



T.C.

**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİ MCF-7 HÜCRE
HATTINDA METABOLİK YOLLARIN
ÇALIŞILMASI**

ARDA KEBAPCI

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YUSUF TUTAR**

**MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
HAZİRAN/2024**

İTHAF

“Annem’e ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Ana Bilim Dalında yürütmüş olduğum ‘MEME KANSERİ MCF-7 HÜCRE HATTINDA METABOLİK YOLLARIN ÇALIŞILMASI’ başlıklı doktora tez çalışmamda, gerek tez konusunun belirlenmesi noktasındaki desteği, gerekse çalışmamın hazırlık sürecinde ve sonrasında paylaştığı bilgi ve deneyimleri için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yusuf TUTAR’a içtenlikle teşekkür etmek isterim.

Çok değerli ve saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Derya BÜYÜKKAYHAN ve Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM'a doktora tez izleme komitemde buldukları ve çalışmalarımnda sağladıkları destek için içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora başlangıç sürecimdeki değerli destekleri için Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Ülkan KILIÇ’a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Akademik hayata girmeme vesile olan ve bu süreçlerde her zaman desteğini aldığım üniversite arkadaşım, değerli dostum Doç. Dr. Emrah YÜCESAN’a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar süreçlerinde sağladıkları değerli desteklerinden dolayı Merve Nur AL ve Kezban UÇAR ÇİFÇİ’ye de özel olarak teşekkür etmek isterim.

Tez çalışmamda verdiği değerli desteklerinden dolayı Tuba OĞUZ’ a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte her daim yanımda olan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok değerli aileme ve her zaman yanımda olan kardeşim Doç. Dr. Ayda Kebapçı’ya,

En içten duygularıyla sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

En değerlisi...Yaşamım boyunca beni gururla destekleyen ve akademik hayat geçmeme vesile olan, karşılaştığım her zorlukla asla pes etmemeyi öğreten, hayatımda unutulmaz izler bırakan, çok erken kaybettiğim biricik anneme derin bir saygı ve sevgiyle selamlarımı sunuyorum. Başarılarımın temelinde, onun sevgi dolu öğretileri ve ilham verici mirası yatmaktadır. Tüm başarılarım senin içindir, senin eserindir.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2022/189

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MEME KANSERİ	3
2.1.1. Meme Kanseri Patolojisi.....	3
2.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etyolojisi	3
2.1.2.1. Epidemiyoloji:	3
2.1.2.2. Etyoloji:	4
2.1.3. Meme Kanseri ile İlişkili Genler	4
2.1.4. Meme Kanseri Tedavisi	5
2.1.4.1. Cerrahi	5
2.1.4.2. Radyoterapi.....	5
2.1.4.3. Kemoterapi.....	6
2.2. HÜCRE METABOLİZMASI.....	6
2.2.1. Glikoz Metabolizması.....	7
2.2.1.1. Glikoliz	8
2.2.1.2. Warburg Etkisi	9
2.2.1.3. Trikarboksilik Asit Döngüsü	9
2.2.1.4. Oksidatif Fosforilasyon.....	10
2.2.1.5. Glukoneogenez:	13
2.2.1.6. Pentoz Fosfat Yolu.....	13
2.2.2. Protein Metabolizması	14
2.2.3. Lipid Metabolizması	15
2.3. ENERJİ METABOLİZMASI	16
2.4. ANTRASİKLİNLER	16
2.4.1. Doksorubisin.....	18
2.5. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI.....	18

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. KULLANILAN MALZEMELER	20
3.1.1. Kullanılan Kitler	20
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	20
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	22
3.2. HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI	22
3.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması	23
3.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	23
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	23
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	24
3.2.5. Hücre Sayımı	24
3.2.6. Hücrelerin Plakalara Ekimi.....	25
3.2.7. MTT deneylerinin yapılması	25
3.2.8. IC50 Değerinin Belirlenmesi.....	26
3.3. TOTAL RNA İZOLASYONU	26
3.3.1. Total RNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi	27
3.3.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	27
3.3.3. Kanser Metabolizmasındaki Sinyal Yolak Analizi.....	27
3.4. FLOW SİTOMETRİ ANALİZLERİ	29
3.4.1. Anneksin V ve Apoptoz Analizi	30
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER VE ANALİZİ.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. HÜCRE KÜLTÜR ANALİZ BULGULARI.....	32
4.1.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	32
4.1.2. MCF-7 Hücre hattında Doksorubisin Uygulama Analizleri.....	32
4.1.3. MCF-7 Hücre Hattında Doksorubisin Sitotoksosite Ölçümleri.....	33
4.1.4. MCF-7 Hücre Hattında Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi	34
4.2. SİNYAL YOLAK ANALİZLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	37
4.2.1. MCF-7 Hücre Hattında Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi	37
4.2.2. Doksorubisine Duyarlı ve Dirençli MCF-7 Hücre Hattında Gen Ekspresyon Analizlerinin Değerlendirilmesi	37
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	57

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1: Kullanılan Kitler	20
Tablo 3.2: Kullanılan sarf malzemeler.....	21
Tablo 4.1: Doksorubisin'in MCF-7 hücre hattında 48. saatteki IC50 değeri	33
Tablo 4.2: Doksorubisin 'in 48 saatlik inkübasyon ve seri dilüsyonlardaki sitotoksik etkileri	33
Tablo 4.3: Apoptoz analizi sonrası veriler	37
Tablo 4.4: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yolaklarında ekspresyonu azalan genler	39
Tablo 4.5: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yolaklarında ekspresyonu artan genler.....	39
Tablo 4.6: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yolaklarında ekspresyonu azalan genler	42
Tablo 4.7: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yolaklarında ekspresyonu artan genler.....	42
Tablo 4.8: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yolaklarında ekspresyonu değişmeyen genler	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1: Doksorubisinin seri dilüsyonlardaki 48. saatteki % canlılık grafiği	34
Şekil 4.2: MCF-7 Doksorubisin dirençli hücrelerinde IC50 konsantrasyonlarında 48 saatlik süre ile uygulanan Doksorubisin molekülünün Anneksin V sonuçları.....	35
Şekil 4.3: MCF-7 Doksorubisin duyarlı hücrelerinde IC50 konsantrasyonlarında 48 saatlik süre ile uygulanan Doksorubisin molekülünün Anneksin V sonuçları.....	36
Şekil 4.4: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolak genel analizi	40
Şekil 4.5: Reactome veri tabanından alınan Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolları.....	41
Şekil 4.6: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolak genel analizi	44
Şekil 4.7: Reactome veri tabanından alınan Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolları.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Aminoasit
ATP	: Adenozintrifosfat
CDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOX	: Doksorubisin
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Östrojen Reseptörü
FADH2	: Flavin Adenin Dinükleotid
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
G6PD	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
IDC	: İnvaziv Duktal Karsinom
ILC	: İnvaziv Lobüler Karsinom
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
OXPHOS	: Oksidatif Fosforilasyon
QPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDK	: Pirüvat Dehidrogenaz Kompleksi
PEP	: Fosfo Enol Pirüvat
PPP	: Pentoz Fosfat Yolu
R5P	: Riboz-5-Fosfat
TME	: Tümör Mikroçevresi
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri

MEME KANSERİ MCF-7 HÜCRE HATTINDA METABOLİK YOLLARIN ÇALIŞILMASI

ÖZET

Amaç: Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda sık görülen ve ölüme neden olan bir hastalıktır. Kemoterapi, meme kanseri tedavisinde temel bir yaklaşımdır. Ancak, kemoterapinin etkinliğini azaltan intrinsik veya edinilmiş ilaç direnci, hastalığın ilerlemesi, nüks etmesi ve ölüme sonuçlanması gibi önemli engellerle karşılaştırılabilir.

Doksorubisin (DOX), meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antrasiklin kemoterapötik ajandır. DOX, DNA'da serbest radikal aracılı oksidatif hasar oluşturarak apoptozu indükleyen bir topoisomera II inhibitörüdür.

Çalışmanın amacı, doksorubisin duyarlı ve dirençli meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarında hücreler arasındaki farklılıkları araştırmak ve doksorubisine karşı dirence katkıda bulunan metabolik aktivitelerde rol oynayan yollarda yeni molekülleri keşfetmektir. Bu araştırma, meme kanseri tedavisinde alternatif terapi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamayı hedeflemektedir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, doksorubisin duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hattı kullanılmış ve doksorubisinin etkileri incelenmiştir. MTT yöntemiyle 48 saatlik IC₅₀ konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca, metabolik yolda görev alan 46 gen üzerinde RT-qPCR yöntemiyle gen ifadesi analizi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Doksorubisinin duyarlı ve dirençli MCF-7 meme kanseri hücre hattında klinik ilaç olarak etkileri incelenmiştir. 48. saat IC₅₀ değeri 0,0027 µM (p<0,001) olarak bulunmuştur. Metabolik yola analizinde, duyarlı MCF-7 hücre hattında apoptozun indüklendiği tespit edilmiştir.

Sonuç: Doksorubisinin, dirençli MCF-7 hücre hattında bazı yollarda direnç gösterdiğini, duyarlı olan MCF-7 hücre hattında ise doksorubisinin hücreyi nekrotik sürece sürüklediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, doksorubisinin farklı hücre hatları üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına ve meme kanseri tedavisindeki potansiyel etkinliğinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, MCF-7, Meme Kanseri, Metabolik Yolak



INVESTIGATION OF METABOLIC PATHWAYS IN MCF-7 CELL LINE FOR BREAST CANCER

ABSTRACT

Aim: Breast cancer is a prevalent and fatal disease among women worldwide. Chemotherapy is a fundamental approach in breast cancer treatment. However, intrinsic or acquired drug resistance that reduces the effectiveness of chemotherapy presents significant obstacles such as disease progression, recurrence, and mortality.

Doxorubicin (DOX) is a widely used anthracycline chemotherapeutic agent in the treatment of breast cancer. DOX induces apoptosis by causing free radical-mediated oxidative damage to DNA and inhibiting topoisomerase II.

The aim of this study is to investigate the differences between doxorubicin-sensitive and resistant breast cancer (MCF-7) cell lines and to discover new molecules involved in pathways contributing to resistance against doxorubicin. This research aims to contribute to the development of alternative therapeutic approaches in breast cancer treatment.

Materials and Methods: In our study, doxorubicin-sensitive and resistant MCF-7 breast cancer cell lines were used, and the effects of doxorubicin were examined. The 48-hour IC₅₀ concentration was determined using the MTT method. Additionally, gene expression analysis was performed on 46 genes involved in metabolic pathways using the RT-qPCR method.

Results: The effects of doxorubicin as a clinical drug were examined in doxorubicin-sensitive and resistant MCF-7 breast cancer cell lines. The 48-hour IC₅₀ value was found to be 0.0027 μ M ($p < 0.001$). In the metabolic pathway analysis, apoptosis was induced in the sensitive MCF-7 cell line.

Conclusion: Doxorubicin was found to exhibit resistance in certain pathways in the resistant MCF-7 cell line, whereas in the sensitive MCF-7 cell line, doxorubicin led the cell towards a necrotic process. These findings can contribute to a better understanding of the effects of doxorubicin on different cell lines and its potential efficacy in breast cancer treatment.

Keywords: Breast Cancer, Doxorubicin, MCF-7, Metabolic Pathway



1. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda sık görülen ve önemli bir mortalite kaynağı olan heterojen kötü huylu tümörlerden biridir.

Son yıllarda tanı ve tedavi alanındaki ilerlemeler, meme kanserinin erken teşhisi ve etkili tedavisi için önemli bir adım olmuştur. Bu ilerlemeler, meme kanseri mortalite oranında belirgin bir düşüş sağlamıştır. Meme kanseri tedavisine verilen yanıt, meme kanserinin özgül biyolojik özelliklerine bağlıdır ve bu nedenle meme kanseri sınıflandırmaları geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmalar arasında, diğer türlerden daha agresif davranışlar sergileyen üçlü negatif meme kanseri (TNBC) öne çıkar. TNBC, östrojen reseptörleri, progesteron reseptörleri ve ERBB2/HER2 proteini için negatif test edildiğinde tanımlanır ve genellikle geleneksel sitotoksik sistemik kemoterapi ile tedavi edilir.

Meme kanseri tedavisi, cerrahi müdahale ve çeşitli adjuvan terapilerin bir kombinasyonunu içerir. Başlangıç tedavisine genellikle iyi bir yanıt alınsa da, tedavi ilerledikçe tümör daha agresif bir fenotipe dönüşebilir ve geleneksel tedavilere direnç geliştirebilir. Bu durum, hastalığın nüks etmesine ve günümüz kanser tedavisi için temel bir sorun haline gelmesine neden olur. Kemoterapötik ajanlar arasında sıkça kullanılan doksorubisin, TNBC'de direnç gelişimine sıkça neden olabilir ve bu da çoklu ilaç direncine yol açabilir. Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde ilaç direncinin gelişimini anlamak ve bu direnci aşmak için yeni stratejiler geliştirmek kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızın odak noktası özellikle doksorubisin duyarlı ve dirençli Meme Kanseri (MCF-7) hücre hattında metabolik yolakta etkili olan genlerin ekspresyon seviyelerini incelemek ve moleküler düzeyde hedefe yönelik yeni inhibisyon mekanizmalarını keşfetmektir. Bu bağlamda, hücredeki metabolik yolların analizi yapılarak, hücre yıkımını düzenleyen yollar dikkate alınmış ve yeni antitümoral hedeflerin belirlenmesi için çalışmalar yürütülmüştür. Elde edilen veriler, farklı yolları hedefleyerek hedefe yönelik bir inhibisyon potansiyelinin varlığını araştırmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, yaygın olarak bulunan yıkım yolları göz önünde bulundurularak, yeni antitümöral hedeflerin keşfi için çaba harcanmıştır. Bu çalışmanın temel amacı, metabolik yolakta etkili olan yeni moleküllerin keşfiyle

hücredeki sağkalım ve yaşamsal faaliyetlerdeki kaliteyi artırarak etkin tedavi maliyetlerini azaltmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve yeni tedavilerin geliştirilmesine rağmen, son on yılda ölüm oranlarında önemli bir düşüş gözlenmemiştir (1). Bu durumun bir kısmı, meme kanserlerinin genetik çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, tüm meme kanseri alt tiplerine karşı etkili tek bir tedavi mevcut değildir. Meme kanserleri, hormon reseptörü durumları veya BRCA1/2 ve PIK3CA gibi belirli mutasyonlar temelinde sınıflandırılabilir (2,3). Bu sınıflandırma, meme kanseri vakaları için en uygun tedaviyi belirlemek için biyo belirteç olarak kullanılabilir. Ancak, birçok meme kanseri tek bir hedefe odaklanan DNA dizisinde meydana gelen mutasyonlar içermez ve tümör heterojenitesi nedeniyle, hedefe yönelik tedavilerin tüm meme kanseri hücrelerini yok etmesi mümkün olmayabilir (4).

2.1.1. Meme Kanseri Patolojisi

Meme kanseri, belirgin patolojik özellikler (örneğin, duktal, lobüler, mükinoz vb.) ve moleküler özellikler (örneğin, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü ekspresyonu (PR), HER2 amplifikasyonu ve daha yakın zamanda lümen ve bazal kanserler gibi transkriptom temelli sınıflandırmalar) tarafından tanımlanan bir dizi hastalıktır (5–7). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), meme kanserini histolojik özelliklere dayanarak sınıflandırmıştır. Meme kanserinin çoğu, %75-80 oranında invaziv duktal karsinoma (IDC) veya %10-15 oranında invaziv lobüler karsinom, klasik tip (ILC) olarak sınıflandırılmıştır (8).

2.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

2.1.2.1. Epidemiyoloji: Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen malign tümörlerden biridir. Onkolojik hasta popülasyonunun yaklaşık %36'sını oluşturarak önemli bir sağlık endişesi oluşturmaktadır (9,10). 2018 yılında yaklaşık 2.089 milyon kadına meme kanseri tanısı konmuştur. Bu vakaların büyük bir kısmı gelişmiş ülkelerde rapor edilmektedir (10,11). Bu artış eğilimi, özellikle kötü beslenme alışkanlıkları, nikotin kullanımı, yoğun stres ve düşük fiziksel aktivite gibi Batı tarzı yaşam biçimleri ile ilişkilendirilmektedir (11).

Meme kanseri taraması genellikle mamografi ile gerçekleştirilir ve özellikle 50-69 yaş aralığındaki kadınlar için önerilmektedir (9,11). Mamografinin bu yaş grubunda yüksek değeri bulunmaktadır. Klasik mamografi, %75-95 hassasiyet ve %80-95 özgüllük seviyelerine sahiptir (12). Şüpheli kalıtsal meme kanseri vakalarında, manyetik rezonans mamografisi tarama testi olarak kullanılmaktadır. Mamografide şüpheli bir lezyon tespit edilirse, genellikle ultrason muayenesi yapılarak ve gerektiğinde tümörün histopatolojik muayenesi için kalın iğne biyopsisi yapılır.

2.1.2.2. Etiyoloji: Meme kanserinin etiyojisi, çeşitli risk faktörlerinin karmaşık etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Özellikle meme kanseri öyküsü, pozitif aile öyküsü, obezite, uzun boyluluk, sigara içme, alkol tüketimi, erken adet görme, geç menopoz, hareketsiz yaşam tarzı, çocuksuzluk ve hormon replasman tedavisi gibi faktörlerin bir araya gelmesi, meme kanseri gelişimini artırabilir.

Meme kanseri riskini azaltan faktörler arasında ise çok doğum yapma, emzirme öyküsü, fiziksel aktivite ve kilo kaybı bulunmaktadır. Obezite ve doğurganlık gibi faktörlerin meme kanseri etiyojisi üzerindeki etkisi, meme kanseri insidans oranlarının yılda yaklaşık %0,5 artmasıyla gösterilmiştir (1).

Meme kanseri, erkeklerden çok kadınlarda daha sık görülen bir hastalıktır ve yaşla birlikte ve ırkla da oldukça ilişkilidir. Birinci derece akrabası meme kanseri olan kadınların, hayatları boyunca meme kanseri geliştirme olasılığının iki ila üç kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (13).

2.1.3. Meme Kanseri ile İlişkili Genler

Meme kanseriyle ilişkili önemli genetik risk faktörlerinden biri aile geçmişidir. Bu aile geçmişi olan meme kanseri vakaları, tüm meme kanseri vakalarının %5 ila %10'unu oluşturmaktadır (14). BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, STK11 ve CDH1 gibi yüksek penetranslı mutasyonların yanı sıra, CHK2, ATM, RAD51C, BRIP1 ve PALB2 gibi daha ılımlı penetranslı varyantların meme kanseri ve hastalığı yatkınlaştırdığı bildirilmiştir (15,16). Bu genler arasında BRCA1 ve BRCA2, meme kanseri için ana yatkınlık gösteren genler olarak kabul edilir ve genetik test önerilir (17).

BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarını taşıyan bireylerin meme kanseri geliştirme riski %47 ile %87 arasında değişirken, BRCA1 taşıyıcılarının yaşamları boyunca meme kanseri geliştirme riski %65 ila %80, BRCA2 mutasyon taşıyıcılarının ise %45 ila %85

arasındadır. Yumurtalık kanseri geliştirme riski de önemlidir; BRCA1 taşıyıcılarında %37 ile %62, BRCA2 taşıyıcılarında ise %11 ile %23 arasında değişmektedir (18–20).

Yaklaşık olarak dört veya daha fazla meme kanseri vakası olan ailelerin yaklaşık %52'sinde BRCA1 mutasyonları, %32'sinde ise BRCA2 mutasyonları bulunmuştur (21). Ancak, BRCA1 ve BRCA2'nin somatik mutasyonları, sporadik meme kanseri vakalarında nadirdir (22,23). 40 yaşından önce meme kanserine yakalanan kadınlarda, BRCA1 veya BRCA2 mutasyonlarının yaygınlığı, daha yaşlı yaşlarda meme kanseri tanısı konmuş kadınlara göre daha yüksektir.

BRCA mutasyon taşıyıcılarında tanımlanan birkaç tanınabilir histolojik özellik bulunmaktadır ve bu mutasyonların yaygınlığı, ilgili popülasyonlarda kurucu mutasyonlar olarak erken yaşta hastalığın başlangıcı ile ilişkilendirilmiştir (24–26).

2.1.4. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin tüm alt tiplerinin tedavisinde genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler bir arada kullanılır (27).

2.1.4.1. Cerrahi: Meme cerrahisinin standart yaklaşımları genellikle mastektomi (meme dokusunun tamamen çıkarılması) veya meme koruyucu cerrahi (lumpektomi) olarak bilinir. Lumpektomi, meme tümörünün etrafındaki normal dokunun bir kısmıyla birlikte tümörün çıkarılmasını içerir (28).

2.1.4.2. Radyoterapi: Radyoterapi, meme dokusunun bir bölümüne, mastektomi sonrası göğüs duvarına ve bölgesel lenf nodlarına uygulanabilir. Mastektomi sonrası nüks riski yüksek olan hastalar için bölgesel nod radyasyonuna ek bir radyasyon takviyesi yapılabilir. Radyoterapi, kişiselleştirilmiş tedavi ile birlikte eş zamanlı olarak uygulanabilir (29). Radyoterapinin önemli yan etkilerinden biri kardiyotoksisite olduğundan, kalp ve akciğerlere maruziyeti en aza indirmek önemlidir. Bu nedenle, yan etkilerin azaltılması için farklı teknikler kullanılabilir, bunlar arasında yüzüstü pozisyon alma, solunum kontrolü veya yoğunluk modülasyonlu radyoterapi bulunur (30).

