, %51.5'tir (Şekil 4.15A-D). p-AKT seviyelerinin MCF 7 parental kanser hücrelerinde MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak daha fazladır (Şekil 4.15 E). Diğer taraftan MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler sırasıyla MDA MB 231 ve MCF 7 parental kanser hücreleri ile kıyaslandığında MKKH'lerde p-AKT düzeylerinde anlamlı artış olduğu gösterilmektedir (Şekil 4.15E). FASN seviyelerindeki değişimin p-AKT oranlarındaki değişimin ile benzer olması sonuçların literatürle uyumlu olarak PI3K/Akt sinyal yolağının FASN ekspresyonunu modüle ettiğini göstermektedir (Wang ve ark., 2014). Bu etki mekanizması aktive olmuş PI3K/Akt'nin, lipogenezle ilgili genleri kontrol eden SREBP-1c'nin, FASN promotorundaki SREBP bağlanma bölgesine bağlanmasını uyarak FASN transkripsiyonunu teşvik etmesinden kaynaklanabilir (Porstmann ve ark., 2008). DHA uygulaması ile p-AKT seviyelerinin flow sitometri analizi sonuçlarına bakıldığında; MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-AKT düzeyi %39.5 iken DHA uygulanan grupta %12.9, MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda %56.4 iken DHA uygulanan deney grubunda %40.2, MDA MB 231 parental kanser hücresinde kontrol grubunda %28.7, DHA uygulanan deney grubunda %16.4 MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de kontrol grubunda %51.5 DHA uygulanan deney grubunda ise %7.15'tir (Şekil 4.16A-D; Şekil 4.17A-D). DHA uygulanan deney gruplarında p-AKT düzeyleri kontrol grubuna kıyasla hem MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde hem de MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler ile MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde etkili bir şekilde azalmaktadır (Şekil 4.16 E; Şekil 4.17 E). Bu sonuçlar göz önüne alındığında FASN'nin inhibe olmasının p-AKT aktivitesini nasıl azalttığı net olarak bilinmese de bir olası açıklama, FASN inhibisyonunun membran fosfolipit seviyelerinde dengesizlik yaratabileceği ve bunun sonucunda AKT'nin membrana

lokalizasyonunun ve aktivasyonunun azalabileceğidir. Bu durumu destekleyen birkaç kanıt vardır. İlk olarak, lipit sallarını membran mikrodalanlarıdır ve hücre sinyalleme için platform olarak hizmet ederler (Sargiacomo ve ark., 1993). Lipit sallarını bozulduğunda, AKT'nin fosforilasyonu inhibe edilir ve hücre hayatta kalması azalmaktadır (Hill ve ark., 2002; Zhuang ve ark., 2002). İkinci olarak, sürekli aktif AKT serin 473 kinaz aktivitesinin plazma membran sallarında bulunduğ, lipit sallarının AKT sinyal iletimindeki rolünü işaret etmektedir (Hill ve ark., 2002). Son olarak, FASN'nin, membran mikrodalanlarına (raft agregatlarına) ayrılan fosfolipitlerin sentezini yönlendirdiğ gösterilmiştir (Swinnen ve ark., 2003). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada DHA'nın, lipit salı ve plazma membran mikrodalanlarının kritik bir bileşeni olan kolesterol ile uyumsuzluğ nedeniyle, lipit salının hücre yüzeyindeki seviyelerini azaltarak, Akt gibi lipit salı ile ilişkili proteinlerin seviyelerini düşürmesi ile antikanser etkilerinin olduğ gösterilmiştir (Lee ve ark., 2014). Yapılan başka bir çalışmada Akt'nin aktivasyon için plazma membranına taşınması gerektiğinden, DHA'ya maruz kaldıktan sonra tümör hücre membranında n-3 yağ asitlerinin zenginleşmesinin, aktivasyon için membrana yönlendirilen Akt gibi sinyal moleküllerinin aktivasyonunu etkileyerek azaltılmış Akt fosforilasyonu sonucu, hem p50 hem de p65 içeren NFκB'nin DNA bağlama aktivitesini azalttığını; DHA'nın neden olduğ Akt fosforilasyonu ve NFκB aktivitesindeki azalmalar sonucunda da DHA'nın meme kanseri hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını azalttığını göstermişlerdir (Schley ve ark., 2005). Ayrıca yapılan çalışmalarda DHA'nın SREBP-1c ekspresyonunu çeşitli mekanizmalarla azalttığ gösterilmekle birlikte son kanıtlar, PI3K/Akt'nin lipit metabolizmasının ana transkripsiyonel düzenleyicileri olan SREBP'leri etkinleştirdiğini göstermektedir (Deng ve ark., 2015; Howell ve ark., 2009; Krycer ve ark., 2010). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda DHA, lipit salı ve plazma membran mikrodalanlarının kritik bir bileşeni olan kolesterol ile uyumsuzluğ nedeniyle, lipit salı yapılarında bozulmalara yol açarak Akt'nin membrana lokalizasyonunu ve aktivasyonunu engellenmesi ile AKT'nin inhibisyonuna yol açarak SREBP-1c'nin aktivitesinin baskılanması sonucu FASN ekspresyonunu azalttığ düşünülmektedir. Akt, NFκB gibi prosurvival transkripsiyon faktörlerini aktive ederek dolaylı yoldan hücre hayatta kalmasını teşvik edebilmektedir. NFκB, hücreleri apoptozdan koruma

ve hücre büyümesini teşvik etme rolü oynayarak prosurvival ve anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir (Nicholson ve Anderson, 2002). Diğer taraftan yapılan çalışmalar FASN'nin homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) DNA çift sarmallı kopma onarım aktivitesindeki artışlara aracılık etmede bir rol belirlediğini ve bu mekanizmanın NFκB'nin inhibisyonunu içerdiğini göstermiştir (Wu ve ark., 2016). Çalışmamızda flow sitometri analizine göre p-NFκB oranları MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻, MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde sırasıyla %22.3, %25.0, %31.8, %33.3'tür (Şekil 4.18 A-D). MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH ve MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler sırasıyla MDA MB 231 ve MCF 7 parental kanser hücreleri ile kıyaslandığında MKKH'lerde p-NFκB düzeylerinde anlamlı artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.18 E). Meme kanseri de dahil olmak çeşitli malignitelerin KKH'lerinde NFκB yolunun tercihli olarak aktive edildiği gösterilmiştir (Garner ve ark., 2013; Liu ve ark., 2007; Murohashi ve ark., 2010). Çeşitli çalışmalar, MKKH'lerin KKH fenotipe sahip olmayan hücrelere (örneğin, CD44⁺/CD24⁺ hücreler) kıyasla önemli ölçüde daha yüksek NFκB aktivitesi sergilediğini göstermektedir (Murohashi ve ark., 2010; Shipitsin ve ark., 2007). Meme kanser kök hücrelerinde NFκB aktivitesi, CD24 proteininin yokluğuyla orantılı görünmektedir. Örneğin, CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde CD24'ün eksojen ifadesinin NFκB sinyalini inhibe edebildiği ve böylece MKKH proliferasyonunu etkilediği bulunmuştur (Ju ve ark., 2011). Elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki sonuçları desteklediği görülmekle birlikte bu sonuçlar, NFκB yolunun MKKH'lerde aktif olduğunu ve bu aktivasyonun kök hücre popülasyonuna belirli avantajlar sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ancak MKKH'lerde NFκB'nin lipid metabolizmasındaki görevlerinin daha ayrıntılı araştırılmasına ihtiyaç vardır. DHA uygulaması ile p-NFκB seviyelerinin flow sitometri analizi sonuçlarına bakıldığında; MCF 7 parental kanser hücresi kontrol grubunda p-NFκB düzeyi %22.3 iken DHA uygulanan grupta %17.1, MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde kontrol grubunda %31.8 iken DHA uygulanan deney grubunda %9.58, MDA MB 231 parental kanser hücresinde kontrol grubunda %25.0, DHA uygulanan deney grubunda %8.62 MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'de kontrol grubunda %33.3 DHA uygulanan deney grubunda ise %9.06'dır (Şekil 4.19A-D; Şekil 4.20A-D). DHA uygulanan deney gruplarında p-NFκB düzeyleri