Gelişmiş invaziv meme kanseri, radyoterapi direnci gösterebilir (31). Oksijeni eksik olan hipoksik tümör mikro çevresi, artmış hücre proliferasyonuna, apoptoz direncine ve radyoterapi direncine neden olabilir (32). Radyoterapi, tüm meme kanseri alt tiplerini tedavi etmek için kullanılır, ancak üçlü negatif meme kanseri (TNBC) için bu

etkisi daha önemlidir, çünkü bu alt tipte kişiselleştirilmiş tedavi yoktur. Meme koruyucu cerrahiden veya mastektomiden sonra radyoterapinin TNBC hastalarına faydalı olduğu gösterilmiştir (33).

2.1.4.3. Kemoterapi: Meme kanseri kemoterapisi, birkaç ailenin sitotoksik ilaçlarını içerir. Bunlar arasında alkile edici ajanlar, antimetabolitler ve tübülün inhibitörleri bulunur (34). Siklofosfamid, DNA zincirlerinin kırılmasına neden olan bir nitrojen mostu alkile edici ajanıdır (35). Antarsiklinlerin (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisin) mekanizması, DNA'ya bağlanarak makromoleküler biyosentezi inhibe eder (36). Doketaksel ve paklitaksel gibi taksanlar, mikrotübüllere bağlanır ve hücre döngüsünün durmasına ve apoptozun başlamasına neden olabilir (37).

2.2. HÜCRE METABOLİZMASI

HücreSEL metabolizma, biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesi için metabolitlerin dönüştürüldüğü kompleks bir biyokimyasal reaksiyon ağıdır (38,39). Bu biyokimyasal ağın merkezinde, molekülleri parçalayarak enerji üreten katabolik yollar bulunur; elde edilen bu enerji ise biyosentetik süreçler ve mekanik işler için kullanılır (40).

Hücreler, enerji gereksinimlerini karşılamak için genellikle glikoliz ve oksidatif fosforilasyon gibi metabolik yolları kullanırlar (41). Glikoliz, düşük bir verimliliğe sahip olmasına rağmen yüksek bir enerji üretme kapasitesine sahiptir; oksidatif fosforilasyon ise daha yüksek bir verimlilikle çalışmasına karşın daha az enerji üretir (40–42). Bu farklılıklar, düşük enerji taleplerinde saf oksidatif fosforilasyondan yüksek enerji taleplerinde karışık oksidatif fosforilasyona ve zorunlu fermantasyona (glikoliz + laktat salımı) metabolik bir geçiş olduğunu gösterir (42,43). Örneğin, memelilerde, bu durum hücre onarımı gibi yüksek enerji gerektiren süreçlerde yaklaşık 2 mol ATP/L/saat enerji tüketiminde ortaya çıkar (43).

Maksimum büyüme hızını veya genel maksimum metabolik hızı sürdürmek için belirli bir enerji talebi gereklidir. Maksimum büyüme hızındaki enerji talebi genellikle yalnızca glikoliz yoluyla sağlanabilir (42).

Hücre metabolizması; makromoleküller ve organel dolu bir hücreSEL ortamda gerçekleşir (44). Moleküler yoğunluk, metabolik enzimlerin ve diğer hücreSEL makromoleküllerin maksimum yoğunluğuna bir sınırlama getirir ve bu nedenle

maksimum metabolik hızı kısıtlar (45). Ayrıca, moleküler yoğunluk, düşük metabolik hızlarda kısıtsız enzim yoğunluğundan yüksek metabolik hızlarda kısıtlı enzim yoğunluğuna bir geçişe işaret eder (46). Hücreler; metabolik hızı artırmak için metabolik enzimlerin yoğunluğunu artırabilir. Yüksek metabolik hızlar için yüksek enzim yoğunluğu, yüksek verimli yolların kullanılmasının nedenidir (45,46).

2.2.1. Glikoz Metabolizması

Glukoz, vücuttaki enerji metabolizmasında hayati bir role sahiptir. Karbonhidratlar ve proteinler, nihayetinde glikoza parçalanır ve bu da memelilerde temel metabolik yakıt olarak hizmet eder, aynı zamanda fetusun evrensel bir yakıtıdır. Yağ asitleri ise ketonlara metabolize edilir. Ancak, ketonlar glukoneogenezde kullanılamazlar. Glikoz, çeşitli karbonhidratların sentezinde birincil öncüdür; bunlar arasında glikojen, riboz, deoksiriboz, galaktoz, glikolipidler, glikoproteinler ve proteoglikanlar bulunmaktadır.

Diğer taraftan, bitkilerde glukoz, karbondioksit ve suyun fotosentez yoluyla sentezlenmesiyle elde edilir ve nişasta olarak depolanır. Hücresel düzeyde, glikoz genellikle dokulara girer ve adenosin trifosfat (ATP)'ye dönüşerek enerji sağlar. ATP, vücudun temel enerji birimidir ve hücre zarları boyunca moleküllerin aktif taşınması, kas kasılması ve mekanik işlerin gerçekleştirilmesi, sentetik reaksiyonlarla hormonların, hücre zarları ve diğer önemli moleküllerin sentezlenmesi, sinir uyarılarının iletilmesi, hücre bölünmesi ve büyümesi gibi bir dizi fizyolojik fonksiyonun gerçekleştirilmesine katkıda bulunur (47,48).

2.2.1.1. Glikoliz: Glikoliz, evrim sürecinde çoğu organizma türünde gelişmiş olan ve anaerobik enerji kaynağı olarak işlev gören bir metabolik yol olarak kabul edilir (49). Glikoliz, oksijen gerektirmemesine rağmen anaerobik solunumdaki işlevi nedeniyle hücresel solunumun başlangıç adımını oluşturur. Bitkilerde, mikroplarda ve hayvanlarda bulunan glikoz moleküllerinin oksidasyonunu içerir; bu moleküller genellikle en önemli organik yakıt kaynağıdır. Çoğu hücre glikozu tercih ederken (ancak istisnalar arasında etanolü tercih eden asetik asit bakterileri gibi örnekler bulunur), glikoliz sürecinde her bir glikoz molekülü için 2 ATP molekülü tüketilir ve 4 ATP, 2 NADH ve 2 pirüvat molekülü üretilir (50–52). Üretilen pirüvat molekülleri sitrik asit döngüsünde kullanılabilir veya diğer reaksiyonların öncüsü olarak görev yapabilir.

Glikoliz, hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşen ve glikozun iki pirüvat molekülüne ayrılmasıyla sonuçlanan iki aşamalı bir süreç olarak kabul edilir. Bu süreci, biri "yatırım" aşaması ve diğeri "ödeme" aşaması olmak üzere iki aşamada değerlendirebiliriz. Her bir reaksiyon, kendi özgün enzimi tarafından katalizlenir ve fosfofruktokinaz enzimi, düzenleme için kritik bir rol oynar, çünkü reaksiyon hızını kontrol eder (49).

Glikoliz, hem aerobik (oksijenli) hem de anaerobik (oksijensiz) koşullarda gerçekleşir. Aerobik koşullarda, pirüvat sitrik asit döngüsüne katılır ve oksidatif fosforilasyon sürecinde net olarak 32 ATP molekülünün üretilmesine yol açar. Anaerobik koşullarda ise pirüvat, anaerobik glikoliz yoluyla laktata dönüşür ve bu süreçte 2 ATP molekülü üretilir.

Glikoz, altı karbon atomu ve altı oksijen atomu içeren bir monosakkarittir ve bir hekzoz şeklindedir. İlk karbon atomuna bir aldehit grubu bağlıdır ve diğer beş karbon atomu üzerinde hidroksil grupları bulunur. Glikoliz sırasında, glikoz sonunda pirüvata parçalanırken ve enerji üretilirken toplamda 2 ATP molekülü elde edilir (Glikoz + 2 NAD⁺ + 2 ADP + 2 Pi --> 2 Pirüvat + 2 NADH + 2 H⁺ + 2 ATP + 2 H₂O). Hidroksil grupları, fosforilasyon reaksiyonlarına izin verir. Glikolizde kullanılan glikozun spesifik formu genellikle glukoz 6-fosfattır (53).

2.2.1.2. Warburg Etkisi: 1920'lerde, Otto Warburg ve meslektaşları, tümör hücrelerinin çevresel dokuda olağanüstü miktarda glukoz tükettiğini gözlemlemiştir ve ayrıca, oksijen varlığında bile glukozun laktata fermentasyona uğradığını keşfetmiştir. Bu keşif sonrasında "aerobik glikoliz" terimini ortaya çıkarmıştır (54). Ancak, sadece solunumun tümör canlılığını sürdürebileceği de görülmüştür. Bu nedenle, tümör hücrelerinin enerji kaynağını kesmek için hem glukozun hem de oksijenin ortadan kaldırılması gerektiği sonucuna varılmıştır (55).

1929'da Herbert Crabtree, Warburg'un çalışmasını genişleterek tümörlerde glikoliz heterojenliğini incelemiş ve Warburg'un bulgularını doğrulamıştır, ancak tümörlerdeki solunumun değişken olduğunu keşfetmiştir (56). Crabtree, tümör hücrelerinin sadece aerobik glikoliz sergilemekle kalmadığını, aynı zamanda fermentasyonda da değişkenlik gösterebileceğini belirtmiştir.

Ancak, Warburg daha sonra aerobik glikolizin temelini işlevsiz mitokondrilerden kaynaklandığını öne sürmüştü ve bu olayın kanserin başlıca nedeni olduğunu iddia etmiştir. Bu fenomen, 1970'lerin başlarında Efraim Racker tarafından "Warburg Etkisi" olarak adlandırılmış ve tümörlerin solunum yeteneğini gösteren önceki verilere atıfta bulunulmuştur (57).

Onkogenlerin keşfi, büyüme faktörü sinyalizasyonunun onkogeneze başlatıcı bir olay olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır. Böylece, kanser biyolojisinde Warburg'un hipotezinin yeniden önem kazanmasını sağlamıştır (58–61). Ancak, yakın zamanlarda yapılan genetik ve farmakolojik çalışmalar, Warburg etkisinin tümör büyümesi için gerekliliğini kesin olarak göstermiştir.

Tümör metabolizması üzerine yapılan orijinal bulguların yeniden gözden geçirilmesi, bugün bile hem aerobik glikoliz hem de mitokondriyal metabolizmanın hedeflenmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır (62–65).

2.2.1.3. Trikarboksilik Asit Döngüsü: Sitrik asit döngüsü, hücresel metabolizmanın temel bir bileşeni olarak, karbon iskeletlerinin oksidatif katabolizmasının son adımlarını gerçekleştirir ve bu süreç, karbonhidratlar, amino asitler ve yağ asitleri gibi çeşitli biyomoleküllerin parçalanmasında rol oynar. Her oksidatif adım sırasında, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) veya flavin adenin dinükleotid (FADH₂) gibi bir koenzim azaltılır ve bu azaltılmış koenzimler doğrudan elektron taşıma zincirine katılarak, insan vücudundaki ATP üretimine önemli katkıda bulunur.

Sitrik asit döngüsüne önemli miktarda karbon girişi sağlayan asetil-CoA, glukoz veya yağ asitlerinden türetilir. Bu süreç, pirüvatın asetil-CoA'ya enzimatik dönüşümünü kolaylaştıran pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDK) tarafından başlatılır. PDK, üç protein alt ünitesinden oluşur ve toplamda beş kofaktör gerektirir. Her bir kofaktörün özgün rolü ve alt üniteler arasındaki düzenleme, kompleksin etkin bir şekilde düzenlenmesini sağlar. Özellikle, PDK'nin glukoz metabolizmasının temel bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir.

PDK'nin düzenlenmesi kovalent modifikasyon, alosterik düzenleme ve transkripsiyonel düzenleme mekanizmaları aracılığıyla gerçekleşir. Kovalent modifikasyon, PDK'nin fosforilasyonunu içerir ve bu, PDK aktivitesinin azalmasına neden olur. Fosforilasyon durumunu düzenleyen PDK kinazı ve fosfataz gibi enzimler, kompleksin aktivitesini ayarlar. Alosterik düzenleme, ürün inhibisyonu veya substrat aktivasyonu gibi doğrudan mekanizmalar aracılığıyla PDK'nin aktivitesini etkiler. Son olarak, transkripsiyonel düzenleme, oruç ve beslenme koşullarında üretilen enzim miktarına bağlıdır (66).

Asetil-CoA'nın sentezlenmesinden sonra, sitrik asit döngüsü olarak da bilinen metabolik bir süreç başlar. Bu döngü, mitokondrial matriks içinde sekiz adımdan oluşur ve asetil gruplarının son oksidatif adımlarını içerir. Bu süreçte, iki molekül karbondioksit gazı salınır ve azalmış koenzimler (NADH, GTP ve FADH₂) üretilir. Bu redoks reaksiyonlarının ayrıntılı mekanizmaları, moleküler düzeyde daha iyi anlaşılabilir (66–68).

2.2.1.4. Oksidatif Fosforilasyon: Normal hücrelerin enerji metabolizması, dengeli bir durumda sürdürülür. Oksijen varlığında, kısmi metabolitler mitokondrilerin iç zarındaki solunum zinciri enzim kompleksleri I-IV aracılığıyla iletilir ve adenosin trifosfat sentazın (ATPaz) oksidatif fosforilasyonu ile nihayetinde adenosin trifosfatlar (ATP'ler) sentezlenir (69,70), ki bu sadece tüm hücre enerjisi kaynağının küçük bir kısmını oluşturur. Hücreler iskemi ve hipoksiye maruz kaldığında hücreler enerji kaynağını sürdürmek için daha fazla glikolizle ilişkili enzim aktive edilir (71). Ancak, 1920'lerde Otto Warburg'un öncü çalışması, normal hücrelerin oksidatif fosforilasyonu aracılığıyla enerji ürettiğine karşın, tümör hücrelerinin oksijen arzı yeterli olsa bile enerjiyi genellikle glikoliz yoluyla ürettiğini göstermiştir (55). Tümör hücrelerindeki bu anormal metabolik durum, normal ve tümör hücreleri arasındaki en önemli metabolik fark olarak adlandırılan

Warburg Etkisi olarak adlandırılır. Warburg Etkisi, fenotip, madde metabolizması, moleküler düzenleme, proliferasyon, invazyon, bağışıklık kaçışı ve anjiyogenez uyarımı gibi tümör hücrelerinin oluşumu ve gelişimi ile ilişkilendirilen çeşitli özelliklerden sorumludur (72–74).

Genellikle oksijen varlığında glikoliz, glukoz molekülü başına sadece iki ATP üretir, bu da oksidatif fosforilasyon aracılığıyla yaklaşık olarak her glukoz molekülü başına üretilen ~38 ATP'den çok daha düşüktür. Bu nedenle, enerji kaynağı için, enerji üretiminin sonraki aşamasında genellikle artan glikoliz yerine, tümör hücrelerinin karmaşık ve enerji gereksinimlerini karşılamak için mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu kullanılmalıdır. Genellikle tümör hücrelerinde glikolizin toplam ATP'ye katkısı %1 ile %64 arasında değişmektedir (75). Ancak, daha fazla araştırma verisi ile, tümör hücrelerinin hala göreceli olarak tam mitokondri ve oksidatif fosforilasyon yeteneğini koruduğu ortaya çıkmıştır.

Glikoliz ile tümör hücreleri belirli koşullar altında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu kullanmaya teşvik edilebilir ve tümör hücrelerinin koruduğu mitokondriyal oksidasyon kapasitesi sadece enerji talebini karşılamakla kalmaz. Bu ayarlanmış eylemler, başlıca olarak anormal fenotipleri, fonksiyonel dönüşümleri veya iç ve dış uyarıcılardan kaynaklanan diğer fiziksel ve kimyasal faktörleri tetikler (76,77).

Glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, tümör hücrelerinin metabolik plastisitesi adı verilen çeşitli ve sofistike bir metabolik fenotipi oluşturur. Tümör hücrelerinin metabolik plastisitesi, hücrelerin hücre içi ve hücre dışı ortamlara uyum sağlamalarını sağlayarak tümör oluşumu ve gelişiminin tüm yönlerinde yüksek plastiklik ve yayılabilirlik kazanmalarını sağlar (78,79), bunlar arasında başlangıç ve ilerleme yer alır.

Ancak, tümör hücrelerinin glikoliz ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) dengesini dengelemek için gen düzenlemelerini nasıl koordine ettikleri ve bunun sonucunda metabolik plastisitelerini düzenleyerek oluşumlarını ve gelişimlerini nasıl etkiledikleri hala bilinmemektedir. Bu konu soruları aynı zamanda mevcut araştırmanın odak noktaları ve zorluklarıdır ve klinik tedavi için fırsatlar ve zorluklar getirir. Tümör oluşumu süreci tümör oluşumunun başlatılması, kontrolsüz proliferasyon, programlanmamış hücre ölümü, tümör mikroçevresinin (TME) gelişimi ve invazyon ve göç yeteneğinin kazanılması gibi birçok aşamayı içerir (80).

Başlangıç aşamasını takiben tümör hücrelerinin ilerlemesi, hücre döngüsü bozuklukları ve immün gözetim fonksiyonunun bozulması ile bir dizi gen mutasyonu veya genom değişiklikleri tarafından tetiklenir, bu da hücrelerin sürekli bölünmesine, apoptozdan kaçınmalarına, immün fagositoza kaçınmalarına ve büyümeyi engellemelerine neden olur (81–84). Bu kontrolsüz hücre durumu giderek birikir ve nihayetinde tümör oluşumuna yol açar. Tümör oluşumunun başlangıç aşamalarında, birçok metabolik yolun tümör oluşumunda ve gelişiminde önemli düzenleyici roller oynayabileceği ortaya çıkar (85–87). Daha da önemlisi, yoğun büyümenin ihtiyaçlarını karşılamak için kanser hücreleri, birçok onkogeni içeren metabolik modelini ayarlamak, bütünleştirmek ve değiştirmek zorundadır (88, 89). Glukoz taşıyıcı tip 3'ün (GLUT3) non-malignant meme kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonu, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR), MAP kinaz-aktive protein kinazının (MAPK), RAC-beta serin/treonin protein kinazının (Akt) ve diğer sinyal yollarının aktivasyonunu artırabilir ve glukoz metabolizmasını ve ilgili onkogenlerin ekspresyonunu artırarak hücre dönüşümü riskini artırabilir (90).

Sınırsız proliferasyon yeteneğine sahip tümör hücreleri, çevresel ortamda normal hücreleri yavaşça değiştirir, mümkün olan tüm besin maddelerini emer, anjiyogenezi teşvik eder ve daha sonra kanser hücrelerini daha da geliştirir. Ortam büyüme ihtiyaçlarını karşılayamadığında, tümör hücreleri endojen düzenleyici moleküllerin ifade modelini ve hücre fenotipini değiştirir, invazyon faktörleri salgılar, TME'yi dışarıdan etkiler, kan dolaşımına nüfuz eder ve dışarıya doğru yayılır. Bu süreçte, tümör hücreleri metabolik plastisite düzenlemesi yoluyla adaptif stratejilerini ayarlar, bu da besin maddelerinin emilim modunu ayarlamak gibi değişiklikleri içerir ve bununla birlikte glikolizden OXPHOS'a dönüşümü içerir (91,92). Başka bir örnek, infiltratif bağışıklık hücrelerinin metabolik yeniden düzenlenmesine yol açarak sonunda kaçınmasına izin vermek için tümör mikroçevresini laktik asit salgılayarak ayarlamaktır (93–96).

Daha sonra, metastatik tümör hücreleri kan ve lenfatik dolaşım yoluyla seyahat eder, çeşitli yollarla bağışıklık hücrelerinin gözetiminden kaçır, kan damarı duvarını infiltr eder ve ardından karşılıklı dolaşım için ikinci dikilebilir alanı ulaşır. Bu süreçte, tümör hücreleri de glikoliz ve OXPHOS'un metabolik süreçlerini yeniden düzenleyerek birçok şekilde metastaz yeteneklerini ve invazyonlarını etkileyebilir (97–100).

Bu nedenle, tümör hücre gelişiminin tüm aşamalarında, bazı faktörlerin ve yolların gelecekteki tümör eğilimlerini etkileyebileceği, dolaylı veya dolaylı olarak metabolizmayı düzenlediği ve metabolik plastisitenin düzenlenmesinin de tümör hücrelerinin hızlı büyümesini ve diğer ihtiyaçlarını etkileyebileceği unutulmamalıdır (101). Glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon arasındaki plastisitenin düzenlenmesi, tümör hücrelerinin temel özelliklerinden biridir (89,101). Bu metabolik plastisite, aynı zamanda antikanser ilaçların performansını da etkiler.

2.2.1.5. Glukoneogenez: Glikoneogenez, glukozun olmayan karbonhidrat substratlarını (örneğin laktat, amino asitler ve gliserol) glukozu dönüştüren biyokimyasal bir süreçtir. Bu süreçte, laktat ve alanin gibi substratlar öncelikle pirüvate dönüştürülür. Daha sonra, pirüvat mitokondriye girer ve pirüvat karboksilaz enzimi tarafından oksaloasetata karboksile edilir. Oksaloasetat, malata indirgenir ve sitoplazmaya taşınmak üzere geri dönüştürülür (102,103). Sonrasında, sitoplazmik PEP karboksikinaz enzimi tarafından fosfoenolpirüvate dekarboksilasyon gerçekleştirilir ve fosforile edilir. Bu aşamadan sonra, PEP glikoneojenik döngüye dahil olur. Ters glikoliz adı verilen bir dizi adımdan sonra, fruktoz 1,6-bifosfat verimli bir şekilde fruktoz 6-fosfata dönüştürülür. Bu dönüşüm, fruktoz 1,6-bifosfataz ve fosfoglukoizomeraz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Son olarak, glukoz-6-fosfat, glukoz-6-fosfataz enzimi tarafından defosforile edilerek glukozu dönüştürülür. Diğer glikoneojenik amino asitler, örneğin aspartat ve glutamat, alanin veya glikoneojenez için trikarboksilik asit döngüsündeki belirli ara maddelere daha dolaylı yollarla dönüştürülürler. Adipoz doku içinden plazmaya salınan gliserol, karaciğerde alınır ve daha sonra glukoneojenik yola giren dihidroksiaseton fosfatına dönüştürülür.