kontrol grubuna kıyasla hem MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerinde hem de MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'ler ile MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde etkili bir şekilde azalmaktadır (Şekil 4.19 E; Şekil 4.10 E). HT29 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, DHA'nın NFκB ve COX-2 promotör aktivitelerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Shin ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada DHA'nın meme kanserinde Akt fosforilasyonu azaltarak ve bunun sonucunda hem p50 hem de p65 içeren NFκB'nin DNA bağlanma aktivitesini azaltarak hücre proliferasyonunu azaltıp apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Schley ve ark., 2005). Meme kanserinde yapılan başka bir çalışmada ise, MDA-MB-231 hücrelerinde DHA uygulamasının NF-κB ekspresyonunu ve NF-κB'nin nükleer translokasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Yun ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak elde edilen sonuçlarda DHA'nın p-NFκB düzeylerini etkili bir şekilde azalttığı gözlemlenmektedir. Flow sitometri apoptoz sonuçlarımızda MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücreleri ile MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde sırasıyla kontrol gruplarında geç evre apoptotik hücre oranı %8.9, %9.7, %9.5 ve %13,6 iken DHA uygulanan deney gruplarında geç evre apoptotik hücre oranı %19.3, %21.1, %41.6, %47.5'tir (Şekil 4.8A-C; Şekil 4.9A-C; Şekil 4.910A-C; Şekil 4.11A-C). Sonuçlar, DHA'nın tüm deney gruplarında hücrelerde proliferasyonu bozarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve bu etkisinin Akt ve NFκB fosforilasyonunu azaltmasından kaynaklanıyor olabileceğini göstermektedir (Schley ve ark., 2005). Bununla birlikte sonuçlarımız FASN'nin yukarı akışındaki Akt, NFκB gibi sinyal yollarının inhibe olması dolaylı yoldan FASN düzeylerini azaltarak hücre içi de novo lipogenezin ihbasyonuna yola açması ile apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu da düşündürmektedir. Ayrıca apoptotik hücre oranlarına bakıldığında DHA uygulanan MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerde MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla apoptoz oranının çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar Şekil 4.5'e bakıldığında DHA uygulamasının MCF 7 CD44⁺/CD24⁻ ve MDA MB 231 CD44⁺/CD24⁻ MKKH'lerin MCF 7 ve MDA MB 231 parental kanser hücrelerine kıyasla koloni oluşturma kapasitelerini daha fazla inhibe ettiği sonuçlarıyla tutarlıdır. Daha önce bahsedildiği gibi DHA'nın MKKH'lerde daha fazla geç evre apoptotik hücre ölümüne yol

açmasının sebeplerinden birinin parental kanser hücre popülasyonu içerisindeki daha dirençli pluripotent hücrelerin olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında bu çalışmada, omega-3 yağ asiti olan DHA'nın MKKH'lerde FASN'nin ekspresyonunu baskılamada etkili olduğunun ve hücre büyümesini in vitro olarak azaltabildiğinin gösterilmiştir. Tez kapsamında elde edilen bulgular, omega-3 yağ asitlerinin meme kanseri kök hücrelerinde lipogenez artışını etkili bir şekilde baskılayabildiğini ve sinyal yollarını (p-AKT, p-NFκB) inhibe edici etkisi ile birlikte, omega-3 yağ asitlerinin bir yandan yapı taşlarının kaynağını (yani yağ asidi sentezinin inhibisyonu) sınırlayarak umut verici bir antikanser ajan olabileceğini göstermektedir. Tüm sonuçlar göz önüne alındığında meme kanserinin farklı alt tiplerindeki MKKH'lerde parental kanser hücrelerine kıyasla hem mRNA hem protein düzeyinde FASN'nin yüksek seviyeleri, bu hücrelerin biyolojik davranışlarını etkilediğini göstermektedir. FASN'in parental kanser hücrelerine kıyasla MKKH'lerdeki artmış seviyeleri, hücresel metabolizmanın ve lipid sentezinin bu hücrelerde belirgin bir rol oynadığını ortaya koyarak FASN'yi, KKH hedefli terapilerde potansiyel bir belirteç olarak ön plana çıkarmaktadır. Ayrıca bu çalışmanın bulguları, FASN'in sadece metabolik değil, aynı zamanda sinyal yolları üzerindeki etkilerini de vurgulamaktadır. AKT sinyal yolunun aktivasyonunda gözlemlenen artışlar FASN'nin ekspresyonunu destekleyici bir etkisi olduğunu ve bunun hücrelerin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyen bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Ancak NFκB sinyal yolağı ile lipid metabolizmasının daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Ayrıca FASN'in apoptoz ve koloni oluşumu üzerindeki etkileri, MKKH'lerin bu protein ile doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte sonuçlarımız dokosaheksaenoik asitin FASN'in etkilerini modüle etme kapasitesini ve bu modülasyonun hücresel süreçler üzerindeki etkilerini ortaya koyarak FASN seviyelerini düşürdüğü ve bu proteinin metabolik etkilerini sınırladığını göstermektedir. Ayrıca DHA'nın apoptoz ve koloni oluşumu üzerindeki etkileri, hücre ölümünü teşvik eden ve parental kanser hücrelerini ve MKKH'lerin çoğalmasını inhibe eden bir etki mekanizması sağladığını göstermektedir. Ancak MKKH'lerin parental kanser hücrelerine kıyasla DHA'ya daha duyarlı olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu sonuçlar parental kanser hücre popülasyonunda daha dirençli olan pluripotent hücrelerin olabileceğini bu

nedenle parental kanser hücre popölasyonundan farklı KKH belirteçleri ve pluripotent hücre belirteçlerine göre izole edilerek FASN seviyelerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Son olarak, FASN'in diğör metabolik yollarla etkileşimini ve bu yolların tümör progresyonuna etkilerini daha detaylı incelemek, bulgularımızın genel geçerliliğini artıracaktır.



6. KAYNAKÇA

- Abbaspanah B, Momeni M, Ebrahimi M, Mousavi SH. Advances in perinatal stem cells research: a precious cell source for clinical applications. *Regen Med*. 2018;13(5):595-610.
- Abiri, B., & Vafa, M. (2018). Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and treatment of cancer. *Adv Obes Weight Manag Control*, 8(3), 198-201.
- Agostini M, Almeida LY, Bastos DC, Ortega RM, Moreira FS, Seguin F, Zecchin KG, Raposo HF, Oliveira HC, Amoêdo ND, Salo T, Coletta RD, Graner E. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(3):585-595.
- Akbarzadeh M, Maroufi NF, Tazehkand AP, Akbarzadeh M, Bastani S, Safdari R, Farzane A, Fattahi A, Nejabati HR, Nouri M, Samadi N. Current approaches in identification and isolation of cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(9):14759-14772.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-3988.
- Shah M, Allegrucci C. Keeping an open mind: highlights and controversies of the breast cancer stem cell theory. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2012;4:155-166.
- Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol*. 2017;8(1):1-8.
- Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63(7):895-902.
- Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008;22(11):1233-1239; discussion 1239-1240, 1243.

- Bacelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol.* 2012;198(3):281-293.
- Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer.* 2009;125(12):2863-2870.
- Barzegar M, Kaur G, Gavins FNE, Wang Y, Boyer CJ, Alexander JS. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2019;37:101421.
- Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J.* 2015;36(3):273-279.
- Basu A, Lambring CB. Akt Isoforms: A Family Affair in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(14):3445.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* 2005;94:29-86.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol.* 2011;12(8):715-723.
- Berger K. The impact of the progranulin-sortilin axis on breast cancer stem cell activity and patient outcome. 2021.
- Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Moule SK, Tavaré JM. The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(37):33895-33900.
- Biehl JK, Russell B. Introduction to stem cell therapy. *J Cardiovasc Nurs.* 2009;24(2):98-103; quiz 104-105.
- Borah A, Raveendran S, Rochani A, Maekawa T, Kumar DS. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis.* 2015;4(11):e177.
- Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer.* 2009;101(12):1978-1985.

- Bougnoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C, Chevalier S. Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res.* 2010;49(1):76-86.
- Brandi J, Dando I, Pozza ED, Biondani G, Jenkins R, Elliott V, Park K, Fanelli G, Zolla L, Costello E, Scarpa A, Cecconi D, Palmieri M. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways. *J Proteomics.* 2017;150:310-322.
- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263.
- Brignole EJ, Smith S, Asturias FJ. Conformational flexibility of metazoan fatty acid synthase enables catalysis. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(2):190-197.
- Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):27-36.
- Calder PC. Docosahexaenoic Acid. *Ann Nutr Metab.* 2016;69 Suppl 1:7-21.
- Capece D, D'Andrea D, Begalli F, Goracci L, Tornatore L, Alexander JL, Di Veroli A, Leow SC, Vaiyapuri TS, Ellis JK, Verzella D, Bennett J, Savino L, Ma Y, McKenzie JS, Doria ML, Mason SE, Chng KR, Keun HC, Frost G, Tergaonkar V, Broniowska K, Stunkel W, Takats Z, Kinross JM, Cruciani G, Franzoso G. Enhanced triacylglycerol catabolism by carboxylesterase 1 promotes aggressive colorectal carcinoma. *J Clin Invest.* 2021;131(11):e137845.
- Carrera PM, Kantarjian HM, Blinder VS. The financial burden and distress of patients with cancer: Understanding and stepping-up action on the financial toxicity of cancer treatment. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(2):153-165.
- Casado-Díaz A. Stem Cells in Regenerative Medicine. *J Clin Med.* 2022;11(18):5460.
- Castelli V, Giordano A, Benedetti E, Giansanti F, Quintiliani M, Cimini A, d'Angelo M. The Great Escape: The Power of Cancer Stem Cells to Evade Programmed Cell Death. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):328.

- Chae YC, Kim JH. Cancer stem cell metabolism: target for cancer therapy. *BMB Rep.* 2018;51(7):319-326.
- Chamras H, Ardashian A, Heber D, Glaspy JA. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J Nutr Biochem.* 2002;13(12):711-716.
- Chan MY, Lim S. Predictors of invasive breast cancer in ductal carcinoma in situ initially diagnosed by core biopsy. *Asian J Surg.* 2010;33(2):76-82.
- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-750.
- Chen K, Zhang C, Ling S, Wei R, Wang J, Xu X. The metabolic flexibility of quiescent CSC: implications for chemotherapy resistance. *Cell Death Dis.* 2021;12(9):835.
- Chin YR, Toker A. Akt isoform-specific signaling in breast cancer: uncovering an anti-migratory role for palladin. *Cell Adh Migr.* 2011;5(3):211-214.
- Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3104-3108.
- Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids.* 2004;39(11):1045-1053.
- Christensen AG, Ehmsen S, Terp MG, et al. Elucidation of Altered Pathways in Tumor-Initiating Cells of Triple-Negative Breast Cancer: A Useful Cell Model System for Drug Screening. *Stem Cells.* 2017;35(8):1898-1912.
- Chuang HY, Chang YF, Hwang JJ. Antitumor effect of orlistat, a fatty acid synthase inhibitor, is via activation of caspase-3 on human colorectal carcinoma-bearing animal. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(4):286-292.
- Clémot M, Sênos Demarco R, Jones DL. Lipid Mediated Regulation of Adult Stem Cell Behavior. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:115.
- Cluntun AA, Lukey MJ, Cerione RA, Locasale JW. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer.* 2017;3(3):169-180.

- Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2016;8:93-107.
- Collins JM, Neville MJ, Pinnick KE, Hodson L, Ruyter B, van Dijk TH, Reijngoud DJ, Fielding MD, Frayn KN. De novo lipogenesis in the differentiating human adipocyte can provide all fatty acids necessary for maturation. *J Lipid Res*. 2011;52(9):1683-1692.
- Corn KC, Windham MA, Rafat M. Lipids in the tumor microenvironment: From cancer progression to treatment. *Prog Lipid Res*. 2020;80:101055.
- Corominas-Faja B, Cuyàs E, Gumuzio J, Bosch-Barrera J, Leis O, Martín ÁG, Menéndez JA. Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses self-renewal growth of cancer stem cells. *Oncotarget*. 2014;5(18):8306-16.
- Correnti M, Binatti E, Gammella E, Invernizzi P, Recalcati S. The Emerging Role of Tumor Microenvironmental Stimuli in Regulating Metabolic Rewiring of Liver Cancer Stem Cells. *Cancers* (Basel). 2022;15(1):5.
- Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B, Rizzo AM. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis*. 2011;10:73.
- Crocker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2236-2252.
- Cui Y, Xing P, Wang Y, Liu M, Qiu L, Ying G, Li B. NADPH accumulation is responsible for apoptosis in breast cancer cells induced by fatty acid synthase inhibition. *Oncotarget*. 2017;8(20):32576-32585.
- Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. 2013;18(2):153-161.
- D'Alessandro A, D'Amici GM, Timperio AM, Merendino N, Zolla L. Docosohaexanoic acid-supplemented PACA44 cell lines and over-activation of Krebs cycle: an integrated proteomic, metabolomic and interactomic overview. *J Proteomics*. 2011;74(10):2138-2158.

- Danhier P, Bański P, Payen VL, Grasso D, Ippolito L, Sonveaux P, Porporato PE. Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017;1858(8):556-572.
- de Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, Schmitt F. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol.* 2013;66(3):187-191.
- De Francesco EM, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication. *Biochem J.* 2018;475(9):1611-1634.
- de Pablo MA, Alvarez de Cienfuegos G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(1):31-39.
- De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63(13):3799-3804.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11-20.
- DeBose-Boyd RA. Significance and regulation of lipid metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;81:97.
- DeGraffenried LA, Friedrichs WE, Fulcher L, Fernandes G, Silva JM, Peralba JM, Hidalgo M. Eicosapentaenoic acid restores tamoxifen sensitivity in breast cancer cells with high Akt activity. *Ann Oncol.* 2003;14(7):1051-1056.
- D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J Clin Med.* 2016;5(2):15.
- Deng X, Dong Q, Bridges D, Raghow R, Park EA, Elam MB. Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(12):1521-1529.
- Deshpande R, Mansara P, Suryavanshi S, Kail-Ghanekar R. Alpha-linolenic acid regulates the growth of breast and cervical cancer cell lines through

- regulation of NO release and induction of lipid peroxidation. *J Mol Biochem.* 2013;2:6–17.
- Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3547-3549.
- DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev.* 2012;246(1):379-400.
- Dontu G: Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications. *Breast cancer research : BCR* 2008;10(5):110.
- Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 2010;39(2):171-183.
- Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2016;114:28-34.
- Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Cancer Discov.* 2013;3(1):27-34.
- Ellsworth RE, Blackburn HL, Shriver CD, Soon-Shiong P, Ellsworth DL. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;64:65-72.
- El-Sahli S, Wang L. Cancer Stem Cell-Associated Pathways in the Metabolic Reprogramming of Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9125.
- Enciso-Benavides J, Alfaro L, Castañeda-Altamirano C, Rojas N, González-Cabeza J, Enciso N, Riesco F, Castillo M, Enciso J. Biological characteristics of a sub-population of cancer stem cells from two triple-negative breast tumour cell lines. *Heliyon.* 2021;7(6):e07273.
- Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology.* 1995;45(1):81-86.

- Ewaschuk JB, Newell M, Field CJ. Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER(-) breast cancer cells. *Lipids*. 2012;47(11):1019-1030.
- Fan TW, Higashi RM, Chernayavskaya Y, Lane AN. Resolving Metabolic Heterogeneity in Experimental Models of the Tumor Microenvironment from a Stable Isotope Resolved Metabolomics Perspective. *Metabolites*. 2020;10(6):249.
- Fhu CW, Ali A. Fatty Acid Synthase: An Emerging Target in Cancer. *Molecules*. 2020;25(17):3935.
- Finstad HS, Dyrendal H, Myhrstad MC, Heimli H, Drevon CA. Uptake and activation of eicosapentaenoic acid are related to accumulation of triacylglycerol in Ramos cells dying from apoptosis. *J Lipid Res*. 2000;41(4):554-563.
- Folmes CD, Park S, Terzic A. Lipid metabolism greases the stem cell engine. *Cell Metab*. 2013;17(2):153-155.
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(2):193-204.
- Freudenberg JA, Wang Q, Katsumata M, Drebin J, Nagatomo I, Greene MI. The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Exp Mol Pathol*. 2009;87(1):1-11.
- Frick C, Rumgay H, Vignat J, Ginsburg O, Nolte E, Bray F, Soerjomataram I. Quantitative estimates of preventable and treatable deaths from 36 cancers worldwide: a population-based study. *Lancet Glob Health*. 2023;11(11):e1700-e1712.
- Fu Y, Zou T, Shen X, Nelson PJ, Li J, Wu C, Yang J, Zheng Y, Bruns C, Zhao Y, Qin L, Dong Q. Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm* (2020). 2020;2(1):27-59.
- Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(11):829-846.
- Garner JM, Fan M, Yang CH, Du Z, Sims M, Davidoff AM, Pfeffer LM. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3

- (STAT3) and nuclear factor κ B signaling in glioblastoma cancer stem cells regulates the Notch pathway. *J Biol Chem*. 2013;288(36):26167-26176.
- Geng L, Zhou W, Liu B, Wang X, Chen B. DHA induces apoptosis of human malignant breast cancer tissues by the TLR-4/PPAR- α pathways. *Oncol Lett*. 2018;15(3):2967-2977.
- Germain N, Dhayer M, Boileau M, Fovez Q, Kluza J, Marchetti P. Lipid Metabolism and Resistance to Anticancer Treatment. *Biology (Basel)*. 2020;9(12):474.
- Ghanbari T, Azadbakht M, Vesi-Raygani A, Khazaei M. Isolation of breast cancer stem cell from MDA-MB231 cell line using vincristine. *Int. j. Morphol*. 2016; 34(4), 1197-1202.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555-567.
- Giudetti AM, De Domenico S, Ragusa A, Lunetti P, Gaballo A, Franck J, Simeone P, Nicolardi G, De Nuccio F, Santino A, Capobianco L, Lanuti P, Fournier I, Salzet M, Maffia M, Vergara D. A specific lipid metabolic profile is associated with the epithelial mesenchymal transition program. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(3):344-357.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286(5439):531-537.
- Gómez-López S, Lerner RG, Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):575-597.
- Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):281-294.
- Grottke A, Ewald F, Lange T, Nörz D, Herzberger C, Bach J, Grabinski N, Gräser L, Höppner F, Nashan B, Schumacher U, Jücker M. Downregulation of AKT3

- Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146370.
- Grube S, Dünisch P, Freitag D, Klausnitzer M, Sakr Y, Walter J, Kalff R, Ewald C. Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis. *J Neurooncol*. 2014;118(2):277-287.
- Gupta A, Das D, Taneja R. Targeting Dysregulated Lipid Metabolism in Cancer with Pharmacological Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2024;16(7):1313.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022; 12: 31–46.
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010;143(4):508-525.
- Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):281-296.
- Harrington BS, Annunziata CM. NF- κ B Signaling in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1182.
- Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, Negri E. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol*. 2016;27(5):926-933.
- He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:377-406.
- He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, Li B. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):425.
- Hershey BJ, Vazzana R, Joppi DL, Havas KM. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. *J Clin Med*. 2019;9(1):87.
- Hill MM, Feng J, Hemmings BA. *Curr. Biol*. 2002;12:1251–1255.
- Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):154.

- Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;13(4):215.
- Howell G 3rd, Deng X, Yellaturu C, Park EA, Wilcox HG, Raghow R, Elam MB. N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXRalpha. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(12):1190-1196.
- Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(2):74-88.
- Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:116.
- Huang LH, Chung HY, Su HM. Docosahexaenoic acid reduces sterol regulatory element binding protein-1 and fatty acid synthase expression and inhibits cell proliferation by inhibiting pAkt signaling in a human breast cancer MCF-7 cell line. *BMC Cancer.* 2017;17(1):890.
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell.* 2008;13(1):58-68.
- Hwang JK, Yu HN, Noh EM, Kim JM, Hong OY, Youn HJ, Jung SH, Kwon KB, Kim JS, Lee YR. DHA blocks TPA-induced cell invasion by inhibiting MMP-9 expression via suppression of the PPAR- γ /NF- κ B pathway in MCF-7 cells. *Oncol Lett.* 2017;13(1):243-249.
- Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005;171(6):1023-1034.
- Jang JY, Kim MK, Jeon YK, Joung YK, Park KD, Kim CW. Adenovirus adenine nucleotide translocator-2 shRNA effectively induces apoptosis and enhances chemosensitivity by the down-regulation of ABCG2 in breast cancer stem-like cells. *Exp Mol Med.* 2012;44(4):251-259.
- Jia D, Lu M, Jung KH, Park JH, Yu L, Onuchic JN, Kaiparettu BA, Levine H. Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(9):3909-3918.