Glikoneogenez teorik olarak glikolizle ters yönlüdür, ancak glikolizde üç ana irreversible kinaz reaksiyonu, yani glukokinase, fosfofruktokinaz-1 ve pirüvat kinazı tarafından katalizlenirken, glikoneojenezde bu reaksiyonlar dört benzersiz glikoneojenik enzim olan pirüvat karboksilaz, fosfoenolpirüvat karboksikinaz, fruktoz 1,6-bifosfataz ve glukoz-6-fosfataz tarafından aşılmaktadır (104).

2.2.1.6. Pentoz Fosfat Yolu: Pentoz Fosfat Yolu (PPP), aynı zamanda heksoz monofosfat şanti veya fosfoglukonat yol olarak da bilinir ve glukoz metabolizmasında önemli bir rol oynar. PPP, riboz-5-fosfat (R5P) üretiminde kritik bir rol oynar ve sitoplazmik redüksiyon-oksidasyon (redoks) homeostazını düzenler (105).

Diğer metabolik yollar gibi, PPP tarafından ATP üretilmez. Ancak, hücrenin hayatta kalması ve çoğalması için kritik olan NADPH ve R5P'nin ana kaynağıdır. NADPH, yağ asitleri, steroidler, nükleotidler ve gerekli olmayan amino asitlerin biyosentezi için gereken bir indirgeyici kofaktördür (106). R5P ise nükleotid sentezi için gereklidir.

Bu nedenle, PPP, neoplastik dönüşüm için temel bir glukoz katabolik ve indirgeyici anabolik yol olarak hizmet eder. Ayrıca, PPP enzimleri arasında yer alan G6PD gibi enzimlerin, kanser önleme ve tedavisi için önemli olduğu gösterilmiştir (105).

PPP'nin oksidatif fazının ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olan G6PD, birçok kanser tipinde yukarı regüle edilmiştir. G6PD'nin aşırı ifadesi, DNA sentezi, DNA onarımı, hücre döngüsü düzenlemesi, redoks homeostazi, çoğalma, epitelyal-mesenkimal geçiş, invazyon ve metastazi etkilerken, artmış G6PD aktivitesi tümör hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direncini teşvik etmektedir. Bu nedenle, G6PD inhibisyonunun, tümör hücrelerinde kemoterapi direncini tersine çevirmede faydalı olduğu gösterilmiştir (107).

2.2.2. Protein Metabolizması

Proteinler, hücrel aktivite ve vücut metabolizmasının birçok yönünün temelini oluşturan önemli makrobesin maddeleridir. Protein sentezi, başlıca amino asit (AA) miktarı tarafından kontrol edilir ve bu miktar, sentez için gereken protein sayısı ve sentetik süreci sürdürmek için gereken enerji gereksinimleriyle doğrudan ilişkilidir (108).

Amino asitler (AA'ler), vücut içinde birçok kritik fonksiyonu yerine getirirler. Memeliler için azotun temel kaynağı olduklarından, AA'lerin sağladığı azot, ana enerji molekülleri (örneğin, ATP, ADP, IMP) ve/veya nükleik asitlerin (örneğin, DNA/RNA) öncüllerinin sentezi için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, nitrik oksit (NO) gibi önemli biyokimyasal sinyal yollarını düzenleyebilecek bileşiklerin üretiminde de kullanılırlar. İskelet kaslarından ve/veya dolaşan visseral proteinlerden salınan AA'ların deaminasyonu, sonraki biyokimyasal dönüşümler için uygun olan oksijen ve hidrojen bakımından zengin bir karbon iskeleti oluşturur (108).

Bu karbon iskeleti, karaciğer tarafından glukoneogenez yoluyla glikoz ve lipidler gibi diğer önemli makromoleküllerin üretimi için kullanılabilir. AA kaynaklı karbon iskeleti ayrıca Krebs döngüsünü besleyen ara maddelerin üretiminde kilit rol oynar ve

daha sonra enerji ve/veya diğerk metabolik ara maddelere dönüştürülür. Bu nedenle, AA'lar, vücut metabolik ihtiyaçlarına bağılı olarak enerji, karbonhidratlar, lipitler ve biyokimyasal ara maddelere dönüştürülebilen "biyokimyasal totipotent moleküller" olarak değerkendirilebilirler (109,110).

2.2.3. Lipid Metabolizması

Lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle birlikte biyolojik zarların temel bileşenleri ve hücreleri oluşturan yapı taşlarıdır. Ayrıca, lipitler enerji depolama ve metabolizmasında kullanılır ve birçok hücrel aktivite için sinyal molekülleri olarak önemli roller üstlenir. Lipid metabolizmasının düzenlenmesi, lipid alımı, sentezi ve hidrolizi gibi süreçler, hücrel homeostazın korunması için esastır (111). Tümör ilerlemesi sırasında besin maddelerinin sürekli olarak değıştiğı tümör mikroçevresinde kanser hücreleri, hızlı proliferasyon, hayatta kalma, göç, invazyon ve metastazlarını desteklemek için lipid metabolizmasını kullanır.

Glikolipitler ve fosfolipitler (fosfogliseritler ve sfingolipitler alt kategorilere ayrılır), kolesterol ile biyolojik zarların başlıca bileşenlerini temsil eder. Kolesterol ayrıca yağda çözünebilen vitaminlerin ve steroid hormonlarının sentezi için bir substrattır (112).

Glikolipitlerin ve fosfolipitlerin başlıca bileşenleri olarak yağ asitleri (YAs), trigliseritler oluşturmak için bir gliserol parçasıyla esterleştirilebilir. Bunlar, yüksek besin maddesi bulunabilirliğinde sentezlenen ve lipid damlacıklarında depolanan polar olmayan lipitlerdir ve enerji stres koşullarında ATP üretmek için yağ asidi oksidasyonu (FAO, aynı zamanda β-oksidasyon olarak da adlandırılır) ile hidrolize edilir. Enerji metabolizması ve zar oluşumunun yanı sıra, lipitler, zar lipitlerinin fosfolipaz bağımlı hidrolizasyonu ve esansiyel FA'ların sentezi yoluyla türetilen ikincil habercileri oluştururlar.

Bunların bulunabilirliği büyük ölçüde diyetle alınan lipitler tarafından belirlenir (113). Fosfolipazlar (PLC, PLD ve PLA), diasilgliserol, fosfatidik asit, lizofosfatidik asit ve arakidonik asit gibi birçok biyoaktif ikincil haberci üretebilirler. Bu moleküller, RAS, fosfoinositid 3-kinazları (PI3K'ler), protein kinaz C, RAC, RHO ve tümör oluşumunu teşvik edebilen diğerk birkaç sinyal ekseni aktivasyonunu tetikler (113,114).

Ayrıca, oksisterol ve kolesterol de dahil olmak üzere steroller, sterol regülatör element (SRE) bağılayıcı protein (SREBP) aktivasyonunun downstream gen ekspresyonu

için kritik düzenleyicileridir ve bu nedenle seviyeleri kanserde lipojenezi etkiler. Kolesterol, sinyalleşme için lipid raftlarının bir bileşenidir ve Hedgehog sinyalleşme aktivasyonu için Hedgehog ve Smoothened proteinlerini kovalent olarak modifiye edebilir (115,116).

2.3. ENERJİ METABOLİZMASI

Yaşayan hücrelerdeki büyüme, substrat katabolizması ile net biyokütle oluşumu ve bakım süreçlerinin birleşimi sonucu meydana gelir. Bu süreçler, iyonik gradyanların sürdürülmesi, protein, lipid ve nükleik asit dönüşümü gibi metabolik süreçlerin yanı sıra ATP/ADP ve NADH/NAD⁺ moleküllerinin etkileşimlerini içerir. Büyüme esnasında, anabolik yollar ATP tüketir ve NADH üretirken, katabolik yollar, örneğin mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, ADP ve Pi'den ATP sentezler ve NADH'yi NAD⁺ haline dönüştürerek enerji sağlar. Dolayısıyla, büyüme için gerekli olan hem ATP hem de NAD⁺ molekülleri, bu moleküllerin bulunabilirliğine bağlıdır. Hücre enerji metabolizması, ATP sentezi ile ilişkili olan metabolik yolları içerir ve NADH dönüşümüne bağlıdır (117).

ATP sentezi, ya substrat düzeyinde fosforilasyon yoluyla (glikoliz ve Krebs döngüsü) ya da oksidatif fosforilasyon yoluyla gerçekleşir. NADH, fermantasyon veya mitokondri iç zarındaki solunum zinciri ile oksitlenebilir. Glikoliz, glukozun pirüvate katabolizasyonunu sağlar ve her bir glukoz molekülü başına 2 ATP üretir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, mitokondri iç zarında bulunur ve redoks enerjisini fosfat potansiyeline dönüştürürken, proton elektrokimyasal potansiyeli membran boyunca bir araç olarak kullanır. Solunum zinciri, redoks reaksiyonlarını çiftleştirerek protonları dışarıya atarak enerji üretir (117).

2.4. ANTRASİKLİNLER

Antrasiklin antibiyotikler, aktinobakteri *Streptomyces peucetius*'tan izole edilen doğal ürünlerdir. Daunorubisin (DNR) fare modellerinde tümör küçülmesini indükleyen ilk bileşik olmuş ve sonrasında pediyatrik akut lösemi tedavisinde etkileyici klinik aktivite göstermiştir (118). 1970'lerdeki daha fazla araştırma, hidroksile daunorubisin türevidir ve son derece geniş bir terapötik aktiviteye sahip olan doksorubisinin (DOX) keşfine yol açmıştır. DOX, Hodgkin dışı lenfoma, Hodgkin lenfoma, multipl miyelom ve ayrıca akciğer, over, mide, tiroid, meme, sarkom ve pediyatrik kanserler dahil olmak

üzere birçok tümör türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık, DNR genellikle akut lösemi indüksiyon tedavisinde sınırlıdır (119).

Epirubisin (EPI), mide ve meme kanseri tedavisinde etkin olan daha az kardiyotoksik bir doksorubisin analogudur. IDA, akut miyeloid lösemi (AML) indüksiyon tedavisi için geliştirilmiş bir daunorubisin analogudur ve son olarak, erken mesane kanserinin intravezikal tedavisinde etkili olan bir antrasiklin olan valrubicin bulunmaktadır. Antrasiklinler, onkolojide kullanılan diğer herhangi bir antitümör ilaca kıyasla en geniş klinik kullanım aralığına sahiptir. Kardiyak toksisite ve miyelosupresyonu içeren iyi tanımlanmış bir toksisite profiline rağmen, antrasiklinler sıkça kombinasyon kemoterapi rejimlerinde kullanılmaktadır (119).

Tüm antrasiklinler, bir glisidik bağ ile bir aminoşeker olan daunosamin ile bağlı bir kinon içeren rijit planar aromatik bir halka yapısını paylaşır (118). Antrasiklin halka yapısında ortak bir kinon parçasının bulunması önemli bir klinik öneme sahiptir. Bu kimyasal grup, antrasiklin kaynaklı kardiyotoksisiteye neden olduğuna inanılan son derece reaktif kimyasal türlerin oluşumuna neden olabilen oksidasyon-indirgeme reaksiyonlarına kolayca katılabilir.

DOX, yalnızca bir C-14 hidroksil grubunun varlığı ile DNR'den farklıdır. EPI, DOX'un epimeridir ve sadece şeker üzerindeki C-4 hidroksil grubunun yöneliminde farklılık gösterir. Bu mütevazı yapısal değişiklik, EPI'nin kardiyak toksisitesini azaltırken geniş antikanser aktivitesini korur. IDA, C-4 metoksi grubu olmayan bir DNR analogudur, bu da artmış lipofiliklik sağlar.

Antrasiklinlerin karmaşık aromatik yapıları nedeniyle, ultraviyole ve görünür ışığı emerler ve bileşiklere derin turuncu-kırmızı bir renk sağlarlar. Fotosensitif olduklarından, hazırlık ve uygulama sırasında doğrudan ışığa maruz kalmaktan kaçınılmalıdır. Başlangıçta, antrasiklinlerin etki mekanizması kesin olarak tanımlanmamıştır (120). DNA interkalasyonu, antrasiklinlerin tanımlanan ilk etki mekanizmasıydı. 1984'te, klinik kullanımın yirmi yılının ardından, kesin etki hedefi topoisomera α z II α enzimi (TOPO II α) olarak karakterize edilmiştir (121,122). Antrasiklinler, TOPO II α 'nın religasyon reaksiyonunun inhibisyonunu indükleyerek proteinle bağlantılı çift ve tek sarmal DNA kırıklarının birikimine neden olur, bu da nihayetinde sitotoksik DNA hasarı ve hücre ölümüne yol açar. Bununla birlikte, antrasiklinlerin DNA TOPO II α kesikleme kompleksini nasıl stabilize ettiğiyle ilgili kesin adımlar tam olarak anlaşılmamıştır ve

aslında DNA interkalasyonundan bağımsız olabilir. Gen mutasyonları veya TOPO II α 'nın indirgenmesi sonucu oluşan ilaç direnci laboratuvar çalışmalarında karakterize edilmiştir (122).

Antrasiklinler, hücelere pasif difüzyon yoluyla girer. Bu, hücre içinde birikimlerinin, hücre dışındaki ilaç seviyelerinden 10 ila 500 kat daha yüksek konsantrasyonlara ulaşmasına neden olur. Antrasiklinlerin tümü, P-glikoprotein aracılı ilaç atılım pompası için substratlardır. MDR-1 ile ilişkili pleiotropik ilaç direnci, hematolojik ve pediatrik kanserlerin tedavisinde ve meme kanseri gibi diğer tümörlerde klinik ilaç duyarlılığının ana belirleyicisi olabilir (123).

2.4.1. Doksurubisin

Doksürubisin, *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen bir antibiyotiktir ve 1960'lardan beri kemoterapötik bir ajan olarak geniş bir kullanıma sahiptir. Doksurubisin, kemoterapötik ajanların antrasiklin grubunun bir parçasıdır; diğer antrasiklinler arasında daunorubisin, idarubisin ve epirubisin bulunur. Genellikle, doksurubisin, yetişkin ve pediatrik hastalarda katı tümörlerin tedavisinde kullanılan bir ajandır. Doksurubisin, yumuşak doku ve kemik sarkomalarını, meme, yumurtalık, mesane ve tiroid kanserlerini tedavi etmek için kullanılabilir. Ayrıca, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Hodgkin lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserini tedavi etmek için de kullanılır (124–127).

Doksürubisinin temel etki mekanizması, ilacın DNA baz çiftleri arasına girmesi yeteneğiyle, DNA ipliklerinin kırılmasına ve hem DNA hem de RNA sentezinin inhibe edilmesine neden olmasıdır. Doksurubisin, topoisomera II enzimini inhibe ederek, DNA hasarına ve apoptozun indüklenmesine neden olur. Demir ile birleştiğinde, doksurubisin ayrıca serbest radikal aracılığıyla DNA'ya oksidatif hasar da meydana getirerek, DNA sentezini daha da sınırlar (128).

2.5. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI

Hücre ölümü, genellikle apoptoz ve nekroz olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Apoptoz, çeşitli hücrel sinyal yolları tarafından düzenlenen bir tür "programlanmış hücre ölümü" olarak tanımlanır ve hücre içinde bir intihar mekanizması olarak işlev görür (129). Bir hücrenin apoptotik olarak sınıflandırılabilmesi için, nükleer yoğunlaşma ve parçalanma, kromozomal DNA'nın internükleozomal fragmanlara bölünmesi ve ölü

hücrenin apoptotik cisimlere paketlenmesi ve plazma membranının bütünlüğünün korunması gibi belirli morfolojik özelliklerin gözlemlenmesi gerekir. Apoptotik cisimler daha sonra fagositoz yapan hücreler tarafından tanınır ve uzaklaştırılır; bu nedenle apoptoz sırasında etrafında iltihaplanma olmaz. Apoptozun morfolojik özellikleri, kaspazların (sistein proteazlarının) ölüm reseptörü bağlanması veya mitokondrilerden apoptotik araçların salınması gibi süreçlerle aktive edilir. Apoptoz sırasında enerji tüketimi olması nedeniyle ATP gereklidir; bu nedenle apoptoz, düzenli ve düzenlenmiş bir ölüm sürecidir.

Apoptozun aksine, nekroz geleneksel olarak bir intihar mekanizması değil, bir tür pasif hücre ölümü şekli olarak kabul edilmiştir. Nekroz, hücrenin ATP tükenmesi sonucu biyoenerjetik bir felaketin meydana gelmesiyle ortaya çıkar ve genellikle toksik saldırılar veya fiziksel hasar gibi hücresel 'kazalar' tarafından tetiklenir. Nekroz sırasında sitoplazmanın boşalması, plazma membranının parçalanması ve ölü hücre çevresinde iltihaplanmanın indüklenmesi gibi belirgin morfolojik özellikler görülür. Nekroz sırasında, genellikle nükleer morfolojide değişiklikler meydana gelir ancak apoptotik hücre ölümünün karakteristik özelliği olan organize kromatin yoğunlaşması ve DNA'nın 200 bp fragmanlara parçalanması gözlenmez.

Son yıllarda, hücrelerin apoptoz dışındaki mekanizmalarla da ölebileceği fikri giderek kabul görmektedir. Bu alternatif hücre ölümü mekanizmaları programlanmış nekroz veya otofajik hücre ölümü olarak adlandırılır ve sınıflandırılır. 'Programlanmış' terimi, hücresel sinyal yollarının nekrozu belirli uyarıcılara yanıt olarak 'kazara' değil, belirli bir program dahilinde başlattığını ima eder. Programlanmış nekroz kavramı literatürde birkaç yıldır mevcuttur. İki süreç arasında morfolojik benzerlikler olmasına rağmen, otofajik hücre ölümü geleneksel olarak nekrozdaki ayrı bir non-apoptotik ölüm biçimi olarak sınıflandırılmıştır. Otofajı, kelimenin tam anlamıyla, kendini yemek anlamına gelir. Bu süreçte, hücreler besin stresi dönemlerinde hayatta kalma mekanizması olarak enerji üretimi için hücresel bileşenlerin parçalanmasına başlarlar. Otofajı süreci, çift zarlı bir vezikülün oluşumuyla başlar ve sitoplazmanın ve organelin içeri alınmasını sağlar. Bu otofagosom daha sonra içeriği parçalayıp geri dönüştüren lizozomla birleşir. Otofajı, hücrenin enerjiye ihtiyaç duyduğu zamanlarda hücreye enerji sağlamakla birlikte, zarar görmüş organel ve uzun ömürlü proteinlerin dönüşümü için de bir mekanizma sağlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma projesi Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) destekleme birimi desteğine başvurulmuş ve gerekli izin alınmıştır. Araştırmanın laboratuvar çalışmaları Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1. Kullanılan Kitler

Çalışma kapsamında kullanılan kitler Tablo 3.1.' de belirtilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan kitler

Kullanılan Kitler
RNA izolasyon Kiti (Analytik Jena Innuprep)
CDNA Sentez Kiti (SensiFast BioLine)
MTT Hücre Canlılık Kiti (Roche)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD)

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışma kapsamında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.2' de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan Sarf Malzeme
MCF-7 Hücre Hattı (ATCC No; HTB 22)
Doksorubisin Antrasiklin
DMEM high-glucose (Euroclone)
L-glutamin-100X (Euroclone)
Penisilin/streptomisin 100X (Euroclone)
SYBR Green Master mix (Euroclone)
qPCR Primer Seti (Sigma-Aldrich)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich)
Tripsin- EDTA %0,25 (Merck-Millipore)
Dulbecco's Fosfat Tampon Çözeltisi (DPBS) (Merck-Millipore)
Tripan mavisi (Merck-Millipore)
Diimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck-Millipore)
Etil Alkol (Merck - Millipore)
Flow (akış) Sitometre Solüsyonu (Beckmann Coulter)
25 cm ² hücre kültürü flasksı (EuroClone)
75 cm ² hücre kültürü flasksı (EuroClone)
100 mm hücre kültürü petri (EuroClone)
qPCR Plakaları (Axygen)
0,25µm şırınga ucu filtre (Merck-Millipore)
50 ml enjektör (steril) (Beybi)
2 ml kriyotüp (Sorfa)
Hücre Sayım Kartuşu TC10/20 (BioRad).
2 ml Santrifüj Tüpü (İsolab) (Euroclone)
15 ml Santrifüj Tüpü (İsolab)
50 ml Santrifüj Tüpü (İsolab)
5 ml serolojik pipet (Euroclone)
10 ml serolojik pipet (Euroclone)
25 ml serolojik pipet (Euroclone)
10 µl filtreli pipet ucu (EuroClone)
100 µl filtreli pipet ucu (EuroClone)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3.3' de belirtilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan cihazlar listesi

Kullanılan Cihaz
qRT-PCR Cihazı Analytik Jena QTower3
Semi-Dry Western Blot Sistemi (Analytik Jena)
Sınıf II Hücre kültürü kabini Eurclone (Safemate Eco 1,2)
Hücre sayım cihazı (Biorad TC20)
Hücre Görüntüleme Sistemi (Biorad)
Akış Sitometresi (Beckmann Coulter CytoFlex)
CO ² İnkübatör (MCO-170AICUV)
Spektrofotometre (Thermo Scientific)
Saf (distile) su cihazı (Merck-Millipore)
Masaüstü Otoklav
RNA izolasyon Kabini (Yerli Üretim)
Masaüstü Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf)
Mikropipet Seti (10-100-1000) (Eppendorf)
Çok Kanallı Mikropipet Seti (Eppendorf)
Pipetör (Eppendorf)
Isıtıcı Blok (İsolab)
Vorteks (İsolab)
Su Banyosu (İsolab)
Buz Makinası (HIMS- 50)
+4 °C Buz Dolabı (Uğur)
-20 °C Buz Dolabı (Uğur)
-20 °C Buz Dolabı (Binder)

3.2. HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

Doksorubisin duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hattı kullanılarak, belirlenen metabolik yolak moleküllerinin ve klinik ilacın hücre kültürü çalışmalarıyla etkinliğinin araştırılması amacıyla aşağıda belirtilen çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

MCF-7 doksorubisine duyarlı ve dirençli hücre hattı meme kanseri hücreleri (ATCC no: HTB 22) için DMEM besiyeri hazırlanmıştır. 445 ml DMEM besiyerine %10 oranında 50 ml sığır fetüs serumu (FBS) ile birlikte 5ml 10u/ml pen/strep (penisilin-streptomisin) eklenerek hazırlık süreci tamamlanmıştır.

Hazırlanan besiyeri, 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve ardından +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. MCF-7 hücre hattına uygulanan bu besiyeri, %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %95 nem içeren CO₂ inkübatöründe inkübasyon sağlanarak hücrelerin büyümesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

MCF-7 doksorubisine duyarlı ve dirençli meme kanseri hücre hattı hücrelerinin temel fizyolojik ve genomik aktiviteleriyle birlikte metabolik faaliyetlerinde herhangi bir zarar görmeden uzun süre saklanabilmesi adına -196°C'de sıvı azot tanklarında kriyovial tüplerinde dondurulmuş bir şekilde saklanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sıvı azot içinde saklanan bu hücreler özellikle düşük pasaj sayısında sahip olmakla birlikte çalışmalara sırasında oluşabilecek kontaminasyon gibi durumlarda hücre kaybının önüne geçmektedir. Sıvı azot tankında bekletilen hücreler özelliklerini kaybetmeden uzun süre saklanabilmekte ve aktivitelerini koruyabilmektedirler. Çalışmamızda ihtiyaç duyulan MCF-7 hücreleri sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra kriyovial tüp içindeki hücrelerin hızlıca erimesi sağlanıp uygun besiyerinin aktarımı gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan hücre süspansiyonu 5 dakika 2000 rpm' de santrifüj edildikten sonra çöktürülen pellette hücreler barınırken, üstteki fazda ise dimetilsülfoksit (DMSO) bulunur. Dimetilsülfoksit hücre üzerinde toksit etkiler oluşturur bu yüzden atılması gerekir. Pellet üzerinde 1ml besiyeri eklenmesi sağlanarak T25 veya T75 flakslara hücrelerin ekimi gerçekleştirilirdi. Co2 inkübatöre büyümesi için kaldırıldı.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

T25 flakslarda büyüyen hücreler, %85-90 yoğunluğa ulaştığında yeniden pasajlandı. Hücreler istenen yoğunluğa ulaştığında flask içindeki besiyeri ortamdaki PBS uzaklaştırılarak, hücreler steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Ardından ortamdaki PBS uzaklaştırılarak hücrelerin flasktan ayrılması ve kaldırılabilmesi için Üremekte olan hücre pasajları, %80-90 yoğunluğa (confluent) ulaşınca yeniden

pasajlandı. Bu amaçla üremekte olan hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında flaskların içerisindeki besiyeri pipetle alınarak steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm² için 2 ml) ile yıkandı. Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştıkları alandan kaldırılması için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 10 dakika bekletildi.

% 0,25 tripsin-EDTA ve hücre karışımı 15 ml'lik falcon tüpe alınarak tripsin inhibisyonunu önlemek amacıyla tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri eklendi. 10 dakika boyunca 1300 rpm'de santrifüjün ardından % 0,25 tripsin-EDTA bu süspansiyondan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yeni besiyeri ile süspansiyonu sağlanarak 4 adet T25 flaska bölünerek pasajlanması gerçekleştirildi. Flasklar, sonrasında %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %95 içeren CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Flasklarda hücrelerin substrat yüzeyinden çıkarılması için %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi kullanıldı. Bu işlem sonrasında, hücreler santrifüj edilerek %0,25 tripsin-EDTA içeren besiyerinden uzaklaştırıldılar. Hücre pelletine 1 ml besiyerinin eklenerek sulandırılması sağlandı. Tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri kullanılarak hücrelerin enzimatik aktivitesi inhibe edildi. Hücreler pipetleme işlemi uygulanarak süspansiyon haline getirildi ve ardından 15 ml'lik falcon tüplere transfer edildi. Hücre süspansiyonu, 10 dakika boyunca 1300 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant ayrıştırıldı. Daha sonra, 900 µl besiyeri ile hücre pelleti sulandırıldı ve hücreler sayıldı. Kriyo tüplerine, 100 µl DMSO (dimetil sülfoksit) ve 900 µl besiyeri ile hazırlanan süspansiyon eklenerek, bu tüpler -80°C'de derin dondurucuda saklanmak üzere hazırlandılar.

3.2.5. Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve eppendorf tüpe kondu. Hücre süspansiyonunun üzerine 10 µl tripan blue boyası eklendi ve pipetaj işlemiyle karıştırılması sağlandı. (Trypan blue membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri mavi renge boyar, canlı hücreler boyanmazlar). Bu karışım Neubauer lamı üzerine konularak 4 bölmedeki hücreler sayılmıştır. Alandaki hücreler sayıldıktan sonra ortalamaları alınarak 1 ml' deki hücre sayısı/ml: 4 alanın ortalaması x Dilüsyon Faktörü x 10⁴ formülü yardımıyla hesaplandı. Dilüsyon katsayısı toplam hacmin hücre süspansiyonu hacmine orantılanarak hesaplanmıştır.

3.2.6. Hücrelerin Plakalara Ekimi

Hücre sayımı işlemi tamamlandıktan sonra hesaplanan dilüsyonlar hazırlandı ve en etkin doz saptanmaya çalışıldı. Hücreler, her kuyucukta 100 µl ' de 10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Ekilen hücreler, %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %95 nem içeren CO₂ inkübatöründe 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, klinik etken madde doksorubisinin hücre hattı üzerindeki farklı konsantrasyonlardaki etkinlikleri in vitro koşullar altında değerlendirildi.

Hücre canlılık seviyeleri, MTT analizi kullanılarak belirlendi ve plate reader ile 570 nm dalga boyunda yapılan okumalarla ölçüldü.

3.2.7. MTT deneylerinin yapılması

MTT analizi, hücre kültürü deneylerinde hücrelerin hayatta kalma, çoğalma ve metabolik aktivitelerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, hücrelerin metabolik aktiviteleriyle ilişkilendirilen bir bileşik olan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) kullanılarak gerçekleştirilir.

MTT, hücrelerin metabolizması sonucu aktif hücreler tarafından indirgenen bir bileşiktir. MTT'nin indirgenmesi, mitokondriyal solunum ve hücrel redoks aktiviteler gibi metabolik aktivitelerin bir göstergesi olarak kabul edilir. MTT'nin indirgenmesi sonucunda ortaya çıkan formazan ürünü, hücrelerin canlılığını ve metabolik aktivitesini yansıtır. Bu nedenle, MTT analizi hücrelerin canlılık ve metabolik aktivitelerini belirlemede yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

MTT analizi için, 48 saatlik inkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plakalardaki her bir kuyucukta bulunan 100 µl süspansiyona MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid) solüsyonundan 10 µl ilave edildi. Daha sonra, 96 kuyucuklu plak, 3 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Bu sürenin sonunda, hücre yüzeyinde kalan besiyerleri atıldı ve 100 µl DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklenerek 20 dakika daha inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından, plakadaki her bir kuyucuktaki absorpsiyon değerleri, plaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülerek okuma gerçekleştirildi. Yapılan hesaplamalar sonucunda %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri logaritmik olarak hesaplandı.

3.2.8. IC50 Değerinin Belrilenmesi

Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

Hücre Canlılık Yüzdesi Hesaplama= (Materyalin optik yoğunluğu/Kontrolün optik yoğunluğu) *100

3.3. TOTAL RNA İZOLASYONU

Doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hattı hücrelerinden total ribonükleik asit (RNA) izolasyonu, innuPREP RNA Mini Kiti 2.0 kullanılarak gerçekleştirildi. RNA izolasyonu, kiti sağlanan protokole uygun olarak tamamlandı. MCF-7 hücre hattında belirlenen IC50 değelerinin moleküler düzeydeki etkilerini belirlemek amacıyla, MCF-7 hücrelerinin ekimi 6 kuyucuklu plakalara gerçekleştirildi.

Ekim sonrası hücreler, %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %95 nem içeren CO₂ inkübatöründe 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından belirlenen konsantrasyonlarda doksorubisin uygulandı ve tekrar 24 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyonun sonunda, plaklara yapışmış hücreler %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Hücre süspansiyonu mikrosantrifüj tüpüne alınarak 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet elde edildi.

Elde edilen pellet üzerine 400 µl RL lysis solution eklenerek 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, pellet pipetajı yapıldı ve 3 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, receiver tüp içerisine spin filter D yerleştirildi ve inkübasyonda bekleyen süspansiyon buraya aktarıldı. 2 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi sonrasında spin D ile elde edilen DNA atıldı ve alttaki süpernatanta %70'lik 400 µl etil alkol ilave edilerek pipetaj işlemi gerçekleştirildi.

Yeni bir receiver tüp içerisine spin filtre R yerleştirildi ve üzerine bu süspansiyon aktarılarak 2 dakika boyunca 11.000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrasında spin filter R'ye 500 µl washing solution HS eklenerek 1 dakika boyunca 11.000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından, spin filter R yeni bir receiver tüpe alınarak üzerine 700 µl washing solution LS eklenerek 1 dakika boyunca

11.000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra, yeniden 3 dakika daha 11.000 rpm'de santrifüj edildi.

Yeni bir kapaklı elution tüp içine spin filter R yerleştirildi ve üzerine 50 µl RNase Free Water eklenerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, 1 dakika boyunca 11.000 rpm'de santrifüj edilerek buz üstünde bekletilmeye alındı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ng/µl cinsinden spektrofotometre (Eppendorf) ile ölçülerek A260/280 değerleri analiz edildi.

3.3.1. Total RNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Spektrofotometrik ölçümler neticesinde elde edilen RNA'ların 260nm ve 280 nm dalga boyunda ışığı soğurma (O.D.) ölçümü sayesinde RNA konsantrasyonu ve saflık derecesi ortaya konmuştur.

3.3.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Bu çalışmada, doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre kültürlerinden izole edilen RNA'ların analizi için SensiFAST cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA elde edilmiştir. Daha sonra, sentezlenen cDNA'lar kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRTPCR) işlemi ile Thermo Fisher Scientific'in qPCR (5020) cihazı kullanılarak çoğaltılmıştır. Sentez için, 20 µl'lik karışımlar hazırlanmış ve bu karışımlar üç adet Eppendorf tüpüne yerleştirilerek sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentez süreci için cihazın termal döngü ayarları, üretici tarafından sağlanan kiti protokolüne uygun olarak ayarlanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, ters transkripsiyon sonrası gerçekleştirilen qPCR analizleri için -20°C'de saklanmıştır.

3.3.3. Kanser Metabolizmasındaki Sinyal Yolak Analizi

Çalışmamızda, klinik ilaç doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hatlarında IC50 değeri hesaplanan doksorubisinin, 46 farklı genin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu genler kanser metabolizmasıyla ilişkilendirilmiş olup aktivasyon seviyelerindeki değişikliklerin sinyal yolağının aktivitesiyle doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, gen ifade seviyelerindeki farklılıkların tespit edilmesi durumunda, bu genlerin moleküler temellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Analiz sürecinde kullanılan bileşenlerin miktarlarıyla birlikte detayları Tablo 3.4'te sunulmuştur. Deneyler, çalışma için belirlenen genlere ilişkin primerlerle birlikte

SYBR Green Master Mix (EuroClone) ve RT-qPCR analizi, kit protokolüne göre planlanmış ve çalışılmıştır. Protokolde belirtilen kontrol amaçlı genler için ACTINB ve GAPDH housekeeping olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.4: Kullanılan RT-qpcr Karışım Bileşenleri

RT-qPCR Karışım Bileşenleri	Hacim (µl)
SYBR green master mix	10
Primerler	1,5
cDNA	1
dH ₂ O	7,5
Toplam	20

RT-qPCR reaksiyonu için tablo 3.5’de verilen kit protokolüne uygun olarak planlanmış ve çalışılmıştır. RT-qPCR karışımı; Analitik Jena qTOWER3 RT-qPCR cihazına,96 kuyucuklu plakaya tablo 3.5’deki protokole uygun şekilde yüklenmiştir. RT-qPCR analizi için kullanılan genlerin listesi Tablo 3.6’te yer almaktadır.

Tablo 3.5: RT-qPCR protokolü

Süre	Sıcaklık	Termal Döngü
5 dk	95 °C	1
15 sn	95 °C	40
30 sn	60 °C	Floresan Okuma

Tablo 3.6: RT-qPCR analizinde kullanılan genlerin listesi

ACADL	GOT1	TKTL1	PDE4D	MAT2A	PSPH
AMPD3	NME2	ACO2	UCKL1	PFKFB4	DNMT1
GNPNAT1	PRPS1	DHFR	SDHA	SLC2A1	ACSL4
MTR	TK1	HMGCS1	ECSL3	ACSS3	ADCY3
PHGDH	ACLY	PAFAH1B2	ENO1	G6PD	FH
SLC7A11	CPT1C	SCD	LDHAL6A	ME1	IDH1
ACAT1	HK2	TPI1	PDK2	PGAM1	
BCAT1	OGDH	ACSL1	SLC1A5	SLC2A2	

Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda elde edilen veriler, gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

3.4. FLOW SİTOMETRİ ANALİZLERİ

Flow sitometri, hücrelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini hızlı bir şekilde analiz etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, hücrelerin boyutu, karmaşıklığı, hücresel DNA içeriği, yüzey proteinleri ve hücre içi bileşenler gibi çeşitli özelliklerini belirlemek için kullanılır. Flow sitometrisi, bir akış hücresi içindeki hücrelerin tek tek geçtiği bir lazer ışını kullanarak çalışır. Bu işlem sırasında hücreler, lazer ışınına maruz kaldıklarında farklı özelliklerine göre farklı şekilde ışık saçarlar ve bu ışık sinyalleri detektörler tarafından ölçülür. Bu sayede, binlerce hücre hızlı bir şekilde analiz edilebilir ve hücre popülasyonları arasındaki farklılıklar belirlenebilir. Flow sitometrisi, hücre döngüsü analizi, hücre apoptozis tespiti, immünofenotipleme ve hücre içi protein miktarı tespiti gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır ve biyolojik araştırmalarda önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Flow sitometri (Cytotflex Flow Cytometer, Beckman Coulter) ile MCF-7 transfekte hücrelerde apoptotik analizler için deneyler yapıldı. Bu deneyler için Annexin-V ve PI boyaları kullanıldı.

Annexin V, hücre ölümü (apoptoz) araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir protein testidir. Bu test, hücre ölümü sürecinin erken aşamalarını belirlemek için kullanılır.

PI (propidyum iyodür), nükleik asit boyama maddesi olarak kullanılan bir floresan bileşiktir. PI, hücre zarı hasarı olan veya ölmüş hücrelerde nükleer DNA'yı boyamak için kullanılır. Canlı hücrelerde PI, zarlarından geçemez ve bu nedenle içindeki nükleik asitleri boyamaz. Ancak, zar hasarı olan veya ölmüş hücrelerde, PI hücre içine girer ve DNA'ya bağlanır, böylece bu hücrelerin floresan özelliklerini değiştirir. Her iki boyanın farklı özelliklerinde yararlanılarak hücrelerin DNA içeriğine bağlı olarak hücre döngüsünün hangi evresinde olduğunu analizlerle ortaya konmuştur.

3.4.1. Anneksin V ve Apoptoz Analizi

Anneksin V, hücre membranındaki fosfatidilserin adı verilen bir lipit olan hücre ölümü sırasında dışarıya doğru ekspozede olduğunda bağlanır. Normalde, sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin iç kısımda yer alır, ancak apoptoz sürecinde hücre membranı değişir ve fosfatidilserin dışarıya doğru taşınır. Annexin V, bu dışı doğru taşınmış fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücreleri belirler.

Hücre hattına uygulanan klinik ilaç doksorubisinin, doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hattındaki apoptoz oranının belirlenebilmesi için 'Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit' (Sigma-Aldrich) ve PI boyama yöntemi uygulandı. Doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücreleri ayrı ayrı 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Her iki hücre hattı için daha önceden belirlenmiş olan moleküller ile belirlenmiş olan sitotoksik konsantrasyon ile 48 saat boyunca inkübasyon sağlandı. 48' lik inkübasyonun ardından her iki hücre hattı 5 ml fosfat tamponlu salin (PBS ile iki kez yıkandı. Yıkanan hücrelere tripsin uygulanarak kalkmaları sağlandı ve 400 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi. Bu işlemde sonra hücreler binding buffer homojenizasyon salandı. Homojen karışımdan 200 µl alınarak flow sitometri tüpüne aktarımı sağlandı. Homojen karışımdan geriye kalan miktar buz üstünde bekletildi ve korundu. Flow tüpünün içinde yer alan 200 µl homojen karışıma 3 µl ApopNexin™ FITC ve 2 µl 100X propidyum iyodür (PI) eklenerek karıştırıldı. Bu karışım karanlık odada, oda sıcaklığında (25°C' de) 15 dk. inkübasyona tabi tutulduktan sonra flow sitometride ölçümler gerçekleştirildi. Analiz süresince nekrotik hücrelerin

yüzeylerindeki Annexin-V bağlanması ve propidyum iyodür etkisiyle hücre döngülerinin evreleri görüntülendi.

Flow sitometride Annexin-V testi hücrelere uygulanarak 46 kanser metabolizmasında ilişkili genin sinyal yolağı analizi yapıldı.

3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER VE ANALİZİ

Veri analizinde Kolmogorov-Smirnov testiyle verilerin miktar olarak dağılımlarının kontrülü sağlandı. Sonrasında, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapıldı. Çeşitli gruplar arasında anlamlık noktasında Student-Newman-Keuls testi ve ikili karşılaştırmalar için de Student t testi kullanıldı. Gen ekspresyon ifadeleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanıldı. Yolak analizi ve istatistiksel hesaplamalar için Reactome ve Enrich veri tabanları kullanıldı. Hücre hattındaki sitotoksik etkileri belirleyebilmek adına elde edilen veri setleri GraphPad Prism 5.0 programıyla analiz edildi. Elde edilen veriler tablolar halinde standart sapma değerleri belirtilerek sunuldu. Kantitatif veriler tablolar halinde \pm standart sapmalarla sunuldu. Çalışmadaki tüm analizler % 95 güven düzeyinde gerçekleştirilmesi sağlandı. Elde edilen p değerleri 0.05' ten küçük olan değerler anlamlı veri olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE KÜLTÜR ANALİZ BULGULARI

4.1.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmada, MTT deneyleri için öncelikle MCF-7 hücre hattında hücreleri, her bir kuyucukta 100 µl hacminde 105 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekim gerçekleştirildi. Ekilen hücreler, %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %95 nem içeren CO₂ inkübatöründe 24 saat boyunca inkübe edildi. Klinik ilaç olan doksorubisini MCF-7 hücre hattındaki canlılık deneyleri için kültür kaplarında yeterli hücre sayısına ulaşıldığında hücreler kaldırılarak kuyucuk başı 100 uL'de 5x10³ hücre olacak şekilde (n=5) 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekildi. Hücrelerin plakalara 24 saat tutunmasının ardından çözünen maddeler kuyucuklarda azalan dozlarda (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 mM) uygulandı. 24 saatlik uygulama efektif sonuçlar elde edilmedi. 48 saat uygulama yapıldı. 48 saatlik sürecin ardından MCF-7 hücre hattı kullanılarak sitotoksik etkileri MTT analizi ile değerlendirildi.

4.1.2. MCF-7 Hücre hattında Doksorubisin Uygulama Analizleri

Hücre kültürü çalışmaları neticesinde 24 saatin sonunda 96 kuyucuklu plakalardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Klinik ilaç belirlenen yoğunluklarda 100 ml besiyerine eklenerek hücrelere verilmiştir. Hücreler 48 saat süreyle, %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %95 nem içeren CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır

48 saatlik inkübasyon süresinin ardından, MTT analizi için tarama testleri yapılmış ve 570 nm dalga boyunda plate reader'da okumalar gerçekleştirilmiştir. MTT yöntemiyle gerçekleştirilen canlılık testleri sonucu elde edilen veriler GraphPad Prism 10.2.2 programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve IC₅₀ değeri belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattında elde edilen IC₅₀ değeri Tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1: Doksorubisin'in MCF-7 hücre hattında 48. saatteki IC50 değeri

Molekül	IC50 Değeri (48 Saat)
Doksorubisin	0.02717

Doksorubisin klinik ilacının yapılan çalışmalarda GraphPad Prism 10.2.2 aracılığıyla 48. saat IC50 değeri 0.02717 belirlendi.

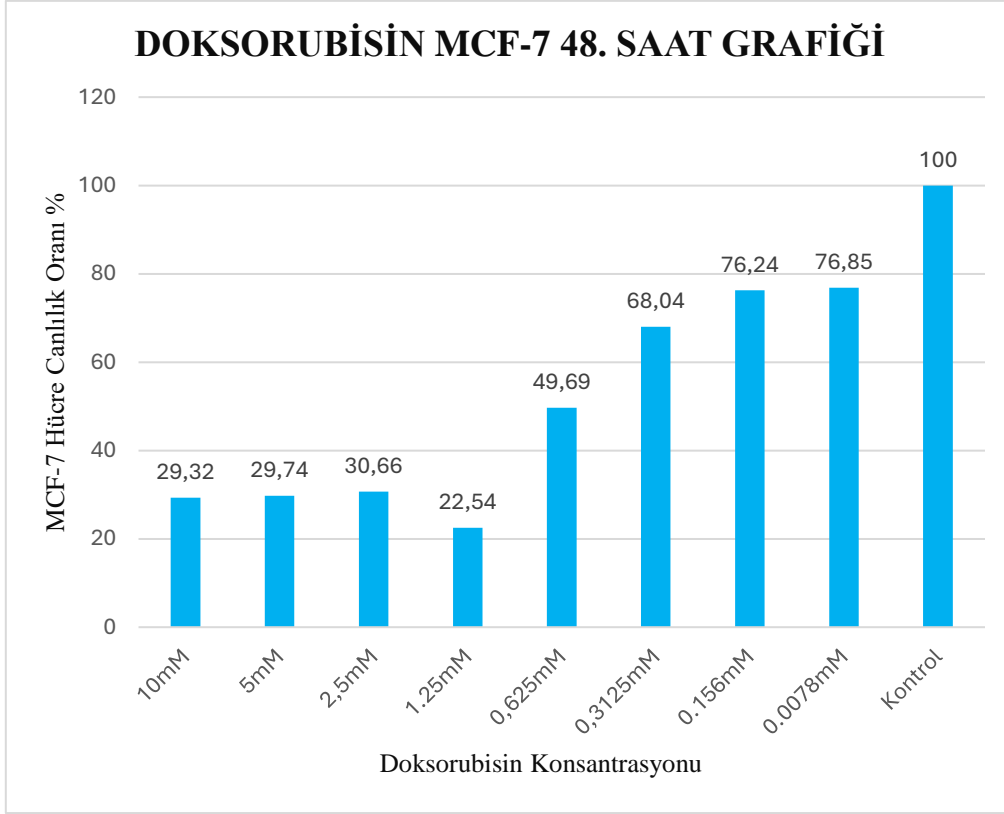
4.1.3. MCF-7 Hücre Hattında Doksorubisin Sitotoksikite Ölçümleri

Doksorubisin seri dozlarda (10), (5), (2,5), (1.25), (0,625), (0,3125), (0,156), (0,0078) mM/ml olarak 8 farklı konsantrasyonlarda 48 saat MCF-7 hücre hattında uygulanmıştır. MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri analiz edilmiştir. Elde edilen veriler kontrol gruplarıyla kıyaslanarak, uygulanan dozlardaki farklılığın, farklı oranlarda hücre canlılık seviyeleri uygulama dozlarındaki farklılığın farklı oranlarda canlılık seviyeleri oluşturduğu istatistiksel olarak gözlemlendi ($p < 0,05$). Tablo 4.2' de sitotoksik etkileri verilmiştir.

Tablo 4.2: Doksorubisin 'in 48 saatlik inkübasyon ve seri dilüsyonlardaki sitotoksik etkileri

Konsantrasyon	Doksorubisin 48. Saat Canlılık Oranı %
10mM	29,32
5mM	29,74
2,5mM	30,66
1.25mM	22,54
0,625mM	49,69
0,3125mM	68,04
0.156mM	76,24
0.0078mM	76,85
Kontrol	100

Doksorubisin'in MCF-7 hücre hattında 48 saat uygulanması sonucu elde edilen % canlılık değerleri grafiği Şekil 4.1'te verildi.

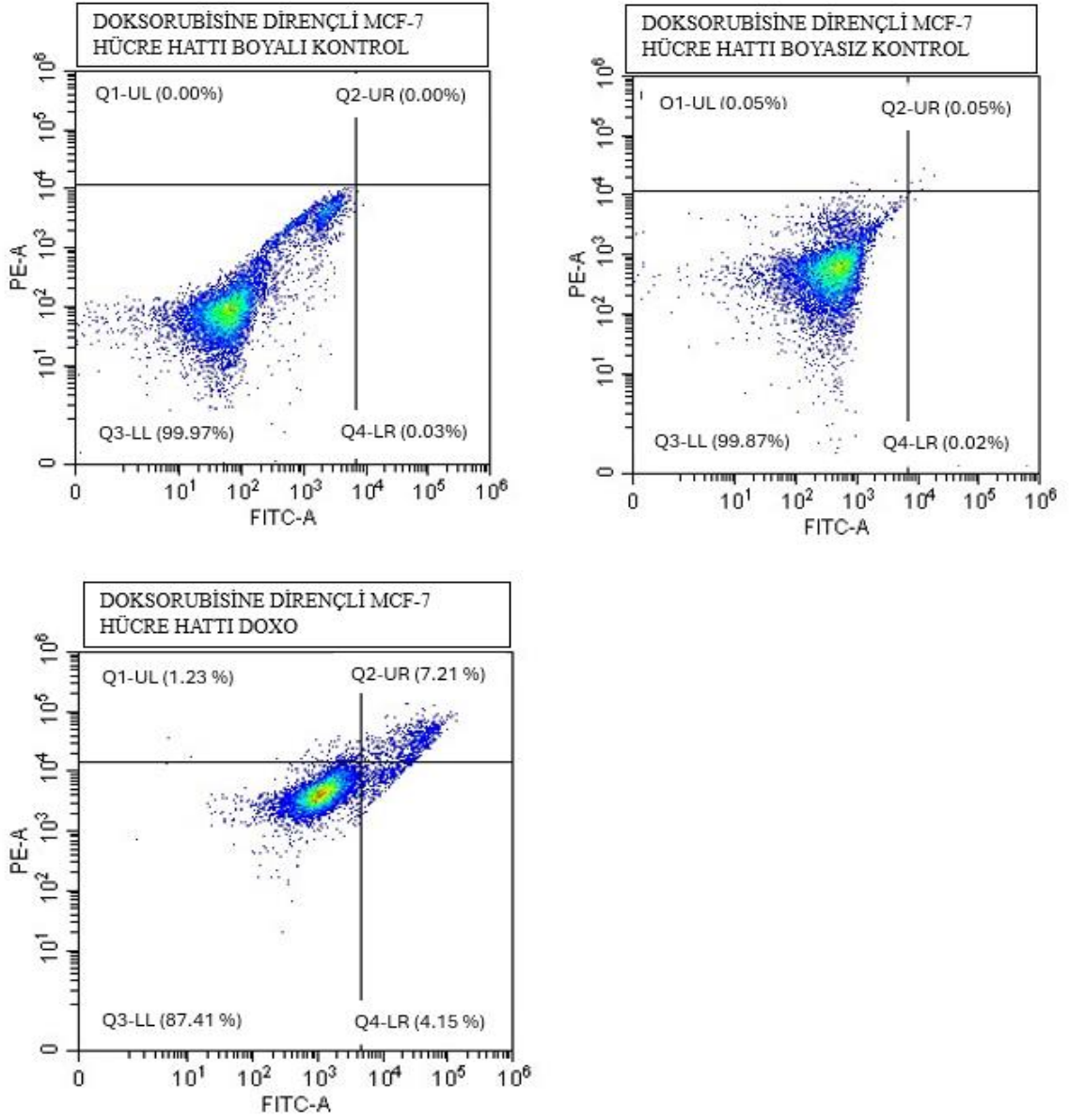


Şekil 4.1: Doksorubisinin seri dilüsyonlardaki 48. saatteki % canlılık grafiği

4.1.4. MCF-7 Hücre Hattında Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

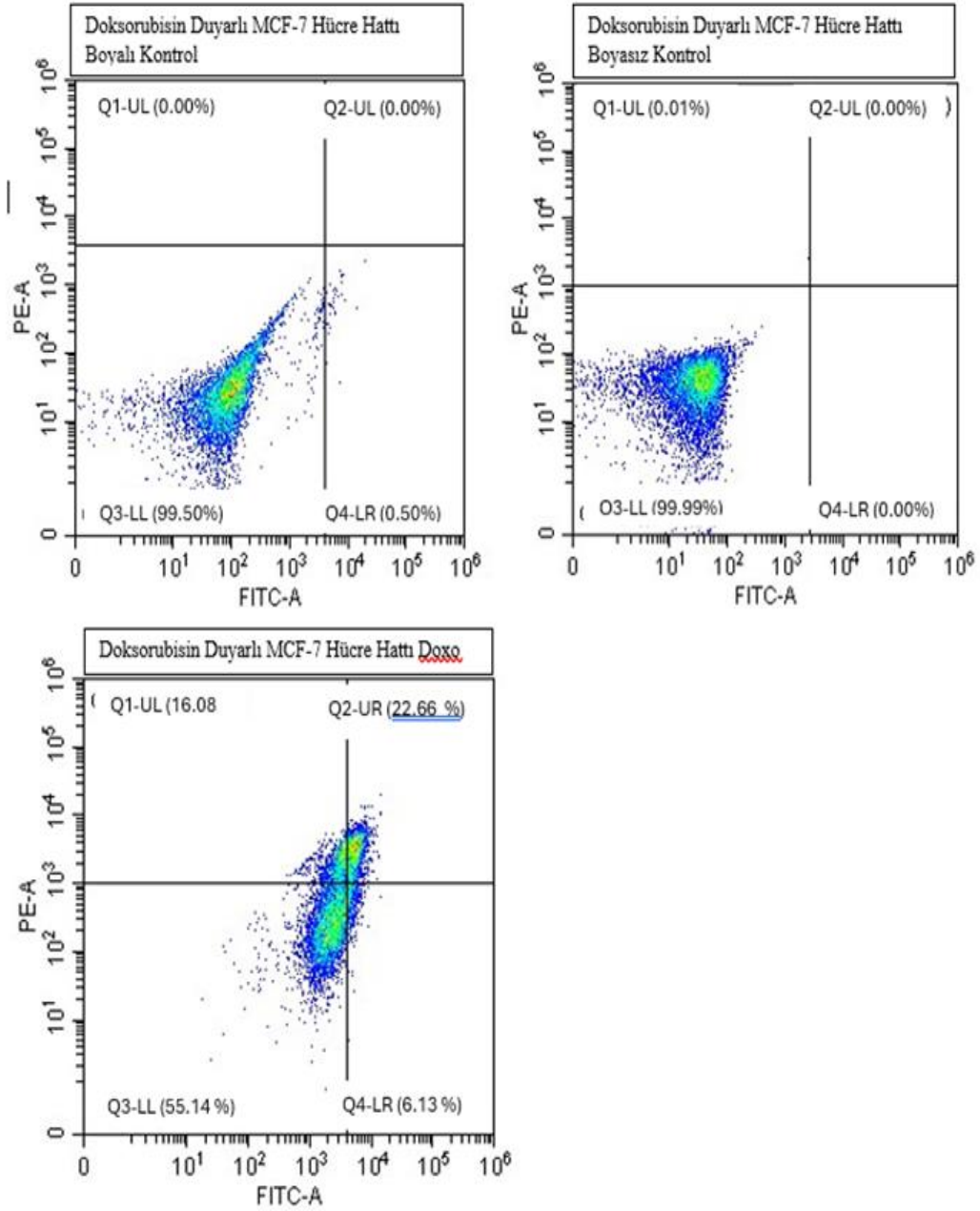
MCF-7 hücre hattında apoptotik etkilerin değerlendirilmesi noktasında yapılan flow sitometri analizlerinde 48 saatlik uygulama sonrasında doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında apoptoz oranının yaklaşık % 12; doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında apoptoz oranının yaklaşık % 29 olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen verilerin kontrol grubu ile yapılan analizinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,005$).

Flow sitometri ile analizlerinin yapılabilmesi adına doksorubisin uygulanan; doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hatları Annexin V ve PI ile boyanarak flow sitometride analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçları Şekil 4.2' teki grafikte ortaya konmuştur.



Şekil 4.2: MCF-7 Doksorubisin dirençli hücrelerinde IC50 konsantrasyonlarında 48 saatlik süre ile uygulanan Doksorubisin molekülünün Anneksin V sonuçları

Flow sitometri ile analizlerinin yapılabilmesi adına doksorubisin uygulanan; doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hatları Anneksin V ve PI ile boyanarak flow sitometride analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçları Şekil 4.3' teki grafikte ortaya konmuştur.



Şekil 4.3: MCF-7 Doksorubisin duyarlı hücrelerinde IC50 konsantrasyonlarında 48 saatlik süre ile uygulanan Doksorubisin molekülünün Anneksin V sonuçları

4.2. SİNYAL YOLAK ANALİZLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1. MCF-7 Hücre Hattında Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

MCF-7 hücre hattında apoptotik etkilerin değerlendirilmesi noktasında yapılan flow sitometri analizlerinde 48 saatlik uygulama sonrasında doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında apoptoz oranının yaklaşık % 29; doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında apoptoz oranının yaklaşık % 12 olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen verilerin kontrol grubu ile yapılan analizinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,005$).

Flow sitometri ile analizlerinin yapılabilmesi adına doksorubisin uygulanan; doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hatları Anneksin V ve PI ile boyanarak flow sitometride analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçları Tablo 4.3' teki grafikte ortaya konmuştur.

Tablo 4.3: Apoptoz analizi sonrası veriler

Anneksin-V Analiz Bölgeleri				
	Q1	Q2	Q3	Q4
MCF-7 Duyarlı / Boyalı Kontrol	0,00	0,00	99,50	0,50
MCF-7 Duyarlı/ Boyasız Kontrol	0,01	0,00	99,99	0,00
MCF-7 Duyarlı / Doxo	16,08	22,66	55,14	6,13
MCF-7 Dirençli / Boyalı Kontrol	0,00	0,00	99,97	0,03
MCF-7 Dirençli/ Boyasız Kontrol	0,05	0,05	99,87	0,02
MCF-7 Dirençli/ Doxo	1,23	7,21	87,41	4,15

4.2.2. Doksorubisine Duyarlı ve Dirençli MCF-7 Hücre Hattında Gen Ekspresyon Analizlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen veriler neticesinde klinik ilaç olan doksorubisinin hesaplanan IC50 değeri gen ekspresyon analizinde kullanıldı. İlk olarak doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattı kullanılarak gen ekspresyon değerleri belirlendi. Genlere ait

ekspresyon değerleri 2- $\Delta\Delta$ CT metodu kullanılarak hesaplandı. Referans gen olarak GAPDH ve ACTINB genleri kullanıldı.

$$\Delta CT = CT \text{ örnek} - CT \text{ referans}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ moleköl uygulanmış örnek} - \Delta CT \text{ kontrol}$$

Klinik ilaç olan doksorubisinin anti tümöral etkinin moleküler düzeyde belirlenebilmesi adına, ilgili genlerde moleküler düzeydeki ekspresyon seviyeleri RT-qPCR yöntemi ile ortaya kondu. Ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre oranlanarak hesaplandı. Elde edilen verilen doğrultusunda genlerdeki ekspresyon düzeylerindeki artış ve azalışlar belirlendi. Log2 Fold Change (Log2FC) ile logaritmik olarak gen ekspresyon seviyeleri hesaplandı.

Pozitif Log2 FC > 2,00 değerine sahip genler yukarı regüle olarak tanımlandı. Negatif Log2 FC < 0.5 değeri olan genler aşağı regüle olarak değerlendirildi.

46 gen ile yapılan kanser yolak analizinde doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında 45 genin doksorubisin için, kontrol genlerine göre ekspresyonlarının azaldığı (p<0,05) tespit edildi. Bu genler GNPAT1, BCAT1, NME2, PRPS1, TK1, ACO2, DHFR, HMGCS1, DNMT1, IDH1, UCKL1, SDHA, ENO1, PDK2, ACSL4, FH, MAT2A, ACSS3, ME1, ACADL, AMPD3, GOT1, ACLY, CPT1C, OGDH, PSPH, SCD, ACSL1, PDE4D, ECSL3, LDHAL6A, SLC1A5, PFKFB4, SLC2A1, G6PD, PGAM1, MTR, PHGDH, SLC7A11, ACAT1, HK2, TKTL1, SLC2A2, PAFAH1B2, TPI1 dir

Yapılan analizlerde 1 genin ekspresyon seviyesinin kontrol genlerine kıyasla arttığı (p<0,05) tespit edildi. Bu gen ADCY3' tür.

Gen ekspresyonları azalan ve artan genlerin listesi Tablo 4.4 ve Tablo 4.5' te verildi.

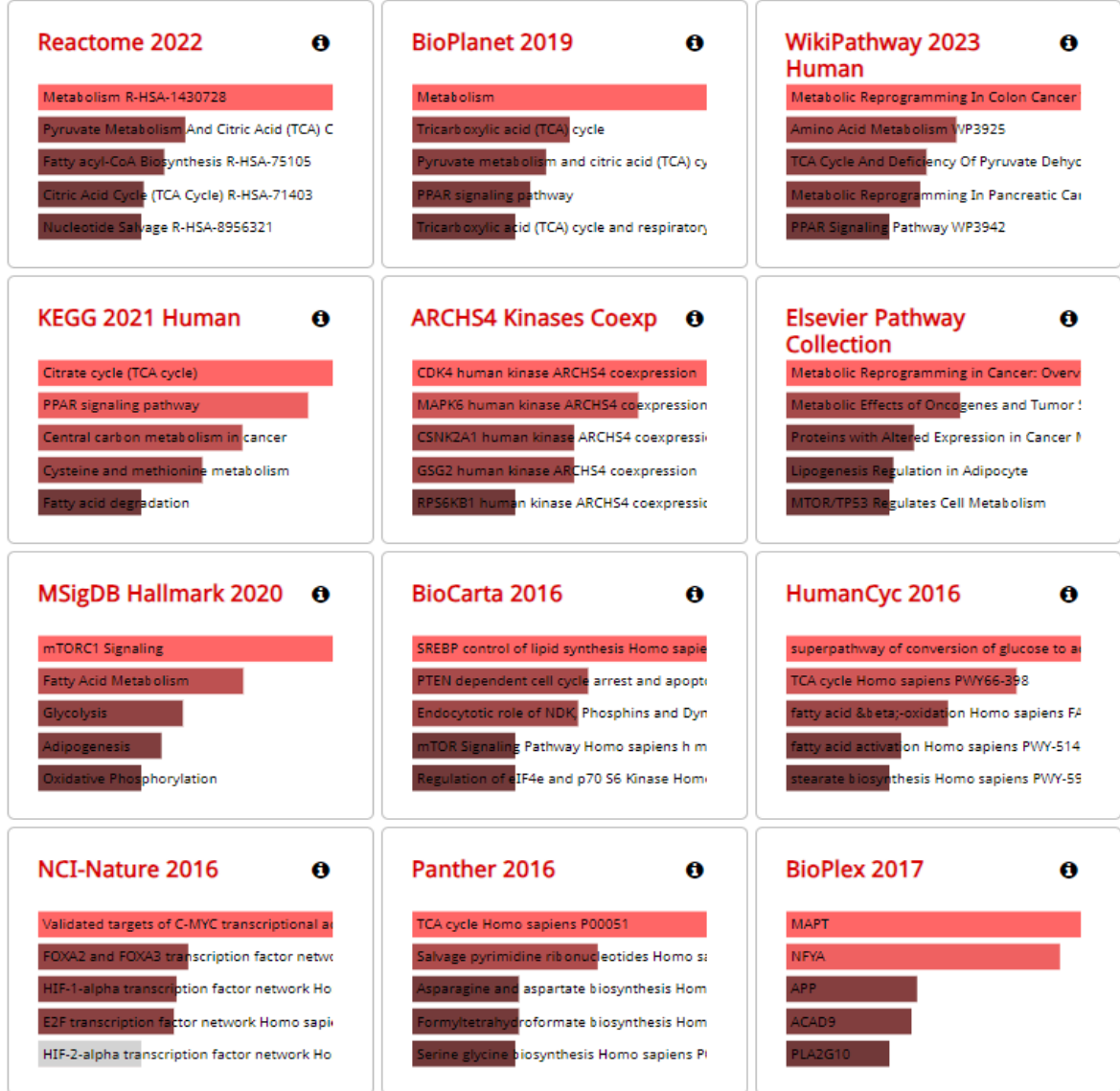
Tablo 4.4: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yollarında ekspresyonu azalan genler

Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$
ACADL	-53,82	OGDH	-28,84	ECSL3	-4,56
AMPD3	-1,96	PSPH	-2,93	ENO1	-9,92
GNPNAT1	-5,90	TKTL1	-32,22	LDHAL6A	-5,70
MTR	-4,06	ACO2	-2,73	PDK2	-11,96
PHGDH	-3,89	DHFR	-14,03	SLC1A5	-4,82
SLC7A11	-2,99	HMGCS1	-6,28	ACSL4	-3,68
ACAT1	-12,91	PAFAH1B2	-2,64	FH	-14,72
BCAT1	-8,82	SCD	-1,74	MAT2A	-5,78
GOT1	-5,90	TPI1	-7,52	PFKFB4	-8,82
NME2	-3,46	ACSL1	-8,22	SLC2A1	-6,92
PRPS1	-3,20	DNMT1	-23,92	ACSS3	-39,95
TK1	-4,35	IDH1	-10,20	G6PD	-8,75
ACLY	-6,77	PDE4D	-5,54	ME1	-7,78
CPT1C	-38,05	UCKL1	-4,29	PGAM1	-16,80
HK2	-2,19	SDHA	-31,78	SLC2A2	-37,53

Tablo 4.5: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yollarında ekspresyonu artan genler

Gen Adı	$\Delta\Delta CT$
ADCY3	33,59

Enrichr veri tabanından Doksorubisin molekülünün, doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolak genel analizi Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.4: Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolak genel analizi

Reactome veri tabanından alınan Doksorubisinin, Doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolakları Şekil 4.5’de verildi.

Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında 46 gen ile yapılan kanser yolak analizinde 19 genin klinik ilaç doksorubisin için, kontrol genlerine göre kıyaslandığında ekspresyon seviyelerinin azaldığı ($p<0,05$) tespit edildi. Bu genler GNPAT1, BCAT1, NME2, PRPS1, TK1, ACO2, DHFR, HMGCS1, DNMT1, IDH1, UCKL1, SDHA, ENO1, PDK2, ACSL4, FH, MAT2A, ACSS3, ME1' dir.

Yapılan analizlerde 17 genin gen ekspresyon seviyelerinde kontrol genlerine artış olduğu ($p<0,05$) tespit edildi. Bu genler ACADL, AMPD3, GOT1, ACLY, CPT1C, OGDH, PSPH, SCD, ACSL1, PDE4D, ECSL3, LDHAL6A, SLC1A5, PFKFB4, SLC2A1, G6PD, PGAM1' dir.

Bu genlerden 10 tanesinin gen ekspresyon seviyelerinden bir değişiklik tespit edilmedi. Bu genler, MTR, PHGDH, SLC7A11, ADCY3, ACAT1, HK2, TKTL1, SLC2A2, PAFAH1B2, TPI1' dir. Gen ekspresyonları azalan, değişmeyen ve artan genlerin listesi Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verildi.

Tablo 4.6: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yollarında ekspresyonu azalan genler

Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$
GNPNAT1	-1,54	HMGCS1	-1,46	ACSL4	-2,63
BCAT1	-1,14	DNMT1	-1,66	FH	-1,90
NME2	-3,08	IDH1	-1,34	MAT2A	-1,40
PRPS1	-1,36	UCKL1	-1,69	ACSS3	-3,24
TK1	-2,18	SDHA	-1,89	ME1	-1,62
ACO2	-2,72	ENO1	-1,43		
DHFR	-2,80	PDK2	-1,42		

Tablo 4.7: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yollarında ekspresyonu artan genler

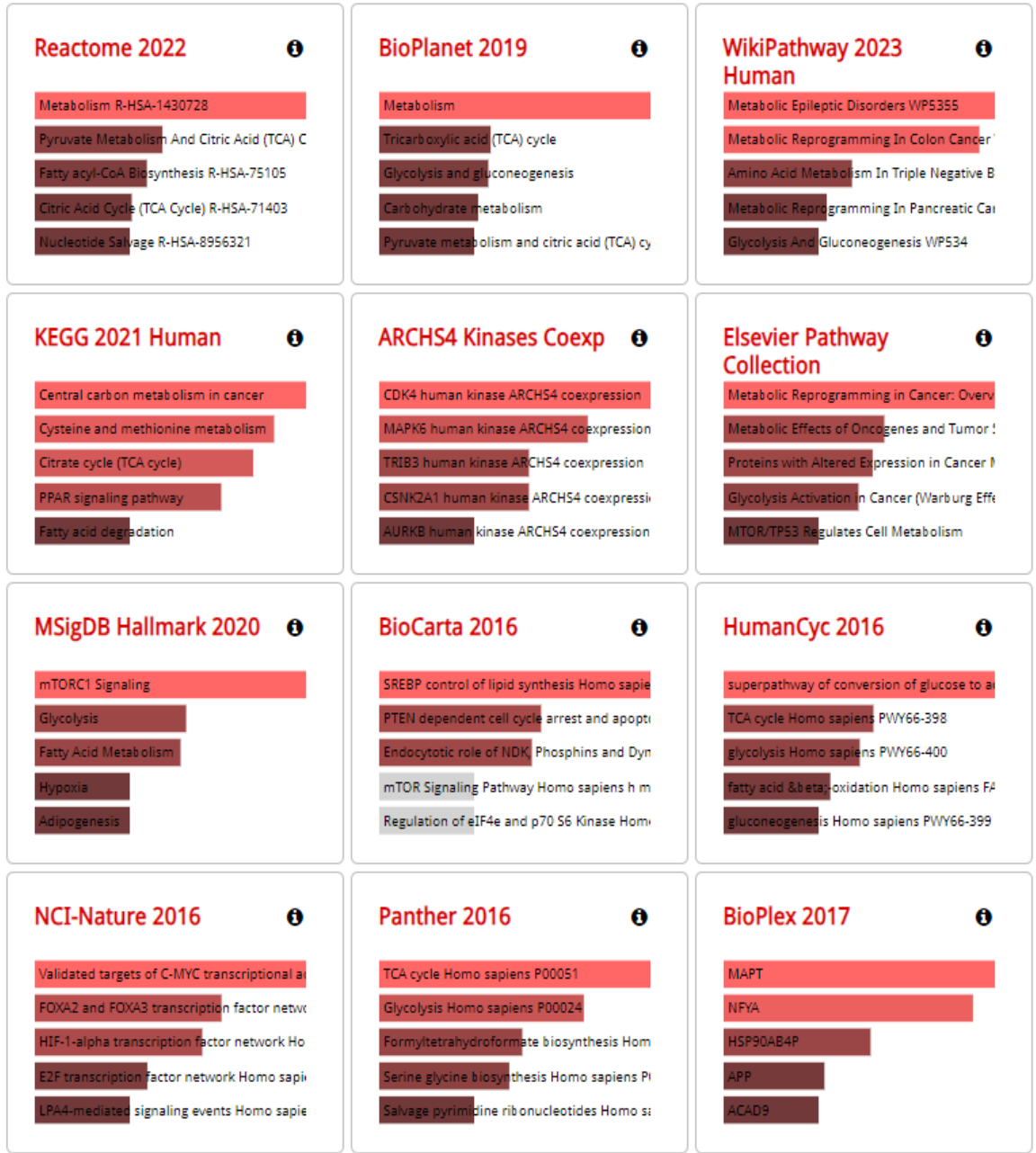
Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$
ACADL	64,67	PSPH	3,54	SLC1A5	4,36
AMPD3	5,56	SCD	3,06	PFKFB4	3,96
GOT1	2,98	ACSL1	3,26	SLC2A1	5,22
ACLY	10,52	PDE4D	2,03	G6PD	3,08
CPT1C	24,17	ECSL3	5,12	PGAM1	2,05
OGDH	2,74	LDHAL6A	3,54		

Tablo 4.8: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında doksorubisin 48 saat maruziyet sonrası sinyal yollarında ekspresyonu değişmeyen genler

Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$	Gen Adı	$\Delta\Delta CT$
MTR	1,65	ACAT1	1,26	PAFAH1B2	1,55
PHGDH	1,86	HK2	1,51	TPI1	1,10
SLC7A11	1,21	TKTL1	1,57		
ADCY3	1,56	SLC2A2	1,70		

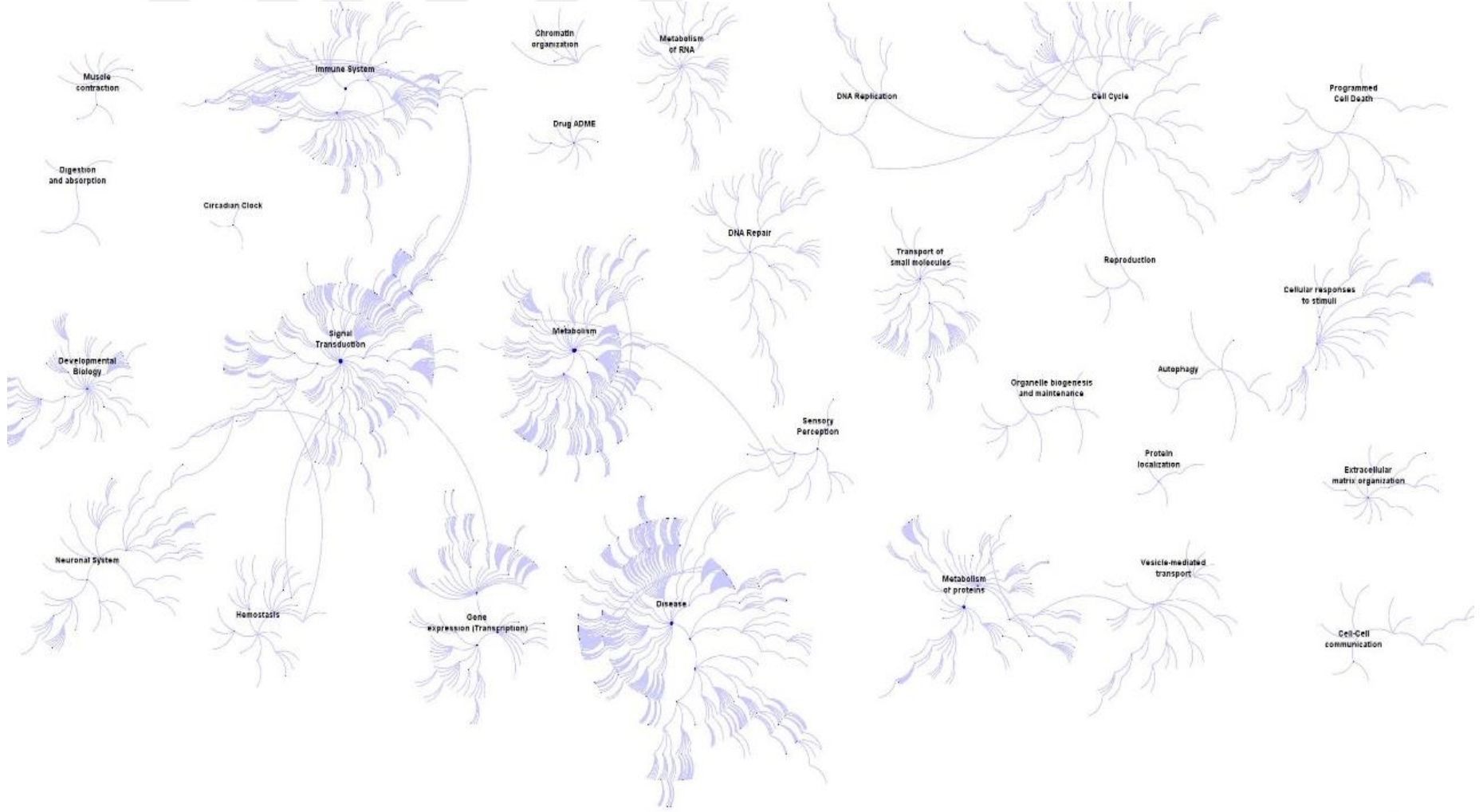
Enrichr veri tabanından Doksorubisin molekülünün, doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolak genel analizi Şekil 4.6’de verildi.





Şekil 4.6: Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolak genel analizi

Reactome veri tabanından alınan Doksorubisinin Doksorubisine dirençli hücre hattında etkilediği sinyal yolları genel analiz sonucu Şekil 4.7’te veril



Şekil 4.7: Reactome veri tabanından alınan Doksorubsine dirençli MCF-7 hücre hattında etkilediği sinyal yolları

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir. Son on yılda yeni tedavilerin geliştirilmesine rağmen ölüm oranlarında kayda değer bir azalma gözlenmemiştir. Bu durumun bir kısmı, meme kanserlerinin genetik heterojenliğinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, mevcut durumda, tüm meme kanseri alt tiplerine yönelik tek bir etkili tedavi bulunmamaktadır.

Doksorubisin, meme kanserinin tedavisinde etkili olan bir kemoterapi ilacıdır. Ancak, doza bağlı yan etkilerin olması, ilaca karşı direnç gelişmesi ve kanser hücrelerine karşı düşük seçiciliği gibi nedenlerle doksorubisinin klinik kullanımı sınırlıdır.

Klasik tedavi protokolleri, artık toksik etkilere ve kısa sürede direnç gelişimine neden olduğundan, yeni tedavi protokolleri arayışı içindedir. Bu yüzden, güncel tedavide kullanılan antitümöral ajanların ve yeni yolak analizlerinin araştırılması önemlidir (130).

İnsan hücrelerindeki metabolik süreçler, alınan besinlerin oksidasyonu yoluyla enerji üretir ve aynı zamanda diyetle alınmayan çeşitli temel moleküllerin sentezini sağlar; ayrıca endojen olarak üretilen veya hücre dışı ortamda bulunan toksik maddelerin deaktive edilmesini ve uzaklaştırılmasını medyan eder. Enerji metabolizması süreçleri, karbonhidrat türetilmiş veya lipid türetilmiş molekülleri içerip içermediğine bağlı olarak iki gruba ayrılabilir ve her grupta, bu moleküllerin parçalanması ve oksidasyonuyla enerji üretmekten sorumlu süreçleri, sentezlerini ve depolanmalarını içeren süreçlerden ayırmak yararlıdır. Sentetik reaksiyonlar, nükleotidler, amino asitler ve ilgili moleküller ve porfirinler gibi son ürünlerin kimyasal doğası açısından uygun bir şekilde gruplandırılır. Detoksifikasyon reaksiyonları (biyolojik oksidasyonlar) aynı şekilde, zehirin kimyasal doğası açısından uygun bir şekilde sınıflandırılır. Aynı zamanda, tüm bu süreçler sıkı bir şekilde entegre edilmiştir. Enerji üretimi reaksiyonlarının ara maddeleri, amino asitler ve diğer bileşiklerin biosentezleri için başlangıç malzemeleridir; geniş-spektrumlu oksidoreduktaz enzimleri hem detoksifikasyon reaksiyonlarında hem de biosentezlerde rol oynayabilir ve hormon aracılı sinyalleme süreçleri, enerji üreten ve

enerji depolayan reaksiyonların işleyişini koordine etmek ve bunları diğer biosentez süreçlerine bağlamak için işlev görür.

Metabolik süreçteki yolak analizleri özellikle metabolizmadaki bu değişkenlerin özellikle kanser tedavisini yönlendirmesi ve yeni tedavi yaklaşımların ortaya konması adına önemlidir.

Bu çalışmada, doksorubisine duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hattında, klinikte kullanılan bir ilaç olan doksorubisinin metabolik aktivite üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 46 genden oluşan bir gen setinin yolak analiziyle ekspresyon seviyelerini inceledik. Deney prosedürüne bağlı hücrelerin plakalara 24 saat tutunmasının ardından çözünen maddeler kuyucuklarda azalan dozlarda (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 mM) uygulandı. 24 saatlik uygulama efektif sonuçlar elde edilmedi. 48 saat uygulama yapıldı. 48 saatlik sürecin ardından MCF-7 hücre hattı kullanılarak sitotoksik etkileri MTT analizlerini değerlendirdik.

Karbonhidratlar, insan diyetinin önemli bileşenleridir ve bunlardan elde edilen özellikle glukoz olmak üzere monosakkaridlerin katabolizması, insan enerji metabolizmasının önemli bir parçasıdır (131). Glukoz, pirüvat'a (glikoliz) katabolize edilebilir ve çeşitli kaynaklardan sentezlenen pirüvat, glukoz oluşturmak için metabolize edilebilir (glukoneogenez). Glukoz, glukoz fazlası koşullarında glikojene polimerize edilebilir (glikojen sentezi), ve stres veya açlık durumunda glikojen glukozu parçalanabilir (glikojenoliz). Diyetle yaygın olarak bulunan diğer monosakkaritler, fruktoz ve galaktoz, glukozu dönüştürülebilir.

Disakkarit laktoz, anne sütündeki başlıca karbonhidrattır ve emziren meme bezi tarafından sentezlenir. Pentoz fosfat yolu, glukozdan çeşitli monosakkaritlerin sentezine izin verir, bunlar arasında pentoz riboz-5-fosfat ve düzenleyici molekül ksilüloz-5-fosfat bulunur, ayrıca biyosentetik süreçler için indirgeyici eşdeğerlerin oluşturulmasını sağlar. Glukuronattan glukoz 5-fosfat sentezi ve glikozaminoglikan metabolizması da karbonhidrat metabolizmasının bir parçası olarak belirtilmiştir (131).

ENO1, glikolitik yolun kritik enzimlerinden biri olan, onkogenik özelliklere sahip çoklu işlevli bir proteindir: tümör hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu teşvik ederek çeşitli tümörlerin hızlanmış ilerlemesine neden olur (132).

PFKFB4 tarafından kodlanan protein, glikolitik yan ürün fruktoz-2,6-bisfosfatın (F2,6BP) konsantrasyonunu düzenleyen dört iki işlevli kinaz/fosfatazdan biridir. Kodlanan protein, kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve hipoksi tarafından indüklenir. Bu protein, hipoksi koşulları altında kanser hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir (133,134).

SLC2A1, memeli kan-beyin bariyerindeki önemli bir glikoz taşıyıcısını kodlar. Kodlanan protein esas olarak hücre zarında ve hücre yüzeyinde bulunur. Bu gendeki mutasyonlar, paroksizmal eforun neden olduğu diskinezisi olan bir ailede bulunmuştur (135).

G6PD geni, glukoz-6-fosfat dehidrojenazı kodlar. Bu protein, ana işlevi oksitleyici maddelere karşı savunmada ve indirgeyici biyosentetik reaksiyonlarda önemli bir elektron donörü olan NADPH'yi üretmek olan, X'e bağlı bir referans geni tarafından kodlanan sitozolik bir enzimdir (136,137).

Metabolik enzim fosfogliserat mutaz enzimi 1 (PGAM1), glikoliz yolunda önemli bir enzimdir ve glikoliz kanser ilerlemesi ile yakından ilişkilidir, bu da PGAM1'in meme kanserinde önemli fonksiyonlara sahip olabileceğini öne sürmektedir (138).

Heksinazlar, glukozu glukoz-6-fosfata fosforile ederek, çoğu glukoz metabolizma yolundaki ilk adımı oluştururlar. Bu gen, iskelet kaslarında bulunan baskın form olan heksozinaz 2'yi kodlar. Mitokondri dışı zarına yerleşir. Bu genin ifadesi insüline duyarlıdır ve sıçanlarda yapılan çalışmalar, hızla büyüyen kanser hücrelerinde görülen glikolizde artış oranında rol aldığını öne sürmektedir (139).

PRPS1 geni riboz 5-fosfatın 5-fosforibozil-1-pirofosfat'a fosforibozilasyonunu katalize eden bir enzimi kodlar. Bu işlem, purin metabolizması ve nükleotid biyosentezi için gereklidir (140).

Yaptığımız çalışmada karbonhidrat metabolizmasındaki yolakta etkili olan ENO1, PFKFB4, SLC2A1, G6PD, PGAM1, HK2, PRPS1 genlerinde klinik ilaç olan doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında ekspresyon seviyeleri azalmıştır, doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında ENO1 ve PRPS1 gen ekspresyon seviyeleri anlamda düzeyde azalmıştır. PFKFB4, SLC2A1, G6PD, PGAM1 gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlar dikkati çekmiştir. HK2 gen ekspresyon

seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar doksorubisinin, doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında, karbonhidrat metabolizmasını etkileyen yolaktaki genler üzerinde hücreyi, dirençli MCF-7 hücre hattına göre daha fazla apoptoza yönelttiğini ve apoptotik yollardaki etkinliğinin daha fazla olduğunu ortaya koymuştur.

Lipitler, hidrofobik ancak kimyasal olarak çeşitli moleküller olup insan biyolojisinde geniş bir yelpazede rol oynarlar. Keton molekülleri, yağ asitleri, triacilgliseroller, fosfolipidler ve sfingolipidler, eikosanoidler, kolesterol, safra tuzları, steroid hormonlar ve yağda çözünen vitaminleri içerirler. Lipitler, enerjinin önemli bir kaynağı olarak işlev görürler. İnsan biyolojisindeki merkezi steroid kolesterol olup, bu kolesterol hayvansal yağlardan alınır ya da asetil-koenzim A'dan de novo sentezlenir (141).

Çalışmamızda ACADL, ACSL4, ACAT1, ACSS3, ACLY, ME1 genlerinin hücrelerde lipid metabolizmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir.

Uzun zincirli asil koenzim A dehidrojenaz (ACADL), katalitik yağ asidi oksidasyonunun ilk adımını gerçekleştiren ve uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunda önemli bir rol oynayan bir enzimdir. ACADL'nin ekspresyonu ve aktivitesi düzenlenerek, metabolizma yollarında kritik bir faktör olarak işlev görür (142). ACADL'nin malign tümör büyümesinde rol oynadığı da belirtilmiştir (143). Bazen ACADL'nin eksikliği veya yokluğu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açabilir (144,145).

ACSL4, yağ asitlerini yağ asil-CoA esterlerine dönüştüren ACS (asit-CoA sentetaz) ailesinin bir üyesi olarak araşidonik asit (AA) için bir substrat seçiciliğine sahiptir. ACSL4'ün disregülasyonu, meme kanseri, kolon adenokarsinomu ve mide kanseri gibi çeşitli kötü huylu tümörlerde rol oynar (146).

Acetyl-CoA acetyltransferaz 1 (ACAT1), iki molekül asetil-CoA'dan asetoasetil-CoA'nın geri dönüşümlü oluşumunu katalize eden bir enzimdir (147). 2016'da Jun Fan ve arkadaşları, ACAT1'in Warburg etkisinde anahtar bir rol oynadığını hipotez etti: ACAT1'e kovalent bir inhibitör olan arekolin hidrobromürün, artmış pirüvat dehidrojenaz kompleksi akışına ve oksidatif fosforilasyonla birlikte kanser hücrelerinin çoğalmasının ve tümör büyümesinin azaldığı gösterildi. Ayrıca, farklı kanser hücrelerinde artmış ACAT1 ifadesi tanımlanmıştır (148).

ACSS3 geni, Asil-koenzim A sentetazlarından (ACS'ler) biridir. ACS'ler, yağ asidi metabolizmasının başlangıç reaksiyonunu katalize eden bir enzim ailesinin önemli bir parçasıdır. Asil-CoA, hücrel metabolizmada hem anabolik (sentetik) hem de katabolik (yıkıcı) süreçlerde önemli bir rol oynar (149).

ATP-sitrat liyaz (ACLY), sitratı asetil-CoA'ya dönüştüren ve lipid sentezinden sorumlu olan ilk adım hız kontrol enzimidir (150). Hızla çoğalan kanser hücrelerinde, lipid sentezi ve ara ürünleri hücre zarı oluşumu için, ilgili sinyal ağları için ve tümörün malign ilerlemesi için gereklidir (151–154).

Birçok kanser türünde ve kanser hücre hatlarında ME (Malik Enzim) bolluğu ve aktivitesinde bozukluklar gözlemlenmiştir. ME1'in kanser hücre büyümesinin düzenlenmesine ilişkin birçok kanıt vardır. Tümör protein 53 (TP53), ME1'i baskılar ve hücre döngülerini indükler. Dahası, onkogenik bir mutasyon formu olan KRAS genine sahip CRC hücreleri artmış ME1 ifadesine sahiptir (155).

Çalışmamızda, lipid ve enerji metabolizması yollarında etkili ACADL, ACSL4, ACAT1, ACSS3, ACLY ve ME1 genlerinin, klinik ilaç olan doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında, ACSS3, ACSL4 ve ME1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. ACLY ve ACADL genlerinde ise anlamlı artışlar gözlenmiştir. ACAT1 gen ekspresyon seviyesinde ise herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, lipid metabolizması yolağındaki genlerin, doksorubisinin duyarlı MCF-7 hücre hattında hücrede apoptotik süreçleri artırdığını, dirençli MCF-7 hücre hattında ise apoptozun daha az seviyede olduğunu göstermektedir.

Pirüvat metabolizması ve sitrik asit (TCA) döngüsü, insan hücresinde enerji metabolizması süreçlerini birbirine ve ana biosentetik tepkimelerle bağlar.

Mitokondriyal asetil-CoA asetiltransferaz 1 (ACAT1), pirovat dehidrogenaz kompleksi (PDK)'i asetilleyerek pirovat dehidrogenazı (PDH) ve PDH fosfatazını düzenler. Aynı şekilde ACAT1, ketogenezde iki asetil-CoA molekülünü asetoasetil-CoA ve CoA'ya dönüştüren tetramerik bir enzimdir. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında ACAT1 enzim aktivitesinin çeşitli insan lösemi, akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde arttığı gözlemlenmiştir (148).

FH geni, trikarboksilik asit (TCA) döngüsündeki önemli bir enzim olan fumarat hidrataz (FH) proteini için kodlar. Patojenik FH mutasyonları ve bu mutasyonların neden olduğu FH fonksiyonundaki eksiklik, birçok metabolik ve hücrel sinyal değişikliğine yol açar; bunların birçoğu onkogenezi destekler ve bu da FH'deki germ hücre mutasyonları ile belirli neoplazmların artmış riski arasındaki ilişkiyi açıklar (156).

Birçok kanser türünde ve kanser hücre hatlarında ME (Malik Enzim) bolluğu ve/veya aktivitesinde bozukluklar gözlemlenmiştir. ME1'in kanser hücre büyümesinin düzenlenmesine ilişkin birçok kanıt vardır. Tümör protein 53 (TP53), ME1'i baskılar ve hücre döngülerini indükler. Dahası, onkogenik bir mutasyon formu olan KRAS genine sahip CRC hücreleri artmış ME1 ifadesine sahiptir (155).

Glutamat oksaloasetat transaminaz 1 (GOT1), esas olarak hücrel glutaminolizini düzenler, bu da glutamat'ı (Glu) alfa-ketoglutarik asit (a-KG) e dönüştürür ve kanser ilerlemesini sürdürmek için hayati öneme sahiptir. GOT1'in inhibisyonu pankreas kanseri ve akciğer kanseri gibi kanserlerde kanser büyümesini bozmak için etkili bir strateji olarak gösterilmektedir (157,158).

PDK2, pirüvat dehidrogenaz kinaz ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanan protein, pirüvat dehidrogenazı fosforile ederek, mitokondriyal pirüvat dehidrogenaz kompleksinin aktivitesini azaltır. Bu genin aşırı ifadesi hem kanser hem de diyabette rol oynayabilir (159).

Aerobik solunum ve solunum elektron taşınmasıyla ilişkili yolda etkili olan ACAT1, FH, ME1, GOT1 ve PDK2 genlerinin, klinik ilaç olan doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında, FH, ME1, PDK2 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. GOT 1 geninde anlamlı artış dikkati çekmiştir. ACAT1 gen ekspresyon seviyesinde ise herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu veriler ışığında yapılan literatür karşılaştırmasında TCA yolağında etkili olan genlerin, doksorubisine duyarlı MCF-7 hücrelerde apoptotik mekanizmaları aktifleştirerek hücreyi apoptoza yönlendirdiği gözlenmiştir. Dirençli MCF-7 hücre hattında ise apoptotik sürecin daha az aktif olduğunu söylemek mümkündür.

Nükleotidler ve türevleri, kısa vadeli enerji depolama (ATP, GTP), hücre içi ve dışı sinyalleşme (cAMP; adenozin), enzim koenzimleri olarak (NAD, FAD) ve DNA ve RNA sentezi için kullanılır. Bu yollar, hücre içi nükleotid havuzunun toplam boyutunu kontrol etmek, bireysel nükleotidlerin göreceli miktarlarını dengelemek ve deoksiribonükleotidlerin sentezini DNA replikasyonunun başlangıcına bağlamak için düzenlenir (160).

AMPD3, purin metabolizmasında adenilatın katalitik deaminasyonunu gerçekleştirerek purin metabolizmasında önemli bir rol oynayan adenozin monofosfat deaminaz ailesinin bir üyesidir (161). Wong'un çalışmasına göre, gastrointestinal stromal tümörlerde (GIST) AMPD3 miktarı önemli ölçüde artmıştır. AMPD3 ekspresyonu, KIT ekspresyonu ile ilişkilidir ve KIT, RAS/MAPK ve PI3K/AKT gibi sinyal yollarına dahil olur. Bu durum, kanserle ilişkili birçok genin ekspresyonunu artırmanın bir mekanizmasını sağlar (162).

NME, kanserin metastazını bastırmak ve yerel dokuya invazyonunu engellemekle ilişkilendirilen 10 genlik bir aileden oluşur ve aynı zamanda NM2 3 genleri olarak da bilinir (163,164). Bu gen ailesinin üyeleri arasında, NME1 ve NME2'nin kanser baskılayıcı aktiviteleri için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

Timidin kinaz 1 (TK1), hücre döngüsüne bağımlı bir işaretleyicidir ve DNA sentezi ve onarımında rol alan bir pirimidin tamir enzimidir. Bu nedenle, TK1 hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü aktivitesi ile yakından ilişkilidir (165,166). Geniş dağılımı ve aşırı ifadesi neredeyse tüm neoplastik hücrelerde bulunur (167).

Proje kapsamında nükleotid metabolizması yolağındaki AMPD3, NME2 ve TK1 genlerinin, klinik ilaç olan doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında, AMPD3 geninde ekspresyon seviyesinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. NME2 ve TK1 gen ekspresyon seviyelerinin azaldığı analiz edilmiştir. Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde doksorubisinin duyarlı MCF-7 hücre hattında hücrede nükleotid metabolizmasındaki genlerin, dirençli MCF-7 hücre hattına kıyasla daha fazla apoptozun indüklendiği ortaya konmuştur.

Vitaminler, yağda çözünen veya suda çözünen olmak üzere çözünebilirliklerine göre sınıflandırılan, insan hücreleri tarafından ya hiç sentezlenmeyen ya da sınırlı miktarlarda sentezlenen, çeşitli organik bileşiklerden oluşan bir gruptur. Bunlar, diyetle küçük miktarlarda alınması gereken ve genellikle koenzimler (ko-faktörler) olarak belirgin biyokimyasal rolleri olan maddelerdir. Vitamin ihtiyacı duyulan reaksiyonlara bağlı fizyolojik süreçler arasında ara metabolizma, görme, kemik oluşumu ve kan pıhtılaşması gibi birçok yön bulunmaktadır ve vitamin eksiklikleri çeşitli ve ciddi hastalık gruplarıyla ilişkilendirilmiştir.

MTR, 5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferazı kodlar. Bu enzim aynı zamanda kobalamin bağımlı metionin sentazı olarak da bilinir ve metionin biyosentezinin son adımını katalizler (168). 5-metil tetrahidrofolat (THF), dolaşımda bulunan ana folat kaynağı olduğunda, folat ve metiyonin metabolik döngülerini birleştiren enzim olan metiyonin sentazının kanser hücresi çoğalması ve tümör büyümesi için gereklidir (169).

SLC2A1, memeli kan-beyin bariyerindeki önemli bir glikoz taşıyıcısını kodlar. Kodlanan protein esas olarak hücre zarında ve hücre yüzeyinde bulunur. GLUT1 proteininin eksikliği veya yokluğu, serebral metabolizma için yetersiz glukoz seviyelerine yol açar. Bu gendeki mutasyonlar, paroksizmal eforun neden olduğu diskinezisi olan bir ailede bulunmuştur (135).

Çalışmamızda vitamin metaolizmasında etkili olduğu belirlenen MTR ve SLC2A1 genleri üzerinde yapılan çalışmada; doksorubisinin duyarlı MCF-7 hücre hattında bu genlerin ekspresyon seviyelerinde azalma, dirençli MCF-7 hücre hattına gen ekspresyon seviyelerinde ise anlamlı bir değişimi gözlemlenmiştir.

Amino asitlerin moleküllerin hücresel metabolizması, amino asitlerin katabolizması için yolları, nonesansiyel amino asitlerin ve selenositin biosentezi, ürenin sentezi ve karnitin, kreatin, kolin, poliamidler, melanin ve amin türetilmiş hormonların metabolizması içerir. Amino asitlerinin metabolizması, protein sentezi için dengeli bir amino asit kaynağı sağlar. Bu metabolik süreçler ayrı olarak işaretlenmiş nükleotid ve hem sentezi için azot atomları da sağlar (170–172).

MTR, 5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferazı kodlar. Bu enzim aynı zamanda kobalamin bağımlı metionin sentazı olarak da bilinir ve metionin biyosentezinin son adımını katalizler (168). 5-metil tetrahidrofolat (THF), dolaşımda

bulunan ana folat kaynağı olduğunda, folat ve metiyonin metabolik döngülerini birleştiren enzim olan metiyonin sentazının kanser hücresi çoğalması ve tümör büyümesi için gereklidir (169).

BCAT1, sitozolik ve mitokondriyal dallanmış zincir amino transferazlarıdır. Bu enzim, hücre büyümesi için esas olan dallanmış zincir L-aminolarının branşlı zincir alfa-keto asitlerine geri dönüşümlü transaminasyonunu katalizler. BCAT1'in aşırı ifadesi, glioblastoma, meme kanseri, akut miyeloid lösemi, kronik miyeloid lösemi ve mide kanseri gibi çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir (173).

D-3-fosfogliserat dehidrogenaz (PHGDH), de novo serin biyosentez yolunun başlangıcında yer alan ilk enzimdir (174,175). PHGDH ile aşırı ifade edilen hücreler, yüksek PHGDH düzeyleri, meme kanseri, glioma, rahim ağzı kanseri, akciğer kanseri ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türleri için olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (176, 177).

Glutamat oksaloasetat transaminaz 1 (GOT1), esas olarak hücrel glutaminolizini düzenler, bu da glutamat'ı (Glu) alfa-ketoglutarik asit (a-KG) e dönüştürür ve kanser ilerlemesini sürdürmek için hayati öneme sahiptir. GOT1'in inhibisyonu pankreas kanseri ve akciğer kanseri gibi kanserlerde kanser büyümesini bozmak için etkili bir strateji olarak gösterilmektedir (157,158).

Metionin adenosiltransferaz (MAT), hücrel metabolizmanın önemli bir düzenleyicisidir MAT, memelilerde iki farklı enzimi kodlayan MAT1A ve MAT2A'yı içerir (178). MAT2A, karaciğer kanseri, meme kanseri ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde düzensizdir ve MAT2A'nın susturulmasının kanser hücresi proliferasyonunun azalmasına ve hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (179).

Çalışmamızda aminoasit metabolizması yolağında ACAT1, BCAT1, GOT1, MTR, PHGDH genleri etkilidir. Klinik ilaç olan doksorubisine duyarlı MCF-7 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doksorubisine dirençli MCF-7 hücre hattında, GOT1 geninde ekspresyon seviyesinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. BCAT1 ve TK1 gen ekspresyon seviyelerinin azaldığı analiz edilmiştir ACAT1, MTR ve PHGDH gen ekspresyon seviyelerinde ise herhangi bir değişim yaşanmamıştır. Bu sonuçları dirençli hücredeki protein metabolizmasındaki aktivitenin duyarlı hücreye kıyasla daha anlamlı bir şekilde etkin olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Meme kanseri, kadınlarda sıkça karşılaşılan ve ciddi sonuçlara yol açabilen çeşitli türlerden biridir. Son yıllarda, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler, meme kanserinin erken teşhis edilmesi ve etkili bir şekilde tedavi edilmesi konusunda önemli adımlar atılmıştır. Bu gelişmeler, meme kanseri kaynaklı ölümlerde belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Meme kanseri tedavisine verilen yanıt, tümörün özelliklerine bağlıdır ve bu nedenle farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Bunlar arasında, özellikle agresif olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) öne çıkar. TNBC, östrojen reseptörleri, progesteron reseptörleri ve ERBB2/HER2 proteini için negatif olarak test edildiğinde tanımlanır ve genellikle geleneksel kemoterapi ile tedavi edilir.

Meme kanseri tedavisi, cerrahi müdahale ve çeşitli ek tedavi yöntemlerinin kombinasyonunu içerir. Başlangıç tedavisine genellikle olumlu yanıt alınsa da, tedavi ilerledikçe tümör daha agresif bir hale gelebilir ve geleneksel tedavilere direnç geliştirebilir. Bu durum, hastalığın tekrar etmesine ve tedavi için ciddi bir zorluk oluşturmasına yol açabilir. Özellikle sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan doksorubisin, TNBC'de direnç gelişimine sıkça yol açabilir ve bu da tedaviye karşı çoklu ilaç direncine neden olabilir. Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde ilaç direncinin nedenlerini anlamak ve bu direnci aşmak için yeni stratejiler geliştirmek son derece önemlidir.

Bu çalışma, doksorubisin duyarlı ve dirençli Meme Kanseri (MCF-7) hücre hatlarında metabolik yolların etkisini inceleyerek, yeni inhibisyon mekanizmalarını keşfetmeyi amaçlamaktadır. Elde edilen veriler, doksorubisinin hücrelerde apoptotik etkileri üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Doksorubisin duyarlı MCF-7 hücrelerinde uygulandığında, apoptozis daha belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Ancak dirençli hücre hatlarında apoptotik etki daha azdır, bu da doksorubisin direncinin altında yatan mekanizmaların önemini vurgulamaktadır.

Sonuçlar, metabolik yolların hedeflenmesinin antitümöral tedaviler için potansiyel bir strateji olduğunu göstermektedir. Özellikle, hücre yıkımını düzenleyen yolların incelenmesi, yeni antitümöral hedeflerin belirlenmesine katkı sağlamaktadır. Bu çalışma, doksorubisin direncinin moleküler düzeyde anlaşılmasına

ve bu dirence karşı etkili tedavilerin geliştirilmesine yönelik önemli bir adım olarak değerlendirilebilir.

Öneriler açısından, doksorubisin direncinin moleküler mekanizmalarının daha detaylı bir şekilde araştırılması önemlidir. Bu bağlamda, direnç gelişiminde rol oynayan genlerin ve metabolik yolların daha kapsamlı bir analizi yapılabilir. Ayrıca, doksorubisin direncini aşmak için yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir. Bu stratejiler, doksorubisinin etkinliğini artırmak veya alternatif terapötik yaklaşımların kullanılmasını içerebilir. Bu öneriler, meme kanseri tedavisinde doksorubisin direncinin üstesinden gelmek için gelecekte yapılacak çalışmalar için yol gösterici olabilir.



KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer J. Clin.* 2015;65(1):5–29.
2. McCubrey JA, Abrams SL, Fitzgerald TL, Cocco L, Martelli AM, Montalto G, et al. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv. Biol. Regul.* 2015;57:75–101.
3. McCubrey JA, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, Libra M, et al. Targeting breast cancer initiating cells: Advances in breast cancer research and therapy. *Adv. Biol. Regul.* 2014;56:81–107.
4. Geck RC, Toker A. Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Adv. Biol. Regul.* 2016;62:11–17.
5. Sharp C, Barsky S. Infiltrating carcinomas of the breast: Not one disease. In: Bland K, Copeland E, eds. *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant disease. 1. Philadelphia.* PA: Saunders Elsevier; 2009:231–47.
6. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.: Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2005;23(29):7350–60.
7. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98(19):10869–10874.
8. Hoda S, Kaplan R. *Breast Tumours: World Health Organization classification of tumours.* 5th ed. Lyon, France: IARC Press; 2019.
9. Nardin S, Mora E, Varughese FM, D'Avanzo F, Vachanaram AR, Rossi V, et al. Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities. *Front. Oncol.* 2020;10:864.
10. Cancer IA for R on. Global Cancer Observatory. [<https://gco.iarc.fr/>]. 13.5.2024 tarihinde erişilmiştir.
11. Bellanger M, Zeinomar N, Tehranifar P, Terry MB. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? *J. Glob. Oncol.* 2018;4(4):1–16.
12. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW. Screening for Breast Cancer. *JAMA* 2005;293(10):1245–1256.
13. Alkabbani F, Ferguson T. *Breast Cancer.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
14. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996;77(11):2318–2324.
15. Bradbury AR, Olopade OI. Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2007;8(3):255–267.
16. Apostolou P, Fostira F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Res. Int.* 2013;2013:747318.
17. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, et al. Breast-Cancer Risk in Families With Mutations in PALB2. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2014;69(11):659–660.
18. Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009;17(6):722–731.
19. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, Pruss D, Deffenbaugh AM, Frye C, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer* 2009;115(10):2222–2233.
20. Balmaña J, Díez O, Castiglione M, Group O behalf of the EGW. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Recommendations. *Ann. Oncol.* 2009;20(suppl_4):iv19–iv20.
21. Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95(23):13869–13874.
22. Khoo U-S, Ozcelik H, Cheung AN, Chow LW, Ngan HY, Done SJ, et al. Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 1999;18(32):4643–4646.
23. Janatova M, Zikan M, Dunder P, Matous B, Pohlreich P. Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Hum. Mutat.* 2005;25(3):319–319.
24. Armes JE, Egan AJ, Southey MC, Dite GS, McCredie MR, Giles GG, et al. The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer* 1998;83(11):2335–45.

25. Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, et al. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer epidemiology, Biomark. Prev. : a Publ. Am. Assoc. Cancer Res., cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 2001;10(5):467–73.
26. King M-C, Marks JH, Mandell JB, Group NYBCS. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302(5645):643–646.
27. Royce ME, Osman D. Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer: Basic Clin. Res.* 2015;9:BCBCR.S29268.
28. Riccardi F, Colantuoni G, Diana A, Mocerino C, Carteni G, Lauria R, et al. Exemestane and Everolimus combination treatment of hormone receptor positive, HER2 negative metastatic breast cancer: A retrospective study of 9 cancer centers in the Campania Region (Southern Italy) focused on activity, efficacy and safety. *Mol. Clin. Oncol.* 2018;9(3):255–263.
29. Zhang M, Jang H, Nussinov R. PI3K inhibitors: review and new strategies. *Chem. Sci.* 2020;11(23):5855–5865.
30. Schöffski P, Cresta S, Mayer IA, Wildiers H, Damian S, Gendreau S, et al. A phase Ib study of pictilisib (GDC-0941) in combination with paclitaxel, with and without bevacizumab or trastuzumab, and with letrozole in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2018;20(1):109.
31. Garrido-Castro AC, Saura C, Barroso-Sousa R, Guo H, Ciruelos E, Bermejo B, et al. Phase 2 study of buparlisib (BKM120), a pan-class I PI3K inhibitor, in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):120.
32. Amicis FD, Aquila S, Morelli C, Guido C, Santoro M, Perrotta I, et al. Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells. *Mol. Cancer* 2015;14(1):130.
33. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pr.* 2012;2012:743193.
34. Yu S, Liu Q, Han X, Qin S, Zhao W, Li A, et al. Development and clinical application of anti-HER2 monoclonal and bispecific antibodies for cancer treatment. *Exp. Hematol. Oncol.* 2017;6(1):31.
35. Xuhong J-C, Qi X-W, Zhang Y, Jiang J. Mechanism, safety and efficacy of three tyrosine kinase inhibitors lapatinib, neratinib and pyrotinib in HER2-positive breast cancer. *Am. J. cancer Res.* 2019;9(10):2103–2119.
36. Ryan Q, Ibrahim A, Cohen MH, Johnson J, Ko C, Sridhara R, et al. FDA Drug Approval Summary: Lapatinib in Combination with Capecitabine for Previously Treated Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER-2. *Oncol.* 2008;13(10):1114–1119.
37. Voigtlaender M, Schneider-Merck T, Trepel M. Small Molecules in Oncology. *Recent Results Cancer Res.* 2018;211:19–44.
38. Nyström T, Gustavsson N. Maintenance energy requirement: what is required for stasis survival of *Escherichia coli*? *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenerg.* 1998;1365(1–2):225–231.
39. Bodegom P van. Microbial Maintenance: A Critical Review on Its Quantification. *Microb. Ecol.* 2007;53(4):513–523.
40. Fernandez-de-Cossio-Diaz J, Vazquez A. Limits of aerobic metabolism in cancer cells. *Sci. Rep.* 2017;7(1):13488.
41. Voet D, Voet J. *Biochemistry*. 4th ed. Wiley; 2011.
42. Vazquez A. *Overflow metabolism: from yeast to Marathon runners*. Academic Press; 2017.
43. Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Syst. Biol.* 2010;4(1):58–58.
44. Berg J van den, Boersma AJ, Poolman B. Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017;15(5):309–318.
45. Beg QK, Vazquez A, Ernst J, Menezes MA de, Bar-Joseph Z, Barabási A-L, et al. Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(31):12663–12668.
46. Vazquez A, Beg QK, deMenezes MA, Ernst J, Bar-Joseph Z, Barabási A-L, et al. Impact of the solvent capacity constraint on *E. coli* metabolism. *BMC Syst. Biol.* 2008;2(1):7.
47. Jaiswal N, Gavin MG, Quinn WJ, Luongo TS, Gelfer RG, Baur JA, et al. The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis. *Mol. Metab.* 2019;28:1–13.
48. Chen Y, Zhao X, Wu H. Metabolic Stress and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: The Role of Protein O-GlcNAc Modification. *Arter., Thromb., Vasc. Biol.* 2019;39(10):1911–1924.
49. Akram M. Mini-review on Glycolysis and Cancer. *J. Cancer Educ.* 2013;28(3):454–457.
50. Matschinsky FM, Wilson DF. The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans. *Front. Physiol.* 2019;10:148.

51. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol. Lett.* 2019;17(5):4213–4221.
52. Liu Y, Zhang Z, Wang J, Chen C, Tang X, Zhu J, et al. Metabolic reprogramming results in abnormal glycolysis in gastric cancer: a review. *OncoTargets Ther.* 2019;12:1195–1204.
53. Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and their Therapeutic Potentials. *Curr. Med. Chem.* 2010;17(7):672–697.
54. Warburg O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.* 1925;9(1):148–163.
55. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 1927;8(6):519–530.
56. Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 1929;23(3):536–545.
57. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956;123(3191):309–314.
58. Boerner P, Resnick RJ, Racker E. Stimulation of glycolysis and amino acid uptake in NRK-49F cells by transforming growth factor beta and epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985;82(5):1350–1353.
59. Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated Levels of Glucose Transport and Transporter Messenger RNA Are Induced by ras or src Oncogenes. *Science* 1987;235(4795):1492–1495.
60. Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. Transformation of Rat Fibroblasts by FSV Rapidly Increases Glucose Transporter Gene Transcription. *Science* 1987;235(4795):1495–1498.
61. Hiraki Y, Rosen OM, Birnbaum MJ. Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *J. Biol. Chem.* 1988;263(27):13655–13662.
62. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* 2015;162(3):540–551.
63. Flaveny CA, Griffett K, El-Gendy BE-DM, Kazantzis M, Sengupta M, Amelio AL, et al. Broad Anti-tumor Activity of a Small Molecule that Selectively Targets the Warburg Effect and Lipogenesis. *Cancer Cell* 2015;28(1):42–56.
64. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E, Vander Heiden MG. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* 2015;162(3):552–563.
65. Viale A, Pettazoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sánchez N, Marchesini M, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* 2014;514(7524):628–632.
66. Sheeran FL, Angerosa J, Liaw NY, Cheung MM, Pepe S. Adaptations in Protein Expression and Regulated Activity of Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex in Human Systolic Heart Failure. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2019;2019:4532592.
67. Verschueren KHG, Blanchet C, Felix J, Dansercoer A, Vos DD, Bloch Y, et al. Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature* 2019;568(7753):571–575.
68. Dhami N, Trivedi DK, Goodacre R, Mainwaring D, Humphreys DP. Mitochondrial aconitase is a key regulator of energy production for growth and protein expression in Chinese hamster ovary cells. *Metabolomics* 2018;14(10):136.
69. Yang D, Kim J. Mitochondrial Retrograde Signalling and Metabolic Alterations in the Tumour Microenvironment. *Cells* 2019;8(3):275.
70. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 2008;131(7):1722–1735.
71. Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004;7(3):254–261.
72. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int. J. Radiat. Biol.* 2019;95(7):912–919.
73. Lu J. The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38(1–2):157–164.
74. Reinfeld BI, Rathmell WK, Kim TK, Rathmell JC. The therapeutic implications of immunosuppressive tumor aerobic glycolysis. *Cell. Mol. Immunol.* 2022;19(1):46–58.
75. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;313(3):459–465.
76. Yuen CA, Asuthkar S, Guda MR, Tsung AJ, Velpula KK. Cancer stem cell molecular reprogramming of the Warburg effect in glioblastomas: a new target gleaned from an old concept. *CNS Oncol.* 2016;5(2):101–108.
77. Xu J, Richard S. Cellular pathways influenced by protein arginine methylation: Implications for cancer. *Mol. Cell* 2021;81(21):4357–4368.
78. Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov.* 2019;9(7):837–851.

79. Goldenring JR, Mills JC. Cellular Plasticity, Reprogramming, and Regeneration: Metaplasia in the Stomach and Beyond. *Gastroenterology* 2022;162(2):415–430.
80. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144(5):646–674.
81. Greten FR, Grivnenkov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 2019;51(1):27–41.
82. Liu C, Qiang J, Deng Q, Xia J, Deng L, Zhou L, et al. ALDH1A1 activity in tumor-initiating cells remodels myeloid-derived suppressor cells to promote breast cancer progression. *Cancer Res.* 2021;81(23):canres.1337.2021.
83. Nakatsuka T, Tateishi K, Kato H, Fujiwara H, Yamamoto K, Kudo Y, et al. Inhibition of histone methyltransferase G9a attenuates liver cancer initiation by sensitizing DNA-damaged hepatocytes to p53-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2021;12(1):99.
84. Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(4):1259.
85. Zou ZW, Ma C, Medoro L, Chen L, Wang B, Gupta R, et al. 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.
86. Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, et al. Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung Cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis. *Cell* 2012;148(1–2):259–272.
87. Sebastián C, Zwaans BMM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The Histone Deacetylase SIRT6 Is a Tumor Suppressor that Controls Cancer Metabolism. *Cell* 2012;151(6):1185–1199.
88. Dong Y, Tu R, Liu H, Qing G. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020;5(1):124.
89. Lunt SY, Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011;27(1):441–464.
90. Onodera Y, Nam J-M, Bissell MJ. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J. Clin. Investig.* 2014;124(1):367–384.
91. Ippolito L, Morandi A, Giannoni E, Chiarugi P. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. *Trends Biochem. Sci.* 2019;44(2):153–166.
92. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Investig.* 2008;118(12):3930–3942.
93. Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, et al. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature* 2021;591(7851):645–651.
94. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016;24(5):657–671.
95. Pérez-Escuredo J, Dadhich RK, Dhup S, Cacace A, Hée VFV, Saedeleer CJD, et al. Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. *Cell Cycle* 2016;15(1):72–83.
96. Brown TP, Bhattacharjee P, Ramachandran S, Sivaprakasam S, Ristic B, Sikder MOF, et al. The lactate receptor GPR81 promotes breast cancer growth via a paracrine mechanism involving antigen-presenting cells in the tumor microenvironment. *Oncogene* 2020;39(16):3292–3304.
97. Dong P, Xiong Y, Konno Y, Ihira K, Kobayashi N, Yue J, et al. Long non-coding RNA DLEU2 drives EMT and glycolysis in endometrial cancer through HK2 by competitively binding with miR-455 and by modulating the EZH2/miR-181a pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2021;40(1):216.
98. Park H-A, Brown SR, Kim Y. Cellular Mechanisms of Circulating Tumor Cells During Breast Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(14):5040.
99. Endo H, Owada S, Inagaki Y, Shida Y, Tatemichi M. Metabolic reprogramming sustains cancer cell survival following extracellular matrix detachment. *Redox Biol.* 2020;36:101643.
100. Zhao H, Yan G, Zheng L, Zhou Y, Sheng H, Wu L, et al. STIM1 is a metabolic checkpoint regulating the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Theranostics* 2020;10(14):6483–6499.
101. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 2011;11(2):85–95.
102. Méndez-Lucas A, Duarte JAG, Sunny NE, Satapati S, He T, Fu X, et al. PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. *J. Hepatol.* 2013;59(1):105–113.
103. Stark R, Guebre-Egziabher F, Zhao X, Feriod C, Dong J, Alves TC, et al. A Role for Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK-M) in the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis*. *J. Biol. Chem.* 2014;289(11):7257–7263.

104. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 1992;54(1):885–909.
105. Ghanem N, El-Baba C, Araji K, El-Khoury R, Usta J, Darwiche N. The Pentose Phosphate Pathway in Cancer: Regulation and Therapeutic Opportunities. *Chemotherapy* 2021;66(5–6):179–191.
106. Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front. Endocrinol.* 2020;11:365.
107. Song J, Sun H, Zhang S, Shan C. The Multiple Roles of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Tumorigenesis and Cancer Chemoresistance. *Life* 2022;12(2):271.
108. Pasini E, Corsetti G, Aquilani R, Romano C, Picca A, Calvani R, et al. Protein-Amino Acid Metabolism Disarrangements: The Hidden Enemy of Chronic Age-Related Conditions. *Nutrients* 2018;10(4):391.
109. Lehninger A. *Principles of Biochemistry*. New York, NY, USA: Worth Publishers Inc; 1982.
110. Bischoff R, Schlüter H. Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J. Proteom.* 2012;75(8):2275–2296.
111. Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2016;16(11):732–749.
112. Luo J, Yang H, Song B-L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21(4):225–245.
113. Park JB, Lee CS, Jang J-H, Ghim J, Kim Y-J, You S, et al. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2012;12(11):782–792.
114. Moolenaar WH, Perrakis A. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011;12(10):674–679.
115. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* 1996;274(5285):255–259.
116. Xiao X, Tang J-J, Peng C, Wang Y, Fu L, Qiu Z-P, et al. Cholesterol Modification of Smoothed Is Required for Hedgehog Signaling. *Mol. Cell* 2017;66(1):154-162.e10.
117. Rigoulet M, Bouchez CL, Paumard P, Ransac S, Cuvellier S, Duvezin-Caubet S, et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenerg.* 2020;1861(11):148276.
118. Vita VD, Chu E. *Drug development. Principles and Practice in Oncology*. Philadelphia: Lippincott; 2003.
119. Weiss RB, Sarosy G, Clagett-Carr K, Russo M, Leyland-Jones B. Anthracycline analogs The past, present, and future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1986;18(3):185–197.
120. Verweij J, Kees N. *Principles of Chemotherapy*. Oxford; 2002.
121. Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 1997;54 Suppl 4:1–7.
122. Zunino F, Capranico G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anti-cancer drug Des.* 1990;5(4):307–17.
123. Buzdar AU. Topoisomerase IIalpha gene amplification and response to anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol. : Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2006;24(16):2409–11.
124. Marcq G, Jarry E, Ouzaid I, Hermieu J-F, Henon F, Fantoni J-C, et al. Contemporary best practice in the use of neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Ther. Adv. Urol.* 2019;11:1756287218823678.
125. Tantari M, Barra F, Domenico SD, Ferraioli D, Vellone VG, Cian FD, et al. Current state of the art and emerging pharmacotherapy for uterine leiomyosarcomas. *Expert Opin. Pharmacother.* 2019;20(6):713–723.
126. Koleini N, Nickel BE, Edel AL, Fandrich RR, Ravandi A, Kardami E. Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Chem.-Biol. Interact.* 2019;303:35–39.
127. Yu AF, Chan AT, Steingart RM. Cardiac Magnetic Resonance and Cardio-Oncology Does T2 Signal the End of Anthracycline Cardiotoxicity? *. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019;73(7):792–794.
128. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sci.* 2021;278:119527.
129. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death Critical Control Points. *Cell* 2004;116(2):205–219.
130. Maugg D, Rothenaigner I, Schorpp K, Potukuchi HK, Korsching E, Baumhoer D, et al. New Small Molecules Targeting Apoptosis and Cell Viability in Osteosarcoma. *PLoS ONE* 2015;10(6):e0129058.
131. Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin. Biochem.* 2013;46(15):1339–1352.
132. Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 2001;58(7):902–920.

133. Olaizola P, Banales JM. PFKFB4 Is a Metabolic Driver of HCC Progression and Chemoresistance Through ROS Mitigation. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2023;15(6):1527–1529.
134. Trojan SE, Dudzik P, Totoń-Żurańska J, Laidler P, Kocemba-Pilarczyk KA. Expression of Alternative Splice Variants of 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase-4 in Normoxic and Hypoxic Melanoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(16):8848.
135. Mauri A, Duse A, Palm G, Previtali R, Bova SM, Olivotto S, et al. Molecular Genetics of GLUT1DS Italian Pediatric Cohort: 10 Novel Disease-Related Variants and Structural Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(21):13560.
136. Chamchoy K, Sudsumrit S, Wongwigkan J, Petmitr S, Songdej D, Adams ER, et al. Molecular characterization of G6PD mutations identifies new mutations and a high frequency of intronic variants in Thai females. *PLOS ONE* 2023;18(11):e0294200.
137. Ahamed A, Hosea R, Wu S, Kasim V. The Emerging Roles of the Metabolic Regulator G6PD in Human Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(24):17238.
138. Zhang D, Jin N, Sun W, Li X, Liu B, Xie Z, et al. Phosphoglycerate mutase 1 promotes cancer cell migration independent of its metabolic activity. *Oncogene* 2017;36(20):2900–2909.
139. Ciscato F, Ferrone L, Masgras I, Laquatra C, Rasola A. Hexokinase 2 in Cancer: A Prima Donna Playing Multiple Characters. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):4716.
140. Jing X, Wang X, Zhang T, Zhu W, Fang Y, Wu H, et al. Cell-Cycle-Dependent Phosphorylation of PRPS1 Fuels Nucleotide Synthesis and Promotes Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2019;79(18):4650–4664.
141. Vance J, Vance D. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th ed. Elsevier Science; 2008.
142. Zhang M, Sunaba T, Sun Y, Shibata T, Sasaki K, Isoda H, et al. Acyl-CoA dehydrogenase long chain (ACADL) is a target protein of stylissatin A, an anti-inflammatory cyclic heptapeptide. *J. Antibiot.* 2020;73(8):589–592.
143. Wang B, Zhang Q, Gao A, Wang Q, Ma J, Li H, et al. New Ratios for Performance Improvement for Identifying Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiencies in Expanded Newborn Screening: A Retrospective Study. *Front. Genet.* 2019;10:811.
144. Ji H, Friedman MI. Reduced hepatocyte fatty acid oxidation in outbred rats prescreened for susceptibility to diet-induced obesity. *Int. J. Obes.* 2008;32(8):1331–1334.
145. Cauwer AD, Mariotte A, Sibilica J, Bahram S, Georgel P. DICER1: A Key Player in Rheumatoid Arthritis, at the Crossroads of Cellular Stress, Innate Immunity, and Chronic Inflammation in Aging. *Front. Immunol.* 2018;9:1647.
146. Chen J, Ding C, Chen Y, Hu W, Yu C, Peng C, et al. ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway. *Cancer Lett.* 2021;502:154–165.
147. Rogers MA, Liu J, Song B-L, Li B-L, Chang CCY, Chang T-Y. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2015;151:102–107.
148. Fan J, Lin R, Xia S, Chen D, Elf SE, Liu S, et al. Tetrameric Acetyl-CoA Acetyltransferase 1 Is Important for Tumor Growth. *Mol. Cell* 2016;64(5):859–874.
149. Yoshimura Y, Araki A, Maruta H, Takahashi Y, Yamashita H. Molecular cloning of rat acss3 and characterization of mammalian propionyl-CoA synthetase in the liver mitochondrial matrix. *J. Biochem.* 2016;161(3):mvw067.
150. Gibson DM, Lyons RT, Scott DF, Muto Y. Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver. *Adv. Enzym. Regul.* 1972;10:187–204.
151. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res.* 2010;70(20):8117–8126.
152. Lee J-H, Phelan P, Shin M, Oh B-C, Han X, Im S-S, et al. SREBP-1a-stimulated lipid synthesis is required for macrophage phagocytosis downstream of TLR4-directed mTORC1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018;115(52):E12228–E12234.
153. Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019;116(2):631–640.
154. Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS-O, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* 2017;541(7635):41–45.
155. Fernandes LM, Al-Dwairi A, Simmen RCM, Marji M, Brown DM, Jewell SW, et al. Malic Enzyme 1 (ME1) is pro-oncogenic in ApcMin/+ mice. *Sci. Rep.* 2018;8(1):14268.
156. Zyla RE, Hodgson A. Gene of the month: FH. *J. Clin. Pathol.* 2021;74(10):615–619.

157. Zhou X, Curbo S, Li F, Krishnan S, Karlsson A. Inhibition of glutamate oxaloacetate transaminase 1 in cancer cell lines results in altered metabolism with increased dependency of glucose. *BMC Cancer* 2018;18(1):559.
158. Yoshida T, Yamasaki S, Kaneko O, Taoka N, Tomimoto Y, Namatame I, et al. A covalent small molecule inhibitor of glutamate-oxaloacetate transaminase 1 impairs pancreatic cancer growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020;522(3):633–638.
159. Kitamura S, Yamaguchi K, Murakami R, Furutake Y, Higasa K, Abiko K, et al. PDK2 leads to cisplatin resistance through suppression of mitochondrial function in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2021;112(11):4627–4640.
160. Rudolph FB. The biochemistry and physiology of nucleotides. *J. Nutr.* 1994;124(1 Suppl):124S-127S.
161. Komatsu K, Buchanan FG, Otaka M, Jin M, Odashima M, Horikawa Y, et al. Gene expression profiling following constitutive activation of MEK1 and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Mol. Cancer* 2006;5(1):63.
162. Wong M, Funasaka K, Obayashi T, Miyahara R, Hirooka Y, Hamaguchi M, et al. AMPD3 is associated with the malignant characteristics of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol. Lett.* 2017;13(3):1281–1287.
163. Boissan M, Dabernat S, Peuchant E, Schlattner U, Lascu I, Lacombe M-L. The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol. Cell. Biochem.* 2009;329(1–2):51–62.
164. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* 1988;80(3):200–4.
165. Bello LJ. Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells. *Exp. Cell Res.* 1974;89(2):263–274.
166. Johnson LF, Rao LG, Muench AJ. Regulation of thymidine kinase enzyme level in serum-stimulated mouse 3T6 fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 1982;138(1):79–85.
167. Arnér ESJ, Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* 1995;67(2):155–186.
168. Ghergurovich JM, Xu X, Wang JZ, Yang L, Ryseck R-P, Wang L, et al. Methionine synthase supports tumour tetrahydrofolate pools. *Nat. Metab.* 2021;3(11):1512–1520.
169. Sullivan MR, Darnell AM, Reilly MF, Kunchok T, Joesch-Cohen L, Rosenberg D, et al. Methionine synthase is essential for cancer cell proliferation in physiological folate environments. *Nat. Metab.* 2021;3(11):1500–1511.
170. Felig P. Amino Acid Metabolism in Man. *Annu. Rev. Biochem.* 1975;44(1):933–955.
171. Owen OE, Reichard GA, Patel MS, Boden G. Energy metabolism in feasting and fasting. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1979;111:169–88.
172. Häussinger D. Liver Glutamine Metabolism. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 1990;14(4S):56S-62S.
173. Nong X, Zhang C, Wang J, Ding P, Ji G, Wu T. The mechanism of branched-chain amino acid transferases in different diseases: Research progress and future prospects. *Front. Oncol.* 2022;12:988290.
174. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* 2011;43(9):869–874.
175. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 2011;476(7360):346–350.
176. Zhu J, Ma J, Wang X, Ma T, Zhang S, Wang W, et al. High Expression of PHGDH Predicts Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Transl. Oncol.* 2016;9(6):592–599.
177. Jia X, Zhang S, Zhu H, Wang W, Zhu J, Wang X, et al. Increased Expression of PHGDH and Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Transl. Oncol.* 2016;9(3):191–196.
178. Pajares MA, Markham GD. Methionine adenosyltransferase (s-adenosylmethionine synthetase). *Adv. Enzym. Relat. areas Mol. Biol.* 2011;78:449–521.
179. Yang H, Huang Z-Z, Wang J, Lu SC. The role of c-Myb and Sp1 in the up-regulation of methionine adenosyltransferase 2A gene expression in human hepatocellular carcinoma. *FASEB J.* 2001;15(9):1507–1516.