- Jia J, Che L, Cigliano A, Wang X, Peitta G, Tao J, Zhong S, Ribback S, Evert M, Chen X, Calvisi DF. Pivotal Role of Fatty Acid Synthase in c-MYC Driven Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8467.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1253-1261.
- Ju JH, Jang K, Lee KM, Kim M, Kim J, Yi JY, Noh DY, Shin I. CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF- κ B signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2011;32(10):1474-1483.
- Kacik M, Oliván-Viguera A, Köhler R. Modulation of K(Ca)_{3.1} channels by eicosanoids, omega-3 fatty acids, and molecular determinants. *PLoS One.* 2014;9(11):e112081.
- Kalra K, Tomar PC. Stem cell: basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics.* 2014;2(7), 919-930.
- Kang JX, Liu A. The role of the tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio in regulating tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1-2):201-210.
- Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T, Zhu BT. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS One.* 2010;5(4):e10296.
- Kempska J, Oliveira-Ferrer L, Grottke A, Qi M, Alawi M, Meyer F, Borgmann K, Hamster F, Eylmann K, Rossberg M, Smit DJ, Jücker M, Laakmann E, Witzel I, Schmalfeldt B, Müller V, Legler K. Impact of AKT1 on cell invasion and radiosensitivity in a triple negative breast cancer cell line developing brain metastasis. *Front Oncol.* 2023;13:1129682.
- Khan F, ElSORI D, Verma M, Pandey S, Obaidur Rab S, Siddiqui S, Alabdallah NM, Saeed M, Pandey P. Unraveling the intricate relationship between lipid metabolism and oncogenic signaling pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1399065.
- Khan S, Suryavanshi M, Kaur J, Nayak D, Khurana A, Manchanda RK, Tandon C, Tandon S. Stem cell therapy: A paradigm shift in breast cancer treatment. *World J Stem Cells.* 2021;13(7):841-860.

- Kinlaw WB, Baures PW, Lupien LE, Davis WL, Kuemmerle NB. Fatty Acids and Breast Cancer: Make Them on Site or Have Them Delivered. *J Cell Physiol.* 2016;231(10):2128-2141.
- Kirkby M, Popatia AM, Lavoie JR, Wang L. The Potential of Hormonal Therapies for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2023;15(19):4702.
- Kleinfeld AM, Prothro D, Brown DL, Davis RC, Richieri GV, DeMaria A. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 1996;78(12):1350-1354.
- Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.
- Kong D, Hughes CJ, Ford HL. Cellular Plasticity in Breast Cancer Progression and Therapy. *Front Mol Biosci.* 2020;7:72.
- Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer.* 2020;122(1):4-22.
- Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(13):4906-4913.
- Kruger DT, Beelen KJ, Opdam M, Sanders J, van der Noort V, Boven E, Linn SC. Hierarchical clustering of activated proteins in the PI3K and MAPK pathways in ER-positive, HER2-negative breast cancer with potential therapeutic consequences. *Br J Cancer.* 2018;119(7):832-839.
- Krycer JR, Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(5):268-276.
- Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6379-6383.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3450-3454.
- Kuhajda FP. AMP-activated protein kinase and human cancer: cancer metabolism revisited. *Int J Obes (Lond).* 2008;32 Suppl 4(Suppl 1):S36-41.

- Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res.* 2005;66(12):5977-5980.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-648.
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 2014;505(7484):495-501.
- Leavens KF, Easton RM, Shulman GI, Previs SF, Birnbaum MJ. Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;10(5):405-418.
- Lee EJ, Yun UJ, Koo KH, Sung JY, Shim J, Ye SK, Hong KM, Kim YN. Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(1):190-203.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276(20):16683-16689.
- Lee SY, Ju MK, Jeon HM, Lee YJ, Kim CH, Park HG, Han SI, Kang HS. Oncogenic Metabolism Acts as a Prerequisite Step for Induction of Cancer Metastasis and Cancer Stem Cell Phenotype. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;1027453.
- Li G, Zhao F, Cui Y. Proteomics using mammospheres as a model system to identify proteins deregulated in breast cancer stem cells. *Curr Mol Med.* 2013;13(3):459-463.
- Li H, Feng Z, He ML. Lipid metabolism alteration contributes to and maintains the properties of cancer stem cells. *Theranostics.* 2020;10(16):7053-7069.
- Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int.* 2005;67(3):867-874.

- Li J, Condello S, Thomes-Pepin J, Ma X, Xia Y, Hurley TD, Matei D, Cheng JX. Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):303-314.e5.
- Li P, Tian W, Ma X. Alpha-mangostin inhibits intracellular fatty acid synthase and induces apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2014;13:138.
- Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211-218.
- Liu B, Peng Q, Wang YW, Qiu J, Zhu J, Ma R. Prognostic and clinicopathological significance of fatty acid synthase in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2023;13:1153076.
- Liu H, Wu X, Dong Z, Luo Z, Zhao Z, Xu Y, Zhang JT. Fatty acid synthase causes drug resistance by inhibiting TNF- α and ceramide production. *J Lipid Res*. 2013;54(3):776-785.
- Liu H, Zhang Z, Song L, Gao J, Liu Y. Lipid metabolism of cancer stem cells. *Oncol Lett*. 2022;23(4):119.
- Liu J, Ma DW. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*. 2014;6(11):5184-5223.
- Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, Willmarth NE, Quong AA, Ju X, Ojeifo J, Jiao X, Yeow WS, Katiyar S, Shirley LA, Joyce D, Lisanti MP, Albanese C, Pestell RG. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res*. 2010;70(24):10464-10473.
- Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, Sherlock G, Lewicki J, Shedden K, Clarke MF. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*. 2007;356(3):217-226.
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*. 2000;288(5475):2379-2381.
- López-Lázaro M. Stem cell division theory of cancer. *Cell Cycle*. 2015;14(16):2547-25418.
- Lounis MA, Péant B, Leclerc-Desaulniers K, Ganguli D, Daneault C, Ruiz M, Zoubeydi A, Mes-Masson AM, Saad F. Modulation of de Novo Lipogenesis

- Improves Response to Enzalutamide Treatment in Prostate Cancer. *Cancers* (Basel). 2020;12(11):3339.
- Lubman DM, Kachman MT, Wang H, Gong S, Yan F, Hamler RL, O'Neil KA, Zhu K, Buchanan NS, Barder TJ. Two-dimensional liquid separations-mass mapping of proteins from human cancer cell lysates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;782(1-2):183-196.
- Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers* (Basel). 2021;13(17):4287.
- Luo H, Chen CY, Li X, Zhang X, Su CW, Liu Y, Cao T, Hao L, Wang M, Kang JX. Increased lipogenesis is critical for self-renewal and growth of breast cancer stem cells: Impact of omega-3 fatty acids. *Stem Cells*. 2021;39(12):1660-1670.
- Lupu R, Menendez JA. Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology*. 2006;147(9):4056-4066.
- Lü X, Xu K, Lü H, Yin Y, Ma C, Liu Y, Li H, Suo Z. CD44(+)/CD24(-) cells are transit progenitors and do not determine the molecular subtypes and clinical parameters in breast carcinomas. *Ultrastruct Pathol*. 2011;35(2):72-78.
- Löönd F, Tiede S, Christofori G. Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression. *Br J Cancer*. 2021;125(2):164-175.
- Makinoshima H, Takita M, Saruwatari K, Umemura S, Obata Y, Ishii G, Matsumoto S, Sugiyama E, Ochiai A, Abe R, Goto K, Esumi H, Tsuchihara K. Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Axis Is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma. *J Biol Chem*. 2015;290(28):17495-17504.
- Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31.

- Mancini R, Noto A, Pisanu ME, De Vitis C, Maugeri-Saccà M, Ciliberto G. Metabolic features of cancer stem cells: the emerging role of lipid metabolism. *Oncogene*. 2018;37(18):2367-2378.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-1274.
- Mansara PP, Deshpande RA, Vaidya MM, Kaul-Ghanekar R. Differential Ratios of Omega Fatty Acids (AA/EPA+DHA) Modulate Growth, Lipid Peroxidation and Expression of Tumor Regulatory MARBPs in Breast Cancer Cell Lines MCF7 and MDA-MB-231. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136542.
- Manupati K, Yeeravalli R, Kaushik K, Singh D, Mehra B, Gangane N, Gupta A, Goswami K, Das A. Activation of CD44-Lipoprotein lipase axis in breast cancer stem cells promotes tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021;1867(11):166228.
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW: Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell cycle* 2011;10(9):1378-1384.
- Martelotto, L. G. et al. (2014) 'Breast cancer intra-tumor heterogeneity.', *Breast cancer research : BCR*. BioMed Central, 16(3), p. 210. doi: 10.1186/bcr3658
- Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763-777.
- Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Ropero S, Colomer R, Lupu R. HER2 (erbB-2)-targeted effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3), in breast cancer cells: the "fat features" of the "Mediterranean diet" as an "anti-HER2 cocktail". *Clin Transl Oncol*. 2006;8(11):812-820.
- Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity enhances vinorelbine (Navelbine)-induced cytotoxicity and apoptotic cell death in human breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2004;12(2):411-422.
- Merkhofer EC, Cogswell P, Baldwin AS. Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene*. 2010;29(8):1238-1248.

- Miricescu D, Diaconu CC, Stefani C, Stanescu AMA, Totan A, Rusu, IR, Greabu M. The serine/threonine protein kinase (Akt)/protein kinase B (Pkb) signaling pathway in breast cancer. *Journal of Mind and Medical Sciences*, 2020;7(1), 34-39.
- Misganaw M, Zeleke H, Mulugeta H, Assefa B. Mortality rate and predictors among patients with breast cancer at a referral hospital in northwest Ethiopia: A retrospective follow-up study. *PLoS One*. 2023;18(1):e0279656.
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-241.
- Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 2012;22(1):66-79.
- Monaco ME. Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 2017;8(17):29487-29500.
- Moon YS, Latasa MJ, Griffin MJ, Sul HS. Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*. 2002;43(5):691-8.
- Mounier C, Bouraoui L, Rassart E. Lipogenesis in cancer progression (review). *Int J Oncol*. 2014;45(2):485-492.
- Mouradian M, Kikawa KD, Dranka BP, Komar SM, Kalyanaraman B, Pardini RS. Docosahexaenoic acid attenuates breast cancer cell metabolism and the Warburg phenotype by targeting bioenergetic function. *Mol Carcinog*. 2015;54(9):810-820.
- Munir R, Lisec J, Swinnen JV, Zaidi N. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *Br J Cancer*. 2019;120(12):1090-1098.
- Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S, Umezawa K, Tojo A, Aburatani H, Gotoh N. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010;102(1):206-212.
- Network CGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
- Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14(5):381-395.

- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
- O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(6):853-875.
- Oliveira GL, Coelho AR, Marques R, Oliveira PJ. Cancer cell metabolism: Rewiring the mitochondrial hub. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021;1867(2):166016.
- Oliveira AF, Cunha DA, Ladriere L, Igoillo-Esteve M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M. In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols. *Biotechniques*. 2015;58(5):228-233.
- O'Neill S, Porter RK, McNamee N, Martinez VG, O'Driscoll L. 2-Deoxy-D-Glucose inhibits aggressive triple-negative breast cancer cells by targeting glycolysis and the cancer stem cell phenotype. *Sci Rep*. 2019;9(1):3788.
- Pandey PR, Xing F, Sharma S, Watabe M, Pai SK, Iizumi-Gairani M, Fukuda K, Hirota S, Mo YY, Watabe K. Elevated lipogenesis in epithelial stem-like cell confers survival advantage in ductal carcinoma in situ of breast cancer. *Oncogene*. 2013;32(42):5111-5122.
- Park JB, Lee CS, Jang JH, Ghim J, Kim YJ, You S, Hwang D, Suh PG, Ryu SH. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(11):782-792.
- Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;5(2):15.
- Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS, Berenguer A, Prats N, Toll A, Hueto JA, Bescós C, Di Croce L, Benitah SA. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2017;541(7635):41-45.
- Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):55.
- Pérez-Tenorio G, Stål O; Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*. 2002;86(4):540-545.

- Pirruccello SJ, LeBien TW. The human B cell-associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. *J Immunol.* 1986;136(10):3779-3784.
- Pizato N, Kiffer LFMV, Luzete BC, Assumpção JAF, Correa LH, Melo HAB, Sant'Ana LP, Ito MK, Magalhães KG. Omega 3-DHA and Delta-Tocotrienol Modulate Lipid Droplet Biogenesis and Lipophagy in Breast Cancer Cells: the Impact in Cancer Aggressiveness. *Nutrients.* 2019;11(6):1199.
- Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMB, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res.* 2018;28(3):265-280.
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008;8(3):224-236.
- Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(7):489-503.
- Ravacci GR, Brentani MM, Tortelli T Jr, Torrinhas RS, Saldanha T, Torres EA, Waitzberg DL. Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression. *J Nutr Biochem.* 2013;24(3):505-515.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-111.
- Ricoult SJ, Yecies JL, Ben-Sahra I, Manning BD. Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP. *Oncogene.* 2016;35(10):1250-1260.
- Riggio M, Perrone MC, Polo ML, Rodriguez MJ, May M, Abba M, Lanari C, Novaro V. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep.* 2017;7:44244.
- Rinkenbaugh AL, Baldwin AS. The NF- κ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells.* 2016;5(2):16.
- Rivas S, Gómez-Oro C, Antón IM, Wandosell F. Role of Akt Isoforms Controlling Cancer Stem Cell Survival, Phenotype and Self-Renewal. *Biomedicines.* 2018;6(1):29.

- Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(11):732-749.
- Saifer A, Goldman L. The free fatty acids bound to human serum albumin. *Journal of Lipid Research*. 1961;2(3), 268-270.
- Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*. 2016;114(12):1305-1312.
- Santolla MF, Lappano R, De Marco P, Pupo M, Vivacqua A, Sisci D, Abonante S, Iacopetta D, Cappello AR, Dolce V, Maggiolini M. G protein-coupled estrogen receptor mediates the up-regulation of fatty acid synthase induced by 17 β -estradiol in cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *J Biol Chem*. 2012;287(52):43234-43245.
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol*. 1993;122(4):789-807.
- Sarkar DK, Jana D, Patil PS, Chaudhari KS, Chattopadhyay BK, Chikkala BR, Mandal S, Chowdhary P. Role of NF- κ B as a Prognostic Marker in Breast Cancer : A Pilot Study in Indian Patients. *Indian J Surg Oncol*. 2013;4(3):242-247.
- Saunier E, Antonio S, Regazzetti A, Auzeil N, Laprévote O, Shay JW, Coumoul X, Barouki R, Benelli C, Huc L, Bortoli S. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):6945.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14(3):281-287.
- Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;92(2):187-195.
- Senga S, Kobayashi N, Kawaguchi K, Ando A, Fujii H. Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, de novo fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(9):1057-1067.

- Shaikh F, Langade N, Khan M, Muglikar S, Zahra Ansari N. Mesenchymal stem cells and tissue engineering in dentistry [Internet]. Recent Update on Mesenchymal Stem Cells. IntechOpen; 2023. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1002291>.
- Shao F, Sun H, Deng CX. Potential therapeutic targets of triple-negative breast cancer based on its intrinsic subtype. *Oncotarget*. 2017;8(42):73329-73344.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
- Shih IeM, Davidson B. Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol*. 2009;5(10):1641-1657.
- Shin S, Kim YJ, Han SH, Silwal P, Heo JY, Jeon YJ, Park SK, Kweon GR, Park JI, Lim K. ω 3-Polyunsaturated Fatty Acids-induced Inhibition of Tumorigenicity and Invasion by Suppression of COX-2/MMPs/VEGF through NF- κ B in Colon Cancer Cells. *J Life Sci*. 2017;27(9):1020-1030.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007;11(3):259-273.
- Shostak K, Chariot A. NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):214.
- Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, Bammerlin EM, Walker C, Altenburg JD. Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. *Biofactors*. 2011;37(6):399-412.
- Simeone P, Tacconi S, Longo S, Lanuti P, Bravaccini S, Pirini F, Ravaioli S, Dini L, Giudetti AM. Expanding Roles of De Novo Lipogenesis in Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(7):3575.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-5828.

- Singh VK, Saini A, Kalsan M, Kumar N, Chandra R. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:134.
- Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 1994;8(15):1248-1259.
- Song EA, Kim H. Docosahexaenoic Acid Induces Oxidative DNA Damage and Apoptosis, and Enhances the Chemosensitivity of Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8):1257.
- Spector AA. Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res.* 1975;16(3):165-79.
- Stanley WC, Khairallah RJ, Dabkowski ER. Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(2):122-126.
- Stillwell W, Wassall SR. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids.* 2003;126(1):1-27.
- Stoll BA. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr.* 2002;87(3):193-8.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
- Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Van de Sande T, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(4):898-903.
- Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):100-10.
- Tracz-Gaszewska Z, Dobrzyn P. Stearoyl-CoA Desaturase 1 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):948.
- Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):221.

- Tsochantaridis I, Roupas A, Mohlin S, Pappa A, Voulgaridou GP. The Concept of Cancer Stem Cells: Elaborating on ALDH1B1 as an Emerging Marker of Cancer Progression. *Life (Basel)*. 2023;13(1):197.
- Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:227.
- Valenzuela R, Videla LA. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct*. 2011;2(11):644-648.
- Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):195-203.
- Vazquez-Santillan K, Melendez-Zajgla J, Jimenez-Hernandez L, Martínez-Ruiz G, Maldonado V. NF- κ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell Oncol (Dordr)*. 2015;38(5):327-339.
- Vazquez-Santillan K, Melendez-Zajgla J, Jimenez-Hernandez LE, Gaytan-Cervantes J, Muñoz-Galindo L, Piña-Sanchez P, Martinez-Ruiz G, Torres J, Garcia-Lopez P, Gonzalez-Torres C, Ruiz V, Avila-Moreno F, Velasco-Velazquez M, Perez-Tapia M, Maldonado V. NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci Rep*. 2016;6:37340.
- Veigel D, Wagner R, Stübiger G, Wuczkowski M, Filipits M, Horvat R, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Leisser A, Valent P, Grusch M, Hegardt FG, García J, Serra D, Auersperg N, Colomer R, Grunt TW. Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. *Int J Cancer*. 2015;136(9):2078-2090.
- Visvader JE, Lindeman GJ: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer* 2008;8(10): 755-768.
- Visweswaran M, Arfuso F, Warriar S, Dharmarajan A. Aberrant lipid metabolism as an emerging therapeutic strategy to target cancer stem cells. *Stem Cells*. 2020;38(1):6-14.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.

- Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C, Reue K, Christofk H, Mischel PS, Pajonk F. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):16062-16067.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10(8):789-799.
- Wadhwa B, Paddar M, Khan S, Mir S, A Clarke P, Grabowska AM, Vijay DG, Malik F. AKT isoforms have discrete expression in triple negative breast cancers and roles in cisplatin sensitivity. *Oncotarget*. 2020;11(45):4178-4194.
- Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.
- Wang H, Luo QF, Peng AF, Long XH, Wang TF, Liu ZL, Zhang GM, Zhou RP, Gao S, Zhou Y, Chen WZ. Positive feedback regulation between Akt phosphorylation and fatty acid synthase expression in osteosarcoma. *Int J Mol Med*. 2014;33(3):633-639.
- Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulidakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2005;24(22):3574-3582.
- Wang SY, Hu QC, Wu T, Xia J, Tao XA, Cheng B. Abnormal lipid synthesis as a therapeutic target for cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2022b;14(2):146-162.
- Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(11):678-689.
- Wang Y, Yu W, Li S, Guo D, He J, Wang Y. Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases. *Front Oncol*. 2022a;12:836058.
- Wang YY, Kuhajda FP, Li J, Finch TT, Cheng P, Koh C, Li T, Sokoll LJ, Chan DW. Fatty acid synthase as a tumor marker: its extracellular expression in human breast cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2004;4(2):101-110.
- Wang YZ, Wong YC. Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer: a review. *Urol Oncol*. 1997;3(2):41-46.
- Wang ZY, Wang DM, Loo TY, Cheng Y, Chen LL, Shen JG, Yang DP, Chow LW, Guan XY, Chen JP. *Spatholobus suberectus* inhibits cancer cell growth by

- inducing apoptosis and arresting cell cycle at G2/M checkpoint. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):751-758.
- Ward PS, Thompson CB. Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(7):a006783.
- Warrier NM, Kelkar N, Johnson CT, Govindarajan T, Prabhu V, Kumar P. Understanding cancer stem cells and plasticity: Towards better therapeutics. *Eur J Cell Biol.* 2023;102(2):151321.
- Wong RH, Sul HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(6):684-691.
- World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer. 2022.https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_population_s=1&sexes=2&types=1. Erişim Tarihi: 10 Mayıs 2024.
- Wu H, Yu W, Meng F, Mi J, Peng J, Liu J, Zhang X, Hai C, Wang X. Polychlorinated biphenyls-153 induces metabolic dysfunction through activation of ROS/NF- κ B signaling via downregulation of HNF1b. *Redox Biol.* 2017;12:300-310.
- Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res.* 2005;123(1):158-169.
- Wu X, Dong Z, Wang CJ, Barlow LJ, Fako V, Serrano MA, Zou Y, Liu JY, Zhang JT. FASN regulates cellular response to genotoxic treatments by increasing PARP-1 expression and DNA repair activity via NF- κ B and SP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(45):E6965-E6973.
- Wu X, Qin L, Fako V, Zhang JT. Molecular mechanisms of fatty acid synthase (FASN)-mediated resistance to anti-cancer treatments. *Adv Biol Regul.* 2014;54:214-221.
- Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):162-176.
- Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem.* 2001;276(13):9800-9807.
- Yan C, Wei H, Minjuan Z, Yan X, Jingyue Y, Wenchao L, Sheng H. The mTOR inhibitor rapamycin synergizes with a fatty acid synthase inhibitor to induce

- cytotoxicity in ER/HER2-positive breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(5):e97697.
- Yang J, Gong Y, Sontag DP, Corbin I, Minuk GY. Effects of low-density lipoprotein docosahexaenoic acid nanoparticles on cancer stem cells isolated from human hepatoma cell lines. *Mol Biol Rep*. 2018;45(5):1023-1036.
- Yang T, Fang S, Zhang HX, Xu LX, Zhang ZQ, Yuan KT, Xue CL, Yu HL, Zhang S, Li YF, Shi HP, Zhang Y. N-3 PUFAs have antiproliferative and apoptotic effects on human colorectal cancer stem-like cells in vitro. *J Nutr Biochem*. 2013;24(5):744-753.
- Yasumoto Y, Miyazaki H, Vaidyan LK, Kagawa Y, Ebrahimi M, Yamamoto Y, Ogata M, Katsuyama Y, Sadahiro H, Suzuki M, Owada Y. Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147717.
- Ye L, Swingen C, Zhang J. Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Curr Cardiol Rev*. 2013;9(1):63-72.
- Yi M, Li J, Chen S, Cai J, Ban Y, Peng Q, Zhou Y, Zeng Z, Peng S, Li X, Xiong W, Li G, Xiang B. Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):118.
- Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell*. 2005;20(4):539-550.
- Yu H, Mohan S, Natarajan M. Radiation-Triggered NF- κ B Activation is Responsible for the Angiogenic Signaling Pathway and Neovascularization for Breast Cancer Cell Proliferation and Growth. *Breast Cancer (Auckl)*. 2012;6:125-35.
- Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012a;44(12):2144-2151.
- Yun EJ, Song KS, Shin S, Kim S, Heo JY, Kweon GR, Wu T, Park JI, Lim K. Docosahexaenoic acid suppresses breast cancer cell metastasis by targeting matrix-metalloproteinases. *Oncotarget*. 2016;7(31):49961-49971.
- Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2013;52(4):585-589.

- Zajdel A, Wilczok A, Tarkowski M. Toxic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in human lung A549 cells. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt B):486-491.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):68.
- Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(7):381-394.
- Zhang L, Chen W, Liu S, Chen C. Targeting Breast Cancer Stem Cells. *Int J Biol Sci*. 2023;19(2):552-570.
- Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm*. 2021;2(4):618-653.
- Zhang X, Powell K, Li L. Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):3765.
- Zhelev Z, Ivanova D, Lazarova D, Aoki I, Bakalova R, Saga T. Docosahexaenoic Acid Sensitizes Leukemia Lymphocytes to Barasertib and Everolimus by ROS-dependent Mechanism Without Affecting the Level of ROS and Viability of Normal Lymphocytes. *Anticancer Res*. 2016;36(4):1673-1682.
- Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J, Li D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ*. 2013;346:f3706.
- Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U, Benz CC. The NF κ B pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12 Suppl 1:S37-46.
- Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002;62(8):2227-2231.
- Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis*. 2020;8(3):287-297.
- Zou ZW, Ma C, Medoro L, Chen L, Wang B, Gupta R, Liu T, Yang XZ, Chen TT, Wang RZ, Zhang WJ, Li PD. LncRNA ANRIL is up-regulated in nasopharyngeal carcinoma and promotes the cancer progression via

increasing proliferation, reprogramming cell glucose metabolism and inducing side-population stem-like cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(38):61741-61754.



MEME KANSERİNDE LİPİT METABOLİZMASININ KANSER KÖK HÜCRE DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI VE DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'İN POTANSİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%10

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET KAYNAKLARI

%8

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%1

2

Tezcan, Havva. "İleri Evre Meme Kanseri Kok Hücrelerinde Let-7a ve Mir-335'in Mirna Temelli Gen Tedavideki Rolünün Arastirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021

Yayın

%1

3

Erturk, Elif. "Kanser Kok hucre Sinyal Iletim yOlaklarinda Gorev Alan Mikrorna'larin Meme Tumorlerinde Biyobelirtec Olarak Degerlendirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021

Yayın

<%1

4

Barış, Elif. "Siçanlarda Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İnflamatuvar Yanıta Sitikolin ve Kolinin Araşidonik Asit Yolak Aracılı Etkisi", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024

Yayın

<%1

ÖZGEÇMİŞ

Elif YAŞAR

EĞİTİM BİLGİLERİ

2016-2021 Lisans, ERCİYES ÜNİVERSİTESİ, SAĞLIK BİLİMLERİ
FAKÜLTESİ, BESLENME VE DİYETETİK

Not Ortalaması: 3.29 / 4.0

2012- 2016 Samsun Anadolu Lisesi

Not Ortalaması: 91,88/100

YAYIN/ BİLDİRİ/KİTAP

Yılmaz, S., Doğan Sarıkaya, M., Atar, E., Bağcı, B. ğ., Kenanoğlu, S., Mutlu, N.,
Yaşar, E., Önal, Ö., Canöz, Ö. & Özkul, Y. (2023). Primary Culture of Cancer Cells
Derived from Human Lung Tumors. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen
Bilimleri Dergisi, 39 (1), 79-86.

Yılmaz, S., Sarıkaya, M. D., **Yaşar, E.**, Bağcı, B. Ş., Canöz, Ö., & Önal, Ö. (2023).
DETERMINATION OF METASTATIC CAPACITY IN PRIMARY LUNG
CANCER CELLS: REFLECTION OF PATIENT PROFILE IN THE CLINIC
USING IN VITRO METHODS. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 6(3),
302-311.

1. S. YILMAZ, M. DOĞAN SARIKAYA, N. MUTLU & **E. YAŞAR**, KANSER
KÖK HÜCREİ VE KANSER TEDAVİSİNDEKİ ÖNEMİ, K. E. ŞAHİN & H.
KAYA [Editörler], SAĞLIK & BİLİM 2022: GÜNCEL TIP-IV (167- 186), ISBN:
978-625-6954-91-5, TÜRKİYE: Efe Akademi, 27 Aralık 2022, Kitapta Bölüm.

2. M. DOĞAN SARIKAYA, **E. YAŞAR**, S. YILMAZ & N. MUTLU, Meme
Kanseri ve Heterojenitesi, D. ATİK [Editörler], Sağlık Bilimleri Alanında Yeni
Trendler (681- 698), ISBN: 978-625-8261-62-2, TÜRKİYE: Duvar Kitapevi, 26
Aralık 2022, Kitapta Bölüm.

Mutlu N, Doğan Sarıkaya M, **Yaşar E**, Yılmaz S. Variation of EpCAM Expression According to Subtypes in Breast Cancer: The Role Of Cancer Stem Cells. Ankara International Congress On Scientific Research-VIII, June 9-11, 2023, 822-824.

PROJELER

2023-... (Devam ediyor)

TÜBİTAK,

1001

Proje Başlığı: Baş-Boyun Kanseri ve Tümör Mikro-Çevresi Arasındaki İlişkilerin Gerçek Hasta Kaynaklı Veriler Yardımıyla Kemoterapi, Radyoterapi ve İmmünoterapi Tedavileri İle İncelenmesi

2023-... (Devam Ediyor)

Erciyes Üniversitesi, BAP, Tezli Yüksek Lisans Projesi

Meme Kanseri Lipit Metabolizmasının Kanseri Kök Hücre Düzeyinde Araştırılması ve Dokosaheksaenoik Asit (DHA)'nın Potansiyel Etkilerinin İncelenmesi

SERTİFİKALAR

Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası