

2016

DOKTORA

FİZYOLOJİ

Ece KOÇ YILDIRIM



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (VETERİNER) DOKTORA PROGRAMI
VTF-2016-0002

**SPRAGUE DAWLEY SIÇANLARINDA DEĞİŞİK
KALORİ KISITLAMA YÖNTEMLERİNİN DENEYSEL
KARSİNOMA ÜZERİNE ETKİLERİ VE ETKİ
MEKANİZMALARI**

ECE KOÇ YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Muharrem BALKAYA

AYDIN-2016

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (VETERİNER) DOKTORA PROGRAMI

**SPRAGUE DAWLEY SIÇANLARINDA DEĞİŞİK KALORİ
KISITLAMA YÖNTEMLERİNİN DENEYSEL KARSİNOMA
ÜZERİNE ETKİLERİ VE ETKİ MEKANİZMALARI**

ECE KOÇ YILDIRIM
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Muharrem BALKAYA

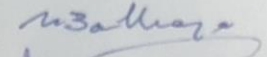
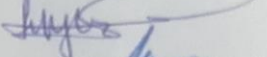
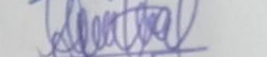
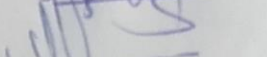
Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-13017 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Ece KOÇ YILDIRIM tarafından hazırlanan “Sprague Dawley Sıçanlarında Değişik Kalori Kısıtlama Yöntemlerinin Deneysel Karsinoma Üzerine Etkileri ve Etki Mekanizmaları” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/06/2016

<u>Ünvanı, Adı ve Soyadı</u>	<u>Üniversitesi</u>	<u>İmzası</u>
Prof. Dr. Muharrem BALKAYA	ADÜ Veteriner Fakültesi	
Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT	AÜ Veteriner Fakültesi	
Prof. Dr. Cenk Aydın	UÜ Veteriner Fakültesi	
Prof. Dr. Celal Ülger	ADÜ Fen-Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK	ADÜ Veteriner Fakültesi	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında bilgisini, tecrübesini ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Muharrem BALKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Erbay BARDIKÇIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet Gökhan ÖNOL, Araş. Gör. Mehmet KAYA, Araş. Gör. Emrah İPEK ve ADÜ Veteriner Fakültesi ikinci sınıf öğrencisi Zahide DEDEOĞLU'na tez çalışmam boyunca vermiş oldukları emek ve göstermiş oldukları yardımları için,

Aynı anabilim dalında çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Ferda BELGE, Doç. Dr. Hümeysra ÜNSAL, Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL, Yrd. Doç. Dr. Aykut Göktürk ÜNER ve Araş. Gör. Mehmet EKİCİ'ye tez süresince göstermiş oldukları anlayışları için,

Annem, babam, kız kardeşim ve eşime hayatımın her döneminde yanımda oldukları, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemedikleri, varlıklarıyla hayatıma anlam kattıkları, kısacası var olmamı sağladıkları için,

TEŞEKKÜR EDİYORUM.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanser Gelişmesinde Glikolitik Yolak	5
2.2. Kalori Kısıtlaması ve Kanser	8
2.2.1. Deneysel Kanser Modellerinde Kalori Kısıtlaması	8
2.2.2. Kalori Kısıtlamasının Olası Mekanizmaları	9
2.2.3. Alternatif Gün Besleme	11
2.2.3.1. Alternatif Gün Beslemenin Kanser Üzerine Etkileri	14
2.3. Enerji Metabolizmasını Etkileyen Bazı Hormonlar ve Kanser	15
2.3.1. İnsülin	15
2.3.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1	17
2.3.2.1. İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Eksenı	18
2.3.3. Adipokinler	20
2.3.3.1. Leptin	20
2.3.3.2. Adiponektin	23
2.3.3.2.1. Leptin ve Adiponektin Oranı	26
2.3.4. Glikokortikoidler	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Hayvanlar ve Meme Kanseri İndüksiyonu	30
3.2. Deney Dizaynı	30
3.3. Kanların Alınması, Serum Örneklerinin Hazırlanması ve Nekropsi	32

3.4. Kimyasallar ve Serumda Sitokin ve Hormon Konsantrasyonlarının Saptanması	32
3.5. Deneyden Çıkartma/Deneyi Sonlandırma Kriterleri	34
3.6. Histopatolojik Değerlendirme	34
3.7. İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Yem Tüketimi	36
4.2. Canlı Ağırlık	36
4.3. Tümör Hacmi	39
4.4. Tümör Sayıları ve Tümör Ağırlıkları	42
4.5. Plazma Hormon Konsantrasyonları	45
4.6. Histopatoloji	47
5. TARTIŞMA	51
5.1. Yem Tüketimi	52
5.2. Canlı Ağırlık	53
5.3. Tümör Hacmi	55
5.4. Tümör Sayısı ve Tümör Ağırlıkları	57
5.5. Plazma Hormon Konsantrasyonları	59
5.6. Histopatoloji	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	68
EKLER	96
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1,3-BPG	: 1,3-bifosfogliserat
2-PG	: 2-fosfogliserat
3-PG	: 3-fosfogliserat
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ADF	: Alternatif gün besleme
AdipoR	: Adiponektin reseptörü
Akt	: Protein kinaz B
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat aktive edici protein kinaz
Asetil CoA	: Asetil koenzim A
ATP	: Adenozin trifosfat
CO₂	: Karbondioksit
CR	: Kalori kısıtlaması
CRH	: Kortikotropin serbestleştirici hormon
DMBA	: 7,12-Dimethylbenzanthracene
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
F1,6-BP	: Fruktoz-1,6-bifosfat
F6P	: Fruktoz 6 fosfat
fAd	: Adiponektinin uzun formu
FADH₂	: Flavın adenin dinükleotid
G6P	: Glikoz 6-fosfat
GA3P	: Gliseraldehid-3-fosfat
gAd	: Adiponektinin globüler formu
GAPDH	: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
GC	: Glikokortikoid
GH	: Büyüme hormonu
GHBP	: Büyüme hormonu bağlayıcı globulin
GLUT4	: Glikoz transporter-4
GPI	: Glikoz fosfat izomeraz
GSK3B	: Glikojen sentaz kinaz 3B

GTP	: Guanizin trifosfat
H⁺	: Hidrojen
H₂O	: Su
HMW	: Yüksek moleküler ağırlık
IF	: Aralıklı besleme
IGFBP-3	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü-1
IL-10	: İnterlökin 10
IL-6	: İnterlökin 6
INFγ	: İnterferon γ
INSR	: İnsülin reseptörü
IRS-I	: İnsülin reseptör substratı-1
ip	: İntraperitoneal
JAK2	: Janus kinaz 2
KD	: Ketojenik diyet
kDa	: Kilodalton
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LMW	: Düşük moleküler ağırlık
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
MCF-7	: Meme kanseri hücre hattı
MI	: Miyokard enfarktüsü
MMTV	: Fare meme tümörü virüsü
MMW	: Orta moleküler ağırlık
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
NaCl	: Sodyum klorür
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMU	: N-metil-N-nitrozaüre
ObR	: Leptin reseptörü
OF1	: Oncins france 1
PDH	: Pirüvat dehidrogenaz
PEP	: Fosfoenolpirüvat

PFK1	: Fosfofruktokinaz-1
PGK	: Fosfogliseratkinaz
PGM	: Fosfogliseratmutaz
PI3K	: Fosfoinosit 3 kinaz
PPP	: Pentoz fosfat yolu
Ras	: Retiküler aktive edici sistem
Sc	: Subkutan
SCID	: Ağır kombine bağışıklık yetersizliği
SHBG	: Seks hormonları bağlayıcı globulin
SIR-2	: Silent information regulator 2
SIRT-1	: Sirtuin 1
STAT	: Transkripsiyonun sinyal dönüştürücü ve aktivatörü
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
TGFα	: Dönüştürücü büyüme faktörü α
TNFα	: Tümör nekrozis faktör α
TSC	: Tuberoz skleroz kompleks
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1999-2005 yıllarında Türkiye’deki kanser insidansı	1
Şekil 2. Dünyada en yaygın kanser tipleri ve bölgelere göre dağılımı	2
Şekil 3. Glikoliz, PPP ve TCA döngüsü	7
Şekil 4. Oksidatif fosforilasyon, aerobik glikolizis ve anaerobik glikolizis (Warburg etkisi) arasındaki farklılıklar	8
Şekil 5. Kalori kısıtlaması veya ADF’nin adipoz doku fizyolojisi ve kronik hastalık riski üzerindeki etkisi	13
Şekil 6. İnsülin-IGF-I eksenini	20
Şekil 7. Kanser gelişim yollarının adiponektin aracılı supresyonu	26
Şekil 8. Yüksek ve düşük adiponektin:leptin oranları	28
Şekil 9. İnsülin (A), IGF-I (B), leptin (C), adiponektin (D) ve kortikosteron (E) için oluşturulan standart grafikler	33
Şekil 10. Canlı ağırlık değişimleri	39
Şekil 11. Tümör hacim değişimleri	40
Şekil 12. İlk 6 hafta sonundaki toplam ve ortalama tümör hacimleri	44
Şekil 13. 12 hafta sonundaki toplam ve ortalama tümör hacimleri	44
Şekil 14. İlk 6 hafta ve 12 hafta sonundaki tümör ağırlıkları	44
Şekil 15. 12 hafta sonundaki toplam ve ortalama tümör ağırlıkları	45
Şekil 16. 12 hafta sonundaki göreceli tümör ağırlıkları	45
Şekil 17. Benign ve malign ve invaziv ve non-inavaziv tümörlerin gruplara göre dağılımı	49

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Deney sonunda tümör en ve boy çaplarının ölçülmesi	32
Resim 2. Böbrekte şekillenen kistik oluşum	43
Resim 3. İnvaziv duktal karsinom	49
Resim 4. Adenokarsinom	50
Resim 5. İntraduktal papillom	50
Resim 6. Adenom	50



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. İnsanda leptin konsantrasyonunu etkileyen hormonlar	22
Tablo 2. Çalışma dizaynı ve prosedürler	31
Tablo 3. Tümör doku kesitlerinin takip edilmek üzere alındıkları solüsyonlar ve bu solüsyonlarda bekletildikleri süreler	34
Tablo 4. Canlı ağırlıklar	38
Tablo 5. Tümör hacimleri	41
Tablo 6. İlk 6 hafta sonundaki tümör hacmine ilişkin değişkenler	42
Tablo 7. 12 hafta sonundaki tümör hacmine ilişkin değişkenler	42
Tablo 8. Serum insülin, IGF-I, kortikosteron, leptin ve adiponektin konsantrasyonları ...	47
Tablo 9. NMU ile indüklenen meme tümörlerinin histopatolojik özellikleri ve gruplara göre dağılımı	48
Tablo 10. Benign ve malign tümörlerin gruplara göre dağılımları	48
Tablo 11. Non-invaziv ve invaziv tümörlerin gruplara göre dağılımları	48

ÖZET

SPRAGUE DAWLEY SIÇANLARINDA DEĞİŞİK KALORİ KISITLAMA YÖNTEMLERİNİN DENEYSEL KARSİNOMA ÜZERİNE ETKİLERİ VE ETKİ MEKANİZMALARI

**YILDIRIM KOÇ E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji
(Veteriner) Doktora Programı Doktora Tezi, Aydın, 2016.**

Günümüzde değişik kalori kısıtlamalarının kanseri de içeren yaş-ilişkili kronik hastalıkları önlediği iyi bilinmektedir. Kalori kısıtlamasının kanser üzerine etkileriyle ilgili çalışmalarda, genellikle kısıtlama, tümör indüksiyonu ile eş zamanlı veya indüksiyondan birkaç gün sonra başlatılmıştır. Tümör geliştikten sonra kalori kısıtlaması uygulanmış çalışmalar çok azdır ve olanlar da sadece belirli tip kanserlerle sınırlıdır.

Bu çalışmada indüklenmiş meme kanseri modelinde tümör belirli bir gelişme sürecini tamamladıktan sonra gerçekleştirilecek kalori kısıtlamasının tümör gelişmesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu bağlamda 34 adet 21 günlük dişi Sprague Dawley sıçan kullanıldı. 29 sıçanda NMU (50 mg/kg/i.p.) ile meme kanseri indüklendi. Tümör çapı 10-12 mm'ye ulaştığında, sıçanlar tümör büyüklüğü açısından eşitlenmiş üç gruba ayrıldı. İzleyen 12 hafta süreyle gruplara sırasıyla *ad libitum* (Kanser Kontrol [KK]), %50 kalori kısıtlaması (%50-CR) ve alternatif gün besleme (ADF) uygulandı. Serum fizyolojik uygulanan 5 sıçan da *ad libitum* beslenen sağlıklı kontrol grubunu oluşturdu. Sıçanlarda %50-CR hızlı bir kilo kaybı ile sonuçlandı; hayvanlar ilk 6 hafta içinde canlı ağırlıklarının %26-38'ini kaybetti ve bu grup için deney 6. haftada sonlandırıldı. Canlı ağırlıklar ve tümör çapları haftada bir kez ölçüldü. Deney sonunda eksize edilen tümörlerin çapları ve ağırlıkları ile serum örneklerinde insülin, IGF-I, kortikosteron, leptin ve adiponektin konsantrasyonları belirlendi. Veriler ANOVA, tekrarlayan ölçümler için ANOVA ve Kruskal Wallis ile değerlendirildi.

Ortalama canlı ağırlık değerleri kontrollerde KK, ADF ve %50-CR gruplarına göre ve KK'larda ADF ve %50-CR gruplarına göre daha yüksekti. Birden çok tümör görülme sıklığı KK grubunda ADF ve %50-CR gruplarına göre daha yüksekti. Ancak tümör hacmi ve ağırlıkları açısından gruplar arasında bir fark tespit edilemedi. Serum adiponektin konsantrasyonu ADF ve kontrol gruplarında KK grubuna göre ve adiponektin/leptin oranı ADF grubunda KK grubuna göre daha yüksekti. Serum insülin, IGF-I, leptin ve kortikosteron konsantrasyonları açısından gruplar arasında bir fark yoktu. %50-CR grubunda 6. hafta sonunda çıkartılan tümörlerin tümü benign özellikteydi. 12 hafta sonunda malign ve invaziv karakterde tümör görülme sıklığı KK grubunda ADF grubuna göre daha yüksekti.

Anahtar Kelimeler: Alternatif gün besleme, dişi Sprague Dawley sıçanları, kalori kısıtlaması, meme kanseri, NMU.



ABSTRACT

EFFECTS AND MECHANISMS OF VARIOUS CALORIE RESTRICTION METHODS ON EXPERIMENTAL CARCINOMA OF SPRAGUE DAWLEY RATS

YILDIRIM KOÇ E. Inaugural Dissertation at Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Physiology (Veterinary), Doctorate/Ph.D. Program, Aydın, 2016.

Preventive effects of calorie restrictions on age-related chronic diseases are well known. In studies regarding the effects of calorie restriction on cancer, restrictions were started generally at the time of induction or a few days later. Studies where calorie restriction started after the tumor has been developed are rare, and these are restricted to only a few tumor types.

This study (model) aimed to investigate the effects of different calorie restrictions, starting after tumor growth progressed to a certain degree, on tumor growth in induced breast cancer models. A total of 34, 21-days old female Sprague Dawley rats were used. Breast cancer was induced *via* NMU (50 mg/kg/i.p.) on 29 rats. When tumors grow to 10-12 mm, rats were divided into 3 groups paired according to tumor size: animals in one group were given chow diet *ad libitum* and served as cancer controls (CC), while others undergo to 50% calorie restriction (CR-50%) or fed alternate days (ADF) for following 12 weeks. Other 5 animals were given physiological saline and served as *ad libitum*-fed healthy controls.

Body weights and, once palpable, tumor diameters were recorded weekly. At the end of experiment animals were euthanized, tumors excised, weighed and their diameters measured. Tumor volumes were calculated by their sizes. In sera prepared from blood samples, concentrations of the insulin, IGF-I, corticosterone, leptin and adiponectin were determined *via* ELISA. Data were analyzed by ANOVA, ANOVA for repeated measures in factor time and Kruskal Wallis test.

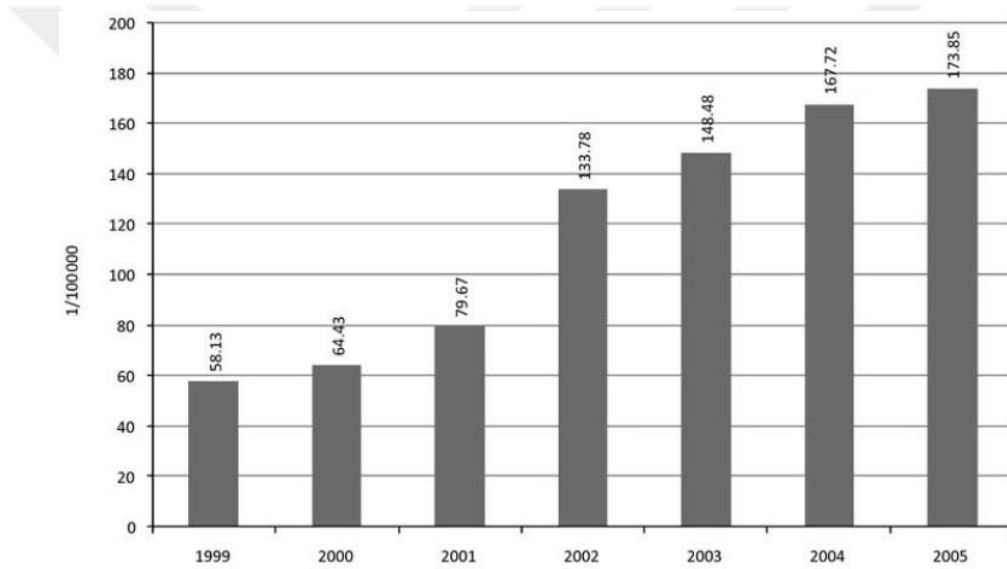
CR-50% caused rapid weight loss in rats, so that animals lost 26-38% of their initial live weights within 6 weeks, and experiment terminated for this group after 6 weeks. Mean body weight of controls was higher than that of CC, ADF and CR-50%, and mean body weight of CC was higher than that of ADF and CR-50%. However, neither volumes nor weights of tumors differed between groups. Serum insulin, IGF-I, leptin and corticosteron concentrations did not differ between groups. All tumors from %50-CR group excised at the end of 6th week of experiment were benign. Highest incidence of malign and invasive tumors at the end of 12th week was encountered in CC.

Key words: Alternate day fasting, breast cancer, calorie restriction, female Sprague Dawley rats, NMU



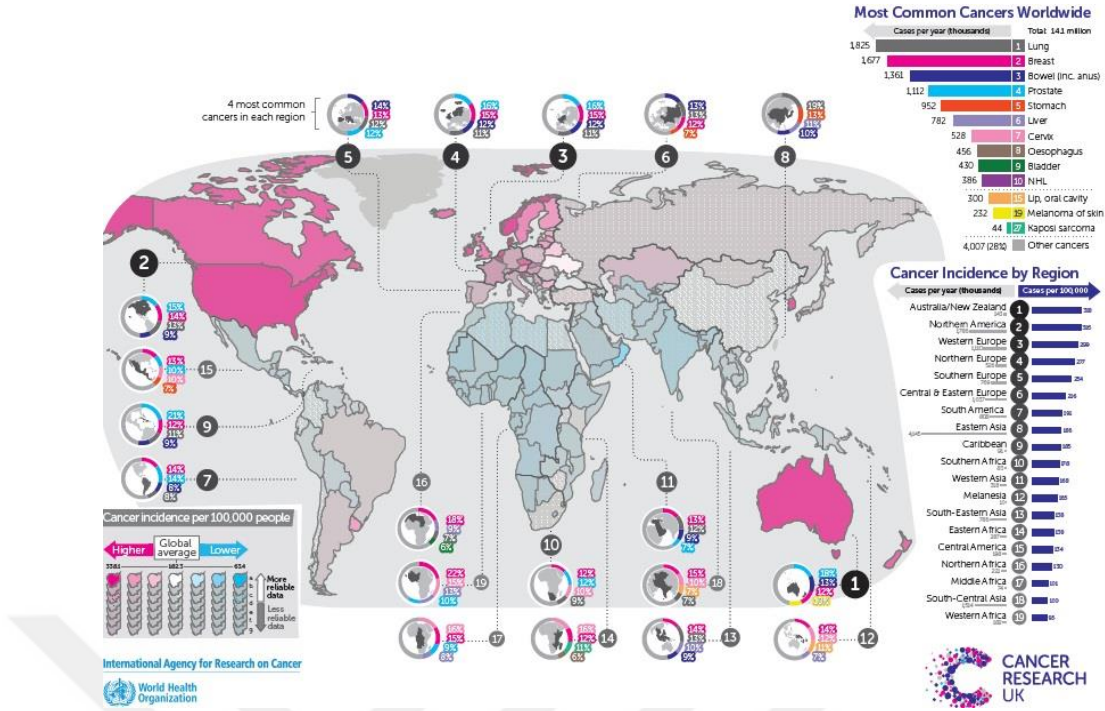
1. GİRİŞ

Kanser, gelişmiş ülkeler başta olmak üzere birçok ülkede önemli bir halk sağlığı problemidir. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 yılında toplam 1 658 370 yeni kanser olgusu görülmüş ve bunlardan 589.430'unun kansere bağlı ölümle sonuçlandığı tespit edilmiştir (Siegel ve ark, 2015). Türkiye'de de her geçen yıl kanser insidansı ve mortalitesinde artış meydana gelmektedir (Şekil 1) (TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Kanser İstatistikleri, 2016). Bugün dünyada yılda 14,1 milyon kişiye kanser tanısı konmakta ve bunun 8,2 milyonu kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir (<http://www.cancerresearchuk.org>).



Şekil 1. 1999-2005 yıllarında Türkiye'deki kanser insidansı (TC Sağlık Bakanlığı Ulusal Kanser Programı, 2009-2015).

Dünya genelinde en çok görülen kanser tipleri ve bölgelere göre dağılımı Şekil 2'de görülmektedir. Buna göre en sık görülen kanser tipleri erkeklerde prostat (%26), kadınlarda ise meme (%29) kanseridir. Bunu her iki cinsten akciğer ve bronş kanserleri (erkek %14 ve kadın %13), kolon ve rektum kanserleri (%8), erkeklerde idrar kesesi (%7) ve kadınlarda serviks kanserleri (%7) izlemektedir. Ölüm oranı en yüksek olan kanser tipleri ise her iki cinsten akciğer ve bronş kanseridir (erkek %28, kadın %26). Bu sırayı kadınlarda meme (%15), erkeklerde prostat (%9) ve her iki cinsten kolon ve rektum kanserleri (erkek %8, kadın %9) izlemektedir (Siegel ve ark, 2015).



Şekil 2. Dünyada en yaygın kanser tipleri ve bölgelere göre dağılımı (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Kanser, tedavisinde sıklıkla kullanılan radyoterapi ve kemoterapiye direnç göstermesi ve uygulanan güncel tedavileriyle birlikte hastalarda oluşturduğu stres, anksiyete ve diğer sonuçlarıyla önemli bir sağlık sorunu ve toplumsal bir sorundur. Bu yüzden kanserin mevcut tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının etkinliğini artırabilecek, bu tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltabilecek ve doğrudan terapötik amaçla kullanılacak alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser gelişmesi açısından bu zamana kadar tanımlanmış ve bilinen hiçbir yan etkisi olmayan en güçlü fizyolojik inhibitör kalori kısıtlamasıdır (Zhu ve ark, 2007). Mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olsa da, bugün değişik kalori kısıtlamalarının kanseri de içeren yaş-ilişkili kronik hastalıkları önlediği iyi bilinmektedir (Descamps ve ark, 2005; Xue ve Michels, 2010). Kalori kısıtlamasının kanser üzerine etkileriyle ilgili çalışmalarda genellikle kalori kısıtlaması indüksiyonla eşzamanlı olarak veya tümör indüksiyonu yapıldıktan birkaç gün sonrasında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle yapılmış olan hayvan deneyleri genellikle koruyucu girişimler kapsamındadır, bu tip çalışmalardan elde edilen bilgiler de kalori kısıtlamasının kanser insidansı ve gelişmesini önlemesiyle ilgilidir ve bu özellikleriyle klinik olgulardaki durumu tam olarak yansıtmazlar. Gerçekte, insanlarda ve hayvanlarda genellikle tümör belirli bir gelişim sürecini tamamladıktan sonra kanser tanılanabilmekte ve kansere özgü girişimler de ancak bu süreçten sonra başlamaktadır. Tümör geliştikten sonra kalori

kısıtlaması uygulanmış çalışmalar çok azdır ve olanlar da sadece belirli tip kanserlerle sınırlıdır.

Ancak, insanlarda diyet girişimler çeşitli nedenlerle deney hayvanlarındaki kadar düzenli uygulanamamaktadır. Bu nedenle, alternatif gün besleme gibi insanlarda uygulanabilirliği daha yüksek kısıtlama yöntemlerinin arayışı devam etmektedir. Ayrıca, kalori kısıtlamalarından beklenen yararlar kısıtlamanın tipi, süresi, başlama zamanı gibi birçok faktöre bağlı olarak farklılıklar da göstermektedir. Bu açıdan kanserden koruyucu ve kanserde tedaviyi destekleyici veya tedavi edici amaçlarla kullanılacak en uygun kısıtlama yönteminin bilinmesine de gereksinim vardır. Bu nedenle bu çalışma deneysel olarak indüklenmiş karsinoma modelinde tümör gelişmesi önemli bir süreci tamamladıktan, tümör çapı yaklaşık 10-12 mm'ye ulaştıktan sonra kalori kısıtlamasının etkilerinin araştırılması ve bunun için eş zamanlı olarak uygulanan *ad libitum*'a göre %50 kalori kısıtlaması ve alternatif gün beslemeyi içeren iki farklı kısıtlama yönteminin tümör gelişmesine etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanserler genellikle çoğalan hücrelerde bir mutasyon ile başlar ve izleyen süreçte büyüme, gelişme ve metastaz yapmalarını sağlayan çeşitli faktörlerin etkisiyle gelişip yayılırlar. Bu faktörler arasında tümörün mikroçevresinde bulunan immun hücreler, yangı hücreleri, vasküler hücreler ve tümör dokusunun etrafını çevreleyen fibroblastlar ile mezenşimal hücreleri içeren stromal hücreler yer alır. Tüm bu hücrelerin tümör dokusu ile etkileşimleri tümörlerin gelişmesi ve prognozu açısından önemli bir role sahiptir (Zetter, 2010).

Tümörler, “*par excellence*” sağlam (robust) sistemler olup, sağlamlığın hücre heterojenitesi ve geri bildirim fonksiyonel transkripsiyon mekanizmaları ile sürdürülen fonksiyonel çeşitlilik aracılığı ile devam ettiği düşünülmektedir (Maxwell ve ark, 2008). Tümörler, orijinlerinden bağımsız, karakteristik olarak sürekli büyümelerini gerçekleştirebilmek için besinlerin kesintisiz olarak yeterli miktarda sağlanmasına ihtiyaç duyarlar. Diyetin başlıca bileşenleri olan karbonhidratlar, yağlar ve proteinler hem konak için hem de konağın barındırdığı tümör için önemli bir role sahiptir. Bu diyeter faktörler tümör oluşmasında da etkin roller üstlenmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar yağ içeriği yüksek diyetle beslenen ülkelerde pankreatik kanser insidansının yüksek olduğuna işaret etmektedir (Yadav ve Lowenfels, 2013). Ayrıca, yine yüksek miktarda yağ içeren diyetler indüklenmiş kolonik adenoma modelinde tümör gelişimini hızlandırmaktadır (Zhu ve ark, 2014). Farelerde spesifik karaciğer karsinogeni dietilnitrozamin ile indüklenmiş hepatik tümörigenezis karbonhidrat ve yağ oranı yüksek diyetle beslenenlerde belirgin bir şekilde artış göstermiştir (Ip ve ark, 2014). Buna karşın, kastre edilmiş fare ksenograft modelinde %20 oranında karbonhidrat içeren diyetin Western diyetle göre tümör oluşumunu yavaşlattığı görülmüştür (Caso ve ark, 2013). Fazla miktarda sebze ve/veya meyve yenilmesinin meme kanseri riskini azalttığı bilinmektedir. Ancak, sebze ve meyvelerin bu koruyucu etkileri tam olarak anlaşılamamıştır (Gandini ve ark, 2000; Michels ve ark, 2007; Brennan ve ark, 2010; Hui ve ark, 2013). Diğer taraftan yağ, kırmızı et ve karbonhidratlar meme kanseri riskini artırmaktadır (Fay ve Freedman, 1997; Romieu ve Lajous, 2009; Kruk ve Marchlewicz, 2013). Tüm bu çalışmalara rağmen, diyeter bileşenler ile kanser arasındaki ilişki halen daha belirsizliğini korumaktadır (Smith-Warner ve ark, 2001).

2.1.1. Kanser Gelişmesinde Glikolitik Yolak

Glikoz, biyolojik süreçlere enerji sağlayan adenzin trifosfat (ATP)'in ana kaynağıdır. Glikozun pirüvata kadar yıkımı ve bunun sonucunda net 2 ATP kazanımı ve 2 nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'in indirgenmesinin gerçekleştiği olaylar glikoliz olarak bilinmektedir. Glikoz, kan dolaşımından hücre içerisine glikoz taşıyıcılar ile pasif olarak taşınmaktadır (Şekil 3). Glikoz hücre içerisine girince heksokinaz enzimleri yoluyla glikoz-6-fosfat (G6P)'a parçalanır. G6P, glikoliz ve pentoz fosfat yolu (PPP)'nun başlıca metabolik ara ürünüdür. G6P, PPP'de hücrenel nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfata oranı ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) arttığında, glikoz 6-fosfat dehidrogenazın etkisiyle riboz 5-fosfat ve NADPH'a dönüşür. Glikolitik yolda ise hücrenel ATP düzeyi azaldığında, G6P glikoz fosfat izomeraz (GPI)'in etkisiyle fruktoz 6-fosfat (F6P)'a dönüşmektedir. Enerji tüketimi ile birlikte F6P fosfofruktokinaz 1 (PFK1) enziminin katalizörlüğünde fruktoz-1,6-bifosfat (F1,6-BP)'a dönüştürülür. Bu noktadan itibaren glikolitik süreç geri dönüşümsüzdür ve dolayısıyla glikoliz için bu düzenleyici bir basamaktır. Aldolaz, F1,6-BP'yi dihidroksiasetonfosfat ve gliseraldehid-3-fosfat (GA3P) olmak üzere iki trioz şekere ayırır. Dihidroksiasetonfosfat da daha sonra triozfosfatizomeraz etkisiyle GA3P'ye dönüşür ve bu şekilde glikolizise devam eder. GA3P, gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) aracılığıyla 1,3-bifosfoglisarat (1,3-BPG)'a dehidrojene olur. Bu basamakta NADH oluşumu için NAD^+ 'a ihtiyaç vardır. Dolayısıyla, yeterli miktarda NAD^+ uzun süreli glikolizisin sağlanmasında oldukça önemlidir. 1,3-BPG, daha sonra fosfoglisarat kinaz (PGK) enzimi etkisiyle 3-fosfoglisarat (3-PG)'a metabolize olur, 3-PG fosfoglisarat mutaz (PGM) enzimi etkisiyle 2-fosfoglisarat (2-PG)'a dönüşür ve 2-PG de enolazın etkisiyle fosfoenolpirüvat (PEP)'a dönüştürülür. Son olarak glikolizisin hız sınırlayıcı üç enziminden biri olan pirüvat kinaz aracılığı ile PEP'den pirüvat oluşmaktadır. Eğer pirüvat mitokondride kullanılmazsa, laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin aktivitesiyle sitozolde laktata dönüşür ve glikolizisin devam etmesini sağlayan GAPDH'nin katalizlediği reaksiyonlar için bir substrat görevi gören NAD^+ oluşur. NAD^+/NADH oranı LDH aktivitesini düzenlemede oldukça önemlidir (Lu ve Huang, 2010).

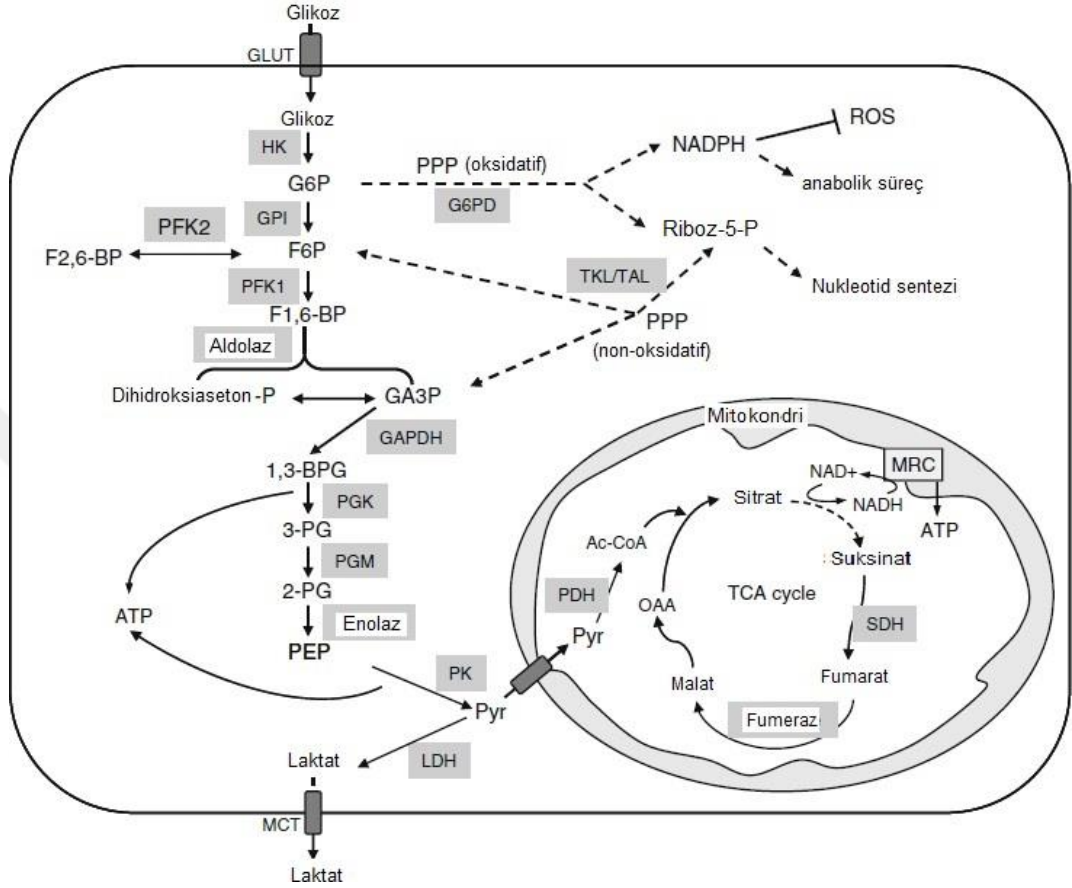
Hücreler ATP'yi sitozolde oksijenden bağımsız glikolitik yolla ve mitokondride oksidatif fosforilasyon yoluyla elde edebildiklerinden, oksijenin varlığı ve hücrelerin mitokondrial fonksiyonu ATP üretiminde her bir yolağın kullanım oranını belirlemede oldukça önemlidir (Lu ve Huang, 2010). Oksijen ve fonksiyonel bir mitokondri varlığında, pirüvat mitokondriye taşınır ve pirüvat dehidrogenaz (PDH)'ın etkisiyle asetil CoA'ya

dönüşür. Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde asetil CoA'nın oksidasyonu sonucu CO₂, H₂O, GTP, NADH ve FADH₂'yi içeren biyoenerjetik ürünler açığa çıkar (Lu ve Huang, 2010). NADH ve FADH₂ elektronları solunum zincirine (elektron transport zinciri) aktarılırlar. Solunum zincirinde bir dizi kompleks üzerinden elektronlar moleküler oksijene taşınır ve moleküler oksijen suya indirgenir. Elektronlar solunum zincirinde ilerledikçe serbest enerjilerinin büyük bir bölümünü kaybederler. Elektron transportu, proton (H⁺)'ların mitokondri matriksinden membranlar arası boşluğa taşınması ile gerçekleşir ve elektron transfer enerjisinin çoğu matriks dışına proton pompalamak için kullanılır. Bu durum membran boyunca bir proton gradiyentinin oluşmasına neden olur. Böylece elektron transfer enerjisi membran boyunca proton gradiyenti şeklinde korunur ve depolanır. Elektronların NADH ve FADH₂'den moleküler oksijene aktarılması sırasında elde edilen ve proton gradiyenti şeklinde depolanan enerji ATP sentezi için gerekli olan enerjiyi sağlar (Skulachev, 1994).

Normal fizyolojik koşullarda mitokondrinin oksidatif fosforilasyonda önemli rolü vardır (Newmeyer ve Ferguson-Miller, 2003). Ancak, kanser hücrelerinde glikoz metabolizması büyük oranda değişmiştir ve bu değişiklikler özellikle malign hücreleri yok etmede biyokimsyal bir temel oluşturabilir. Kemoterapinin başlıca amacı normal hücrelerde belirgin bir toksisite oluşturmadan kanser hücrelerini öldürmektir. Son zamanlarda kanser hücrelerinin biyokimyasal ve metabolik özelliklerinin ve kanser gelişmesini sağlayan moleküler mekanizmaların anlaşılması konusunda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Böylelikle kanser hücrelerinin yüksek düzeyde heterojenite sergilediği, adaptasyon yeteneklerinin iyi olduğu ve genetik olarak değişkenlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Lu ve Huang, 2010).

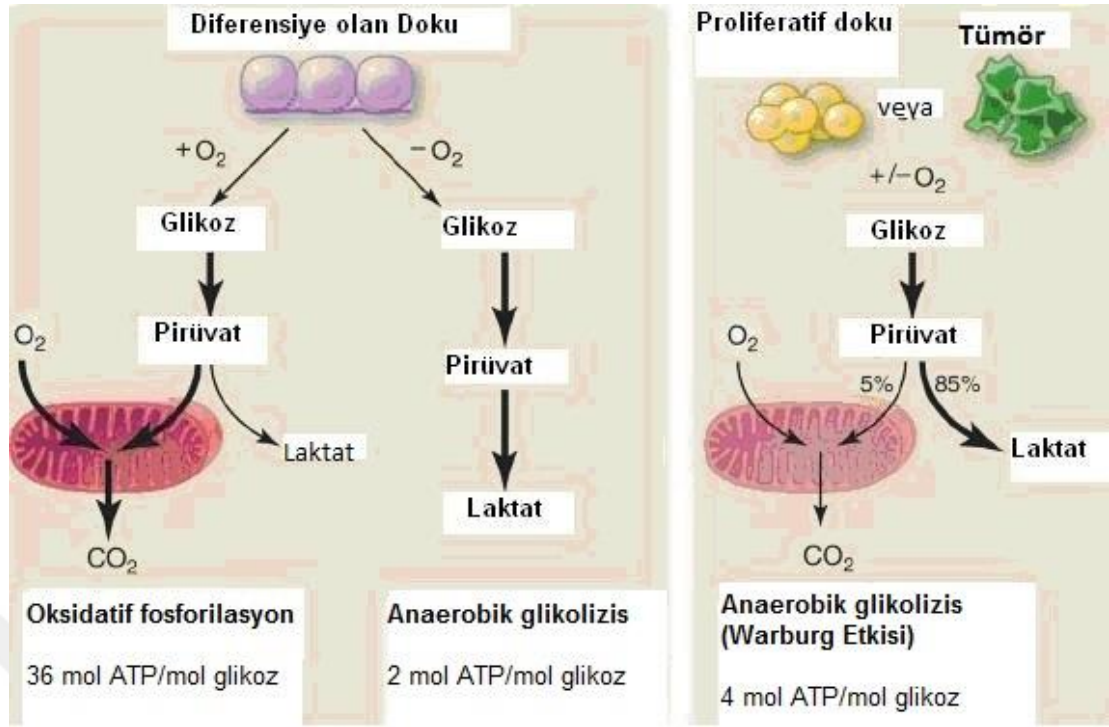
Otto Warburg, kanser hücreleri ile normal hücreleri metabolik aktiviteleri yönünden karşılaştırmış, kanser hücrelerinin normal hücrelere göre çok daha fazla miktarda glikoz kullandıklarını ve bunu öncelikle glikolizis aracılığı ile gerçekleştirdiklerini, böylece oksijenden zengin koşullarda bile fazla miktarda laktat ürettiklerini gözlemlemiştir (Warburg etkisi) (Şekil 4) (Warburg ve ark, 1924, Warburg, 1956). Metastatik tümörlerin %90'ından fazlası yüksek düzeyde glikolitikdir (Lu ve Huang, 2010). Warburg'un belirttiği gibi, malign hücreler yaşamsal aktiviteleri için enerji üretmede oksidatif fosforilasyondan ziyade anaerobik glikolizisi tercih etmektedirler. Anaerobik glikolizisde oluşan her ATP molekülü başına aerobik solunumdan 7 kat daha fazla asit üretilir. Kanser hücrelerinde sürekli olarak artan glikolizis ve sonuçta fazla laktik asit üretimi asidik bir mikroçevre sağlayarak gelişmekte olan tümörün pre-invasiv durumdan malign karsinomaya geçişinde ve malign hücre davranışlarının gelişmesinde kritik bir rol oynar (Gatenby, 1995; Gatenby ve Gillies, 2004). Böylelikle, tümör

mikroçevresinin asidifikasyonu yoluyla invazyon ve metastaz daha kolay gerçekleşir. Sonuçta kanser hücreleri daha agresif özellikler sergilerler (Gatenby ve Gawlinski, 1996; Schornack ve Gillies, 2003; Wallace, 2005; Gatenby ve ark, 2006).



Şekil 3. Glikoliz, PPP ve TCA döngüsü. Glikoz glikolitik yolla ve mitokondride TCA döngüsüyle ATP oluşturmak için metabolize edilir. Glikoz, ayrıca, PPP yoluyla nükleik asit sentezinin bir öncüsü olan riboz-5-fosfat (riboz-5-P)'i ve yağ asitlerinin anabolik sentezinde veya ROS oluşumunu azaltmada gerekli olan NADPH'ı oluşturmak için de metabolize olabilmektedir. Notlar: Dihidroksiaseton-P, Dihidroksiaseton fosfat; F6P, fruktoz-6-fosfat; F1,6-BP, fruktoz-1,6-bisfosfat; G6PD, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; GA3P, gliseraldehid-3-fosfat; G6P, glukoz-6-fosfat; GAPDH, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz; GLUT, glukoz taşıyıcısı; GPI, glukoz-fosfat izomeraz; LDH, laktat dehidrogenaz; HK, heksokinaz; MCT, monokarboksilat taşıyıcısı; MRC, mitokondrial solunum zinciri (kompleks I-V); PFK1, fosfofruktokinaz 1; PFK2, fosfofruktokinaz 2; PGK, fosfoglisarat kinaz; PGM, fosfoglisarat mutaz; PK, pirüvat kinaz; Pyr, pirüvat; Riboz-5-P, riboz-5-fosfat; Ac-CoA, asetil koenzim A; OAA, okzolasetat; PDH, pirüvat dehidrogenaz; PPP, pentoz fosfat yolu; ROS, reaktif oksijen türleri; SDH, süksinat dehidrogenaz; TAL, transaldolaz; TKL, transketolaz (Lu ve Huang, 2010).

Warburg'un gözlemleriyle ilgili sonraki süreçte yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin aşırı glikoz kullandığı bilgisini desteklemiş ve aşırı kalori tüketiminin kanser gelişmesindeki olası rolü birçok araştırmanın konusunu oluşturmuştur. Bugün bu yolağın ilgili tümörlerin gelişmesini engellemek ve regresyonunu sağlamak için iyi bir olanak sağladığı kabul edilmektedir (Lu ve Huang, 2010).



Şekil 4. Oksidatif fosforilasyon, aerobik glikolizis ve anaerobik glikolizis (Warburg etkisi) arasındaki farklılıklar (Vander Heiden ve ark, 2009).

2.2. Kalori Kısıtlaması ve Kanser

2.2.1. Deneysel Kanser Modellerinde Kalori Kısıtlaması

Bugüne kadar kanser gelişmesiyle ilgili bilinen en güçlü fizyolojik inhibitör diyetel enerji kısıtlaması olarak da tanımlanan kalori kısıtlamasıdır (Zhu ve ark, 2007). Geçen yüzyılın ilk yarısında McCay ve ark (1935), laboratuvar hayvanlarına sütten kesim döneminden sonra diyet kısıtlamasının uygulanması durumunda hayvanların ortalama ve maksimum yaşam sürelerinin uzayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Sonraki 70 yıl boyunca McCay'in bulguları çeşitli hayvan türlerinde de doğrulanmıştır (Xue ve Michels, 2010). Bazı araştırmacılar kalori kısıtlamasının tercihen fizyolojik yaşlanma sürecini etkilediğini ileri sürerken (Masoro, 1985; Yu ve ark, 1985; Kubo ve ark, 1987), bazıları da aynı zamanda kanser gibi kronik hastalıkları da engelleyebileceğini belirtmişlerdir (Xue ve Michels, 2010).

İlk kez 1914 yılında Rous, kalori kısıtlamasının farelere transplante edilen tümörlerin gelişmesini yavaşlattığını, böylece hayvan modellerinde tümör gelişmesinin kalori alınmasına bağımlılığını göstermiştir (Rous, 1914). Daha sonra Tannenbaum (1940), yetersiz beslenmenin farklı fare soylarında spontan veya indüklenmiş tümörlerin gelişmesini inhibe ettiğini rapor etmiştir. Ayrıca, Tannenbaum (1944) kalori kısıtlamasının kanser riskini

azaltmada tümörigenezisin başlangıç evresinden çok gelişme evresinde daha etkili olduğunu ve *ad libitum* beslenmeyi izleyen kalori kısıtlamasının başlangıç evresinde etkisiz olduğunu göstermiştir. Kalori kısıtlaması spontan, indüklenmiş veya transplante edilmiş çeşitli tümörlerin insidansını azaltmakta, ancak bu etkisi kısıtlamanın derecesine bağlı olarak değişmektedir (Kritchevsky ve ark, 1984; Klurfeld ve ark, 1987; Kritchevsky, 1997). 1942–1994 yılları arasında yapılan 14 hayvan deneyinin meta-analitik değerlendirilmesinde %23–40 oranlarındaki kalori kısıtlamalarının farelerde spontan meme tümörü insidansını %55 oranında azalttığı rapor edilmiştir (Dirx ve ark, 2003). Sıçanlarda da %40 kalori kısıtlamasının indüklenmiş tümör gelişimini etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Kritchevsky ve ark, 1984; Klurfeld ve ark, 1987). Ayrıca, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) ile meme kanseri indüklenmiş dişi Sprague Dawley sıçanlarda %10, %20 ve %30 kalori kısıtlamalarının tümör insidansını veya çeşitliliğini azalttığı görülmüştür (Klurfeld ve ark, 1989a).

Genel olarak enerji kaynağını yağlar, karbonhidratlar ve proteinleri içeren besin maddeleri oluşturmaya rağmen, bu çalışmalarda kalori kısıtlamasının kanser riski üzerindeki etkisinin diyetel içeriklerden bağımsız olduğu tespit edilmiştir (Albanes, 1987; Klurfeld ve ark, 1989a; 1989b). Klurfeld ve ark (1989b), DMBA ile meme tümörü indüklenmiş sıçanlarda %5, %15 veya %20 yağ içeren diyetle *ad libitum* beslenenlere göre, %20 veya %26,7 yağ içeren diyetle %25 enerji kısıtlaması uygulanarak beslenen hayvanlarda tümör insidansının belirgin düzeyde azaldığını saptamışlardır.

2.2.2. Kalori Kısıtlamasının Olası Mekanizmaları

Kalori kısıtlaması çeşitli biyolojik ve metabolik yollarla kanser riskini etkileyebilmektedir. Kalori kısıtlaması hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini azaltır, apoptozisi artırır ve DNA onarımına katkı sağlar. Tüm bu olaylar preneoplastik lezyonların sayısını sınırlandırmaktadır. Ayrıca, kalori kısıtlaması östrojen, insülin, prolaktin, leptin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 (IGFBP-3) gibi kanseri etkileyebilen hormonların ve büyüme faktörlerinin üretimlerini ve miktarlarını da değiştirir (Albanes, 1987; Kritchevsky, 1997; Kaaks ve Lukanova, 2001; Weindruch ve ark, 2001; Hursting ve ark, 2003). Kalori kısıtlamasının yaşam süresini uzattığı ve kanserleri de içeren birçok hastalığın riskini azalttığı bilinmesine rağmen, bu etkilerin temelini oluşturan mekanizmalar bugün de belirsizliğini korumaktadır.

Eskiden kalori kısıtlamasının hayvanların büyüme ve gelişmesini yavaşlatmak yoluyla yaşam süresini uzattığı ileri sürülüyordu (McCay ve ark, 1935). Sonraları kalori kısıtlamasının büyüme ve gelişmeyi sınırlandırmada bir etkisinin olmadığı ve kemirgenlerde metabolik hızı yavaşlatarak yaşam süresini uzatabildiği ileri sürülmüştür. Ancak, bu hipotez de çeşitli laboratuvar çalışmalarıyla çürütülmüştür (McCarter ve ark, 1985; McCarter ve McGee, 1989). Erkek sıçanlar 6 aylık olduklarında iki gruba ayrılmış, gruplardan birisi *ad libitum* beslenirken diğetine 4,5 ay boyunca yaşam süresini uzatacak şekilde besin kısıtlaması uygulanmıştır. Her iki grubun metabolik hızları oksijen tüketimlerinden yola çıkılarak hesaplanmış ve bu açıdan gruplar arasında bir fark olmadığı görülmüştür (McCarter ve ark, 1985). Bir başka çalışmada %40 kısıtlama uygulanan sıçanlarda normal günlük koşullardaki metabolik ve bazal metabolik hızın azaldığı, ancak bu azalmanın geçici olduğu ve birkaç hafta içerisinde kısıtlama uygulanan sıçanların metabolik hızlarının *ad libitum* beslenen sıçanlarla aynı düzeye geldiği tespit edilmiştir (McCarter ve McGee, 1989).

Kanser riskini azaltmada endokrinolojik değişiklikler de olası mekanizmalar arasındadır. Kalori kısıtlamasının glikokortikoidlerin ve IGFBP-3'ün değerlerini artırmak ve IGF-1, insülin, prolaktin, östrojen ve leptin değerlerini azaltmak yoluyla kanser riskini azaltabildiği bilinmektedir (Albanes, 1987; Kritchevsky, 1997; Kaaks ve ark, 2001; Weindruch ve ark, 2001). Ancak, kanser etiolojisinde endokrin sistemin önemli rol oynadığı bilinmesine rağmen, kalori kısıtlamasının endokrinolojik değişiklikler üzerinden kanser riskini nasıl etkilediği bugün de belirsizliğini korumaya devam etmektedir (Sinclair, 2005). Örneğin, IGF-1 ve insülin değerlerinin hem kalori kısıtlaması uygulanan hayvanlarda hem de Ames cüce farelerde azalmış olduğu saptanmıştır (Bartke ve ark, 2001). Bartke ve ark (2001) yaşam süreleri görece kısa olan Ames cüce farelerde yaşam süresinin kalori kısıtlaması uygulanarak uzayabileceğini, ancak kalori kısıtlamasının bu etkiyi IGF-1 konsantrasyonunu azaltmanın dışında kısmen başka mekanizmalar yoluyla da gerçekleştirdiğini ileri sürmüşlerdir. Kalori kısıtlaması düşük yoğunluktaki bir stres faktörü gibi de davranabilmektedir. Böylelikle sıçan ve farelerde uygulandığı süreçte plazma kortikosteron değerlerini artırmaktadır (Sabatino ve ark, 1991; Han ve ark, 1995). Biyolojik strese yanıt olarak hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ve azaltılmış kalori tüketimi/kısıtlama, hücreleri ve dokuları koruyabilmekte ve protein, yağ ve glikoz metabolizmasını düzenleyebilmektedir (Sinclair, 2005).

Kalori kısıtlaması; mitokondrial serbest radikallerin üretimini azaltmak (Feuers ve ark, 1993), antioksidan (Xia ve ark, 1995; Guo ve ark, 2001) ve detoksifikan (Armeni ve ark, 1998) enzimlerin konsantrasyonlarını, plazma membran antioksidan sistemi (De Cabo ve ark,

2004; Hyun ve ark, 2006) ve DNA onarım kapasitesini (Guo ve ark, 1998; Cabelof ve ark, 2003; Stuart ve ark, 2004) değiştirmek gibi koruyucu mekanizmaları artırmak yoluyla oksidatif hasarı önleyerek kanser riskini azaltabilmektedir (Yu, 1996; Zainal ve ark, 2000).

Kalori kısıtlamasının olası mekanizmaları arasında, korunmuş uzun ömür faktörü olan SIR2 ekspresyonundaki değişiklikler de yer almaktadır. Mayalarda SIR2 artışının yetersiz beslenme koşullarında hayatta kalmayı destekleyen biyolojik süreçleri etkileyerek yaşam süresini uzattığı bulunmuştur (Hekimi ve Guarente, 2003). SIR2 homologları mayalar ve bakterilerden memelilere kadar birçok türde bulunmaktadır (Frye, 1999; 2000). Hücresel düzeyde SIR2'nin bir homoloğu olan SIRT1 kalori kısıtlaması uygulanan sıçanların dokularında indüklenmiş (Cohen ve ark, 2004) ve bu nedenle kanser hücrelerindeki gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Kim ve Um, 2008). Birçok kanserde SIRT1, DNA'nın hipermetile olduğu tümör supresör genlerin promotörlerini sınırlandırır (Jones ve Baylin, 2002), SIRT1'in inhibisyonu endojen promotörlerde H4-K16 ve H3-K9 asetilasyonunu artırır ve meme ve kolon kanser hücrelerinde gen re-ekspresyonunun indüklenmesine olanak sağlar (Pruitt ve ark, 2006). Ayrıca, SIRT1'in kanser gelişmesinde apoptozis (Luo ve ark, 2001; Vaziri ve ark, 2001), DNA onarımı (Brunet ve ark, 2004; Motta ve ark, 2004) ve büyümenin düzenlenmesi açısından gerekli olan çeşitli transkripsiyon faktörlerini içeren nonhiston proteinleri deasetile ettiği saptanmıştır (Langley ve ark, 2002). H3-K56'nın asetilasyonu birçok kanser tipinde artmaktadır ve SIRT1 ve SIRT2'nin H3-K56ac'yi deasetile ettiği bilinmektedir (Das ve ark, 2009).

2.2.3. Alternatif Gün Besleme

Diğer bir diyetel kısıtlama yöntemi alternatif gün besleme (Alternate Day Feeding, ADF)'dir (Varady ve ark, 2008). ADF, yemin *ad libitum* olarak tüketildiği bir “beslenme günü/dönemi” ve besinin kısıtlandığı veya verilmediği “açlık günü/dönemi”nin sırasıyla birbirini takip etmesi prensibine dayanır. Beslenme ve açlık dönemleri genellikle 24 saat aralıklarla birbirini takip eder, ancak değişiklikler olabilmektedir (Varady ve Hellerstein, 2007). ADF uygulamasında alınan toplam kalori miktarı sınırlandırılmaz, bunun yerine yem alma/beslenme sıklığı değiştirilmektedir (Mattson ve Wan, 2005).

Günümüze kadar yapıldığı bilinen 12 çalışmada ADF'nin kronik hastalıklar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalardan yaklaşık yarısı açlık glikoz ve insülin konsantrasyonu,

yağ oksidasyonu, insülitisin derecesi ve tip II diyabetin varlığı gibi konuları inceler ve diyabetle ilişkilidir. Hayvan modellerinde, açlık glikoz konsantrasyonu ADF uygulamasına yanıt olarak genellikle azalmıştır. Bazı çalışmalar 20-24 haftalık uygulamadan sonra dolaşımdaki glikoz konsantrasyonunun azaldığını belirtirken (Pedersen ve ark, 1999; Anson ve ark, 2003), Mager ve ark (2006) 16 haftalık uygulamadan sonra glikoz konsantrasyonunun değişmediğini rapor etmişlerdir. ADF uygulamalarından sonra insülin konsantrasyonu sürekli olarak azalmış ve bu durum 20-24 hafta kadar devam etmiştir (Anson ve ark, 2003; Wan ve ark, 2003). Anson ve ark (2003)'nın yaptığı çalışmada insülin ve glikoz konsantrasyonundaki düşüşlerin ADF ve %40 kalori kısıtlaması (%40-CR) gruplarında benzer olduğu tespit edilmiştir. Krizova ve Simek (1996a), 8 haftalık ADF uygulamasından sonra karaciğer ve kastaki yağ oksidasyonunda artış gözlemlemiştir. Yağ oksidasyonunun bozulması, oksidasyondaki bir artış ektopik intraselüler lipid birikimine ve insülin direçliliğine neden olabilmektedir. ADF uygulamasında yağ asidi oksidasyon hızında artış ketogeneze neden olurken, %40-CR uygulamasında bu durum gözlenmemiştir (Varady ve Hellerstein, 2007).

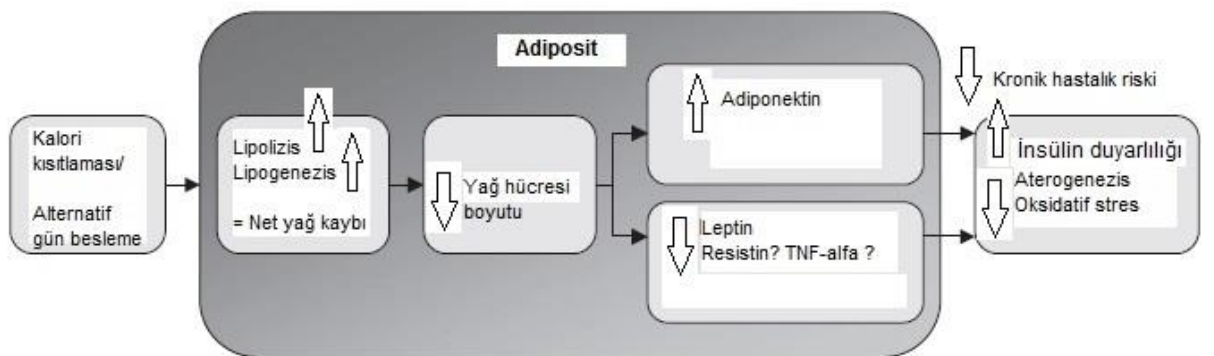
Alternatif gün beslemenin kardiyovasküler sisteme ilişkin olarak kalp atım hızı, kan basıncı, dolaşımdaki lipid konsantrasyonu ve iskemik hasar üzerindeki etkileri de araştırılmaktadır (Varady ve Hellerstein, 2007). Mager ve ark (2006) 16 haftalık ADF uygulamasından sonra Sprague Dawley sıçanlarda kalp atım hızının azaldığını saptamışlardır. Kalp atım hızına ilişkin benzer etkiler Wan ve ark (2003) tarafından 24 haftalık ADF uygulamasından sonra da rapor edilmiştir. Her iki çalışmada da 4 hafta sonra sistolik ve diyastolik basınçlarda azalma şekillenmiş ve bu azalmaların çalışmalar boyunca devam ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, kan basıncı ve kalp atım hızı üzerindeki etkilerin ADF ve %40-CR gruplarında benzer olduğu rapor edilmiştir. Böylelikle bu değişkenlerin düzenlenmesinde ADF'nin de %40-CR kadar yararlı olduğu ileri sürülmektedir (Mager ve ark, 2006). Krizova ve Simek (1996b), erişkin farelerde 8 haftalık ADF uygulaması sonucunda total kolesterol ve triasilgliserol konsantrasyonlarının azaldığını tespit etmişlerdir. 12 hafta süreyle ADF uygulanan ve *ad libitum* beslenen kontrol grubu Sprague Dawley sıçanlarında koroner arter ligasyonu ile miyokard enfarktüsü (MI) indüklenmiştir. MI indüksiyonundan 24 saat sonra etkilenen alandaki apoptotik miyositlerin sayısının *ad libitum* beslenen kontrollerde ADF grubundakilerin dört katı kadar olduğu, MI alanının boyutunun da yaklaşık iki katı kadar daha büyük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, ADF grubunda inflamatuvar yanıtı gösteren nötrofil infiltrasyonunun belirgin olarak azaldığı da gözlemlenmiştir (Ahmet ve ark, 2005).

Alternatif gün besleme uygulamaları bazı fare soylarında ortalama ve maksimum yaşam süresini uzatabilmektedir. C57BL/6J farelere 2, 6 ve 10 aylık yaşlarda ADF uygulanmaya

başlandığında vücut ağırlığının azaldığı ve maksimum yaşam süresinin uzadığı tespit edilmiştir. Ancak, aynı ADF protokolü A/J farelere uygulandığında vücut ağırlığının değişmediği ve yaşam süresinin sadece 2 aylık yaşta başlatılan farelerde uzadığı belirlenmiştir (Goodrick ve ark, 1990). Bu bulgular, ADF uygulaması sonrasında vücut ağırlığının ve maksimum yaşam süresindeki değişikliklerin genotipe ve uygulamanın başladığı yaşa göre farklılıklar gösterdiğine işaret etmektedir (Varady ve Hellerstein, 2007).

Alternatif gün besleme beyin fonksiyonlarını ve yapısını da geliştirmekte ve bunu büyük olasılıkla beyinde oksidatif stresi azaltarak gerçekleştirmektedir (Li ve ark, 2013). Ayrıca, kalori kısıtlamasında olduğu gibi, ADF de adipoz doku fizyolojisini birkaç yolla etkilemektedir (Şekil 5). ADF, yağ hücrelerinin büyüklüğünü %20-40 kalori kısıtlamasına benzer düzeyde azaltır (Varady ve Hellerstein, 2008). Böylece bazı kronik hastalıkların riskini artıran büyük yağ hücrelerini küçültür bu hastalıklara karşı koruyucu bir etki sergilemektedir (Weyer ve ark, 2000; Heilbronn ve ark, 2004).

Kalori kısıtlaması ve alternatif gün besleme adipoz dokudaki trigliserit metabolizmasını da etkiler. Her iki uygulama lipid sentezini ve lipolizisi artırmaktadır. Bu besleme yöntemleri adipositlerin sekretörük profillerini de olumlu yönde değiştirebilir. En belirgin etki leptin sekresyonunda gözlemlenmiş, 4 haftalık %20-40 CR uygulaması leptin konsantrasyonunu %30-70 oranında azaltmıştır. Ayrıca, ADF uygulaması da leptin konsantrasyonunu belirgin olarak düşürmüş, adiponektin konsantrasyonunu ise önemli ölçüde artırmıştır (Varady ve Hellerstein, 2008).



Şekil 5. Kalori kısıtlaması veya ADF'nin adipoz doku fizyolojisi ve kronik hastalık riski üzerindeki etkisi. CR ve ADF hem lipolizisi hem de lipogenezisi artırabilirler, ancak lipolizis üzerindeki etkileri daha fazladır. Bu nedenle hücrenden yağ kaybı şekillenir ve adiposit boyutu küçülür. Küçük adipositlerden daha fazla miktarda adiponektin, daha az oranda leptin salgılanır. Böylelikle insülin duyarlılığı artar, oksidatif stres azalır ve aterosklerotik lezyon gelişimine karşı koruyucu etki şekillenir (Varady ve Hellerstein, 2008).

2.2.3.1. Alternatif Gün Beslemenin Kansere Üzerine Etkileri

Çeşitli diyet veya kalori kısıtlama yöntemleri arasında kalori kısıtlaması, aralıklı aç bırakma (Intermittent Feeding [IF]) ve karbonhidrat kısıtlaması/ketojenik diyet (KD) uygulamalarının kanserin önlenmesinde yararlı olduğu kabul gören uygulamalardır (Lv ve ark, 2014). CR metabolik hızı ve oksidatif hızı azaltarak tümörigenezisi önler (Martin-Montalvo ve ark, 2011). Aralıklı beslemenin antikanserojen mekanizması ise oldukça basittir ve tümör hücrelerini glikozdan kısa süre yoksun bırakarak tümör gelişmesini yavaşlatma olarak özetlenebilir (Simone ve ark, 2013). IF çoğunlukla alternatif gün besleme (ADF) şeklinde uygulanmaktadır (Harvie ve Howell, 2012).

Alternatif gün beslemenin kansere karşı koruyucu etkisi ilk olarak Siegel ve ark (1988) tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar 3-4 aylık sıçanlara ADF uygulamasına başladıktan 1 hafta sonra MAT 13762 asites tümör hücrelerini inoküle etmişlerdir. ADF uygulanan 24 sıçandan 12 tanesi (%50) inokülasyondan sonra 10 gün süreyle hayatta kalırken, kontrol grubunda ise 24 sıçandan sadece 3'ü (%12,5) hayatta kalabilmiştir. ADF'nin özellikle IGF-1'i etkileyerek kanser riskini azalttığı kabul edilmektedir (Anson ve ark, 2003; Wan ve ark, 2003). Ancak, bu konuda sonuçlar bir örnek değildir (Varady ve Hellerstein, 2007). Anson ve ark (2003) 20 hafta ADF uygulamasından sonra IGF-1 değerlerinde artış saptamışlardır ve hayvanlarda kilo kaybı gözlenmemiştir. Buna karşın Wan ve ark (2003), 24 hafta süreli ADF'de IGF-1 değerlerinde ve canlı ağırlıklarda belirgin bir azalma gözlemlemişlerdir.

Son yıllarda farelerde ADF protokolünün yaş ile ilişkili lenfoma ve hepatokarsinogeneze karşı koruyucu etkisi çalışılmaktadır. ADF uygulanan OF1 farelerde 16 hafta sonra lenfoma insidansı %0 iken, kontrol grubunda bu oran %33 olmuştur (Descamps ve ark, 2005). Rocha ve ark (2002) karaciğer karsinogenezi oluşturmak için Wistar sıçanlarını dietilnitrozamin ile indüklemişler ve bu sıçanlara 48 hafta boyunca ADF uygulamışlardır. *Ad libitum* beslenen kontroller ile karşılaştırıldığında, ADF'nin preneoplastik lezyonların gelişmesini inhibe ettiğini ve ayrıca karaciğerdeki nodüllerin sayı ve büyüklüğünü azalttığını tespit etmişlerdir. Elde edilen bu bulgular, uzun süreli ADF uygulamasının deneysel karsinogenezi inhibe edebildiğini göstermektedir (Varady ve Hellerstein, 2007). Yapılan bir başka çalışmada da 12 hafta süreyle uygulanan ADF'nin meme epitel hücreleri, deri epitel hücreleri ve dalak T-hücrelerini de içeren birkaç hücre tipinin proliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Hsieh ve ark, 2005). IF ve CR, 7-8 haftalık 100 SCID erkek fareye 1×10^5 LAPC-4 prostat kanser hücrelerinin subkutan (sc) verildiği kanser modelinde karşılaştırılmıştır. Serum IGF-1 konsantrasyonu ve IGF-1/IGFBP-3 oranı IF grubunda daha

yüksek çıkarken, serum insülin, IGFBP-3 ve tümör fosfo-Akt değerleri ile hayatta kalma ve tümör hacmi açısından iki grup arasında bir farklılık görülmemiştir. IF, farelerin hayatta kalma sürecini uzatmadığı gibi, prostat kanser gelişimini de yavaşlatmamıştır (Thomas ve ark, 2010). Bu zamana kadar ADF'nin kanser üzerindeki direkt etkisi sadece hayvan modellerinde denenmiştir. Bu denemelerin birçoğunda ADF'nin kanser riski üzerinde yararlı etkilerinin olabildiği gösterilmiştir. Ancak bu etkilerin temelini oluşturan mekanizmalar bugün de belirsizliklerini korumaktadır (Varady ve Hellerstein, 2007).

2.3. Enerji Metabolizmasını Etkileyen Bazı Hormonlar ve Kanser

2.3.1. İnsülin

İnsülin 51 aminoasitten oluşan iki zincirli (α ve β) bir peptid hormondur. Moleküler ağırlığı 58 kDa'dur. Pankreastaki β hücrelerinde 91 aminoasitli proinsülin şeklinde sentezlenir. Plazma insülin konsantrasyonu kan glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Kan glikoz konsantrasyonunun yükselmesi insülin sentez ve salınımını sağlar. İnsülin, kaslarda ve adipoz dokuda enerji üretilmesi için glikozun hücre içine girmesini ve kullanılmasını sağlar, aynı zamanda karaciğerde glikoz üretimini de azaltır. Normal koşullarda, insülin doğrudan reseptörlerine bağlanarak etkilediği sayısız sinyal molekülü (örn; IRS-I, Akt) yoluyla glikoz taşıyıcılarının (örn; iskelet kasında GLUT4) hücre membranına geçişini sağlar ve böylece glikolizis, glikojen ve yağ asidi sentezi gibi metabolik olaylarda kullanılan glikozun hücre içine alınmasına neden olur (Nock and Berger, 2010). Ancak, obezite gibi durumlar insüline karşı duyarlılığı azaltır (insülin dirençliliği) ve bu durumu kompanze etmek için insülin salınımı artar (hiperinsülinemi) (Rabinowitz ve Zierler, 1962). Açlık durumlarında pankreatik insülin sekresyonunun yerine C-peptid geçer. C-peptid proinsülininden insülin ile birlikte ayrıldığı ve insülin ihtiyacı olduğu zaman eşit miktarlarda dolaşıma verildiği için, insülin sekresyonunun yedek belirteci olarak kullanılır. C-peptid karaciğer tarafından yıkımlanmaz, metabolik atılımı yavaştır ve antikorlarla çarpaz reaktivite göstermez (Bonser ve Garcia-Webb, 1984). Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmektedir (Nock and Berger, 2010).

İnsülinin ve C-peptidin karsinojenik süreçte önemli roller üstlendikleri kabul edilmektedir. İnsülin normal fizyolojik koşullardan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu doğrudan mitojenik aktivite sergileyebilmektedir (Renehan ve ark, 2006).

Kronik hiperinsülinemi hücre proliferasyonunun artışına ve apoptozisin inhibisyonuna neden olur. Bu durum doğrudan insülinin reseptörüne bağlanarak veya dolaylı olarak insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin (IGFBP-I ve IGFBP-2) miktarlarının azalması ile gerçekleşebilmektedir (Calle ve Kaaks, 2004). İnsülinin hücre membranında yer alan reseptörüne (INSR) bağlanması ile insülin reseptörü substratı (IRS-I) ve sonra fosfoinosit 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağının fosforilasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir. Böylelikle hücre metabolizmasının merkez düzenleyicisi olarak görev yapan rapamisin (mammalian target of rapamycin [mTOR]) olarak bilinen madde aktive olur. PI3K ile ilişkili IRS-I aktivitesinin obez kadınlarda belirgin olarak bozulduğu tespit edilmiştir ve obezlerde GLUT4 protein konsantrasyonu zayıf bireylerdekine göre büyük oranda azalmıştır (Björnholm ve ark, 2002). Ayrıca, PI3K/Akt yolağı glikojen sentaz kinaz 3B (GSK3B)'nin deaktivasyonu ile ilişkilidir ve bu durum siklin D1'in regülasyonu aracılığı ile hücre proliferasyonunu artırır (Nock ve Berger, 2010). Birçok kanserde anormal Akt sinyali gözlemlenir ve bu durum besin alımında ve büyüme faktörlerine yanıt olarak protein sentezini kontrol eden mTOR'un regülasyonunda artışa neden olabilmektedir (Rosner ve ark, 2008). Yapılan çalışmalarda mTOR'un TNF- α ve Wnt tarafından da düzenlendiği ve bunların birçok insan neoplazisinin gelişmesinde kritik rollerinin olduğu ileri sürülmüştür (Choo ve ark, 2006; Rosner ve ark, 2008). Adenozin monofosfat aktive edici protein kinaz (AMPK) hücre AMP/ATP oranına karşılık verir. AMP yükseldiğinde veya ATP azaldığında tuberöz skleroz kompleks (TSC) aktive olur ve mTOR sinyal yolağı inhibe edilir (Wang ve Guan, 2009). İnsülin aynı zamanda seks hormonlarını bağlayıcı globulin (SHBG) üretimini de inhibe eder (Singh ve ark, 1990) ve böylece biyoyararlanılabilir steroid hormonların miktarı artar (Nock ve Berger, 2010). C-peptidin dolaşımında yüksek konsantrasyonlarda bulunması da obezite (Allen ve ark, 2003) ve endometriyal kanser (Nock ve Berger, 2010), postmenopozal meme kanseri (Schairer ve ark, 2004), kolorektal (Ma ve ark, 2004) ve pankreatik (Michaud ve ark, 2007) kanser risklerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir.

Buna karşın, yapılan meta-analizler sadece kolorektal ve pankreatik kanser hastalarında pre-diagnostik kan insülin ve glikoz konsantrasyonlarının artış gösterdiğini (Pisani, 2008) ve karsinogenezdeki etkilerin sadece yemek sonrası (postprandial) durumla bağlantılı olabildiğini ileri sürmektedir (Michaud ve ark, 2007).

2.3.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) karaciğerde sentezlenmektedir. Büyüme hormonunun kendi hepatik reseptörü ile etkileşmesi IGF-1 geninin ekspresyonunu uyarmakta ve IGF-1 peptidinin üretilmesi ve salınmasına neden olmaktadır (Roberts ve ark, 1986). IGF-1 yaklaşık 7 kDa ağırlığında bir peptid hormondur. Hücre büyümesi ve metabolizmasını etkileyen önemli bir mitojendir. Yapısal olarak insülinle yaklaşık %50 oranında benzerlik gösterir (Benetar ve ark, 2011). Protein yapısında olduğundan hücre membranını geçemez ve etkisini membrandaki reseptörlerine (IGF-1R) bağlanarak gerçekleştirir. Ayrıca, insülin reseptörü (IR) ile de ilişki kurabilmektedir. IGF-1 plazmada bağlayıcı proteinler (IGFBP) ile taşınır. IGFBP ailesi yüksek (IGFBP1-6) ve düşük afiniteye (IGFBP7-10) sahip olanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Kim ve ark, 1997). IGF-1'in majör bağlayıcı proteini IGFBP-3'tür (Nimptsch ve Giovannucci, 2012). IGFBP'ler sadece IGF'lerin taşıyıcısı olarak görev almazlar, aynı zamanda IGF'lerin yarılanma ömrünü uzatırlar, aktivitelerini ve kullanımlarını düzenlerler (Benetar ve ark, 2011) ve böylece onların fonksiyonlarını artırabilir veya inhibe edebilirler. Bütün IGFBP'lerin IGF/IGF-1R'den bağımsız olarak hücre proliferasyonu, diferensiyasyonu, migrasyonu, anjiyogenezis ve apoptozis gibi biyolojik fonksiyonlarının olduğu ileri sürülmektedir (Hwa ve ark, 1999; Perks ve ark, 1999; Fu ve ark, 2007; Kiepe ve ark, 2008; Zhu ve ark, 2008). Genelde IGFBP'lere bağlanan IGF'lerin IGF reseptörlerine afinitesi düşüktür. Ancak, belirli durumlarda bazı IGFBP'ler (IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5) IGF-1'in reseptörüne afinitesini artırabilmektedir (Kaaks ve Lukanova, 2001; Nimptsch ve Giovannucci, 2012).

IGF-1 meme bezinin gelişmesinde önemli rol oynamakta ve ayrıca büyüme hormonu ve östrojen ile birlikte glandüler meme gelişimine aracılık etmektedir (Ruan ve Kleinberg, 1999; Kleinberg ve ark, 2000). Ancak, IGF-1 üretimi bazı faktörlerin etkilerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, uzun süreli enerji ve protein kısıtlamaları plazma IGF-1 konsantrasyonunu azaltmaktadır (Kaaks, 2004). İyi beslenen toplumlarda genetik faktörler (Harrela ve ark, 1996) ve yaş yine IGF-1 değerini etkiler (Brabant ve Wallaschofski, 2007). İnsülin direnci, hepatik IGFBP sekresyonunu azaltarak IGF-1'in biyoaktivitesini artırabilmektedir (Nimptsch ve Giovannucci, 2012).

Deneyisel (Wu ve ark, 2003; Majeed ve ark, 2005) ve laboratuvar (Myal ve ark, 1984) çalışmalar birçok dokuda IGF-1'in kanser hücrelerinin gelişmesini ve büyümesini etkileyebildiğine işaret etmektedir. Ayrıca, IGFBP-3'ün de IGF-1'in biyokullanımını düzenleyerek kanser riskini etkileyebildiği ve IGF-1'den bağımsız olarak antiproliferatif ve

proapoptotik etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir (Baxter, 2001). Ancak, bunlar hücresel düzeydeki gözlemlerin popülasyon düzeyinde gerçekleşme durumu hakkında bir bilgi verememektedir. Epidemiyolojik çalışmalar 1990'ların başlarında kan örneklerinde IGF-1 ve majör bağlayıcı proteini IGFBP-3'ün değerlerini ölçerek bu soruyu cevaplamaya çalışmışlardır. Olgu-kontrol çalışmalarında tanıdan sonra alınan kan örneklerinde tümörün dolaşımdaki IGF-1 konsantrasyonunu etkileyebildiği gözlemlenmiştir (Nimptsch ve Giovannucci, 2012). IGF-1, mitojenik ve antiapoptotik etkiler yoluyla meme karsinogenezisini doğrudan etkileyebilmektedir. Ayrıca, hiperinsülinemik durumlar IGF-1'in biyokullanımını artırarak meme kanseri riskini artırabilmektedir (Nimptsch ve Giovannucci, 2012). *In vitro* (Myal ve ark, 1984; Lee ve ark, 1999) ve *in vivo* (Wu ve ark, 2003) çalışmalar IGF-1'in meme kanser gelişimini stimüle ettiğini ve epidemiyolojik veriler dolaşımdaki IGF-1 konsantrasyonunun normal kontrollere göre meme kanseri hastalarında yükseldiğini göstermektedir (Peyrat ve ark, 1988; Bruning ve ark, 1995; Bohlke ve ark, 1998; Hankinson ve ark, 1998). Bu çalışmaların bazılarında artan IGF-1 ve meme kanseri riski arasında premenopozal kadınlarda doğrudan bir ilişki görülürken, postmenopozal kadınlarda böyle bir ilişki gözlemlenmemiştir (Bruning ve ark, 1995; Hankinson ve ark, 1998). Hankinson ve ark (1998) plazma IGF-1 konsantrasyonunun yüksek olduğu 50 yaş altındaki kadınlarda meme kanseri riskinin yaklaşık 5 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bruning ve ark (1995) da, meme kanseri olan premenopozal kadınlarda plazma IGF-1 konsantrasyonunun yükseldiğini, IGFBP-3 değerinin düştüğünü ve sonuç olarak IGF-1/IGFBP-3 oranının arttığını belirlemişlerdir. Ancak, postmenopozal kadınlarda benzer bulgular elde edilememiştir. Sonraki yıllarda yapılmış bazı çalışmalarda yüksek IGF-1 konsantrasyonuna sahip premenopozal kadınlarda da meme kanseri riskinin artış göstermediği ileri sürülmektedir (Rinaldi ve ark, 2006; Schernhammer ve ark, 2006; Baglietto ve ark, 2007). Bu çalışmalardan iki tanesi sadece postmenopozal kadınlarda bu ilişkiyi tespit etmiştir (Rinaldi ve ark, 2006; Baglietto ve ark, 2007). Sonuçta bu zamana kadar yapılan olgu-kontrol ve kohort çalışmaları değerlendirildiğinde, plazma IGF-1 konsantrasyonu ve meme kanseri riski arasındaki ilişki de halen belirsizliğini korumaktadır (Ferguson ve ark, 2012).

2.3.2.1. İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Eksen

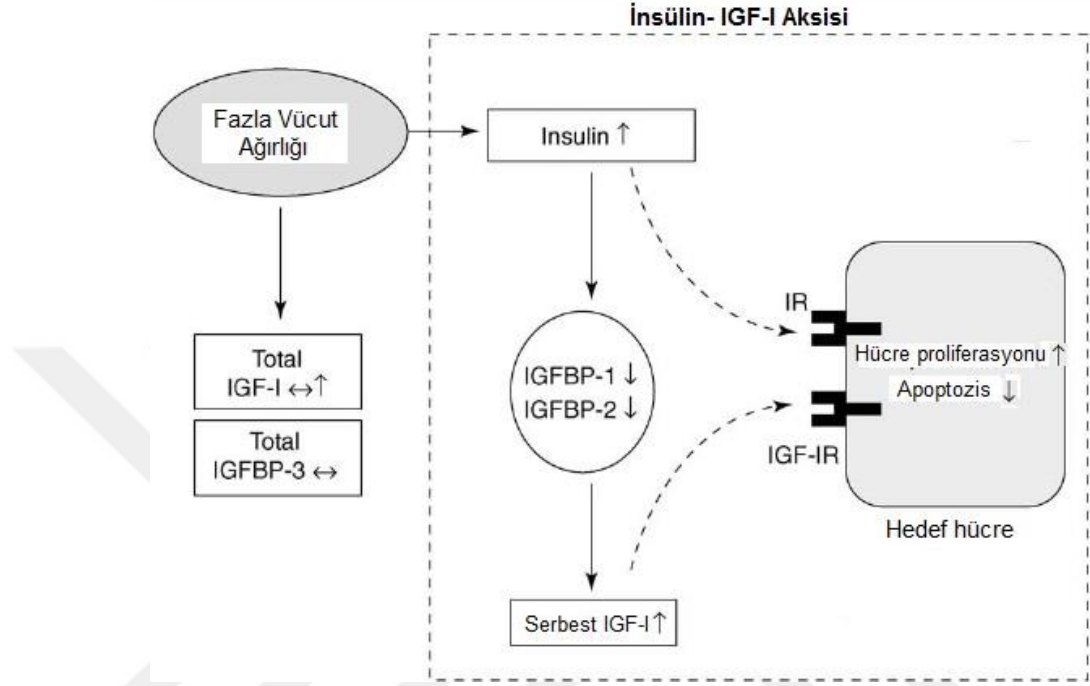
İnsülin, enerji metabolizmasını düzenlemekte ve aynı zamanda IGF-1'in sentezini artırarak ve bağlayıcı proteinlerini (IGFBP-1 ve IGFBP-2) azaltarak biyoaktivitesini artırmaktadır. İnsülin ve IGF-1 kullanılabilir enerji ve temel besin maddelerinin (örn,

aminoasitler) fonksiyonu gibi bir takım anabolik süreçleri stimüle etmektedir. İnsülin ve IGF-1 tarafından oluşturulan bu anabolik sinyaller apoptozisi inhibe ederek ve hücre proliferasyonunu uyararak tümör gelişimini destekleyebilmektedir. Bu etkileri başta meme bezi, endometriyum, kolorektum ve prostat olmak üzere birçok doku ve organda tespit edilmiştir (Kaaks ve Lukanova, 2001). İnsülin-kanser hipotezi; kronik hiperinsülinemisinin normal koşullarda IGF-1'e bağlanarak onu inhibe eden IGFBP-1 ve IGFBP-2 konsantrasyonlarının azalması ile ilişkili olduğunu, IGF-1'in kullanımının arttığını ve böylece tümör gelişimine uygun hücrel değişikliklerin meydana geldiğini ileri sürmektedir (Şekil 6) (Giovannucci, 2003; Renehan ve ark, 2006).

Enerji alımının kısıtlanması birçok hayvan modelinde karsinogenezisi inhibe etmiştir. Enerji restriksiyonunun metabolik sonuçlarının birçoğu insülin ve IGF-1 konsantrasyonlarının azalması ile karakterizedir (Renehan ve ark, 2006). İnsülin ve IGF-1 konsantrasyonlarının azalması enerji kısıtlamasının önemli anti-kanserojen etkilerinden birisidir (Sell, 2003). Fischer 344 sıçanlarında yapılan bir çalışmada, insülin enjeksiyonu anormal kript odakların (kolorektal kanserin öncüleri) gelişmesini sağlamış ve intestinal tümörlerin boyutu ve sayısını artırmıştır. İnsülin dirençliliğinin derecesi anormal kript odakların sayısı ile orantılıdır (Tran ve ark, 2003). Enerji kısıtlaması ve (n-3) yağ asitlerinin alımındaki artış insülin duyarlılığını ve glikoz toleransını artırmış ve böylece anormal kript odakların azalmasını sağlamıştır (Koohestani ve ark, 1998). Ancak, yine de yüksek insülin değerleri ve kanser arasındaki ilişki her zaman orantılı değildir. Örneğin, Zucker sıçanlarında N-metil-N-nitrozoüre (NMU) ile indüklenmiş meme tümörlerinin sayısı ve boyutu zayıf ve obez bireyler arasında farklılık göstermemiştir (Renehan ve ark, 2006).

Tümör gelişiminde dolaşımdaki IGF-1 de oldukça önemlidir. Sekal tümörlerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu ve damar mikro-dansisitesinin IGF-1'in serum konsantrasyonlarına bağlı olduğu görülmektedir (Renehan ve ark, 2006). Wu ve ark (2003) dolaşımda IGF-1 konsantrasyonundaki azalmanın kimyasal veya genetik olarak indüklenmiş meme tümörlerinin oluşumunu geciktirdiğini ileri sürmüşlerdir. İnsülinin portal düzeyinin artışı hepatik büyüme hormonu (GH) reseptörlerinin duyarlılığını ve yoğunluğunu artırır. Buna bağlı olarak büyüme hormonu bağlayıcı protein (GHP) 'in dolaşımdaki konsantrasyonu da artar. GH reseptörlerinin duyarlılığındaki bu değişiklik IGF-1 ve IGFBP-3 üretiminde de birtakım değişikliklere neden olabilmektedir (Renehan ve ark, 2006). Sandhu ve ark (2002), IGF-1 konsantrasyonunun doğrudan veya dolaylı olarak arttığını, ancak IGFBP-3 de herhangi bir değişiklik olmadığını ve IGF-1/IGFBP-3 artışının tümörigenezisi desteklediğini ileri sürmüşlerdir.

İnsülin-kanser hipotezi tümör gelişiminde biyoaktif IGF-1'in yüksek konsantrasyonlarının merkezi bir rol aldığını öne sürmektedir. Ancak, bu kompleks mekanizma ile ilgili de cevaplanmamış ve araştırılması gereken sorular bulunmaktadır (Renehan ve ark, 2006).



Şekil 6. İnsülin-IGF-1 eksenini. Fazla vücut ağırlığı uzun süreli hiperinsülinemi ile ilişkilidir. Hiperinsülinemi IGFBP-1 ve IGFBP-2 üretimini azaltır ve böylece IGF'nin biyoaktif formu olduğuna inanılan, serbest IGF-1 konsantrasyonu artırır. Bu durum tümör gelişimi için uygun bir ortam yaratır. Kısaltmalar: IR, insülin reseptörü; IGF-1R, insülin-benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü. Oklar: ↔ dolaşımdaki konsantrasyonlarında bir değişiklik yok; ↓ dolaşımdaki konsantrasyonları azaldı; ↑ dolaşımdaki konsantrasyonları arttı (Renehan ve ark, 2006).

2.3.3. Adipokinler

2.3.3.1. Leptin

Leptin, yoğun olarak adipositlerden sekrete edilen 16 kDa ağırlığında bir polipeptiddir, daha az oranlarda ise iskelet kası, plasenta ve beyinden salgılanmaktadır. Vücut yağ oranı (Hamilton ve ark, 1995; Lonnqvist ve ark, 1995; Considine ve ark, 1996; Dagogo-Jack ve ark, 1996; Schwartz ve ark, 1996), cinsiyet (Considine ve ark, 1996; Dagogo-Jack ve ark, 1996; Ostlund ve ark, 1996), yaş (Ostlund ve ark, 1996), puberte (Mantzoros ve ark, 1997), açlık (Boden ve ark, 1996), beslenme (Kolaczynski ve ark, 1996a; Romon ve ark, 1999) gibi fizyolojik faktörler ve egzersiz (Landt ve ark, 1997; Bramlett ve ark, 1999) dolaşımdaki leptinin konsantrasyonunu etkiler. Dolaşımdaki leptin konsantrasyonu diurnal bir özellik

gösterir ve akşam saatlerinde pik düzeylere ulaşır (Sinha ve ark, 1996). Uzun süreli açlık durumunda plazma leptin değerleri %70 oranında azalma göstermektedir (Boden ve ark, 1996; Mantzoros ve ark, 1997). Kalori kısıtlaması da leptin konsantrasyonunun düşmesine neden olmaktadır (Ostlund ve ark, 1996). Bazı hormonlar, sitokinler ve fizyopatolojik durumlar da plazma leptin değerlerini etkilerler (Tablo 1). Örneğin, glikokortikoidler, insülin ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinler ve akut enfeksiyonlar leptin sekresyonunu artırırken, adrenerjik stimülasyon, IGF-1, somatostatin ve büyüme hormonu sekresyonu azaltır (Hardie ve ark, 1996; Bing ve ark, 1998; Trayhurn ve ark, 1999).

Leptin birçok fizyolojik süreçte gerekli olan bir hormondur. Hipotalamusta besin alımı ve enerji tüketimini düzenler. Üreme, anjiyogenezis, yara iyileşmesi, hematopoiezis, kemik gelişmesi ve immun sistemin aktivasyonu gibi süreçlere enerji sağlanmasında görevlidir (Halaas ve ark, 1995; Lord ve ark, 1998; Wauters ve ark, 2000; Ducky ve ark, 2000; Ring ve ark, 2000; Caldefie-Chezet ve ark, 2001; Zarkesh-Esfahani ve ark, 2001; Zhao ve ark, 2003). Ayrıca, glikoz homeokinezisini ve lipid metabolizmasını düzenlemektedir (Huang ve ark, 2006; Morioka ve ark, 2007). Dolaşımdaki leptin konsantrasyonu total adipoz doku miktarıyla doğru orantılıdır; obez bireylerde artış gösterirken, zayıf bireylerde azalır (Maffei ve ark, 1995; Considine ve ark, 1996).

Leptin hücrel fonksiyonlarını transmembran leptin reseptörleri (ObR) aracılığıyla gerçekleştirir (Tartaglia ve ark, 1995). ObR'nin birkaç izoformu tanımlanmıştır; uzun formu (Ob-R1/Rb) aktif intraselüler sinyal alanı içerir ve böylece intraselüler JAK2/STAT, Ras/ERK-1/2, PI3K/Akt/GSK3 yollarını aktive edebilmektedir (Bjorbaek ve ark, 1997; Kloeck ve ark, 2002). Kısa formu (Ob-Rs) ise majör alanlardan yoksundur ve çoğunlukla MAPK'yı aktive eder, buna karşın STAT aktivasyonu üzerinde az bir etkisi vardır (Bjorbaek ve ark, 1997; Yamashita ve ark, 1998). Ancak, ObR'nin kısa formu intraselüler ve transselüler taşımada rol oynamaktadır (Hileman ve ark, 2000).

Tablo 1. İnsanda leptin konsantrasyonunu etkileyen hormonlar (Dagogo-Jack, 2015)

Hormon	Plazma Leptin	Leptin Mrna	Referanslar
Glikokortikoid	Artırır	Artırır	Berneis ve ark, 1996; Larsson ve Ahren, 1996; Considine ve ark, 1997; Dagogo-Jack ve ark, 1997; Kolaczynski ve ark, 1997; Papaspyrou-Rao ve ark, 1997; Wolthers ve ark, 1998; Askari ve ark, 2000
İnsülin	Artırır	Artırır	Considine ve ark, 1996; Dagogo-Jack ve ark, 1996; Kolaczynski ve ark, 1996b; Malmstrom ve ark, 1996; Saad ve ark, 1998
Östradiol	Artırır	Veri yok	Elbers ve ark, 1997
Testosteron	Azaltır	Veri yok	Elbers ve ark, 1997; Jockenhovel ve ark, 1997
Büyüme Hormonu	Artırır (akut)	Veri yok	Fouque ve ark, 1998
	Azaltır (kronik)	Veri yok	Kristom ve ark, 1998
IGF-1	Azaltır	Veri yok	Dagogo-Jack ve ark, 1998; Fouque ve ark, 1998
Somatostatin	Azaltır	Veri yok	Donahoo ve ark, 1997

Leptin, tümör hücreleri için potansiyel bir büyüme faktörüdür. İlk kez Nakao ve ark (1998) tarafından insan lösemi hücrelerinde leptin reseptörlerinin varlığı tanımlanmıştır. Başka bir çalışma miyeloid lösemi ve hematopoietik hücre hatlarında leptin reseptörlerinin izoformlarının eksprese olduğunu, leptin konsantrasyonundaki artışın bu hücre hatlarında hücre proliferasyonunu artırdığını ve apoptozisi inhibe ettiğini göstermiştir (Konopleva ve ark, 1999). Sonraki süreçte leptinin tümör büyümesi üzerindeki rolü meme kanserinde de incelenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen bulgulara göre sağlıklı meme dokusunda leptin meme bezi gelişimini ve laktasyonu düzenlemektedir (Woodside ve ark, 2000; Bonnet ve ark, 2002; Hu ve ark, 2002). Leptinin bu fonksiyonu normal meme epitel hücrelerinin proliferasyonunu artırmak yoluyla gerçekleşir. Ancak, Hu ve ark (2002) leptinin meme kanseri hücrelerindeki proliferatif etkisinin normal meme epitel hücrelerinden çok daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır. Leptinin meme kanser hücreleri üzerindeki etkisi memedeki uzun reseptörleri aracılığı ile gerçekleşmektedir (Dieudonne ve ark, 2002; Hu ve ark, 2002; Choi ve ark, 2005; Jiang ve ark, 2008). Meme kanseri tedavisinde ve ilaç dirençliliği durumunda leptin çeşitli biyolojik sistemlerin aktivasyonu ile antiapoptotik etkiler gösterebilmektedir. Bir çalışmada leptin uygulanan MCF-7 hücrelerinde apoptozis protein ailesinin bir inhibitörü olan survivin ekspresyonunun STAT3 bağımlı transkripsiyon yoluyla indüklendiği tespit edilmiştir (Jiang ve ark, 2008). Ray ve ark (2007), bazı meme kanser hücrelerinde leptinin IGF-1/IGF-1R oranını ve insülinin regülasyonunu artırabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca, leptin neoanjyogenezis ve tümör metastazının güçlü bir düzenleyicisi olan VEGF ekspresyonunu da indüklemektedir (Gonzalez ve ark, 2006; Ray ve ark, 2007).

Meme kanser hücrelerini etkileyen leptinin kaynağı halen tartışma konusudur. Leptin, hipoksi, insülin, IGF-1 ve östrojen gibi obezite ile ilişkili çeşitli uyaranlara cevap olarak meme kanser hücreleri tarafından üretilmektedir (Garofalo ve ark, 2006). Meme kanser hücrelerindeki leptin sentezi ve sekresyonu, leptinin meme dokusunda otokrin mekanizmalar yoluyla neoplastik süreçleri destekleyebildiğini göstermektedir (Cascio ve ark, 2008). Meme bezindeki adipositlerden üretilen parakrin leptin de kanser gelişiminde rol oynayabilmektedir (Manabe ve ark, 2003).

Dolaşımdaki leptinin meme kanseri riski veya meme kanseri üzerindeki etkisi halen tam olarak net değildir. Bazı araştırmacılar meme kanseri olan kadınlarda plazma veya serum leptin değerlerinin artış gösterdiğini ileri sürmektedirler. Tessitore ve ark (2000) yüksek plazma leptin değerlerinin hastalığın evresi ve hormonal durum (progesteron ve östradiolün plazma konsantrasyonları) ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Goodwin ve ark (2005) da hastalardaki yüksek plazma leptin değerleri ile hastalığın evresi ve tümörün derecesi arasında göreceli olarak bir ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir. Buna karşın bazı araştırmacılar meme kanseri hastalarındaki serum leptin değerlerinin lenf düğümü metastazı ve hastalığın veya tümörün evresi ile bir ilişkisinin olmadığını ileri sürmüştür (Ozet ve ark, 2001; Chen ve ark, 2006). Liu ve ark (2007) meme kanseri hastalarında serum leptin değerinin yükseldiğini, ancak bu yükselmenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Bazı yazarlar da leptin ve meme kanseri arasında hiçbir ilişkinin olmadığını veya ters yönde bir ilişkinin olduğunu belirtmektedirler. Klinik çalışmalarda, sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında, meme karsinomalı postmenapozal (Petridou ve ark, 2000) ve premenapozal (Mantzoros ve ark, 1997) kadınlarda leptin değerlerinin önemli olmayan bir azalma gösterdiğini saptamışlardır. Benzer şekilde, diğer bulgular da hem pre- hem de post-menapozal kadınlarda meme kanser insidansı ve serum leptin konsantrasyonları arasında herhangi bir ilişki olmadığına işaret etmektedir (Coskun ve ark, 2003; Sauter ve ark, 2004; Woo ve ark, 2006).

Sonuç olarak; birçok çalışma kontrollere göre meme kanseri hastalarında dolaşımdaki leptin konsantrasyonunun arttığını söylese de, tümör belirteçleri veya prognoz arasındaki ilişki halen net olarak açıklanamamıştır. Bu nedenle meme kanseri gelişiminde sistemik leptinin rolünün daha iyi anlaşılması için bu alanda daha spesifik ve kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Surmacz ve Koda, 2009).

2.3.3.2. Adiponektin

Adiponektin, 0,5-30 µg/mL plazma konsantrasyonu ile organizmada en fazla bulunan adipokinlerden biridir. Uzun (fAd) ve globüler (gAd) formu olmak üzere iki formu

bulunmaktadır. Yoğun olarak beyaz adipoz dokudan salgılanır. Ayrıca, iskelet kası (Delaigle ve ark, 2004), kardiyomiyositler (Pineiro ve ark, 2005), osteoblastlar (Berner ve ark, 2004), lenfositler (Crawford ve ark, 2010), adrenal bez (Pashke ve ark, 2010), plasenta (Caminos ve ark, 2005), testis (Caminos ve ark, 2008), ovaryum (Chabrolle ve ark, 2007), hipofiz bezi (Rodriguez-Pachero ve ark, 2007) ve karaciğerde (Ma ve ark, 2009) de üretilmektedir. Salgılanan adiponektinin farklı multimerik formları bulunmaktadır. Globüler adiponektin trimer formda bulunurken, uzun adiponektinin düşük moleküler ağırlıklı trimer (LMW), orta moleküler ağırlıklı hekzamer (MMW) ve yüksek moleküler ağırlıklı oligomer (HMW) olmak üzere üç formu bulunmaktadır (Hada ve ark, 2007). Metabolik olarak en aktif formu HMW'dir. İnsülin dirençliliği, diyabet ve obezite durumlarında HMW'de azalma meydana geldiği bilinmektedir (Lara-Castro ve ark, 2006; Wang ve ark, 2008).

Adiponektinin pleiotropik etkilerine AdipoR1 ve AdipoR2 olmak üzere iki reseptör aracılık etmektedir (Lustig ve ark, 2012). AdipoR1, büyük oranda iskelet kasında eksprese edilirken, AdipoR2 genellikle karaciğerde eksprese edilmektedir (Fang ve ark, 2005). AdipoR1 ve AdipoR2 *in vivo* adiponektinin majör reseptörleridir ve insülin duyarlılığı ve glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rolleri bulunmaktadır (Bjursell ve ark, 2007; Liu ve ark, 2007; Yamauchi ve ark, 2007; Iwabu ve ark, 2010). AdipoR1'in gAd'ye karşı yüksek, ancak fAd'ye karşı düşük bir afinitesi vardır. Buna karşın, AdipoR2'nin her iki forma da orta düzeyde bir afinitesi bulunmaktadır (Yamauchi ve ark, 2002; Yamauchi ve ark, 2003). Adiponektin reseptörü olarak kabul edilen diğer bir molekül ise T-cadherin'dir. T-cadherin adiponektinin sadece hekzamerik ve HMW oligomerleriyle bağlanabilmekte, buna karşın trimerik (düşük moleküler ağırlıklı adiponektin) ve globüler formlarına bağlanmamaktadır (Hug ve ark, 2004). T-cadherin yoğun olarak iskelet kasından eksprese edilmektedir (Ordelleide ve ark, 2011), ancak bu dokudaki fonksiyonu halen anlayamamıştır.

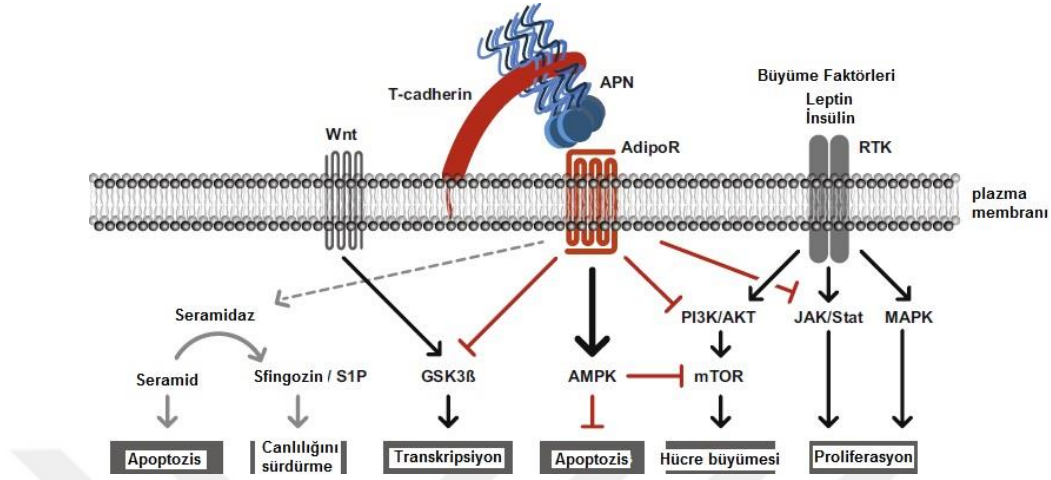
Adiponektin öncelikle insülin duyarlılığını artırıcı, antiaterojenik ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. İskelet kasında GLUT4 translokasyonunu artırarak glikozun hücre içine girmesini destekler (Ceddia ve ark, 2005). İnsülin sinyal iletimini aktive eder ve yağ asitlerinin taşınmasını, oksidasyonunu ve enerji kaybını kolaylaştırır (Yamauchi ve ark, 2001). Karaciğerde insülinin etkisini artırarak glikoz üretimini ve glikoneogenezisi azaltır (Berg ve ark, 2001; Combs ve ark, 2001). Ayrıca, fosfoenolpirüvat karboksikinas ve glikoz-6-fosfotaz gibi glikoneojenik enzimlerin aktivitesini azaltır ve yağ asidi oksidasyonunu artırır (Combs ve ark, 2001; Yamauchi ve ark, 2002). Sonuçta, adiponektin yağ asidi akışını ve karaciğerin içerdiği trigliserit miktarını azaltır (Yamauchi ve ark, 2001). Adiponektin, insülin dirençliliğine katkı sağlayan adipoz dokudaki TNF- α sekresyonunu da inhibe etmektedir

(Hotamisligil, 1999). Adiponektinin güçlü anti-inflamatuar özellikleri bulunmaktadır. Adiponektin IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini indükler ve makrofajlar yoluyla INF- γ , IL-6, TNF- α gibi proinflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe eder (Wolf ve ark, 2004; Wulster-Radcliffe ve ark, 2004). Bunların dışında, adiponektin arteriosklerotik plakları stabilize edebilmekte ve TNF- α 'nın immun hücre stimülasyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve köpük hücre formasyonu üzerindeki etkilerini bloke ederek bu plakların rüptürünü engelleyebilmektedir (Quchi ve ark, 2001). Adiponektin bir proanjiyojenik faktör olarak da tanımlanmaktadır. Adiponektinin endotel fonksiyonu üzerindeki koruyucu etkisi endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyonunu artırarak gerçekleşir (Chen ve ark, 2003).

Adiponektinin kanser gelişimine karşı koruyucu bir rol üstlendiği ileri sürülmektedir. Dolaşımdaki adiponektin konsantrasyonları ile gastrik, prostat, meme ve endometriyal kanserlerin insidansı arasında göreceli bir ilişki bulunmaktadır (Mantzoros ve ark, 2004; Bub ve ark, 2006; Cong ve ark, 2007; Ishikawa ve ark, 2007). Meme kanserinde plazma adiponektin konsantrasyonu ve tümörün histopatolojik evresi arasında ters bir ilişki bulunmuştur (Miyoshi ve ark, 2003). *In vitro* çalışmalarda da adiponektinin insan meme kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozisi desteklediği bildirilmiştir (Dieudonne ve ark, 2006; Dos Santos ve ark, 2008). Ayrıca, kanser dokularında adiponektin reseptörlerinin ekspresyonlarında da bir takım değişiklikler meydana gelebilmektedir. Birçok kanser dokusunda AdipoR1/R2 yoğun olarak eksprese edilirken (Mistry ve ark, 2006; Petridou ve ark, 2007; Takahata ve ark, 2007; Dalamaga ve ark, 2009; 2012), T-cadherin sessiz kalmaktadır (Andreeva ve Kutuzov, 2010). Düşük adiponektin konsantrasyonlarında meydana gelen tümörigenezis, normal hücrelerde proliferatif yolları inhibe eden AMPK-adiponektin sinyal iletiminin bozulmasıyla ilişkilidir (Hebbard ve Ranscht, 2014). AMPK hücrel enerjiyi temel düzenleyicisidir. Glikoz eksikliği, hipoksi ve oksidatif stres gibi metabolik koşulların değiştiği durumlarda AMPK aktive olarak proliferatif ve büyümeyi destekleyici yolları devre dışı bırakır ve ATP üretimini artırmak için katabolik yolları uyarır (Steinberg ve Kemp, 2009). AMPK hücre proliferasyonu ve gelişimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği için “kanserden-koruyucu” olarak tanımlanmaktadır. Adiponektin, PI3K/Akt/mTOR yolağının da güçlü bir inhibitörüdür ve böylece kanser hücre gelişmesini baskılayabilir (Şekil 7) (Hebbard ve Ranscht, 2014).

Sonuç olarak, adiponektin kanser gelişiminde etkisi olan birçok yolağı dengelemektedir. Etkilerini doğrudan AMPK sinyal yolağı ile ve dolaylı yoldan metabolik homeostazı sürdürerek gerçekleştirir. Böylelikle insülin ve leptin gibi kanser gelişimine katkı sağlayan

hormonların veya TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını kontrol altında tutar (Hebbard ve Ranscht, 2014).



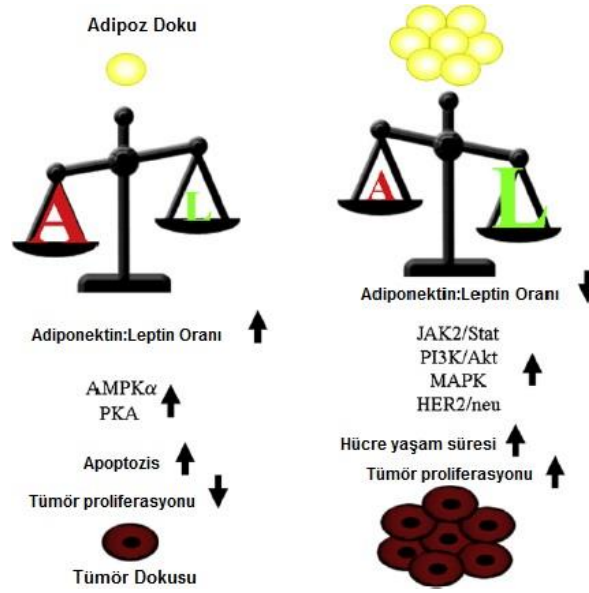
Şekil 7. Kanser gelişim yollarının adiponektin aracılığıyla supresyonu. Normal epitel hücrelerinde adiponektin T-cadherin'e bağlanır ve neoplazide aktive olan sinyal yollarını inhibe etmek için doğrudan veya dolaylı olarak AdipoR1/R2'ye sunulur. Kanser gelişimini baskılamak için AMPK'yı aktive ederken, PI3K/AKT, mTOR, MAPK ve JAK/STAT yollarını inhibe eder veya doğrudan GSK3 β 'yi etkiler. Ancak, AdipoR1/R2 ekspresyonu sürerken ve kanser gelişim yolları aktive olurken T-cadherin baskılanır. Ayrıca, AdipoR1/R2 ile ilişkili seramidaz aktivitesi de kanser hücre gelişimine katkı sağlar (Hebbard ve Ranscht, 2014). Tümör damar bölgesinden ekprese edilen T-cadherin ise bir pro-anjiyojenik faktör gibi adiponektin ile birlikte kanser gelişimini destekler (Hebbard ve ark, 2008; Parker-Duffen ve ark, 2013). Siyah oklar aktive olan yolları; kırmızı çizgiler inhibe olan yolları ifade etmektedir (Hebbard ve Ranscht, 2014).

2.3.3.2.1. Leptin ve Adiponektin Oranı

Adiponektin/leptin oranının artması veya azalmasının kanser gelişmesinde önemli (Şekil 8) ve kanser diagnozu ile ilişkili olduğu tartışılmaktadır. Adiponektin ve leptin arasındaki ilişkiler ve bunun kanser gelişmesine etkisi *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Grossmann ve Cleary, 2012). Örneğin, meme kanseri hücre hattında yüksek adiponektin/leptin oranının azalan hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Grossmann ve ark, 2008; Nkhata ve ark, 2009b). Benzer etkiler prostat kanseri hücre hattında da gösterilmiştir (Mistry ve ark, 2008; Grossmann ve ark, 2009).

Tümörigenezde adiponektin ve leptin arasındaki ilişki klinik öncesi hayvan modellerinde de çalışılmaktadır. Örneğin, yüksek yağlı (%45 yağ kalorisi) diyetle beslenen farelerde, yağ oranı düşük AIN-93C ile beslenen farelere göre serum adiponektin konsantrasyonu daha düşük, buna karşın leptin konsantrasyonu ve Lewis akciğer karsinomanın metastaz hızı daha yüksektir. Ayrıca, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde adiponektin/leptin oranı yaklaşık %80 oranında azalmıştır (Yan ve DeMars, 2010). Adiponektin/leptin oranı meme tümörigenezinde de çalışılmaktadır. 6 haftalık CD-1 nude

dişi farelerde goldthioglikoz ile obezite oluşturulmuş ve 10 haftalık yaşa geldiklerinde farelere T47-D meme kanseri hücreleri inoküle edilmiştir. Obez farelerde serum leptin konsantrasyonu belirgin olarak artarken, adiponektin konsantrasyonunda bir değışiklik olmamış, böylelikle adiponektin/leptin oranı azalmıştır. Ancak, bu modelde meme tümör gelişimi obeziteden etkilenmemiştir (Nkhata ve ark, 2009a). Buna karşın MMTV-TGF α farelerde aralıklı kalori kısıtlamasının, *ad libitum* beslenen ve kronik kalori kısıtlaması uygulananlara göre meme tümörigenezisini azalttığı tespit edilmiştir (Cleary ve ark, 2002; Cleary ve ark, 2007; Rogozina ve ark, 2009; Dogan ve ark, 2010). Bu girişim, 3 hafta %50 kalori kısıtlaması ve izleyen 3 hafta *ad libitum* besleme şeklinde yapılmıştır. Adiponektin konsantrasyonu kronik kalori kısıtlamasından ve aralıklı beslemenin *ad libitum* beslenme aşamasından etkilenmezken, leptin konsantrasyonu aralıklı beslemenin kısıtlama aşamasında belirgin olarak bir azalma göstermiştir. Dolayısıyla, bu süreçte adiponektin/leptin oranı da artmıştır. Ayrıca, çalışma boyunca *ad libitum* beslenen farelerin 10 haftalıktan 82 haftalık oluncaya kadarki süreçte adiponektin/leptin oranının düzenli olarak azaldığı, buna karşın aralıklı kalori kısıtlaması uygulanan farelerde bu durumun şekillenmediği gözlemlenmiştir. Adiponektin/leptin oranı ve tümör varlığı arasında her zaman bir ilişki saptanamasa da, aralıklı kalori kısıtlaması uygulanan farelerin tümör insidansında belirgin ve sürekli azalmanın adiponektin/leptin oranının artışı ile ilişkili olduğu öngörülmüştür (Dogan ve ark, 2010; Rogozina ve ark, 2011). Genel olarak düşük adiponektin/leptin değerinins kanser gelişmesini desteklediği kabul edilmektedir. Ancak, yüksek adiponektin/leptin oranının kanserin önlenmesinde bir etkisinin olup olmadığı halen belirsizliğini korumaktadır (Grossmann ve Cleary, 2012).



Şekil 8. Yüksek ve düşük adiponektin/leptin oranları. Soldaki şekilde az miktardaki, sağdaki şekilde ise fazla miktardaki adipoz dokunun etkileri gösterilmektedir. Adiponektin miktarı A, leptin miktarı ise L ile ifade edilmiştir (Grossmann ve Cleary, 2012).

2.3.4. Glikokortikoidler

Glikokortikoid (GC)'ler stres hormonlarının bir sınıfını oluştururlar, katabolik steroid hormonlardır ve adrenal kortekste üretilirler (Shpilberg ve ark, 2015). Ayrıca, adipoz dokudan salgılanırlar ve adipoz dokudan adipokin ekspresyonu ve sekresyonunu değiştirebilmektedirler (Shpilberg ve ark, 2015).

Hipotalamo-hipofizer-adrenal eksen GC'lerin üretiminin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Hipotalamustan salınan kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), ön hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon (ACTH)'un salınımını uyarır. Dolaşıma geçen ACTH adrenal korteksten GC sekresyonunu indükler. GC konsantrasyonu belli bir değere ulaştıktan sonra negatif geribildirim yoluyla CRH ve ACTH salınımını inhibe etmektedir (Tsigos ve Chrousos, 2002). Normal koşullarda glikokortikoidler güçlü bir sirkadiyen döngü gösterirler. Örneğin, insanlarda sabahın erken saatlerinde, nokturnal hayvanlarda ise akşamın erken saatlerinde en yüksek düzeylere ulaşmaktadırlar (Almon ve ark, 2008).

Glikokortikoidlerin enerji metabolizmasında görev alan substratların üretimi, dağılımı, depolanması ve kullanılmasında önemli rolleri bulunmaktadır (Vegiopoulos ve Herzig, 2007). Ayrıca, inflamatuvar ve immün süreçlerin düzenlenmesinde de önemli fonksiyonlar gerçekleştirirler (Barnes, 1998). GC'ler bu süreçleri baskılar. Bu nedenle anti-inflamatuvar özelliklerinden dolayı sentetik GC'ler yangısal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar (Swartz ve Dluhy, 1978; Barnes, 1998). Bunların yanında GC'ler sentral

adipozite ve şiddetli insülin dirençliliğinin gelişimi gibi zararlı etkilerin şekillenmesine de katkıda bulunmaktadır (Ruzzin ve ark, 2005). GC'lerin en önemli fonksiyonlarından birisi yeterli glikoz bulunmadığı koşullarda sinir hücrelerinin beslenmesini sürdürmek için gerekli plazma glikoz konsantrasyonunu sağlamaktır (Vegiopoulos ve Herzig, 2007). Açlık ve stres durumlarında plazma GC konsantrasyonu artar. GC'ler karaciğerde ve bazen de böbreklerde glikoneogenezisi artırmak yoluyla glikoz üretimini artırır (Gunn ve ark, 1975; Vegiopoulos ve Herzig, 2007). İskelet kası ve adipoz doku gibi birçok dokuda insüline bağlı glikoz alımını azaltarak insülin dirençliliğine neden olurlar (Owen ve ark, 1973; Oda ve ark, 1995; Weinstein ve ark, 1995; Coderre ve ark, 1996; Dimitriadis ve ark, 1997). GC'ler iskelet kasında protein yıkımını stimüle ederler ve böylece aminoasitlerden sağlanan karbon karaciğerde glikoneogenezis için kullanılır (Hasselgren, 1999). Ayrıca, beyaz adipoz dokuda da lipolizisi uyararak glikoneogenezis için gerekli olan serbest yağ asitlerinin açığa çıkmasını sağlarlar. GC'ler lipid sentezini de inhibe ederler (Vegiopoulos ve Herzig, 2007).

Glikokortikoidlerin kanser hücre gelişimi üzerinde de etkileri bulunmaktadır. GC'lerin meme kanser hücre gelişimini doğrudan inhibe ettiği *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Lippman ve ark, 1976). Buna karşın, ilk yapılan çalışmalarda non-metastatik karsinomalarda GC reseptörlerinin eksprese olmadığı, metastatik karsinomalarda ise güçlü bir şekilde eksprese oldukları düşünülmüştür (Lien ve ark, 2006). Ayrıca, yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda GC'lerin dolaşımdaki adiponektin, leptin, IL-6, TNF- α ve resitin konsantrasyonları üzerinde doğrudan bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Shpilberg ve ark, 2015). Bu hormonlar adipoz dokudan IL-6, TNF- α ve adiponektin üretimini azaltırken (Fried ve ark, 1998; Fasshauner ve ark, 2002), leptin ve resitin üretimini artırır (Shojima ve ark, 2002; Vicennati ve ark, 2002). Dolaşımdaki adipokin profilindeki bu değişikliklerin meme kanserinin gelişmesi, devamlılığı ve metastazı üzerinde uyarıcı bir etkisi olabilir (Shpilberg ve ark, 2015). Ayrıca, Pang ve ark (2006) glikokortikoidlerin kemoterapinin etkisini azalttığını ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak, bugün glikokortikoidlerin kanser gelişimi üzerindeki etkisi ve bu etkiyi hangi mekanizmalar yoluyla gerçekleştirdiği de çok net değildir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvanlar ve Meme Kanseri İndüksiyonu

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile yapıldı. Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan annelerden doğan, sütten kesim dönemine gelmiş, 30–65 g canlı ağırlığında 34 dişi Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) yavru sıçan kullanıldı.

Hayvanlar yetiştirme döneminde, indüksiyonla başlayan tümör gelişmesi sürecinde, adaptasyon periyodunda ve izleyen deneysel süreçte $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %50-70 nem ve 12/12 saat aydınlık/karanlık koşullarında barındırıldı. Çalışma süresince hayvanlara su ve yem, kısıtlama grupları için deneysel süreç dışında, *ad libitum* verildi.

Toplam 29 dişi yavru sıçana 21 günlük olduklarında intraperitoneal yolla 50 mg/kg N-nitroso-N-metilüre (NMU) (Thompson ve ark, 1995) uygulandı (Tablo 2). NMU, 14 mg/ml olacak şekilde %0,9'luk NaCl içerisinde hazırlandı ve $\text{pH} \leq 4$ olacak şekilde %3'lük asetik asit ilave edildi (Thompson ve Sporn, 2002). Hazırlama sürecinde önce bütün malzemelerin oda sıcaklığına gelmesine dikkat edildi ve böylece karsinogen maddenin NaCl içerisinde daha kolay çözündüğü gözlemlendi. NMU, günlük olarak hazırlandı ve hazırlandıktan sonra en geç 2 saat içerisinde uygulandı (Thompson ve Sporn, 2002). Kalan 5 sıçan yavrusuna $\text{pH} \leq 4$ olacak şekilde %3'lük asetik asit ilave edilmiş %0,9'luk NaCl eşdeğer hacimde ve aynı yolla uygulandı.

Uygulamadan 1 hafta sonra her sıçan haftada bir kez tümör gelişmesi ve vücut ağırlıkları açısından incelendi. Saptanılabilir boyuta ulaştığında palpe edilebilen tümörlerin boyutları milimetre duyarlı dijital kumpas ile her hafta ölçüldü ve büyüklükleri ve lokalizasyonları kaydedildi.

3.2. Deney Dizaynı

Tümör indüksiyonu yapılan 29 sıçandan 24'ünde tümör gelişti. Tümörler yaklaşık 10-12 mm çapa ulaştığında, deney koşullarına adaptasyon sağlamaları için tümör gelişen ve fizyolojik serum uygulanan hayvanlar bireysel metabolik kafeslere yerleştirildi ve 10 günlük adaptasyon döneminden sonra sıçanlar tümör büyüklüğü açısından eşitlenmiş ve her grupta 8 sıçan olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Böylece deneyde 1) Sağlıklı kontroller (**K**), 2) Kanser

kontroller (**KK**), 3) Alternatif gün beslenenler (**ADF**) ve 4) Kalori kısıtlaması uygulananlar (**%50-CR**) olmak üzere toplam 4 grup kullanıldı. Gruplar ve prosedürler Tablo 2’de özetlendi.

Tablo 2. Çalışma dizaynı ve prosedürler¹⁻⁵

Hazırlık	İndüksiyon	Tümör çapı 10-12 mm	Adaptasyon (10 gün)	Gruplara Ayırma		Diyeter Girişim Süreci (Hafta)											
Doğumlar Gebelik Süreci Çiftleşmeler	21. Gün	≥80 gün	≥90 gün	≥90. gün	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	 FTS			K	5	Ad libitum besleme											
	 NMU			KK	8	Ad libitum besleme											
	 NMU			ADF	8	Bir gün aç, bir gün <i>ad libitum</i> besleme											
	 NMU			%50-CR	8	Ad libitum'a göre %50 kısıtlanmış besleme						Vücut ağırlıklarının %26-38'ini kaybettikleri için deneyleri 6. hafta sonunda sonlandırıldı.					

¹Yetiştirme, indüksiyonla başlayan tümör gelişim süreci, adaptasyon dönemi ve deney süresince verilen yem %23 ham protein, %8 ham kül, %7 ham selüloz ve %3 ham yağ içermektedir (BilYem Gıda, Ankara).

²Alternatif gün beslemenin %30 kalori kısıtlamasına karşılık geldiği bildirilmektedir (Saleh ve ark, 2013).

³Kalori kısıtlanan gruptaki hayvanlara ~10 g yem/gün verildi (Hubert ve ark, 2000; Molon-Noblot ve ark, 2005).

⁴Tüm prosedürler (yem ve su verilmesi, tümör kontrolleri, tümör büyüklüklerinin ölçülmesi, canlı ağırlıkların belirlenmesi) 08.³⁰ - 12.³⁰ saatleri arasında gerçekleştirildi.

⁵Palpe edilebilen tümörlerin boyutları en ve boy olacak şekilde haftada bir kez milimetre duyarlı dijital kumpas ile ölçüldü ve kaydedildi. Tümör hacimleri (mm³) Carlson formülü [$\frac{1}{2}(en^2 \times boy)$] ile hesaplandı (Yankuzo ve ark, 2014).

Deney süresince sıçanların canlı ağırlıkları ve yem tüketimleri ile gelişen tümörlerin hacimleri, deneyin sonlandırılma aşamasında ise çıkartılan tümörlerin ağırlıkları ve sayıları ile alınan kanlardan hazırlanan serum örneklerinde insülin, IGF-1, adiponektin, leptin ve kortikosteron konsantrasyonları saptandı ve adiponektin/leptin oranı hesaplanarak değerlendirildi.

3.3. Kanların Alınması, Serum Örneklerinin Hazırlanması ve Nekropsi

Çalışmada, 12 haftalık deney sürecini tamamlayan sıçanlar bir gece öncesinden saat 18.⁰⁰'da aç bırakılarak ertesi gün 08.³⁰'dan itibaren tartıldıktan sonra eter anestezisine alındı. Anestezi altında, her bir sıçandan kalpten punksiyon yoluyla yaklaşık 4-5 ml kan alındı. Kan alma işleminden sonra, yoğun anestezi altında sıçanlara servikal dislokasyon yoluya ötenazi uygulandı. Aynı günde birden fazla ötenazi uygulanması gerektiğinde, anestezi ve ötenazi 1,5–2 saat aralıklarla gerçekleştirildi.

Antikoagülsüz tüplere alınan kanlar oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 3000 x g 15 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum örnekleri ELISA testleri yapılncaya kadar -80°C'de saklandı.

Kan alınması ve servikal dislokasyonu takiben sıçanların derisi yüzüldü ve palpe edilebilen ve/veya edilemeyen, saptanabilen tüm meme tümörleri eksize edildi. Çıkarılan tümörlerin lokalizasyonları kaydedildi, ağırlıkları ve boyutları (Resim 1) ölçüldü. Tümörler histopatolojik olarak değerlendirilmek üzere %10'luk formalin içerisine alındı.



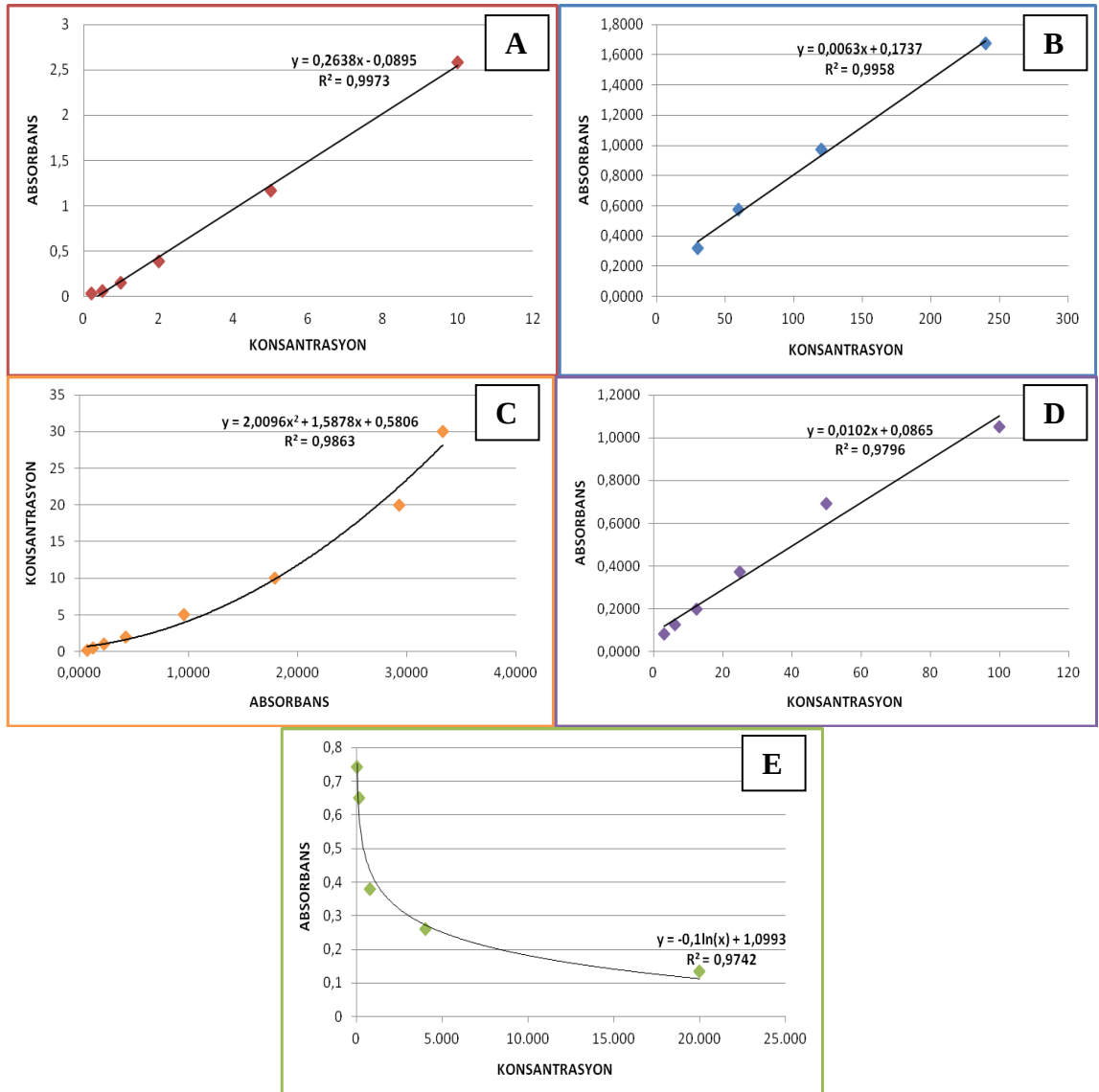
Resim 1. Deney sonunda tümör en ve boy çaplarının ölçülmesi.

3.4. Kimyasallar ve Serumda Sitokin ve Hormon Konsantrasyonlarının Saptanması

Karsinojen: N-nitroso-N-metilüre (NMU) Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) firmasından sağlandı ve kullanımına kadar -20°C'de saklandı.

Deney sonunda hayvanlardan alınan kanlardan hazırlanan serum örneklerinde insülin, IGF-1, leptin, adiponektin ve kortikosteron konsantrasyonları ELISA yöntemi ile ölçüldü. Rat adiponektin (Katalog No: EZRADP-62K), leptin (Katalog No: EZRL-83K), insülin (Katalog No: EZRMI-13K) için enzim ilişkili immün testi kitleri (ELISA) Millipore (Billerica, MA, USA), rat insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) (Katalog No: 201-11-0710) için SunRed Biotechnology (Shangai) ve rat kortikosteron (Katalog No: ADI-900-097) için ise Enzo Life

Science'dan sağlandı ve kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandılar. Hormonların serum konsantrasyon analizleri üretici firma önerileri doğrultusunda ilgili ELISA kitlerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Özetle, substrat solüsyonunun ilave edilmesiyle kuyucuklarda mavi renk oluştu ve stop solüsyonunun eklenmesiyle asidifikasyonu takiben bu mavi renk sarı renge dönüştü. Stop solüsyonu eklendikten sonra izleyen 5 dakika içerisinde insülin, leptin ve adiponektin için 450 ve 590 nm, IGF-1 için 450 nm, kortikosteron için 405 nm absorbans değerlerinde okuma yapıldı ve her bir hormona ilişkin bir standart grafiği oluşturularak konsantrasyonlar hesaplandı (Şekil 9A-E).



Şekil 9. İnsülin (A), IGF-1 (B), leptin (C), adiponektin (D) ve kortikosteron (E) için oluşturulan standart grafikler.

3.5. Deneyden Çıkartma/Deneyi Sonlandırma Kriterleri

Deney sürecinde bütün sıçanlar fizyolojik distres (örn; yem veya su tüketiminin olmaması, anormal solunum, tekrarlayan anormal davranışlar vb) bulguları yönünden gözlemlendi ve bu gözlemler tümör çapı ölçümleri, tümör hacimleri ve haftalık canlı ağırlık değişimleriyle birlikte değerlendirildi. Vücut ağırlığının %26-38'nin kaybedildiği ve/veya tek bir palpe edilebilir subkutan tümörün varlığında, tümör çapının 4 cm'yi geçtiği veya birden fazla subkutan tümör varlığında tümör hacimleri toplamının 32 cm³'ü geçtiği durumlarda sıçanların deneyi sonlandırıldı.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Eksize edilen tümörlere 3-4 mm kalınlığında birbirine paralel seri kesitler yapıldı ve kesitler 24-48 saat süreyle %4'lük tamponlanmış formaldehid solüsyonunda (Sigma-Aldrich) immersiyon yöntemiyle tespit edildi. Bu süre sonunda doku takip kasetlerine yerleştirilen dokular 6-8 saat süreyle akan çeşme suyunda yıkandı ve Tablo 3'de verilen solüsyonlarda otomatik doku takip cihazında (Leica TP1020) takip edilerek parafine gömüldü.

Tablo 3. Tümör doku kesitlerinin takip edilmek üzere alındıkları solüsyonlar ve bu solüsyonlarda bekletildikleri süreler

Solüsyon	Takip Süresi
%70 Alkol	1 saat
%80 Alkol	1 saat
%90 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
Absolut Alkol	1 saat
Ksilen	20 dakika
Ksilen	20 dakika
Parafin (erime sıcaklığı 46-48°C)	1 saat
Parafin (erime sıcaklığı 56-58°C)	1 saat

Parafine gömülen dokulardan lamlara (Thermo Scientific) 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Tümörlerden histopatolojik inceleme amacıyla alınan kesitler hematoksisilen-eozin ile boyandı (Carson ve Hladik, 2009). Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus

BX51) incelendi ve mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Tümörlerin sınıflandırılması *ad modum* Russo ve Russo (2000) yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analizler

Verilerin toplanması ve değerlendirilmesi SPSS for Windows® Versiyon 22 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılan ve normal dağılmayan değişkenler için ortalama ve standart sapma kullanılarak verildi. Diyetler girişimlerin canlı ağırlık ve tümör hacmine etkisi Zaman İçinde Tekrarlı Ölçümler için Varyans Analizi ile değerlendirildi. Sferisite varsayımının sağlanmadığı durumlarda Greenhouse-Geisser düzeltmesi kullanıldı. Tümör sayısı, tümör ağırlıkları ve bunların ortalama değerleri, tümör ağırlığının son canlı ağırlığa oranı, toplam yem tüketimi ve plazma hormon konsantrasyonları normal dağılım göstermediğinden bu değişkenler için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Tümörlerin benign, malign ve non-invaziv ve invaziv özelliklerine göre sıklıkları ve oranları diyetler girişimler bazında çarpaz tablolar kullanılarak verildi ve bu değişkenlerin sıklıklarının analizi için Ki-kare testi kullanıldı.

4. BULGULAR

İlk palpe edilebilen tümörler karsinojen enjeksiyonundan sonra 60. günde tespit edildi ve tümör gelişimi 20. haftaya kadar devam etti. Tümör indüklenen toplam 29 sıçandan 24'ünde meme tümörü gelişti. Tümör insidansı %82,7 olarak bulundu ve karsinojen uygulamasından sonraki 8-10. haftalarda maksimum düzeydeydi.

Toplam 39 tümörden %48,7'si (19/39) sağ meme hattında, %51,3'ü (20/39) sol meme hattında şekillendi. Bölgesel olarak değerlendirildiğinde; tümörlerin %66,6'sı (26/39) abdominal-inguinal ve %33,4'ü (13/39) servikal-torakal meme bezlerinde şekillendi.

4.1. Yem Tüketimi

İlk 6 haftalık deney süreci sonunda hesaplanan toplam yem tüketimi ortalamaları %50 kalori kısıtlama grubunda 246 ± 60 g, ADF grubunda 560 ± 49 g, KK grubunda 832 ± 105 g ve K grubunda 969 ± 24 g düzeylerindeydi.

Deneyssel süreci tamamlayan üç grubun 12 haftada tükettikleri toplam yem miktarı incelendiğinde, kontrol grubunda bulunan hayvanların kanser kontrol ve alternatif gün besleme gruplarına göre biraz daha fazla yem tükettikleri gözlemlendi. Bu gruplarda ortalama yem tüketimi kontrol grubunda 1940 ± 49 g, kanser kontrol grubunda 1665 ± 210 g ve alternatif gün besleme uygulanan grupta 1122 ± 99 g kadardı. Ancak, sadece sağlıklı kontrol [K] ve ADF gruplarının ortalama yem tüketim miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemliydi ($P < 0,001$).

4.2. Canlı Ağırlık

Gruplandırma tümör büyüklüğü ölçü alınarak yapıldığı için hayvanların başlangıç canlı ağırlıkları benzer değildi. Bu nedenle, kontrol grubunun beslenme girişimleri öncesi ortalama canlı ağırlığı diğer grupların canlı ağırlık ortalamalarından daha yüksekti ($P < 0,01$).

Hayvanların canlı ağırlıkları 12 haftalık deney sürecinde önemli değişiklikler gösterdi (Tablo 4, Şekil 10). Hayvanlarda %50 kalori kısıtlaması hızlı bir kilo kaybı ile sonuçlandı. Bu gruptaki hayvanlar 6 hafta içinde canlı ağırlıklarının ortalama %26-38'ini kaybetti ve etik kurallar çerçevesinde bu grup için deney 6. hafta sonunda sonlandırıldı.

Kontrol ve kanser kontrol grubundaki hayvanların canlı ağırlıklarında yavaş, ancak düzenli bir artış görüldü. 12 haftalık süreçte kontrol grubunun ortalama canlı ağırlığı 318 g'dan 365 g'a ve kanser kontrollerin ortalama canlı ağırlığı 277 g'dan 316 g'a yükseldi. Bu iki grupta ortalama ağırlık artışları sırasıyla %14,8 ve %14 oldu. Buna karşın, ADF grubunda 12 haftalık deney sürecinde canlı ağırlıkta ortalama 32 g (%12,16) bir azalma görüldü.

Kalori kısıtlaması uygulanan gruptan sadece ilk 6 haftanın verileri toplanabildiği için istatistiksel değerlendirmede canlı ağırlıklar önce 4 grubun ilk 6 haftadaki değişimleri ve sonra 3 grubun 12 hafta sürecindeki değişimleri açısından ayrı ayrı incelendi.

Zaman içinde tekrarlayan ölçümler için varyans analizi ilk 6 haftada zamanın canlı ağırlıklar üzerine etkisinin önemli olduğunu, ayrıca zaman ile girişimler arasında önemli etkileşimler bulunduğunu gösterdi ($P=0,000$). Subjeler içi test de zamanın etkisini ve zaman ile girişimler arasındaki etkileşimi onayladı (sırasıyla; $P=0,004$ ve $P=0,000$) Subjeler arası testde (eşleştirmeli karşılaştırmalar) girişimlerin etkisi önemliydi. *Post hoc*s kontrol grubu ile kanser kontrol, ADF ve %50-CR grupları ortalama canlı ağırlıkları arasındaki farkların önemli olduğunu gösterdi (sırasıyla; $P=0,008$, $P=0,000$ ve $P=0,000$). Ayrıca, kanser kontrol grubu ile ADF ve %50-CR grupları canlı ağırlıkları ortalama değerleri arasındaki farklar da istatistiksel olarak onaylandı (sırasıyla; $P=0,002$ ve $P=0,001$). Buna karşın ADF ve %50-CR gruplarının ortalama canlı ağırlık değerleri arasında önemli bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Zaman için eşleştirmeli karşılaştırmalar canlı ağırlığın zamanla önemli değişimler gösterdiğini ortaya koydu (Ek-1).

Çoklu karşılaştırmalar ilk 6 haftada kontrol grubu ile KK, ADF ve %50-CR grupları (sırasıyla; $P=0,037$, $P=0,000$ ve $P=0,000$) ve KK ile ADF ve %50-CR grupları (sırasıyla; $P=0,012$ ve $P=0,003$) için ortalama canlı ağırlık değerleri arasındaki farkları onayladı.

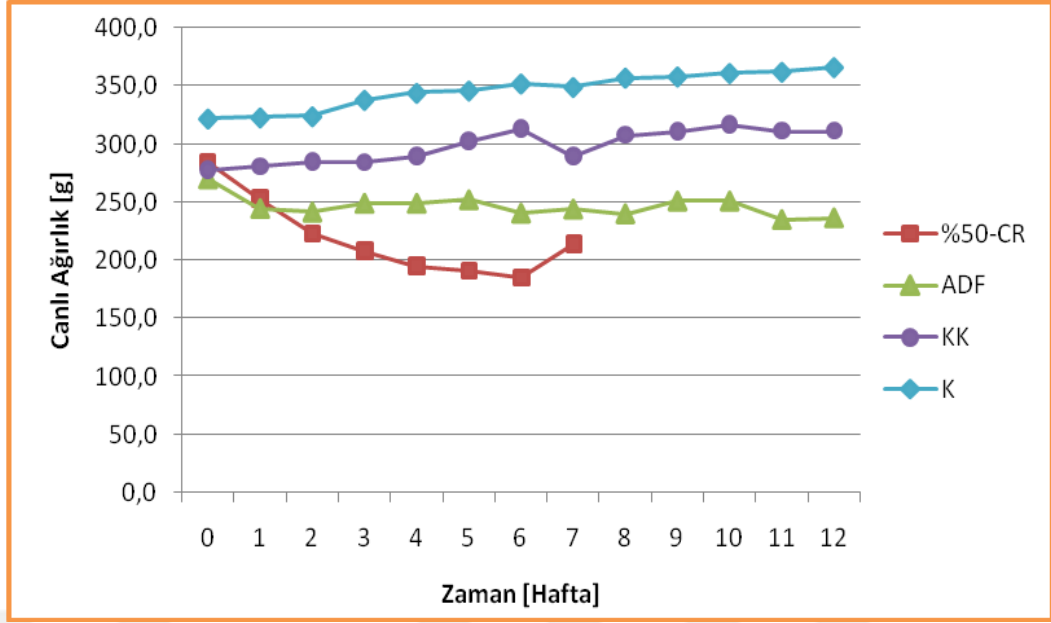
Kontrol, kanser kontrol ve alternatif gün besleme gruplarını içeren üç grup için 12 haftalık deney sürecindeki ortalama canlı ağırlık değişimleri incelendiğinde zamanın etkisi önemliydi ($P=0,009$), ancak zaman ile girişimler arasındaki etkileşim istatistiksel olarak onaylanmadı ($P=0,069$, $F=4,774$). Subjeler arası testde girişimlerin etkisi ($P=0,000$), subjeler içi testde de zamanın etkisi ve zaman ile girişimler arasındaki etkileşim önemliydi ($P=0,000$). Eşleştirmeli karşılaştırmalar kontrol grubu ile kanser kontrol ve ADF grupları (sırasıyla; $P=0,003$ ve $P=0,000$) ve KK grubu ile ADF grubunun canlı ağırlık ortalama değerleri arasındaki farkların anlamlı olduğunu gösterdi ($P=0,001$). Zaman için eşleştirmeli karşılaştırmalar da genel olarak ortalama canlı ağırlık değişimlerinin deney sürecinde önemli değişiklikler gösterdiğini ortaya koydu (Ek-1).

Çoklu karşılaştırmalar 12 haftada kontrol grubu ile KK ve ADF grupları (sırasıyla; P=0,007 ve P=0,000) ve KK ile ADF grubu (P=0,003) ortalama canlı ağırlık değerleri arasındaki farkları onayladı.

Tablo 4. Canlı ağırlıklar (g)

Ölçüm Zamanı	Kontrol	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
CA 0	318,00±6,95	277,25±9,62	263,00±8,01	281,25±7,03
CA 1	319,60±6,75	283,25±9,67	245,00±8,62	249,50±6,05
CA 2	323,00±8,68	285,50±11,16	233,25±7,21	223,63±6,11
CA 3	337,40±10,90	288,25±10,65	242,38±7,46	208,29±7,44
CA 4	337,40±10,33	293,25±10,21	245,38±9,82	196,40±9,88
CA 5	342,20±10,09	295,29±14,02	245,38±7,47	190,50±14,08
CA 6	347,80±10,03	305,86±14,15	241,63±7,00	185,67±18,47
CA 7	349,20±9,33	291,29±15,13	234,29±8,05	214,00*
CA 8	351,60±11,75	308,71±13,17	237,14±9,18	-
CA 9	355,40±10,98	309,14±12,59	247,57±8,66	-
CA 10	357,20±10,96	313,00±12,29	248,29±8,59	-
CA 11	361,20±10,40	310,00±14,09	238,33±7,60	-
CA 12	365,20±10,13	316,00±16,30	231,67±8,00	-

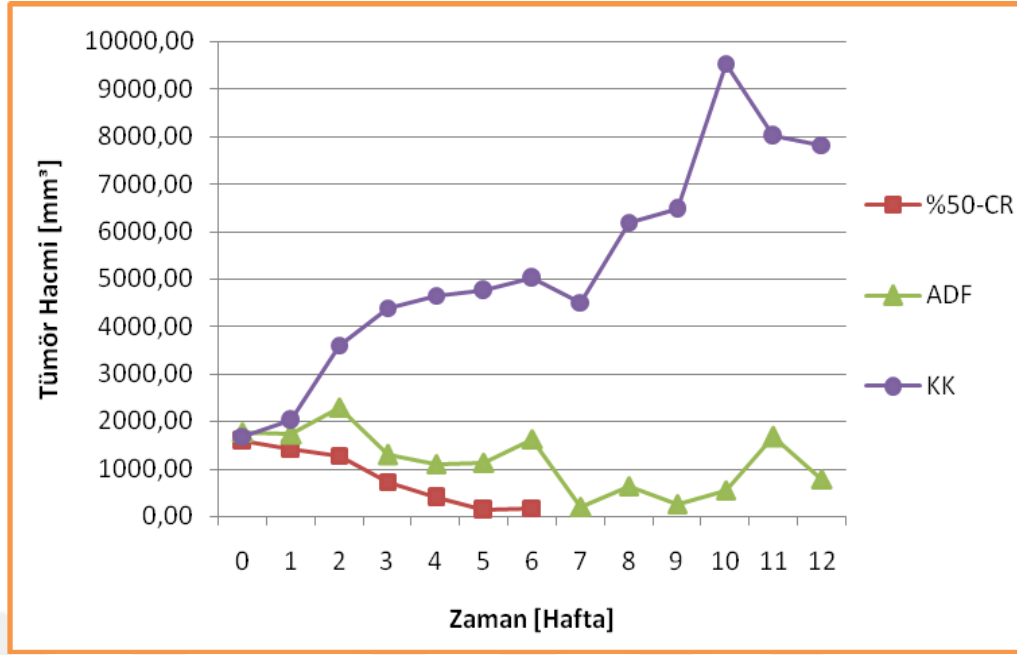
* Bu ölçüm zamanında grupta 1 hayvan kalmıştır.



Şekil 10. Canlı ağırlık değişimleri (g).

4.3. Tümör Hacmi

Kanser kontrol, ADF ve %50-CR'yi içeren üç grup için ilk 6 haftayı ve kanser kontrol ve ADF'yi içeren iki grup için 12 haftayı değerlendiren zaman içinde tekrarlayan ölçümler için varyans analizi zamanın tümör hacimleri üzerine etkisinin önemli olmadığını ve zaman ile girişimler arasında bu açıdan bir etkileşim de bulunmadığını gösterdi ($P>0,05$). Subjeler içi test de zamanın etkisini ve zaman ile girişimler arasındaki etkileşimleri onaylamadı ($P>0,05$). Benzer şekilde, subjeler arası testde girişimlerin etkisi önemli değildi. Sonuç olarak, eşleştirmeli karşılaştırmalarda da grup ortalama değerleri arasında önemli bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Ancak, zaman için eşleştirmeli karşılaştırmalar tümör hacmi ortalama değerlerinin gruplarda iki ölçüm zamanı arasında zamanla farklılıklar gösterdiğini ortaya koydu (Ek-2).



Şekil 11. Tümör hacim değişimleri (mm³).

Tümörlerin toplam hacmi grup ortalamaları Tablo 5 ve Şekil 11 ve 12’de ve 6. ve 12. haftadaki ortalama tümör hacimleri (toplam tümör hacmi/tümör sayısı/sıçan) Tablo 6 ve 7’de ve Şekil 12 ve 13’de gösterilmiştir. Tümörlerin 6. haftadaki toplam hacmi %50-CR grubunda ADF ve KK gruplarına göre daha düşüktü, ancak sadece %50-CR ve KK grupları arasındaki fark anlamlıydı ($P=0,009$). İlk 6 hafta sonunda 3 grup arasında ortalama tümör hacmi açısından bir farklılık tespit edilmedi ($P>0,05$). 12 hafta sonunda hesaplanan tümör kitlesi hacimlerinin istatistik analizi, kanser kontrol ve ADF grupları arasında değerlendirildiğinde, kanser kontrol grubuna göre alternatif gün beslenen grubun ortalama tümör hacminin bir azalma gösterdiği, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı görüldü (Tablo 7).

Tablo 5. Tümör hacimleri (mm³)

Ölçüm Zamanı	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması
	$\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$
TH 0	1877,66±578,01	1924,26±514,85	2944,70±1394,64
TH 1	2466,33±612,60	2749,50±1061,85	4406,94±2000,71
TH 2	4415,51±1266,92	3760,38±1522,14	3395,80±1732,90
TH 3	6119,15±2631,58	3745,47±1612,49	2854,84±2332,96
TH 4	8226,80±3672,83	5314,48±2653,34	5924,33±5619,23
TH 5	4444,37±836,18	4585,81±3090,26	2483,80±2401,05
TH 6	6339,35±1886,06	5500,83±3464,91	2156,33±2032,32
TH 7	7761,55±2776,40	2669,04±1991,46	3516,80*
TH 8	9752,67±4247,98	1727,63±1167,16	-
TH 9	9640,12±3546,42	2397,41±1984,11	-
TH 10	11717,74±4462,50	2386,60±1849,79	-
TH 11	11530,86±4680,63	3620,88±2520,43	-
TH 12	15014,61±6932,12	4044,46±3068,94	-

* Bu ölçüm zamanında grupta 1 hayvan kalmıştır.

Tablo 6. İlk 6 hafta sonundaki tümör hacmine ilişkin değişkenler (mm³)

Değişkenler	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması	Önemlilik
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Tümör Toplam Hacmi	9675,31±3657,50 ^b	4138,73±2677,99 ^{ab}	1263,46±727,03 ^a	P<0,05
Ort. Tümör Hacmi	4254,83±1250,41	4060,90±2695,48	1263,46±727,03	ÖD

ÖD; önemli değil.

Tablo 7. 12 hafta sonundaki tümör hacmine ilişkin değişkenler (mm³)

Değişkenler	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	Önemlilik
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Tümör Toplam Hacmi	19784,47±5313,19	7931,81±4287,61	ÖD
Ort. Tümör Hacmi	8856,48±3283,97	7529,55±4381,00	ÖD

ÖD; önemli değil.

4.4. Tümör Sayıları ve Tümör Ağırlıkları

Deneyin ilk 6 haftasındaki birden çok palpe edilebilir tümör görülme sıklığı grup ortalamaları kanser kontrol grubunda 2,25±0,41, ADF grubunda 1,12±0,12 ve %50-CR grubunda 1,00±0,00 olarak belirlendi (Şekil 14). Kanser kontrol grubunda tümör görülme sıklığı ortalama değerleri ADF ve %50-CR gruplarının ortalama değerlerinden belirgin olarak daha yüksekti (sırasıyla; P=0,015, P=0,004). Buna karşın, ADF ve %50-CR grupları arasında bu açıdan önemli bir fark yoktu.

Benzer şekilde, 12 haftalık deney sonunda da palpe edilebilen ve edilemeyen birden çok tümör görülme sıklığı kanser kontrol grubunda (2,50±0,42) ADF grubuna (1,42±0,29) göre daha yüksekti (P<0,05) (Şekil 14).

İlk 6 hafta sonunda %50-CR grubunda toplam tümör ağırlığı grup ortalaması $0,55 \pm 0,23$ ve ortalama tümör ağırlığı (toplam tümör ağırlığı/tümör sayısı/sıçan) $0,39 \pm 0,13$ olarak belirlendi.

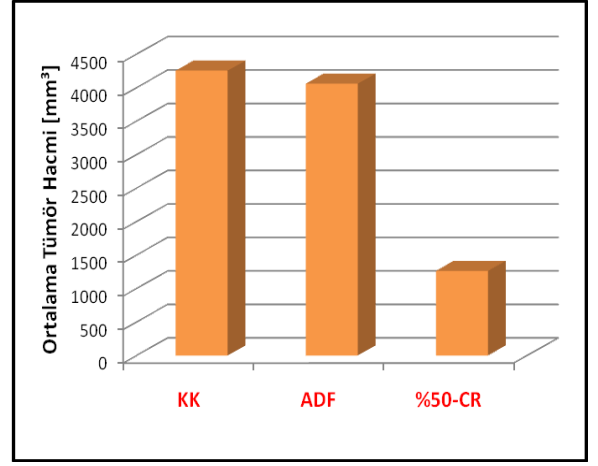
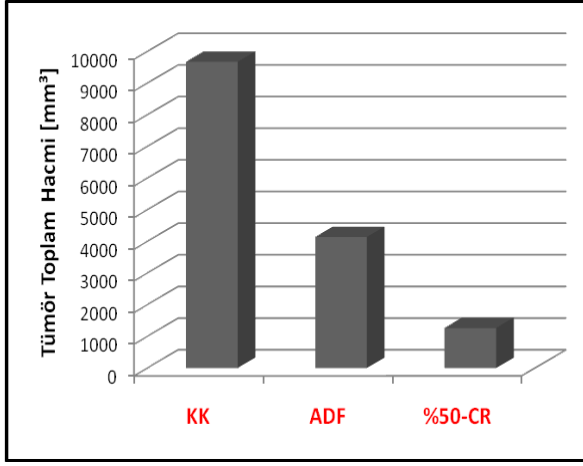
Deneysel süreci tamamlayan iki grup için 12 haftalık süreç değerlendirildiğinde, toplam tümör ağırlıkları grup ortalaması ve ortalama tümör ağırlığı için KK (sırasıyla; $13,78 \pm 3,89$ g ve $6,31 \pm 2,55$ g) ve ADF (sırasıyla; $4,87 \pm 2,65$ g ve $4,65 \pm 2,71$ g) grupları arasında önemli bir fark görülmedi (Şekil 15).

Göreceli tümör ağırlığı (tümör ağırlığının son canlı ağırlığa oranı) %50-CR grubunda ilk 6 hafta için $0,002 \pm 0,001$ olarak hesaplandı. KK ve ADF grupları için 12 haftalık deney süreci sonunda göreceli tümör ağırlığı ortalama değerleri sırasıyla $0,045 \pm 0,013$ g ve $0,022 \pm 0,012$ g düzeylerindeydi (Şekil 16). İstatistik değerlendirmede bu açıdan gruplar arasında bir fark olmadığı görüldü.

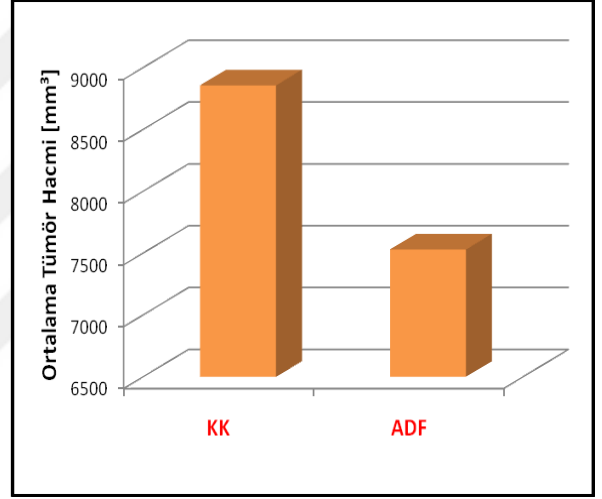
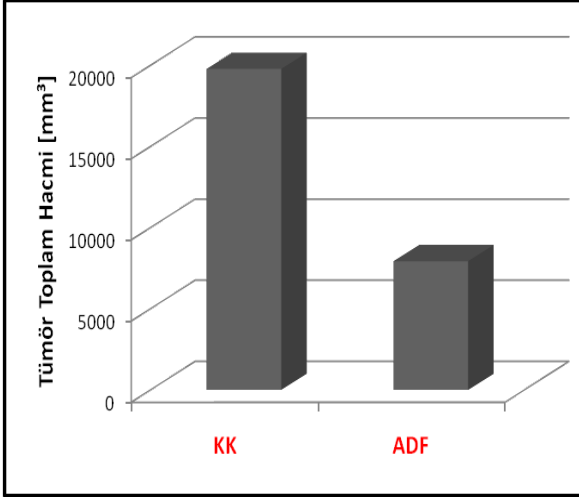
NMU'nun meme dokusu dışında başka organ veya dokuları da etkilediği görüldü. Nekropside; kanser kontrol grubundan 5 sıçanda, alternatif gün besleme grubundan ise 1 sıçanda sol ve/veya sağ böbrekte kistik oluşumlara rastlandı (Resim 2). Ayrıca alternatif gün besleme grubundan 1 sıçanda sol kulağın hemen arkasında trikoepitelyum geliştiği saptandı.



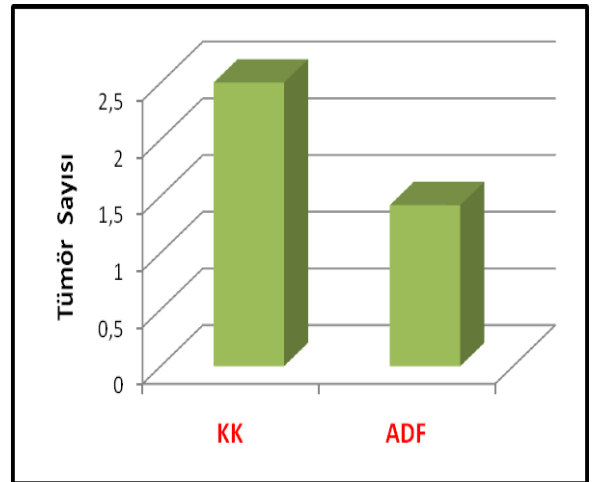
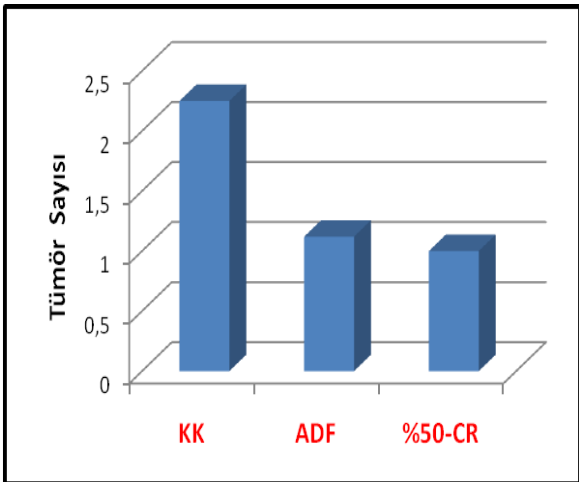
Resim 2. Böbrekte şekillenen kistik oluşum.



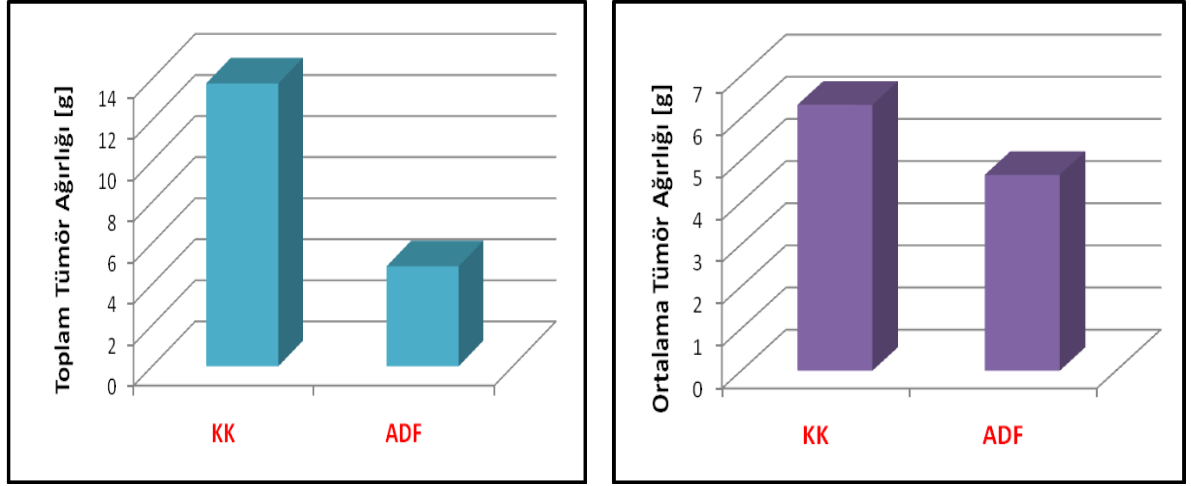
Şekil 12. İlk 6 hafta sonundaki toplam ve ortalama tümör hacimleri.



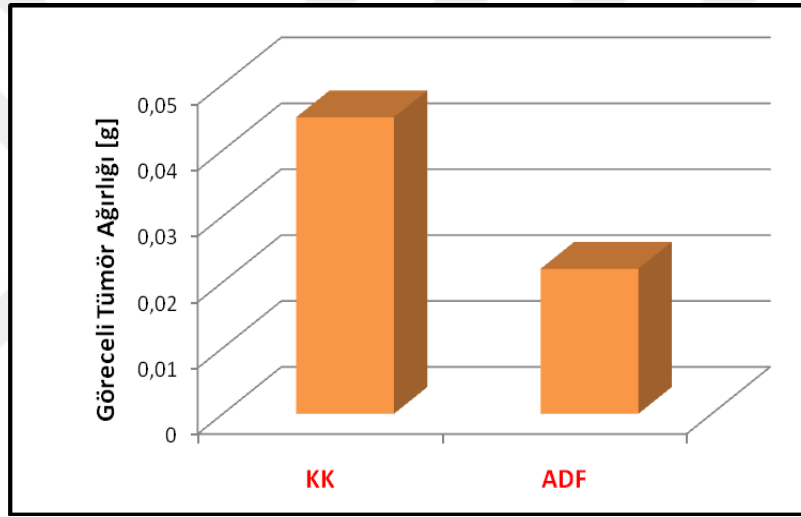
Şekil 13. 12 hafta sonundaki toplam hacim ve ortalama tümör hacimleri.



Şekil 14. İlk 6 hafta (sol) ve 12 hafta (sağ) sonundaki tümör sayıları.



Şekil 15. 12 hafta sonunda toplam ve ortalama tümör ağırlıkları.



Şekil 16. 12 hafta sonunda göreceli tümör ağırlıkları (toplam tümör ağırlığı/canlı ağırlık).

4.5. Plazma Hormon Konsantrasyonları

İlk 6 hafta sonunda deneyden çıkartılan %50-CR grubunun ortalama leptin konsantrasyonunun kontrol, kanser kontrol ve ADF gruplarına göre, adiponektin değerlerinin ise kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. Ancak, kan örneklerinin alınması açısından 6 haftalık bir zaman farkının olduğu göz önüne alındığında, bu karşılaştırma zamanın olası etkisinden arındırılmış değildir ve bu nedenle görecelidir. Buna karşın 12 haftalık deney sürecinin sonunda kontrol, kanser kontrol ve ADF grupları için hazırlanan serum örneklerindeki adiponektin konsantrasyonu ortalama değerleri kontrol ve alternatif gün besleme grubunda kanser kontrol grubuna göre daha yüksekti ($P < 0,01$). Ayrıca, alternatif gün besleme grubunun adiponektin/leptin oranı ortalama değeri diğer iki grubunkine göre daha

yüksekti. Ancak, sadece kanser kontrol grubu ile ADF grubu arasındaki fark anlamlı bulundu ($P<0,05$). İnsülin, IGF-1 ve kortikosteron konsantrasyonları açısından gruplar arasında önemli bir fark görülmedi (Tablo 8).



Tablo 8. Serum insülin, IGF-1, kortikosteron, leptin ve adiponektin konsantrasyonları

	Kontrol	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması	Önemlilik
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
İnsülin (ng/ml)	0,44±0,00	0,47±0,01	0,53± 0,05	0,43±0,01	ÖD
IGF-1 (ng/ml)	178,31±3,17	166,25±9,50	194,56±12,25	156,34±16,64	ÖD
Kortikosteron (pg/ml)	1,65±0,01	1,53±0,04	1,63±0,03	1,64±0,03	ÖD
Leptin (ng/ml)	9,89±0,28 ^b	9,12±0,29 ^b	9,07±0,25 ^b	8,15±0,03 ^a	P<0,001
Adiponektin (ng/ml)	118,20±3,67 ^b	79,23±6,00 ^a	119,52±11,39 ^{bc}	77,36±15,53 ^{ac}	P<0,01
Adiponektin/Leptin (ng/ml)	11,99±0,55 ^{ac}	8,76±0,76 ^a	13,07±0,96 ^{bc}	9,43±1,87 ^{ac}	P<0,05

ÖD; önemli değil.

4.6. Histopatoloji

Sıçanlarda gelişen meme tümörlerinin klasifikasyonu *ad modum* Russo ve Russo (2000) yapıldı ve histopatolojik özellikleri Tablo 9’da özetlendi. Buna göre, toplam 39 meme tümörünün %51,2’si (20/39) malign ve %48,8’i (19/39) benign ve ayrıca %35,8’i (14/39) invaziv ve %64,2’si (25/39) non-invaziv özelliklerdeydi. Tümörlerin 15’i (%38,4) invaziv duktal karsinom (Resim 3), 5’i (%12,8) adenokarsinom (Resim 4), 1’i (%2,5) *in situ* duktal karsinom, 8’i (%20,5) intraduktal papillom (Resim 5), 7’si (%17,9) tubüler adenom (Resim 6), 2’si (%5,1) papillar kistadenom ve 1 tanesi (%2,5) de fibroadenom olarak tanımlandı.

İndüksiyon sonucu gelişen tümörler ve gruplara göre dağılımı Tablo 10 ve Tablo 11 ile Şekil 17’de özetlendi. Çıkarılan toplam 39 tümörün 20’si kanser kontrol, 9’u alternatif gün besleme ve 10 tanesi de %50 kalori kısıtlama grubundaki hayvanlarda gelişti. Kanser kontrol grubundaki 20 tümörün 3’ü (%15) benign ve 17’si (%85) malign, ayrıca 9’u (%45) invaziv ve 11’i (%55) non-invaziv özelliklere sahipti. Buna karşın, ADF grubundaki 9 tümörün 5’i (%55,5) benign ve non-invaziv, 4’ü (%44,5) malign ve invaziv özellikteydi.

Süreç açısından diğer gruplarla bir karşılaştırma yapılamasa da, deneyin ilk 6 haftasının sonunda deneyden çıkarılan %50-CR grubunda gelişmiş olan 10 tümörün tümünün benign ve non-invaziv özellikte olması önemli bir bulguydu.

Tablo 9. NMU ile indüklenen meme tümörlerinin histopatolojik özellikleri ve gruplara göre dağılımı

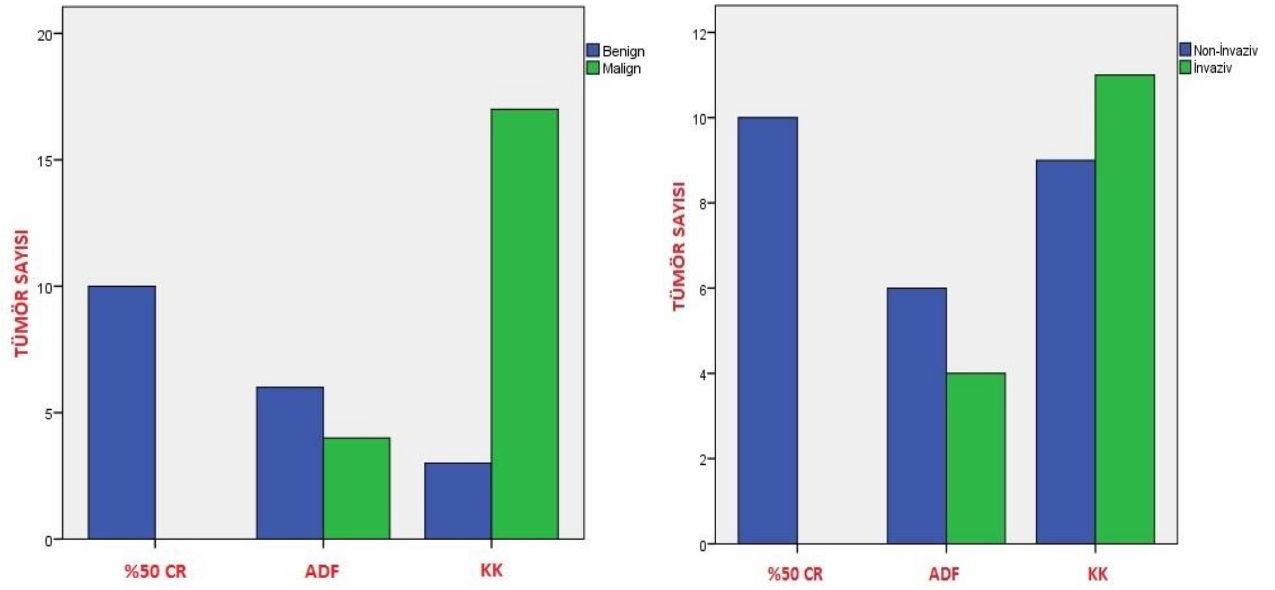
Tümör Tipi	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması	TOPLAM
İnvaziv duktal karsinom	11	4	-	15
Adenokarsinom	5	-	-	5
İn situ duktal karsinom	1	-	-	1
İntraduktal papillom	2	3	3	8
Tübüler adenom	-	1	6	7
Papillar kistadenom	1	-	1	2
Fibroadenom	-	1	-	1
TOPLAM	20	9	10	39

Tablo 10. Benign ve malign tümörlerin gruplara göre dağılımları

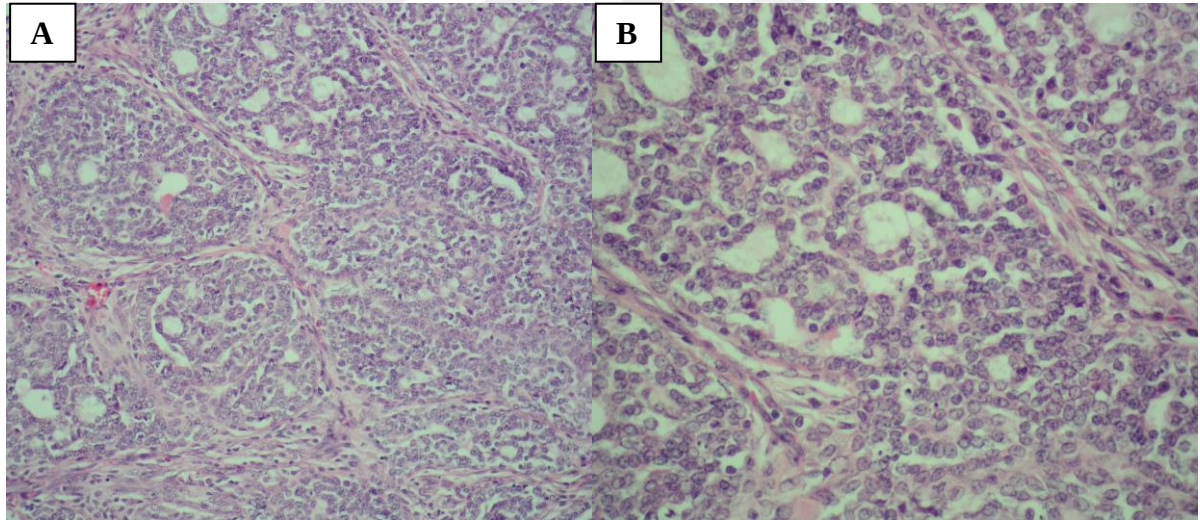
	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması	TOPLAM
Benign	3 (%15)	5 (%55,5)	10 (%100)	19 (%48,7)
Malign	17 (%85)	4 (%44,4)	0 (%0)	20 (%51,2)
TOPLAM	20 (%100)	9 (%100)	10 (%100)	39 (%100)

Tablo 11. Non-invaziv ve invaziv tümörlerin gruplara göre dağılımları

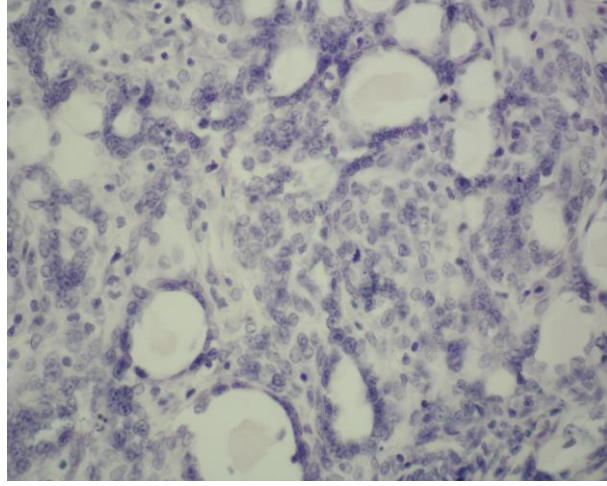
	Kanser Kontrol	Alternatif Gün Besleme	%50 Kalori Kısıtlaması	TOPLAM
Non-İnvaziv	9 (%45)	5 (%55,5)	10 (%100)	25 (%64,1)
İnvaziv	11 (%55)	4 (%44,4)	0 (%0)	14 (%35,8)
TOPLAM	20 (%100)	9 (%100)	10 (%100)	39 (%100)



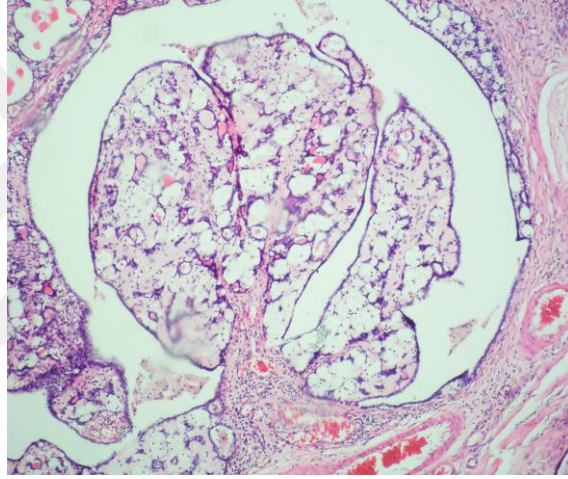
Şekil 17. Benign ve malign ve invaziv ve non-invaziv tümörlerin gruplara göre dağılımı.



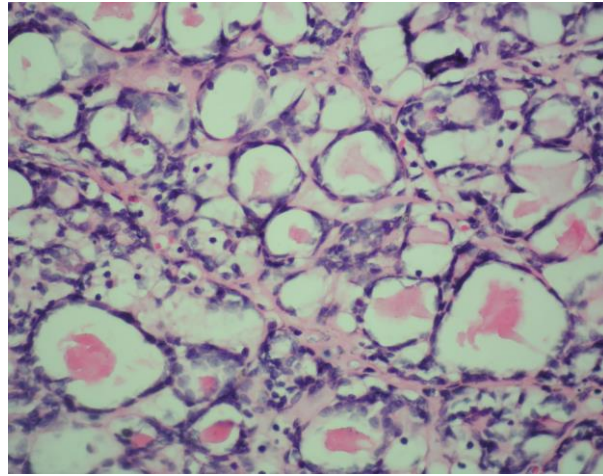
Resim 3. İnvaziv duktal karsinom. (A), Birbirinden belirgin stroma ile ayrılan, tümör hücrelerinin oluşturduğu solid yapılarda farklı büyüklüklerde ikincil lümenler görülmektedir (HEx20). (B), Pleomorfik karakterdeki neoplastik hücrelerin invazyonu görülmektedir (HEx40).



Resim 4. Adenokarsinom. Pleomorfik tümör hücrelerinden oluşan ve çok sayıda mitotik figürün bulunduğu düzensiz ve farklı büyüklüklerdeki alveoller görülmektedir (HEx40).



Resim 5. İntraduktal papillom. Genişlemiş duktus lümenlerinde tek sıralı kübik epitel hücrelerinin sekonder lümenler oluşturduğu papiller uzantılar görülmektedir (HEx10).



Resim 6. Adenom. Birbirinden çok ince bir stroma ile ayrılan, tek sıralı yassı epitel hücreleriyle örtülü alveollerin proliferasyonu görülmektedir (HEx20).

5. TARTIŞMA

Tümör hücrelerinde gelişen direnç nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanılan radyoterapi ve kemoterapi ile başarı çoğunlukla imkânsız gibidir. Ayrıca, kanser için olduğu gibi, sorgulanan etkinlikleri yanında iyi bilinen aşırı yan etkileriyle bu güncel tedavi yöntemleri etkilenen bireylerde ve yakınlarında oluşturdıkları anksiyete, stres ve diğer sonuçlarıyla birlikte önemli bir sağlık sorunu ve toplumsal bir sorundur. Kalori veya diyet kısıtlamaları kemoterapi ve radyoterapinin çeşitli yan etkilerine karşı koruyucu veya önleyici özelliklere sahiptir ve ayrıca tümör gelişmesini önlediği konusunda bulgular giderek artmaktadır. Gerçekte kalori kısıtlaması kanser gelişmesi açısından bu zamana kadar tanımlanan en güçlü fizyolojik inhibitördür (Zhu ve ark, 2007). Kalori kısıtlamaları kanser riskini çeşitli biyolojik ve metabolik yollarla etkiler: hücre proliferasyonu ve DNA sentezini azaltır, apoptozisi artırır ve DNA onarımına katkı sağlar; tüm bu olaylar preneoplastik lezyonların sayısını sınırlandırmaktadır. Kanser etiyolojisinde endokrin sistem de önemli rol oynamaktadır, ancak kalori kısıtlamasının endokrinolojik değişiklikler üzerinden kanser riskini nasıl etkilediği belirsizliğini korumaya devam etmektedir (Sinclair, 2005).

Bu çalışmada farklı kalori kısıtlama yöntemlerinin meme kanseri üzerine etkilerini ve olası etki mekanizmalarını incelemek amacıyla 21 günlük dişi Sprague Dawley sıçanlarda NMU indüksiyonu ile meme kanseri modeli oluşturuldu. Tümör insidansı %82,7 olarak bulundu.

Yapılan çalışmalarda NMU ile tümör indüksiyonu sonucunda hayvanlarda tümör gelişme olasılığı %45 ile %100 arasında değişmektedir. İndüklenmiş tümör insidansını Vegh ve de Salamanca (2007) %45, Yuri ve ark (2004) %55, Gullino ve ark (1975) %73, Liska ve ark (2000) %76, Saminathan ve ark (2014) %82,8, Thompson ve Meeker (1983) %90 ve Thompson ve Adlakha (1991) %100 olarak rapor etmişlerdir. Genel olarak Sprague Dawley sıçanların kimyasal madde indüksiyonu ile oluşturulan meme karsinogenezisine karşı oldukça duyarlı oldukları ileri sürülmekte ve bu soyda karsinogenik cevap iyi karakterize edilmektedir (Thompson ve Sporn, 2002). Ancak, tümör indüksiyonuna duyarlılık ve dirençlilik açısından aynı ırkın soyları arasında da farklılıklar bulunduğu bilinmektedir. Örneğin, Cop ve WKy soyları hem spontan şekillenen hem de indüksiyon ile şekillenen meme tümörlerine karşı oldukça dirençlidirler (Shepel ve Gould, 1999).

Bu çalışmada elde edilen tümör insidansı, Saminathan ve ark (2014)'nın yapmış olduğu çalışmada elde edilen tümör insidansına benzer bulunurken, Thompson ve Meeker (1983) ve

Thompson ve Adlakha (1991)'nin yapmış oldukları çalışmalarda elde edilen tümör insidanslarına göre düşük, Liska ve ark (2000), Gullino ve ark (1975), Yuri ve ark (2004) ve Vegh ve de Salamanca (2007) tarafından belirtilen tümör insidanslarına göre yüksek bulundu.

İlk palpe edilebilen tümör karsinojen enjeksiyonundan sonra 60. günde saptandı. Bu Ashrafi ve ark (2012)'nin dişi Wistar albino sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri bulgularla uyumludur.

Bu çalışmada kullanılan hayvanlarda sağ ve sol meme hattında eşit sayıda tümör gelişti. Thompson ve Meeker (1983), Thompson ve Adlakha (1991) ve Saminathan ve ark (2014)'nin yapmış oldukları çalışmalarda da benzer bulgular rapor edilmiştir.

Görülen tüm meme tümörlerinin %66,6'sı (26/39) abdominal-inguinal, %33,4'ü (13/39) servikal-torakal meme bezlerinde gelişti. Abdominal-inguinal meme bezlerinde servikal-torakal meme bezlerine göre 2 kat daha fazla tümör şekillendi. Bu bulgu, Thompson ve Adlakha (1991)'nin bulguları ile benzerlik göstermektedir, ancak Thompson ve Meeker (1983) ve Saminathan ve ark (2014)'nin elde ettikleri oranlara göre daha düşüktür.

Tümör oranlarında gözlemlenen bu farklılıkların dişi Sprague Dawley sıçanlara NMU'nun veriliş yolu, kullanılan hayvanların soyu ve indüksiyon zamanındaki yaşı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5.1. Yem Tüketimi

Kanser yem tüketimini etkileyebilmektedir. Kanser gelişiminde tümör hücrelerinden salınan IL-1 ve TNF gibi bir takım pro-inflamatuar sitokinler hipotalamusu etkileyerek yem tüketimini baskılayabilir. Pro-inflamatuar sitokinlerin yanında ghrelin ve paratiroid hormon ile ilişkili protein gibi bazı faktörler de kanserin yem tüketimi üzerindeki etkisine aracılık etmektedir (Mendes ve ark, 2015). Örneğin, ghrelin hormonunun subkutan enjeksiyonu rodentlerde (De Boer ve ark, 2007; Lage ve ark, 2008; Fujitsuka ve ark, 2011) ve kanser hastalarında (Neary ve ark, 2004) yiyecek tüketimini artırmıştır. Cleary ve ark (2007) 10 haftalık MMTV-TGF α farelere 80 haftalık oluncaya kadar *ad libitum* besleme, aralıklı besleme (3 hafta %50-CR, 3 hafta *ad libitum*) ve kronik kalori kısıtlaması uygulamışlardır. Kronik kalori kısıtlaması ve aralıklı besleme uygulanan grupların ortalama yem tüketimleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. De Lorenzo ve ark (2011) 8 haftalık dişi BALB/c farelere 5 hafta boyunca *ad libitum* besleme ve %40 kalori kısıtlaması uygulamışlar ve 6. haftada tümör inokülasyonu ile meme kanseri modeli oluşturmuşlardır. İnokülasyondan

4 hafta sonra çalışma sonlandırılmıştır. Kısıtlama uygulanan grubun toplam yem tüketimi *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada kümülatif yem tüketimi değerlendirildi. İlk 6 haftalık deney süreci sonunda %50 kalori kısıtlama grubu 246 ± 60 g, ADF grubu 560 ± 49 g, KK grubu 832 ± 105 g ve K grubu 969 ± 24 g yem tüketti. 12 haftalık deneysel süreçte de kontrol grubunda (1939 ± 49 g) bulunan hayvanların kanser kontrol (1664 ± 210 g) ve alternatif gün besleme (1121 ± 99 g) gruplarına göre biraz daha fazla yem tükettikleri gözlemlendi. Ancak, ortalama yem tüketimi için sadece kontrol ve ADF grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($P < 0,001$).

Çalışmalarda görülen bu farklılığın kanser modeli oluşturma yöntemi (inokülasyon, indüksiyon), diyetler girişimlere başlama ve uygulama sürelerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5.2. Canlı Ağırlık

Diyet, kanser oluşumu ve gelişimi açısından son derece önemlidir. Bu nedenle standart kanser tedavisinin diyetel değişikliklerle desteklenmesi de giderek yaygınlaşmaktadır (Saleh ve ark. 2013). Birçok hayvan modelinde kalori kısıtlamasının kanser insidansını ve gelişimini azalttığı gösterilmiştir (Beauchene ve ark, 1986; Colman ve ark, 2009). Ancak, aşırı kalori kısıtlamasının da kas ve kilo kaybı gibi yan etkileri olabilmektedir (Weiss ve ark, 2007; Miller ve Wolfe, 2008). Ayrıca, hayvan çalışmalarında kalori kısıtlamasıyla ilgili gözlemlenen olumlu sonuçlar çeşitli nedenlere bağlı olarak insan denemelerinde görülmeyebilir. Bu yüzden bazı araştırmacılar alternatif gün beslemenin (aralıklı besleme) kalori kısıtlamasına benzer yararlı etkiler sergileyebileceğini ve hastalarda böyle bir diyet girişiminin çok daha uygun olabileceğini ileri sürmektedirler (Bonorden ve ark, 2009; Buschemeyer ve ark, 2010). Bu çalışmaya benzer şekilde; 4 aylık erkek Sprague Dawley sıçanlara 6 ay boyunca uygulanan alternatif gün besleme sonucu hayvanların canlı ağırlıkları *ad libitum* beslenen sıçanlara göre belirgin olarak azalmıştır (Wan ve ark, 2003). Hubert ve ark (2000)'nın 35 günlük 360 dişi Sprague Dawley sıçanda %55 ve Molon-Noblot ve ark (2005)'nın 35 günlük 240 dişi Sprague Dawley sıçanda %50 kalori kısıtlamasını 106 hafta boyunca uyguladıkları çalışmalarda da, kısıtlama uygulanan sıçanların canlı ağırlıkları *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük bulunmuştur. Ancak, belirtilen çalışmalardaki %50 ve %55 kısıtlama uygulanan gruplarda, bu çalışmada %50 kısıtlama uygulanan hayvanlarda görülen şekilde hızlı bir kilo kaybı gerçekleşmemiştir. Varady ve ark (2007)'nın 8 haftalık erkek C57BL/6J farelerde farklı

oranlarda uyguladıkları modifiye edilmiş alternatif gün besleme yöntemlerinde, ADF-%100 uygulanan farelerin canlı ağırlıkları ADF-%25 ve ADF-%50 uygulananlara göre daha düşük bulunmuştur. Rogozina ve ark (2013)'nın 10 haftalık yaşta MMTV-TGF α farelere 79 (kısıtlama için) veya 82 haftalık (yeniden besleme için) oluncaya kadar uyguladıkları *ad libitum* besleme, aralıklı besleme (3 hafta %50-CR, 3 hafta *ad libitum*) ve kronik kalori kısıtlaması (%25-CR) sonucunda, çalışma boyunca *ad libitum* beslenenlerin canlı ağırlıkları aralıklı besleme ve kalori kısıtlama gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Bir başka çalışmada da 14 haftalık 80 dişi fareye tümör inokülasyonu ile oluşturulan meme kanseri modelinde, inokülasyondan sonra 50 gün farelere sırasıyla %30 kısıtlama, alternatif gün ve *ad libitum* besleme uygulanmış, deney sürecinde ADF grubunda canlı ağırlık kaybı şekillenmezken %30-CR grubunda *ad libitum* beslenenlere göre %12 ağırlık kaybı gözlemlenmiştir (Saleh ve ark, 2013). Buna karşın, Ashrafi ve ark (2012)'nin dişi Wistar albino sıçanlara 50, 65 ve 80 günlük yaşlarda ip 50 mg/kg NMU uygulayarak oluşturdukları meme karsinoma modelinde, tümör büyüklüğü 1,5 cm³'e ulaştıktan 4 hafta sonra sıçanları kurban etmişler ve bu süreçte kontrol ve kanser kontrol grubu canlı ağırlık ölçümleri arasında bir fark tespit edememişlerdir. Benzer şekilde, Bishayee ve Mandal (2014)'in dişi Sprague Dawley sıçanları 57 günlük yaşta 50 mg/kg peros DMBA ile oluşturdukları meme karsinoma modelinde de 16 haftalık deney sürecinde kontrol grubu ortalama canlı ağırlıkları kanser kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında önemli bir fark saptanmamıştır. Benzer şekilde Thomas ve ark (2010), 7-8 haftalık erkek SCID farelere tümör inokülasyonu ile oluşturdukları prostat kanseri modelinde 35 gün farelere *ad libitum* ve aralıklı besleme (haftada 2 gün aç, 5 gün *ad libitum*) uygulamışlar ve çalışma sürecinde iki grup arasında canlı ağırlık yönünden bir fark tespit edememişlerdir.

Bu çalışmada beslenme girişimleri öncesinde kontrol grubunun ortalama canlı ağırlığı diğer grupların canlı ağırlık ortalamalarından daha yüksekti ($P<0,01$). Gruplandırma tümör indüksiyonundan haftalarca sonra, tümörler gelişip öngörülen belirli bir boyuta ulaştığında yapıldığından, böyle bir farklılık kaçınılmaz olmuştur. Ancak, indüksiyonun hayvanlar 21 günlük yaşta rastgele seçimle yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda, bu bulgu kanserojen etkileşiminin hayvanlarda bir gelişme problemine neden olduğuna da işaret etmektedir.

Hayvanların canlı ağırlıkları 12 haftalık deney sürecinde önemli değişiklikler gösterdi. Kontrol ve kanser kontrol grubundaki hayvanların ortalama canlı ağırlıklarında yavaş, ancak düzenli bir artış görüldü. Alternatif gün besleme grubunda 12 haftalık deney sürecinde ortalama 32 g (%12,16) bir azalma görülürken, %50 kalori kısıtlaması hızlı bir kilo kaybı ile

sonuçlandı. Bu gruptaki hayvanlar 6 hafta içinde canlı ağırlıklarının ortalama %26-38'ini kaybetti ve grup için deney sonlandırıldı. Kalori kısıtlaması uygulanan gruptan sadece ilk 6 haftanın verileri toplanabildiği için, değerlendirmede canlı ağırlıklar önce 4 grubun ilk 6 haftadaki değişimleri ve sonra 3 grubun 12 hafta sürecindeki değişimleri açısından ayrı ayrı incelendi. İlk 6 haftada zamanın canlı ağırlıklar üzerine etkisinin önemli olduğu, ayrıca bu açıdan zaman ile girişimler arasında önemli etkileşimler bulunduğu saptandı. Kontrol grubunun ortalama canlı ağırlığı (347 ± 10 g), kanser kontrol (305 ± 14 g), ADF (241 ± 7 g) ve %50-CR (185 ± 18 g) gruplarına göre belirgin olarak daha yüksekti. Ayrıca, kanser kontrol grubunun ortalama canlı ağırlığı da ADF ve %50-CR gruplarının canlı ağırlık ortalamalarından daha yüksek bulundu. Buna karşın, ADF ve %50-CR gruplarının canlı ağırlık ortalama değerleri arasında önemli bir fark yoktu. Üç grup için 12 haftalık deney sürecindeki ortalama canlı ağırlık değişimleri incelendiğinde de; kontrol grubunun ortalama canlı ağırlığının (365 ± 10 g) kanser kontrol (316 ± 16 g) ve ADF (231 ± 8 g) gruplarına göre ve kanser kontrol grubunun ortalama ağırlığının da ADF grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Değişik çalışmalarda gözlemlenen bu farklılıklar kullanılan hayvanların türü ve soyu, tümör indükleyicileri ve diyetler girişimlerin uygulanmaya başladığı zaman ve uygulanma süresi gibi faktörlerin bir sonucu olabilir.

5.3. Tümör Hacmi

İlk kez 1914 yılında Rous kalori kısıtlamasının farelere transplante edilen tümörlerin gelişmesini yavaşlattığını, böylece hayvan modellerinde tümör gelişmesinin kalori alınmasına bağımlılığını göstermiştir (Rous, 1914). Daha sonra Tannenbaum (1940), yetersiz beslenmenin farklı fare soylarında spontan veya indüklenmiş tümörlerin gelişmesini inhibe ettiğini tespit etmiştir. Ayrıca Tannenbaum (1946) kalori kısıtlamasının kanser riskini azaltmada tümörigenezisin başlangıç evresinden ziyade gelişim evresinde daha etkili olduğunu ve *ad libitum* beslemeyi takiben uygulanan kalori kısıtlamasının tümör gelişmesinin başlangıç evresinde etkisiz olduğunu göstermiştir. Thomas ve ark (2010), 7-8 haftalık erkek SCID farelere 1×10^5 LAPC-4 prostat kanser hücrelerini inoküle etmişler, tümör hacimleri 200 mm^3 'e ulaştıktan sonra farelere *ad libitum* ve haftada 2 gün aç, 5 gün *ad libitum* olacak şekilde aralıklı besleme uygulamışlar ve tümör hacimleri 1000 mm^3 'e ulaştıktan sonra fareleri kurban etmişlerdir. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, iki grup arasında tümör hacmi

açısından bir fark tespit edilmemiştir. Buna karşın, Zhu ve ark (1997), 21 günlük Sprague Dawley sıçanlarda 50 mg/kg ip NMU ile oluşturdukları meme karsinogenezis modelinde, indüksiyondan 8 gün sonra %10, %20 ve %40 oranlarında kalori kısıtlaması uygulamaya başlamışlar ve kalori kısıtlamasının 35 günlük deney sürecinde tümör hacmini kısıtlamanın derecesine bağlı olarak azalttığını saptamışlardır. Rocha ve ark (2002), 10 haftalık erkek Wistar albino sıçanlara 200 mg/kg ip dietilnitrozamin indüksiyonu ile oluşturulan karaciğer karsinogenezisinde, indüksiyondan 4 hafta sonra hayvanlara 48 hafta süreyle haftada 48 saat aç olacak şekilde aralıklı besleme uygulamışlardır. Çalışma sonunda preneoplastik lezyonların gelişmesinin inhibe olduğu ve ayrıca karaciğerdeki nodüllerin sayılarının ve büyüklüklerinin azaldığı tespit edilmiştir. Varady ve ark (2008) 7 haftalık dişi C57BL/6J farelere 4 hafta boyunca %25-CR, ADF-%75, ADF-%85, ADF-%100 ve *ad libitum* besleme uygulamışlar ve kontrollere göre meme epitel hücre proliferasyonunun ADF-%100 grubunda %62, %25-CR grubunda %70 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Saleh ve ark (2013) da 14 haftalık 80 dişi fareye tümör inokülasyonu ile oluşturulan meme kanseri modeli çalışmasında, tümör hacmi yaklaşık 60 mm³'e ulaştıktan sonra farelere sırasıyla %30 kısıtlama, alternatif gün ve *ad libitum* besleme uygulamışlar ve tümör hacmi yaklaşık 2000 mm³'e ulaştıktan sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. ADF grubuna göre %30 kısıtlama uygulanan grupta tümör gelişiminde daha fazla oranda bir gerileme olmuştur. Harvey ve ark (2013) 6 haftalık dişi C57BL/6 farelere 22 hafta boyunca *ad libitum* besleme ve %30 kalori kısıtlaması uygulamışlar, 22. haftada tümör hücre inokülasyonu ile kolon kanseri oluşturmuşlar ve diyeter uygulamaların tümörigenezis üzerindeki etkisini inokülasyondan sonra 24 gün boyunca değerlendirmişlerdir. Bu süreç sonunda deney sonu ortalama tümör hacminin %30 kalori kısıtlama grubunda *ad libitum* beslenen gruba göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Phoenix ve ark (2010) da 6-8 haftalık dişi BALB/c farelerde tümör inokülasyonu sonucu oluşturdukları meme kanseri modelinde deney sonu ortalama tümör hacminin %40 kısıtlama uygulanan grupta *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada üç grup (KK, ADF ve %50-CR) için ilk 6 hafta ve iki grup (KK ve ADF) için 12 hafta değerlendirildiğinde, zaman için eşleştirmeli karşılaştırmalar tümör hacmi ortalama değerlerinin gruplarda zamanla farklılıklar gösterdiğini ortaya koysa da (Ek-2), çoklu karşılaştırmalarda gruplar arasında önemli bir farklılık görülmedi. Kısaca, 12 haftaya kadar devam eden deneysel süreç ve diyeter girişimler tümör hacmi üzerine önemli bir etkide bulunmadı (P>0,05).

Yapılan çalışmaların birçoğunda diyeter girişimler tümör indüksiyonundan önce, tümör indüksiyonu ile eş zamanlı veya indüksiyonu izleyen kısa bir zaman diliminde başlatılmıştır.

Bu çalışmada tümör indüksiyonundan haftalar sonra, tümör boyutu 10-12 mm çaplara ulaştıktan sonra diyetler girişimler uygulandı. Kanser kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, deneyin ilk 6 haftalık sürecinde %50 kalori kısıtlamasının tümör hacminde önemli bir azalmaya neden olduğu ($P<0,05$), buna karşın alternatif gün besleme uygulamasının tümör hacmi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görüldü. Benzer şekilde, alternatif gün besleme 12 haftalık süreçte de tümör hacmi üzerine önemli bir etki oluşturmadi. Rocha ve ark (2002), Varady ve ark (2008) ve Saleh ve ark (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında, alternatif gün beslemenin tümör hacmi üzerine önemli bir etkisinin gözlemlenmemesi, diyetler girişimlerin tümör gelişiminin oldukça geç evresinde uygulanmaya başlamış olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, bu çalışmada %50 kalori kısıtlamasının 6 hafta gibi kısa bir sürede tümör hacmi üzerine sınırlayıcı bir etkide bulunduğu saptanması önemli bir bulgudur ve ileri evre tümörlere diyetler girişimde radikal yaklaşımların başarı şansının olduğuna işaret etmektedir.

Zhu ve ark (1997), 21 günlük Sprague Dawley sıçanlara 50 mg/kg NMU indüksiyonu sonucu oluşturdukları meme kanseri modelinde, karsinogen indüksiyonundan 4 gün sonra %10, %20 ve %40 kalori kısıtlaması uygulamışlar ve 5 hafta sonra hayvanları kurban etmişlerdir. *Ad libitum* beslenenlerde birim hayvan başına ortalama tümör hacminin (son tümör hacmi/tümör sayısı/sıçan) en yüksek olduğunu, kısıtlamanın derecesine bağlı olarak hayvanların ortalama tümör hacimlerinin giderek azaldığını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada da hayvan başına ortalama tümör hacmi değerlendirilmiştir. Hayvan başına ortalama tümör hacmi açısından 6 ve 12 hafta sonunda gruplar arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Çalışmada, Zhu ve ark (1997)'dan farklı sonuç elde edilmesinin sebebi diyetler uygulamaların tümör indüksiyonundan en erken 8-10 hafta sonra başlamış olması olabilir.

5.4. Tümör Sayıları ve Tümör Ağırlıkları

Kalori kısıtlaması, spontan, indüklenmiş veya transplante edilmiş çeşitli tümörlerin insidansını kısıtlamanın derecesine bağlı olarak değişen derecelerde azaltmaktadır (Kritchevsky ve ark, 1984; Klurfeld ve ark, 1987; Kritchevsky, 1997). Thompson ve ark (2004), Zhu ve ark (2005) ve Jiang ve ark (2008) tarafından bu çalışmaya benzer şekilde 21 günlük Sprague Dawley sıçanlara 50 mg/kg NMU indüksiyonu sonucu oluşturulan meme kanseri modellerinde, karsinogen indüksiyonundan sırasıyla 9, 4 ve 5 gün sonra diyetler

girişimler uygulanmaya başlanmış ve karsinojen uygulamasından 78, 49 ve 52 güne kadar devam etmiştir. Bu süreçlerde %40 kalori kısıtlama grubundaki sıçanlarda birden çok tümör görülme sıklığının *ad libitum* beslenen kontrollere göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, deneyin ilk 6 haftasında kanser kontrol, alternatif gün besleme ve %50 kalori kısıtlama grupları şekillenen “palpe edilebilir meme tümörleri” ve 12 haftalık deney süreci sonunda kanser kontrol ve alternatif gün besleme grupları “palpe edilebilir ve edilemeyen meme tümörleri” açısından karşılaştırıldı. Kanser kontrol grubunda ($2,25 \pm 0,41$) birden çok tümör görülme sıklığı ADF ($1,12 \pm 0,12$) ve %50-CR ($1,00 \pm 0,00$) gruplarına göre belirgin olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla; $P=0,015$, $P=0,004$). Buna karşın, ADF ve %50-CR grupları arasında önemli bir fark yoktu. Ancak, 12 haftalık deney sonunda da palpe edilebilen ve/veya edilemeyen meme tümörleri sayısı kontrol grubundaki sıçanlarda ($2,50 \pm 0,42$), ADF ($1,42 \pm 0,29$) grubundaki sıçanlara göre daha yüksekti ($P<0,05$). Bu çalışmada da tümör gelişiminin ileri safhasında uygulanmaya başlanılan diyetler girişimlerin yeni tümör oluşumunu engellediği görüldü.

Cleary ve ark (2007), 10 haftalık MMTV-TGF α farelerine 60 hafta süreyle uyguladıkları *ad libitum* besleme, aralıklı besleme ve kronik kalori kısıtlaması çalışmasında tümör ağırlıklarının *ad libitum* beslenenlerde en yüksek, kısıtlama uygulananlarda ise en düşük değerlere sahip olduğunu saptamışlardır. De Lorenzo ve ark (2011) 8 haftalık BALB/c farelerine 5 hafta boyunca *ad libitum* ve %40 kalori kısıtlaması uygulamışlar, deneyin 6. haftasında tümör inokülasyonu ile meme kanseri oluşturmuşlar ve inokülasyondan 4 hafta sonra deneyi sonlandırmışlardır. Araştırmacılar, deney sonunda çıkartılan tümör ağırlıklarının %40 kısıtlama grubunda *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Nogueira ve ark (2012) ovariectomize 6-8 haftalık C57BL/6 farelerde 8 hafta boyunca diyet indüksiyonu ile obezite oluşturduktan sonra 10 hafta boyunca *ad libitum* besleme ve %30 kalori kısıtlaması uygulamışlar, hayvanlar 12 haftalık olduklarında tümör inokülasyonu ile meme kanseri oluşturmuşlar ve 18. haftada deneyi sonlandırmışlardır. Bu süreç sonunda tümör ağırlıkları kalori kısıtlaması uygulanan gruplarda *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük bulunmuştur. Buna karşın, Rogozina ve ark (2013) MMTV-TGF α farelere 10 haftalık olduklarında uygulamaya başladıkları *ad libitum* besleme, aralıklı besleme ve kronik kalori kısıtlaması çalışmasında, spontan gelişen tümörlerin ağırlıklarının kısıtlama uygulanan grupta *ad libitum* beslenenlerinkine göre belirgin olarak daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada deneyin sonlandırılma aşamasında yapılan nekropside çıkartılan tümörlerin ağırlıkları belirlendi. İlk 6 hafta sonunda %50-CR grubundaki sıçanların toplam tümör ağırlıkları ortalaması $0,5 \pm 0,2$ g'dı. 12 haftalık süreç değerlendirildiğinde, kanser

kontrol (13 ± 3 g) grubuna göre alternatif gün beslenen (4 ± 2 g) grupta toplam tümör ağırlıkları ortalamasının bir azalma gösterdiği, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı görüldü.

De Lorenzo ve ark (2011) 8 haftalık BALB/c farelerine 5 hafta boyunca *ad libitum* ve %40 kalori kısıtlaması uygulamışlar, 6. haftada tümör inokülasyonu ile meme kanseri oluşturmuşlar ve tümör inokülasyonundan 4 hafta sonra deneyi sonlandırmışlardır. Araştırmacılar, tümör ağırlığının canlı ağırlığa oranının %40 kısıtlama grubunda *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

İlk 6 hafta sonunda her bir sıçan için ortalama tümör ağırlığı (tümör ağırlığı/tümör sayısı/sıçan) %50-CR grubundaki sıçanlarda $0,3\pm0,1$ ve 12 haftalık deney sürecinin sonunda kanser kontrol grubunda 6 ± 2 ve alternatif gün beslenen grupta 4 ± 2 g'dı. Tümör ağırlıklarının son canlı ağırlıklara oranı olarak hesaplanan göreceli tümör ağırlığı ortalaması %50-CR grubunda ilk 6 hafta için $0,002\pm0,001$ olarak hesaplandı. 12 haftalık deney süreci sonunda kanser kontrol grubu ve alternatif gün besleme grubu için hesaplanan değerler sırasıyla $0,04\pm0,01$ ve $0,02\pm0,01$ düzeyindeydi. Bu iki değişkenin ortalama değerleri kanser kontrol grubunda alternatif gün beslenen grubunkinden daha yüksek olsa da, iki grup arasındaki fark anlamlı değildi. Bu çalışmada De Lorenzo ve ark (2011)'dan farklı olarak 12 haftalık deneysel süreç sonunda tümör ağırlığının canlı ağırlığa oranı açısından ADF ve KK grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Bu çalışmada; *ad libitum* beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tümör indüksiyonundan haftalar sonra uygulanmaya başlayan ADF'nin tümör ağırlığını etkilemediği görüldü. Yukarıda belirtilen çalışmalardan genel olarak farklı olan bu bulgu, diyetler girişimin tümör gelişiminin ileri evresinde başlamasıyla ilgili olabilir.

5.5. Plazma Hormon Konsantrasyonları

Hormonların konsantrasyonları için de %50 kalori kısıtlama grubunun ilk 6 haftalık verileri bulunduğundan, karşılaştırmalar 12 haftalık deney sürecini tamamlayan üç grup için yapıldı.

Adiponektin kanda en fazla bulunan adipokinlerden biridir. Adiponektinin kanser gelişmesine karşı koruyucu bir rol üstlendiği ileri sürülmektedir. Meme kanserinde plazma adiponektin konsantrasyonu ve tümörün histopatolojik derecesi arasında ters bir ilişki bulunmuştur (Miyoshi ve ark, 2003). *In vitro* çalışmalarda da adiponektinin insan meme

kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozisi desteklediği bildirilmiştir (Dieudonne ve ark, 2006; Dos Santos ve ark, 2008). Adiponektinin birçok etkilerinden biri de PI3K/AKT/mTOR yolağının güçlü bir inhibitörü olmasıdır ve böylece kanser hücre gelişmesini önleyebilir (Hebbard ve Ranscht, 2014). De Lorenzo ve ark (2011)'nın BALB/c ve Nogueira ve ark (2012)'nin ovarektomize C57BL/6 farelerde tümör inokülasyonu ile oluşturdukları meme kanseri modellerinde serum adiponektin konsantrasyonları %40 ve %30 kalori kısıtlaması uygulanan gruplarda *ad libitum* beslenenlere göre daha yüksek bulunmuştur. Harvey ve ark (2013) da C57BL/6 farelerde oluşturdukları kolon kanseri modelinde kısıtlama uygulanan ve *ad libitum* beslenen gruplar arasında adiponektin konsantrasyonları açısından benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Buna karşın, Rogozina ve ark (2013) MMTV-TGF α farelere %25 kalori kısıtlaması, aralıklı besleme (3 hafta boyunca %50 kalori kısıtlaması, izleyen 3 hafta boyunca *ad libitum* besleme) ve *ad libitum* besleme uygulamışlar ve adiponektin konsantrasyonu için gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada ilk 6 hafta sonunda %50 kalori kısıtlama grubundaki hayvanlardan alınan kan örneklerinden hazırlanan serumlarda ortalama adiponektin konsantrasyonu 77 ± 15 ng/ml'dir. 12 haftalık deney süreci sonunda alternatif gün beslenen (119 ± 11 ng/ml) ve kontrol (118 ± 3 ng/ml) gruplarında bulunan hayvanların ortalama serum adiponektin konsantrasyonları kanser kontrol grubunun ortalama serum adiponektin konsantrasyonundan (79 ± 6 ng/ml) daha yüksekti ($P < 0,01$). Ancak, ADF ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. Buna göre; kanser kontrollerle karşılaştırıldığında, alternatif gün besleme uygulamasının tümörigenezis üzerindeki etkisini serum adiponektin konsantrasyonunu değiştirme yoluyla gösterebildiği düşünülmektedir. Bulgular Rogozina ve ark (2013)'nın çalışmasının bulgularını desteklememektedir. Bu farklılığın sebebinin kullanılan hayvan türü ile diyeter girişimin başlama ve uygulama süresinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dolaşımdaki leptinin meme kanseri riski ve gelişmesi üzerindeki etkisi halen tam olarak net değildir. Bazı araştırmacılar meme kanseri gelişmiş kadınlarda serum leptin konsantrasyonunun artış gösterdiğini ileri sürerken (Tessitore ve ark, 2000; Goodwin ve ark, 2005), bazıları da leptin ve meme kanseri arasında hiçbir ilişkinin olmadığını veya ters yönde bir ilişkinin olduğunu belirtmektedirler (Mantzoros ve ark, 1997; Petridou ve ark, 2000; Coskun ve ark, 2003; Sauter ve ark, 2004; Woo ve ark, 2006). Ayrıca, dolaşımdaki leptin konsantrasyonu total adipoz doku miktarıyla doğru orantılıdır; obez bireylerde artış gösterirken zayıf bireylerde düşüktür (Maffei ve ark, 1995; Considine ve ark, 1996). Kanser

majör risk faktörlerinden biri obezitedir ve adipokin profilindeki değişikliklerin obezite ve kanser riski arasındaki ilişkide temel mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir (De Pergola ve Silvestris, 2013). De Lorenzo ve ark (2011)'nın BALB/c, Nogueira ve ark (2012)'nin ovarektomize C57BL/6 farelerde tümör inokülasyonu sonucu oluşturdukları meme kanseri modellerinde sırasıyla %40 ve %30 kalori kısıtlaması uygulanan grupların *ad libitum* beslenenlere göre serum leptin konsantrasyonları daha düşük bulunmuştur. Dolaşımdaki leptin ve meme kanseri arasındaki ilişkiler olgu kontrol çalışmalarında da incelenmiştir. Meme kanseri premenopozal (Mantzoros ve ark, 1997) ve postmenopozal (Petridou ve ark, 2000) kadınlarda kontrollere göre leptin konsantrasyonunun düştüğü, ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Bu çalışmada 12 haftalık deney süreci sonunda beslenme girişimlerinin sıçanların leptin konsantrasyonları üzerine önemli bir etkisi saptanmadı.

Adiponektinin leptine oranının da kanser gelişiminde önemli olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak, yüksek adiponektin/leptin oranının kanserin önlenmesinde bir etkisinin olup olmadığı halen belirsizliğini korumaktadır (Grossman ve Cleary, 2012). MMTV-TGF α farelere uygulanan %25 kalori kısıtlaması, aralıklı besleme (3 hafta boyunca %50 kalori kısıtlaması, izleyen 3 hafta boyunca *ad libitum* besleme) ve *ad libitum* beslemede adiponektin/leptin oranı aralıklı beslemenin kısıtlama aşamasında diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur (Rogozina ve ark, 2011; 2013; Dogan ve ark, 2010).

Bu çalışmada dişi Sprague Dawley sıçanları için hesaplanan adiponektin/leptin oranı %50 kısıtlama grubunda ilk 6 haftalık deneysel süreç sonunda 9 ± 1 'dir. Bu oran, ADF ($13 \pm 0,9$) ve kontrol ($11 \pm 0,5$) gruplarında kanser kontrol ($8 \pm 0,7$) grubuna göre daha yüksekti. Ancak, istatistiksel analizler sadece ADF ve kanser kontrol grupları arasındaki farkı onayladı ($P < 0.05$). Bu bulgulara göre, *ad libitum* beslenen sağlıklı sıçanlarda ve meme tümörü gelişmiş ve alternatif gün besleme uygulanmış sıçanlarda adiponektin/leptin oranı meme tümörü gelişmiş *ad libitum* beslenen sıçanlara göre daha yüksektir. Bir başka deyişle, alternatif gün besleme hayvanların adiponektin üretmelerini ve/veya kullanmalarını, ya da bu ikisi arasındaki dengeyi koruyucu bir etki göstermiştir. Alternatif gün beslemenin yeni tümörlerin oluşumunun engellenmesinde, kısmen de olsa, yükselmiş olan bu adiponektin/leptin oranının da etkili olma olasılığı vardır.

Enerji alımının kısıtlanması birçok hayvan modelinde karsinogenezi inhibe etmektedir. Benzer şekilde, enerji restriksiyonunun metabolik sonuçlarının birçoğu insülin ve IGF-1 konsantrasyonlarının azalması ile sonuçlanmıştır (Renehan ve ark, 2006). İnsülin ve IGF-1 konsantrasyonlarının azalması enerji kısıtlamasının önemli anti-kanserojen etkilerinden

birisi (Sell, 2003) olmakla birlikte, bugün de bu kompleks mekanizma ile ilgili cevaplanmamış ve araştırılması gereken birçok soru bulunmaktadır (Renehan ve ark, 2006). Thomas ve ark (2010), 7-8 haftalık erkek SCID farelerde tümör inokülasyonu ile oluşturdukları prostat kanseri modelinde farelere 35 gün süreyle *ad libitum* ve aralıklı besleme (haftada 2 gün aç, 5 gün *ad libitum*) uygulamışlar ve serum insülin konsantrasyonu açısından iki grup arasında bir fark tespit etmemişlerdir. Rogozina ve ark (2013) da MMTV-TGF α farelerde yapmış oldukları meme kanseri çalışmasında aralıklı beslemenin beslenme aşamasında, *ad libitum* besleme ve kronik kalori kısıtlaması uygulanan gruplar arasında serum IGF-1 konsantrasyonu açısından bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Buna karşın, Zhu ve ark (2005) bu çalışmaya benzer şekilde oluşturdukları meme kanseri modelinde %40 kalori kısıtlaması uygulanan grubun serum insülin ve IGF-1 konsantrasyonlarını *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük bulmuşlardır. BALB/c ve ovarektomize C57BL/6 farelerde tümör inokülasyonu sonucu oluşturulan meme kanseri modelinde %30 ve %40 kalori kısıtlaması uygulanan grupların *ad libitum* beslenenlere göre serum insülin ve IGF-1 konsantrasyonları daha düşük bulunmuştur (De Lorenzo ve ark, 2011; Nogueira ve ark, 2012). Phoenix ve ark (2010)'nın BALB/c farelere tümör inoküle ederek oluşturdukları meme kanseri modelinde, %30 kısıtlama grubunun serum insülin ve IGF-1 konsantrasyonları *ad libitum* beslenenlere göre daha düşük bulunmuştur. Harvey ve ark (2013) da, kolon kanseri modelinde benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Rogozina ve ark (2013) MMTV-TGF α farelerde yapmış oldukları meme kanseri çalışmasında, serum IGF-1 konsantrasyonunu *ad libitum* beslenenlere ve aralıklı beslemenin beslenme aşamasında olanlara göre aralıklı beslemenin kısıtlama aşamasında daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Buna karşın, 7-8 haftalık erkek SCID farelere tümör inoküle edilerek oluşturulan prostat kanseri modelinde aralıklı besleme uygulananların serum IGF-1 konsantrasyonunu *ad libitum* beslenenlere göre daha yüksek bulunmuştur (Thomas ve ark, 2010).

Bu çalışmada 12 haftalık deney sürecinde beslenme rejimlerinin sıçanların serum insülin ve IGF-1 konsantrasyonları üzerine önemli bir etkisi saptanmadı.

Glikokortikoidlerin de kanser hücre gelişimi üzerinde etkileri bulunmakla birlikte, nasıl etki gösterdikleri net değildir. *In vitro* koşullarda GC'lerin meme kanser hücre gelişimini doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir (Lippman ve ark, 1976). Buna karşın, GC'ler adipoz dokudan adiponektin üretimini azaltırken (Fried ve ark, 1998; Sewter ve ark, 1999; Fasshauner ve ark, 2002) leptin üretimini artırmaktadır (Shojima ve ark, 2002; Vicennati ve ark, 2002). Bu nedenle, GC'lerin dolaşımdaki adipokin profillerinde oluşturdukları bu değişiklikler aracılığıyla da meme kanseri gelişimi, devamlılığı ve metastazı üzerinde uyarıcı

bir etkilerinin olabileceği tartışılmaktadır (Shpilberg ve ark, 2015). 21 günlük Sprague Dawley sıçanlarda NMU ile oluşturulan meme kanseri modelinde, %40 kalori kısıtlaması uygulanan grubun serum kortikosteron konsantrasyonu *ad libitum* beslenenlere göre daha yüksek bulunmuştur (Zhu ve ark, 2005).

Bu çalışmada 12 haftalık deney sürecinde beslenme rejimlerinin sıçanların serum kortikosteron konsantrasyonları üzerine önemli bir etkisi saptanmadı. Bu çalışmada tümör indüksiyonundan haftalar sonra diyetler girişimlerin uygulanmaya başlaması ve diyetler girişimlerin uygulanma süresi böyle bir farklılığa neden olmuş olabilir.

5.6. Histopatoloji

Sıçanlara kimyasal madde verilerek indüklenen meme karsinomaları duktal meme epitel hücrelerinden köken alır. İnsan meme kanserlerinin büyük çoğunluğunun duktal histogenezise sahip olması nedeniyle, bu durum oldukça önemlidir. Bu karsinomlar insanlarda şekillenen meme karsinomları ile benzer patogeneze sahiptir (Thompson ve Sporn, 2002). Bu amaçla meme kanseri modellemelerinde NMU ve DBMA karsinojen maddeleri sıklıkla kullanılır. NMU, meme bezi için çok daha spesifik bir karsinojendir ve DBMA'nın aksine, yarılanma ömrü daha kısadır. NMU indüksiyonu sonucu şekillenen meme tümörleri çoğunlukla östrojen bağımlıdır, lokal olarak agresiftir ve metastaz yapabilir (Saminathan ve ark, 2014). Ayrıca, NMU indüksiyonu sonrasında şekillenen meme tümörleri daha az sıklıkta benign karakter sergiler (Gullino ve ark, 1975; McCormick ve ark, 1981; Thompson ve Adlakha 1991). Saminathan ve ark (2014), dişi Sprague Dawley sıçanları 50, 80 ve 110 günlük yaşlarda 50 mg/kg ip NMU ile indüklemişler ve sıçanları 28 hafta sonra sakrifiye etmişlerdir. Şekillenen 44 meme tümörünün %88,64'ü malign, %11,36'sı benign olarak tanımlanmıştır. Bu meme tümörlerinden 2'si tubüler adenom, 2'si fibroadenom, 1'i papiller adenom, 13'ü invaziv duktal karsinom, 17'si invaziv karsinom ve 8'i adenokarsinom olarak tanımlanmıştır. Zhu ve ark (1997), bu çalışmaya benzer şekilde, 21 günlük dişi Sprague Dawley sıçanlarda 50 mg/kg NMU ip enjeksiyonu ile meme karsinoma modeli oluşturmuşlar, indüksiyondan 6 gün sonra sıçanlara *ad libitum* besleme, %10-CR, %20-CR ve %40-CR uygulamışlar ve karsinojen indüksiyonundan 35 gün sonra sıçanları sakrifiye etmişlerdir. Deney sürecinin sonunda kalori kısıtlamalarının meme karsinogenezisinin pre-malign ve malign evreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve kısıtlamanın derecesine bağlı olarak adenokarsinom oranının azaldığı, ancak intraduktal proliferasyon ve *in situ* duktal karsinom oranının arttığı tespit edilmiştir. Bu

araştırmacılar, benzer şekilde karsinoma modeli oluşturdıkları bir başka çalışmada da sıçanlara karsinojen enjeksiyonunu takiben 4 gün sonra *ad libitum* besleme ve %40 kısıtlama uygulamışlar ve *ad libitum* beslenen grubun adenokarsinom insidansı %96,6 iken %40 kısıtlama grubunda %56,7 olarak bulunmuştur. Sprague Dawley sıçanlarda yapılan bir çalışmada pre-malign meme patolojilerinin insidansı *ad libitum* beslenenlerde %55,2, kısıtlama uygulananlarda da %50 olarak tespit edilmiştir (Zhu ve ark, 2005). Cleary ve ark (2007) 10 haftalık MMTV-TGF α farelere *ad libitum* besleme, aralıklı besleme (3 hafta %50 kısıtlama izleyen 3 hafta *ad libitum* besleme) ve kronik kalori kısıtlaması uygulamışlar ve hayvanlar 79 (12. kısıtlamanın sonu) veya 80 (12. yeniden beslemeden 1 hafta sonra) haftalık olduklarında sakrifiye edilerek çalışma sonlandırılmıştır. Bu süreçte *ad libitum* beslenen kontrol grubunda 75, aralıklı besleme grubunda 14 ve kalori kısıtlama grubunda 20 meme tümörü şekillenmiştir. *Ad libitum* beslenen kontrol grubundaki 75 tümörün 2'si yüksek dereceli ve 51'i de düşük dereceli adenokarsinom, 15'i atipik hiperplazi ve 7'si benign olarak tanımlanmıştır. Kalori kısıtlama grubundaki 20 tümörün ise 1'i yüksek dereceli ve 12'si düşük dereceli adenokarsinom, 3'ü atipik hiperplazi ve 4'ü benign olarak tanımlanırken, aralıklı besleme grubunda 14 tümörün 8'i düşük dereceli adenokarsinom, 6'sı benign olarak tanımlanmış ve yüksek dereceli adenokarsinom ve atipik hiperplaziye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada gelişen 39 tümörün 20'si (~%51.3) kanser kontrol, 9'u (~%23.1) alternatif gün besleme ve 10 tanesi (~%25.6) de %50 kalori kısıtlama grubundaydı. Kanser kontrol grubundaki 20 tümörün 3'ü (%15) benign, 17'si (%85) malign; 9'u (%45) invaziv ve 11'i (%55) non-invaziv özellik sergilerken, ADF grubundaki 9 tümörün 5'i (%55,5) benign ve non-invaziv ve sadece 4'ü (%44,5) malign ve invaziv özellikteydi. Buna karşın, %50-CR grubunda 6. hafta sonunda çıkartılan 10 tümörün tümünün benign ve non-invaziv özellikte olduğu görüldü (Tablo 10 ve Tablo 11) (Şekil 17). Kanser kontrol grubunda şekillenen 20 tümörün 11'i invaziv duktal karsinom (Resim 3), 5'i adenokarsinom (Resim 4), 1'i *in situ* duktal karsinom, 2'si intraduktal papillom (Resim 5) ve 1'i papillar kistadenom olarak tanımlandı. Alternatif gün besleme grubunda şekillenen 9 tümörün 4'ü invaziv duktal karsinom (Resim 3), 3'ü intraduktal papillom (Resim 5), 1'i tubüler adenom ve 1'i fibroadenom özelliğindeydi. %50 kalori kısıtlama grubunda ise ilk 6 hafta sonunda şekillenen 10 tümörün 3'ü intraduktal papillom (Resim 5), 6'sı tubüler adenom ve 1'i papillar kistadenom olarak tanımlandı (Tablo 9).

Diyeter girişimlerin 12 hafta sonunda palpe edilebilen ve/veya edilemeyen tümörlerin sayıları ve histopatolojik özelliklerini etkilediği görüldü. Alternatif gün besleme grubunda tümörler dahaz az sıklıkta malign (P=0,000) ve invaziv (P=0,013) karakter sergiledi. ADF

grubunda adenokarsinoma hiç rastlanmazken, invaziv duktal karsinom %44,4 (4/9) oranındaydı. Buna karşın, kanser kontrol grubunda adenokarsinom %25 (5/20) ve duktal karsinom %55 (11/20) oranlarındaydı.

Yapılan çalışmaların birçoğunda diyetler girişimler tümör indüksiyonundan önce veya tümör indüksiyonu ile eş zamanlı olarak başlatılmıştır. Bu çalışmada tümör indüksiyonundan haftalar sonra, tümör boyutu 10-12 mm çaplara ulaştıktan sonra diyetler girişimler uygulanmaya başlamıştır. Buna rağmen diyetler girişimlerin uygulandığı gruplarda tümörler belirgin olarak daha az sıklıkta malign ve invaziv karakter göstermiştir. Özellikle, girişim süreci 6 haftayla sınırlanmış olsa da, %50 kalori kısıtlama grubundaki hayvanlarda gelişmiş olan 10 tümörün hepsinin benign ve non-invaziv karakterde olması önemli bir bulgudur. Zira, literatürde 4 hafta gibi çok daha kısa süreli kalori kısıtlaması çalışmalarında çıkartılan tümörlerin önemli bir oranının malign özelliklerde olduğuna ilişkin birçok örnek görülmektedir (Zhu ve ark, 1997; Zhu ve ark, 2005).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser, bugün hem dünyada hem de ülkemizde giderek artış gösteren bir hastalıktır. Tedavisinde sıklıkla kullanılan radyoterapi ve kemoterapiye direnç göstermesi ve uygulanan güncel tedavileriyle birlikte hastalarda oluşturduğu stres, anksiyete ve diğer sonuçlarıyla önemli bir sağlık sorunu ve toplumsal bir sorundur. Bu yüzden kanserin mevcut tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının etkinliğini artırabilen, bu tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltabilen ve daha da önemlisi, doğrudan terapötik amaçla kullanılabilen alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser gelişmesi açısından bu zamana kadar tanımlanan en güçlü fizyolojik inhibitör kalori kısıtlamasıdır. Mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olsa da, bugün değişik kalori kısıtlamalarının kanseri de içeren yaş-ilişkili kronik hastalıkları önlediği iyi bilinmektedir. Kalori kısıtlamasının kanser üzerine etkileriyle ilgili çalışmalarda genellikle kalori kısıtlaması indüksiyonla eşzamanlı olarak veya tümör indüksiyonu yapıldıktan birkaç gün sonra gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle yapılmış olan hayvan deneyleri genellikle koruyucu girişimler kapsamındadır ve klinik olgulardaki durumu tam olarak yansıtmaz. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler de kalori kısıtlamasının kanser insidansı ve gelişmesini önlemesiyle ilgilidir. Ancak, insanlarda genellikle tümör belirli bir gelişim sürecini tamamladıktan sonra kanser tanılanabilmekte ve kansere özgü girişimler de bu süreçten sonra başlamaktadır. Tümör geliştikten sonra kalori kısıtlaması uygulanmış çalışmalar çok azdır ve olanlar da sadece belirli tip kanserlerle sınırlıdır.

Ayrıca, insanlarda diyeter girişimler çeşitli nedenlerle deney hayvanlarındaki kadar düzenli olamamaktadır. Bu nedenle alternatif gün besleme gibi, insanlarda uygulanabilirliği daha yüksek kısıtlama yöntemlerinin arayışı devam etmektedir. Kalori kısıtlamalarından beklenen yararlar kısıtlamanın tipi, süresi, başlama zamanı gibi birçok faktöre bağlı olarak farklılıklar da göstermektedir. Bu nedenle, kanserde koruyucu, tedaviyi destekleyici ve/veya tedavi edici amaçlarla kullanılacak en uygun kısıtlama yönteminin bilinmesine de gereksinim vardır.

Bu çalışmada 21 günlük yaşta NMU ile meme kanseri indüklenmiş dişi Sprague Dawley sıçanlarında şekillenen tümörler 10-12 mm çapa ulaştıktan sonra %50 kalori kısıtlaması ve alternatif gün besleme uygulandı. İndüksiyonun ve diyeter girişimlerin hayvanlarda ve ileri evredeki tümörler üzerine etkileri canlı ağırlık, gelişen tümörlerin sayısı, tümör hacmi ve

ağırlığı, tümörlerin histopatolojik özellikleri ve serum insülin, IGF-1, leptin, adiponektin, kortikosteron konsantrasyonları aracılığıyla değerlendirildi. Bulgular, deney süreci görece kısa olsa da, %50 kalori kısıtlamasının ileri evre tümörlerde en etkin diyet girişimi olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmada elde edilen verilerin gelecekte yapılan çalışmalar için referans oluşturabileceği, özellikle daha gerçekçi bir klinik tablo yaratması açısından diyet girişimleri gibi alternatif tedavi yöntemlerinin etki ve etki mekanizmalarının araştırılmasına bir ışık tutabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M.** Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 2005,112 (3), 115–21.
- Albanes D.** Total calories, body weight, and tumor incidence in mice. *Cancer Research* 1987, 47, 1987–1992.
- Allen NE, Appleby PN, Kaaks R, Rinaldi S, Davey GK, Key TJ.** Lifestyle determinants of serum insulin-like growth-factor-I (IGF-I), C-peptide and hormone binding protein levels in British women. *Cancer Causes and Control* 2003, 14(1), 65-74.
- Almon RR, Yang E, Lai W, Androulakis IP, Ghimbovschi S, Hoffman EP, Jusko WJ, Dubois DC.** Relationships between circadian rhythms and modulation of gene expression by glucocorticoids in skeletal muscle. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2008, 295(4), R1031-47.
- Andreeva AV, Kutuzov MA.** Cadherin 13 in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010, 49(9), 775-90.
- Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP.** Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(10), 6216-20.
- Armeni T, Pieri C, Marra M, Saccucci F, Principato G.** Studies on the life prolonging effect of food restriction: glutathione levels and glyoxalase enzymes in rat liver. *Mechanisms of Ageing and Development* 1998, 101(1-2), 101-10.
- Ashrafi M, Bathaie SZ, Abroun S.** High Expression of Cyclin D1 and p21 in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Wistar Albino Female Rats. *Cell Journal* 2012, 14(3), 193-202.
- Askari H, Liu J, Dagogo-Jack S.** Hormonal regulation of human leptin in vivo: effects of hydrocortisone and insulin. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2000, 24, 1254–9.
- Baglietto L, English DR, Hopper JL, Morris HA, Tilley WD, Giles GG.** Circulating insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2007, 16(4), 763-8.
- Barnes PJ.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 1998, 94(6), 557-72.
- Bartke A, Wright JC, Mattison JA, Ingram DK, Miller RA, Roth GS.** Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 2001, 414(6862), 412.
- Baxter RC.** Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Molecular Pathology* 2001, 54(3), 145-8.

Beauchene RE, Bales CW, Bragg CS, Hawkins ST, Mason RL. Effect of age of initiation of feed restriction on growth, body composition, and longevity of rats. *The Journals of Gerontology* 1986, 41(1), 13-9.

Benetar T, Amemiya Y, Yang W, Seth A. Insulin Like Growth Factor Binding Protein 7: Antagonist to Breast Cancer. In: *Breast Cancer Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis*, Gunduz M, Gunduz E (Eds), Croatia, 2011, s 39-42.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* 2001, 7(8), 947-53.

Berneis K, Vosmeer S, Keller U. Effects of glucocorticoids and of growth hormone on serum leptin concentration in man. *European Journal of Endocrinology* 1996, 135, 663-5.

Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 2004, 35(4), 842-9.

Bing C, Frankish HM, Pickavance L, Wang Q, Hopkins DF, Stock MJ, Williams G. Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *The American Journal of Physiology* 1998, 274(1 Pt 2), R62-8.

Bishayee A, Mandal A. Trianthema portulacastrum Linn. exerts chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Mutation Research* 2014, 768, 107-18.

Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(51), 32686-95.

Björnholm M, Al-Khalili L, Dicker A, Näslund E, Rössner S, Zierath JR, Arner P. Insulin signal transduction and glucose transport in human adipocytes: effects of obesity and low calorie diet. *Diabetologia* 2002, 1128-35.

Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, William-Olsson L, Rhedin M, Peng XR, Ploj K, Gerdin AK, Arnerup G, Elmgren A, Berg AL, Oscarsson J, Lindén D. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 2007, 56(3), 583-93.

Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81, 3419-23.

Bohlke K, Cramer DW, Trichopoulos D, Mantzoros CS. Insulin-like growth factor-I in relation to premenopausal ductal carcinoma in situ of the breast. *Epidemiology* 1998, 9(5), 570-3.

Bonorden MJ, Rogozina OP, Kluczny CM, Grossmann ME, Grambsch PL, Grande JP, Perkins S, Lokshin A, Cleary MP. Intermittent calorie restriction delays prostate tumor detection and increases survival time in TRAMP mice. *Nutrition and Cancer*, 2009, 61(2), 265-75.

Bonser AM, Garcia-Webb P. C-peptide measurement: methods and clinical utility. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1984, 19(4), 297-352.

Brabant G, Wallaschofski H. Normal levels of serum IGF-I: determinants and validity of current reference ranges. *Pituitary* 2007, 10(2), 129-33.

Bramlett SB, Zhou J, Harris RB, Hendry SL, Witt TL, Zachwieja JJ. Does beta(3) adrenoreceptor blockade attenuate acute exercise-induced reductions in leptin mRNA? *Journal of Applied Physiology* 1999, 87, 1678-83.

Brennan SF, Cantwell MM, Cardwell CR, Velentzis LS, Woodside JV. Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2010, 91(5), 1294-302.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004, 303(5666), 2011-5.

Bruning PF, Van Doorn J, Bonfrère JM, Van Noord PA, Korse CM, Linders TC, Hart AA. Insulin-like growth-factor-binding protein 3 is decreased in early-stage operable premenopausal breast cancer. *International Journal of Cancer* 1995, 62(3), 266-70.

Bonnet M, Delavaud C, Laud K, Gourdou I, Leroux C, Djiane J, Chilliard Y. Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reproduction Nutrition and Development* 2002, 42(5), 399-413.

Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 340(4), 1158-66.

Buschemeyer WC, Klink JC, Mavropoulos JC, Poulton SH, Demark-Wahnefried W, Hursting SD, Cohen P, Hwang D, Johnson TL, Freedland SJ. Effect of intermittent fasting with or without caloric restriction on prostate cancer growth and survival in SCID mice. *The Prostate* 2010, 70(10), 1037-43.

Cabelof DC, Yanamadala S, Raffoul JJ, Guo Z, Soofi A, Heydari AR. Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline. *DNA Repair* 2003, 2(3), 295-307.

Caldefie-Chezet F, Poulin A, Tridon A, Sion B, Vasson MP. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *Journal of Leukocyte Biology* 2001, 69(3), 414-8.

Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 2004, 4(8), 579-91.

Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005, 90(7), 4276-86.

Caminos JE, Nogueiras R, Gaytán F, Pineda R, González CR, Barreiro ML, Castaño JP, Malagón MM, Pinilla L, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M. Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 2008, 149(7), 3390-402.

Cascio S, Bartella V, Auriemma A, Johannes GJ, Russo A, Giordano A, Surmacz E. Mechanism of leptin expression in breast cancer cells: role of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Oncogene* 2008, 27(4), 540-7.

Carson FL, Hladik C. Histotechnology: a self-instructional text (3 nd ed), American Society for Clinical Pathology Press, 2009, 334-348.

Caso J, Masko EM, Ii JA, Poulton SH, Dewhirst M, Pizzo SV, Freedland SJ. The effect of carbohydrate restriction on prostate cancer tumor growth in a castrate mouse xenograft model. *The Prostate* 2013, 73(5), 449-54.

Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* 2005, 48(1), 132-9.

Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007, 133(4), 719-31.

Chen DC, Chung YF, Yeh YT, Chaung HC, Kuo FC, Fu OY, Chen HY, Hou MF, Yuan SS. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Letters* 2006, 237(1), 109-14.

Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(45), 45021-6.

Choi JH, Park SH, Leung PC, Choi KC. Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005, 90(1), 207-10.

Choo AY, Roux PP, Blenis J. Mind the GAP: Wnt steps onto the mTORC1 train. *Cell* 2006, 126(5), 834-6.

Cleary MP, Hu X, Grossmann ME, Juneja SC, Dogan S, Grande JP, Maihle NJ. Prevention of mammary tumorigenesis by intermittent caloric restriction: does caloric intake during refeeding modulate the response? *Experimental Biology and Medicine* 2007, 232(1), 70-80.

Cleary MP, Jacobson MK, Phillips FC, Getzin SC, Grande JP, Maihle NJ. Weight-cycling decreases incidence and increases latency of mammary tumors to a greater extent than does chronic caloric restriction in mouse mammary tumor virus-transforming growth factor-alpha female mice. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2002, 11(9), 836-43.

Coderre L, Vallega GA, Pilch PF, Chipkin SR. In vivo effects of dexamethasone and sucrose on glucose transport (GLUT-4) protein tissue distribution. *The American Journal of Physiology* 1996, 271(4 Pt 1), E643-8.

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004, 305(5682), 390-2.

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 2009, 325(5937), 201-4.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *The Journal of Clinical Investigations* 2001, 108(12), 1875-81.

Cong L, Chen K, Li J, Gao P, Li Q, Mi S, Wu X, Zhao AZ. Regulation of adiponectin and leptin secretion and expression by insulin through a PI3K-PDE3B dependent mechanism in rat primary adipocytes. *The Biochemical Journal* 2007, 403(3), 519-25.

Considine RV, Nyce MR, Kolaczynski JW, Zhang PL, Ohannesian JP, Moore Jr JH, Fox JW, Caro JF. Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. *Journal of Cellular Biochemistry* 1997, 65, 254-8.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriaciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal- weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine* 1996, 334, 292-5.

Coskun U, Günel N, Toruner FB, Sancak B, Onuk E, Bayram O, Cengiz O, Yilmaz E, Elbeg S, Ozkan S. Serum leptin, prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. *Neoplasma* 2003, 50(1), 41-6.

Crawford LJ, Peake R, Price S, Morris TC, Irvine AE. Adiponectin is produced by lymphocytes and is a negative regulator of granulopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology* 2010, 88(4), 807-11.

Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes* 1996, 45, 695-8.

Dagogo-Jack S, Franklin SC, Vijayan A, Liu J, Askari H, Miller SB. Recombinant human insulinlike growth factor-I (IGF-I) therapy decreases plasma leptin concentration in patients with chronic renal insufficiency. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1998, 22, 1110-5.

Dagogo-Jack S, Selke G, Melson AK, Newcomer JW. Robust leptin secretory responses to dexamethasone in obese subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82, 3230-3.

Dagogo-Jack S. Physiological and Hormonal Factors that Influence Leptin Production. In: Leptin- Regulation and Clinical Applications, Dagogo-Jack S (Ed), Springer, New York, 2015, s 45-65.

Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocrine Reviews* 2012, 33(4), 547-94.

Dalamaga M, Migdalis I, Fargnoli JL, Papadavid E, Bloom E, Mitsiades N, Karmaniolas K, Pelecanos N, Tseleni-Balafouta S, Dionyssiou-Asteriou A, Mantzoros CS. Pancreatic cancer expresses adiponectin receptors and is associated with hypoleptinemia and hyperadiponectinemia: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2009, 20(5), 625-33.

Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 2009, 459(7243), 113-7.

DeBoer MD, Zhu XX, Levasseur P, Meguid MM, Suzuki S, Inui A, Taylor JE, Halem HA, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Marks DL. Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. *Endocrinology* 2007, 148(6), 3004-12.

De Cabo R, Cabello R, Rios M, López-Lluch G, Ingram DK, Lane MA, Navas P. Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver. *Experimental Gerontology* 2004, 39(3), 297-304.

Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 2004, 145(12), 5589-97.

De Lorenzo MS, Baljinnyam E, Vatner DE, Abarzúa P, Vatner SF, Rabson AB. Caloric restriction reduces growth of mammary tumors and metastases. *Carcinogenesis* 2011, 32(9), 1381-7.

De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of Obesity* 2013, 2013, 291546.

Descamps O, Riondel J, Ducros V, Roussel AM. Mitochondrial production of reactive oxygen species and incidence of age-associated lymphoma in OF1 mice: effect of alternate-day fasting. *Mechanisms of Ageing and Development* 2005, 126, 1185–91.

Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 345(1), 271-9.

Dieudonne MN, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, Leneuve MC, Pecquery R, Giudicelli Y. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002, 293(1), 622-8.

Dimitriadis G, Leighton B, Parry-Billings M, Sasson S, Young M, Krause U, Bevan S, Piva T, Wegener G, Newsholme EA. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *The Biochemical Journal* 1997, 321 (Pt 3), 707-12.

Dirx MJ, Zeegers MP, Dagnelie PC, van den Bogaard T, van den Brandt PA. Energy restriction and the risk of spontaneous mammary tumors in mice: a meta-analysis. *International Journal of Cancer* 2003, 106(5), 766-70.

Dogan S, Rogozina OP, Lokshin A, Grande JP, Cleary MP. Effects of chronic vs. intermittent calorie restriction on mammary tumor incidence and serum adiponectin and leptin levels in MMTV-TGF- α mice at different ages. *Oncology Letters* 2010, 167e176.

Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ, Eckel RH. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82, 4139-43.

Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne MN, Leneuve MC, Serazin V, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncology Reports* 2008, 20(4), 971-7.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000, 100(2), 197-207.

Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, Frölich M, Meinders AE, Gooren LJ. Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82(10), 3267-70.

Fang X, Palanivel R, Zhou X, Liu Y, Xu A, Wang Y, Sweeney G. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005, 35(3), 465-76.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002, 290(3), 1084-9.

Fay MP, Freedman LS. Meta-analyses of dietary fats and mammary neoplasms in rodent experiments. *Breast Cancer Research and Treatment* 1997, 46(2-3), 215-23.

Ferguson RD, Alikhani N, Vijayakumar A, Fierz Y, Cannata D, Yakar S. IGF-I Cellular Action and its Relationship to Cancer: Evidence from in Vitro and in Vivo Studies. In: *Insulin-like Growth Factors and Cancer: From Basic Biology to Therapeutics*, Cancer Drug Discovery and Development, LeRoith D (Ed), Humana Press, New York, 2012, s 105-146.

Feuers RJ, Weindruch R, Hart RW. Caloric restriction, aging, and antioxidant enzymes. *Mutation Research* 1993, 295, 191-200.

Fouque D, Juillard L, Lasna Y, Tabakian A, Laville M, Joly M-O, Laville M. Acute leptin regulation in end-stage renal failure: the role of growth hormone and IGF-1. *Kidney International* 1998, 54, 932–47.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83(3), 847-50.

Frye RA. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP ribosyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999, 260, 273–279.

Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, 273, 793–798.

Fu P, Thompson JA, and Bach LA. Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF) independent action of IGF-binding protein-6. *The Journal of Biological Chemistry* 2007, 282(31), 22298-306.

Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y, Inui A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Translational Psychiatry* 2011, 1, e23.

Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *European Journal of Cancer* 2000, 36(5), 636-46.

Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clinical Cancer Research* 2006, 12(5), 1447-53.

Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Research* 2006, 66, 5216–5223.

Gatenby RA, Gawlinski ET. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Research* 1996, 56, 5745–5753.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 2004, 4, 891–899.

Gatenby RA. The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction. *Cancer Research* 1995, 55, 4151–4156.

Giovannucci E. Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Hormon and Metabolic Research* 2003, 35, 694–704

Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, Yoo JH, Carino C, Styer AK, Sullivan BT, Sakamoto H, Olawaiye A, Serikawa T, Lynch MP, Rueda BR. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(36), 26320-8.

Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mechanisms of Ageing and Development* 1990, 55, 69–87.

Goodwin PJ, Ennis M, Fantus IG, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Hood N. Is leptin a mediator of adverse prognostic effects of obesity in breast cancer? *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23(25), 6037-42.

Grossmann ME, Cleary MP. The Balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis- focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* 2012, 94, 2164-2171.

Grossmann ME, Mizuno NK, Bonorden MJ, Ray A, Sokolchik I, Narasimhan ML, Cleary MP. Role of the adiponectin leptin ratio in prostate cancer. *Oncology Research* 2009, 18(5-6), 269-77.

Grossmann ME, Ray A, Dogan S, Mizuno NK, Cleary MP. Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth. *Cell Research* 2008, 18(11), 1154-6.

Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *Journal of National Cancer Institute* 1975, 54(2), 401-14.

Gunn JM, Hanson RW, Meyuhas O, Reshef L, Ballard FJ. Glucocorticoids and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) in the rat. *The Biochemical Journal* 1975, 150(2), 195-203.

Guo Z, Heydari A, Richardson A. Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: effect of age and dietary restriction. *Experimental Cell Research* 1998, 245, 228–238.

Guo ZM, Yang H, Hamilton ML, VanRemmen H, Richardson A. Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorta. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001, 22(15), 1771-86.

Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 356(2), 487-93.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995, 269(5223), 543-6.

Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM, Deitel M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nature Medicine* 1995, 1, 953–6.

- Han ES, Levin N, Bengani N, Roberts JL, Suh Y, Karelus K, Nelson JF.** Hyperadrenocorticism and food restriction-induced life extension in the rat: evidence for divergent regulation of pituitary proopiomelanocortin RNA and adrenocorticotrophic hormone biosynthesis. *The Journals of Gerontology* 1995, 50(5), B288-94.
- Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M.** Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998, 351(9113), 1393-6.
- Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P.** Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Hormon and Metabolic Research* 1996, 28(12), 685-9.
- Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppälä M.** Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *The Journal of Clinical Investigation* 1996, 98(11), 2612-5.
- Harvey AE, Lashinger LM, Otto G, Nunez NP, Hursting SD.** Decreased systemic IGF-1 in response to calorie restriction modulates murine tumor cell growth, nuclear factor- κ B activation, and inflammation-related gene expression. *Molecular Carcinogenesis* 2013, 52(12), 997-1006.
- Harvie M, Howell A.** Energy restriction and the prevention of breast cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2012, 71(2), 263-75.
- Hasselgren PO.** Glucocorticoids and muscle catabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 1999, 2(3), 201-5.
- Hebbard LW, Garlatti M, Young LJ, Cardiff RD, Oshima RG, Ranscht B.** T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model. *Cancer Research* 2008, 68(5), 1407-16.
- Hebbard L, Ranscht B.** Multifaceted roles of adiponectin in cancer. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014, 28(1), 59-69.
- Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E.** Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2004, 28(4), 12–21.
- Hekimi S, Guarente L.** Genetics and the specificity of the aging process. *Science* 2003, 299, 1351–1354.
- Hileman SM, Tornøe J, Flier JS, Bjørbaek C.** Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology* 2000, 141(6), 1955-61.
- Hotamisligil GS.** Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 1999, 107(2), 119-25.

Hsieh EA, Chai CM, Hellerstein MK. Effects of caloric restriction on cell proliferation in several tissues in mice: role of intermittent feeding. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2005, 288, E965–72.

Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP. Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *Journal of National Cancer Institute* 2002, 94(22), 1704-11.

Huang W, Dedousis N, Bandi A, Lopaschuk GD, O'Doherty RM. Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinology* 2006, 147(3), 1480-7.

Hubert MF, Laroque P, Gillet JP, Keenan KP. The effects of diet, ad Libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences* 2000, 58(1), 195-207.

Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(28), 10308-13.

Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS One* 2013, 8(1), e54318.

Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annual Review of Medicine* 2003, 54, 131-52.

Hwa V, Oh Y, and Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrinology Review* 1999, 20, 761-787.

Hyun DH, Emerson SS, Jo DG, Mattson MP, de Cabo R. Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(52), 19908-12.

Ip BC, Liu C, Smith DE, Ausman LM, Wang XD. High-refined-carbohydrate and high-fat diets induce comparable hepatic tumorigenesis in male mice. *The Journal of Nutrition* 2014, 144(5), 647-53.

Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, Kadowaki T, Maki T, Miyato H, Yamashita H, Nagawa H. Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2. *Cancer Science* 2007, 98(7), 1120-7.

Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 2010, 464(7293), 1313-9.

Jiang L, Li Z, Rui L. Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(42), 28066-73.

Jockenhovel F, Blum W, Vogel E, Englaro P, Muller- Wieland D, Reinwein D, Rascher W, Krone W. Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82, 2510-3.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2002, 3, 415-428.

Kaaks R, Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proceedings of the Nutrition Society* 2001, 60, 91-106.

Kaaks R. Nutrition, insulin, IGF-1 metabolism and cancer risk: a summary of epidemiological evidence. *Novartis Foundation Symposium* 2004, 262, 247-60.

Kiepe D, Van Der Pas A, Ciarmatori S, Standker L, Schutt B, Hoefflich A, Hugel U, Oh J and Tonshoff B. Defined carboxy-terminal fragments of insulinlike growth factor (IGF) binding protein-2 exert similar mitogenic activity on cultured rat growth plate chondrocytes as IGF-I. *Endocrinology* 2008, 149, 4901-4911.

Kim EJ, Um SJ. SIRT1: roles in aging and cancer. *BMB Reports* 2008, 41, 751-6.

Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT, and Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94, 12981-12986.

Kleinberg DL, Feldman M, Ruan W. IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2000, 5(1), 7-17.

Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG Jr. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(44), 41547-55.

Klurfeld DM, Welch CB, Davis MJ, Kritchevsky D. Determination of degree of energy restriction necessary to reduce DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats during the promotion phase. *The Journal of Nutrition* 1989b, 119(2), 286-91.

Klurfeld DM, Weber MM, Kritchevsky D. Inhibition of chemically induced mammary and colon tumor promotion by caloric restriction in rats fed increased dietary fat. *Cancer Research* 1987, 47(11), 2759-62.

Klurfeld DM, Welch CB, Lloyd LM, Kritchevsky D. Inhibition of DMBA-induced mammary tumorigenesis by caloric restriction in rats fed high-fat diets. *International Journal of Cancer* 1989a, 43(5), 922-5.

Kolaczynski JW, Goldstein BJ, Considine RV. Dexamethasone, OB gene, and leptin in humans; effect of exogenous hyperinsulinemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82, 3895-7.

Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans. *Diabetes* 1996b, 45, 699-701.

Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996a, 81, 4162-5.

Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau SM, Dong J, Kliche KO, Jiang S, Snodgrass HR, Estey EH, Andreeff M. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 1999, 93(5), 1668-76.

Koohestani N, Chia MC, Pham NA, Tran TT, Minkin S, Wolever TM, Bruce WR. Aberrant crypt focus promotion and glucose intolerance: correlation in the rat across diets differing in fat, n-3 fatty acids and energy. *Carcinogenesis* 1998, 19(9), 1679-84.

Kristom B, Carlsson B, Rosberg S, Carlsson LM, Albertsson-Wikland K. Short-term changes in serum leptin levels provide a strong metabolic marker for the growth response to growth hormone treatment in children *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83, 2735-41.

Kritchevsky D. Caloric restriction and experimental mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* 1997, 46, 161-7.

Kritchevsky D, Weber MM, Klurfeld DM. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Research*, 1984, 44(8), 3174-7.

Krizova E, Simek V. Effect of intermittent feeding with high-fat diet on changes of glycogen, protein and fat content in liver and skeletal muscle in the laboratory mouse. *Physiological Research* 1996a, 45, 379-83.

Krizova E, Simek V. Influence of intermittent fasting and high-fat diet on morphological changes of the digestive system and on changes of lipid metabolism in the laboratory mouse. *Physiological Research* 1996b, 45, 145-51.

Kruk J, Marchlewicz M. Dietary fat and physical activity in relation to breast cancer among Polish women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013, 14(4), 2495-502.

Kubo C, Johnson BC, Gajjar A, Good RA. Crucial dietary factors in maximizing life span and longevity in autoimmune-prone mice. *The Journal of Nutrition* 1987, 117(6), 1129-35.

- Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M.** AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends in Molecular Medicine* 2008, 14(12), 539-49.
- Landt M, Lawson GM, Helgeson JM, Davila-Roman VG, Ladenson JH, Jaffe AS, Hicker RC.** Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations. *Metabolism* 1997, 46, 1109–12.
- Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T.** Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO Journal* 2002, 21(10), 2383-96.
- Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT.** Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 2006, 55(1), 249-59.
- Larsson H, Ahren B.** Short-term dexamethasone increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81, 4428–32.
- Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, Yee D.** Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Molecular Endocrinology* 1999, 13(5), 787-96.
- Li L, Wang Z, Zuo Z.** Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice. *PLoS One* 2013, 8(6), e66069.
- Lien HC, Lu YS, Cheng AL, Chang WC, Jeng YM, Kuo YH, Huang CS, Chang KJ, Yao YT.** Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms. *The Journal of Pathology* 2006, 209(3), 317-27.
- Lippman M, Bolan G, Huff K.** The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Research* 1976, 36(12), 4602-9.
- Liska J, Galbavy S, Macejova D, Zlatos J, Brtko J.** Histopathology of mammary tumours in female rats treated with 1-methyl-1-nitrosourea. *Endocrine Regulations* 2000, 34(2), 91-6.
- Liu CL, Chang YC, Cheng SP, Chern SR, Yang TL, Lee JJ, Guo IC, Chen CP.** The roles of serum leptin concentration and polymorphism in leptin receptor gene at codon 109 in breast cancer. *Oncology* 2007, 72(1-2), 75-81.
- Lonngqvist F, Aener P, Nordfors L, Schalling M.** Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of obese subjects. *Nature Medicine* 1995, 1, 950–3.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI.** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998, 394(6696), 897-901.

Lu W, Huang P. Glycolytic Pathway as a Target for Tumor Inhibition. In: *The Tumor Microenvironment, Cancer Drug Discovery and Development*, Bagley RG (Ed), Springer, New York, 2010, s 91-118.

Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001, 107(2), 137-48.

Lustig Y, Hermi R, Kanety H. Regulation and Function of Adiponectin Receptors in Skeletal Muscle. In: *Adiponectin*, Litwack G (Ed), Elsevier, Amsterdam, 2012, s 95-123.

Lv M, Zhu X, Wang H, Wang F, Guan W. Roles of caloric restriction, ketogenic diet and intermittent fasting during initiation, progression and metastasis of cancer in animal models: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014, 9(12), e115147.

Ma J, Giovannucci E, Pollak M, Leavitt A, Tao Y, Gaziano JM, Stampfer MJ. A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men. *Journal of National Cancer Institute* 2004, 96(7), 546-53.

Ma H, Gomez V, Lu L, Yang X, Wu X, Xiao SY. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009, 24(2), 233-7.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1995, 1(11), 1155-61.

Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, Mattson MP. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB Journal* 2006, 20(6), 631-7.

Majeed N, Blouin MJ, Kaplan-Lefko PJ, Barry-Shaw J, Greenberg NM, Gaudreau P, Bismar TA, Pollak M. A germ line mutation that delays prostate cancer progression and prolongs survival in a murine prostate cancer model. *Oncogene* 2005, 24(29), 4736-40.

Malmstrom R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Jarvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996, 39, 993-6.

Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *The Journal of Pathology* 2003, 201(2), 221-8.

Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82, 1066-70.

Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, Papadiamantis Y, Markopoulos C, Spanos E, Chrousos G, Trichopoulos D. Adiponectin and breast cancer risk. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004, 89(3), 1102-7.

Martin-Montalvo A, Villalba JM, Navas P, de Cabo R. NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene* 2011, 30, 505–520.

Masoro EJ. Nutrition and aging--a current assessment. *The Journal of Nutrition* 1985, 115(7), 842-8.

Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 2005, 126, 913–922.

Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2005, 16, 129 –37.

Maxwell CA, Moreno V, Solé X, Gómez L, Hernández P, Urruticoechea A, Pujana MA. Genetic interactions: the missing links for a better understanding of cancer susceptibility, progression and treatment. *Molecular Cancer* 2008, 7, 4.

McCarter R, Masoro EJ, Yu BP. Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *The American Journal of Physiology* 1985, 248, E488–490.

McCarter RJ, McGee JR. Transient reduction of metabolic rate by food restriction. *The American Journal of Physiology* 1989, 257, E175–9.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *Journal of Nutrition* 1935, 10, 63–79.

McCormick DL, Adamowski CB, Fiks A, Moon RC. Lifetime dose-response relationships for mammary tumor induction by a single administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Research* 1981, 41(5), 1690-4.

Mendes MC, Pimentel GD, Costa FO, Carnevali JB. Molecular and neuroendocrine mechanisms of cancer cachexia. *The Journal of Endocrinology* 2015, 226(3), R29-43.

Michaud DS, Wolpin B, Giovannucci E, Liu S, Cochrane B, Manson JE, Pollak MN, Ma J, Fuchs CS. Prediagnostic plasma C-peptide and pancreatic cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2007, 16(10), 2101-9.

Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer* 2007, 109, 2712–2749.

Miller SL, Wolfe RR. The danger of weight loss in the elderly. *The Journal of Nutrition Health and Aging* 2008, 12(7), 487-91.

Mistry T, Digby JE, Chen J, Desai KM, Randeva HS. The regulation of adiponectin receptors in human prostate cancer cell lines. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2006, 348(3), 832-8.

Mistry T, Digby JE, Desai KM, Randeva HS. Leptin and adiponectin interact in the regulation of prostate cancer cell growth via modulation of p53 and bcl-2 expression. *BJU International* 2008, 101(10), 1317-22.

Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Noguchi S. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clinical Cancer Research* 2003, 9(15), 5699-704.

Molon-Noblot S, Hubert MF, Hoe CM, Keenan K, Laroque P. The effects of ad libitum feeding and marked dietary restriction on spontaneous skeletal muscle pathology in Sprague-Dawley rats. *Toxicologic Pathology* 2005, 33(5), 600-8.

Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2007, 117(10), 2860-8.

Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 2004, 116(4), 551-63.

Myal Y, Shiu RP, Bhaumick B, Bala M. Receptor binding and growth-promoting activity of insulin-like growth factors in human breast cancer cells (T-47D) in culture. *Cancer Research* 1984, 44, 5486-90.

Nakao T, Hino M, Yamane T, Nishizawa Y, Morii H, Tatsumi N. Expression of the leptin receptor in human leukaemic blast cells. *British Journal of Haematology* 1998, 102(3), 740-5.

Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004, 89(6), 2832-6.

Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003, 112, 481–490.

Nimptsch K, Giovannucci E. Epidemiology of IGF-I and Cancer. In: *Insulin-like Growth Factors and Cancer: From Basic Biology to Therapeutics, Cancer Drug Discovery and Development*, LeRoith D (Ed), Humana Press, New York, 2012, s 1-24.

Nkhata KJ, Ray A, Dogan S, Grande JP, Cleary MP. Mammary tumor development from T47-D human breast cancer cells in obese ovariectomized mice with and without estradiol supplements. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009a, 114(1), 71-83.

Nkhata KJ, Ray A, Schuster TF, Grossmann ME, Cleary MP. Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth. *Oncology Reports* 2009b, 21(6), 1611-9.

Nock NL, Berger NA. Obesity and Cancer: Overview of Mechanisms. In: *Cancer and Energy Balance, Epidemiology and Overview*, Berger NA (Ed), Springer, New York, 2010, s 129-179.

Nogueira LM, Dunlap SM, Ford NA, Hursting SD. Calorie restriction and rapamycin inhibit MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in a mouse model of postmenopausal obesity. *Endocrine Related Cancer* 2012, 19(1), 57-68.

Oda N, Nakai A, Mokuno T, Sawai Y, Nishida Y, Mano T, Asano K, Itoh Y, Kotake M, Kato S, ve ark. Dexamethasone-induced changes in glucose transporter 4 in rat heart muscle, skeletal muscle and adipocytes. *European Journal of Endocrinology* 1995, 133(1), 121-6.

Ordelheide AM, Heni M, Gommer N, Gasse L, Haas C, Guirguis A, Machicao F, Häring HU, Staiger H. The Myocyte Expression of Adiponectin Receptors and PPAR δ Is Highly Coordinated and Reflects Lipid Metabolism of the Human Donors. *Experimental Diabetes Research* 2011, 692536.

Ostlund Jr RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81, 3909–13.

Owen OE, Cahill GF Jr. Metabolic effects of exogenous glucocorticoids in fasted man. *The Journal of Clinical Investigation* 1973, 52(10), 2596-605.

Ozet A, Arpaci F, Yilmaz MI, Ayta H, Ozturk B, Komurcu S, Yavuz AA, Tezcan Y, Acikel C. Effects of tamoxifen on the serum leptin level in patients with breast cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2001, 31(9), 424-7.

Pang D, Kocherginsky M, Krausz T, Kim SY, Conzen SD. Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. *Cancer Biology and Therapy* 2006, 5(8), 933-40.

Papaspyrou-Rao S, Schneider SH, Petersen RN, Fried SK. Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82, 1635–7.

Parker-Duffen JL, Nakamura K, Silver M, Kikuchi R, Tigges U, Yoshida S, Denzel MS, Ranscht B, Walsh K. T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization. *The Journal of Biological Chemistry* 2013, 288(34), 24886-97.

Paschke L, Zemleduch T, Rucinski M, Ziolkowska A, Szyszka M, Malendowicz LK. Adiponectin and adiponectin receptor system in the rat adrenal gland: ontogenetic and physiologic regulation, and its involvement in regulating adrenocortical growth and steroidogenesis. *Peptides* 2010, 31(9), 1715-24.

Pedersen CR, Hagemann I, Bock T, Buschard K. Intermittent feeding and fasting reduces diabetes incidence in BB rats. *Autoimmunity* 1999, 30, 243–50.

Perks CM, Newcomb PV, Norman MR, Holly JM. Effect of insulinlike growth factor binding protein-1 on integrin signalling and the induction of apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 1999, 22, 141-150.

Petridou ET, Mitsiades N, Gialamas S, Angelopoulos M, Skalkidou A, Dessypris N, Hsi A, Lazaris N, Polyzos A, Syrigos C, Brennan AM, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. Circulating adiponectin levels and expression of adiponectin receptors in relation to lung cancer: two case-control studies. *Oncology* 2007, 73(3-4), 261-9.

Petridou E, Papadiamantis Y, Markopoulos C, Spanos E, Dessypris N, Trichopoulos D. Leptin and insulin growth factor I in relation to breast cancer. *Cancer Causes Control* 2000, 11(5), 383-8.

Peyrat JP, Bonnetterre J, Laurent JC, Louchez MM, Amrani S, Leroy-Martin B, Vilain MO, Delobelle A, Demaille A. Presence and characterization of insulin-like growth factor 1 receptors in human benign breast disease. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 1988, 24(9), 1425-31.

Phoenix KN, Vumbaca F, Fox MM, Evans R, Claffey KP. Dietary energy availability affects primary and metastatic breast cancer and metformin efficacy. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010, 123(2), 333-44.

Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Letters* 2005, 579(23), 5163-9.

Pisani P. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2008, 114(1), 63-70.

Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genetics* 2006, 2(3), e40.

Quchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001, 103(8), 1057-63.

Rabinowitz D, Zierler KL. Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin. Characterization of insulin resistance and evidence for adaptive hyperinsulinism. *The Journal of Clinical Investigation* 1962, 41, 2173-81.

Ray A, Nkhata KJ, Cleary MP. Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status. *International Journal of Oncology* 2007, 30(6), 1499-509.

Renehan AG, Frystyk J, Flyvbjerg A. Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2006, 17(8), 328-36.

Rinaldi S, Peeters PH, Berrino F, Dossus L, Biessy C, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, T  hard B, Nagel G, Linseisen J, Boeing H, Lahmann PH, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Koliva M, Palli D, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, van Gils CH, van Noord P, Grobbee DE, Bueno-de-Mesquita HB, Gonzalez CA, Agudo A, Chirlaque MD, Barricarte A, Larra  naga N, Quiros JR, Bingham S, Khaw KT, Key T, Allen NE, Lukanova A, Slimani N, Saracci R, Riboli E, Kaaks R. IGF-I, IGFBP-3 and breast cancer risk in women: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocrinology Related Cancer* 2006, 13(2), 593-605.

Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pellemounter MA, Danilenko DM. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology* 2000, 141(1), 446-9.

Roberts CT, Brown AL, Graham DE, Seelig S, Berry S, Gabbay KH and Rechler MM. Growth hormone regulates the abundance of insulin-like growth factor I RNA in adult rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1986, 261, 10025-10028.

Rocha NS, Barbisan LF, de Oliveira ML, de Camargo JL. Effects of fasting and intermittent fasting on rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 2002, 22, 129 –38.

Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Casta  o JP, Malagon MM. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007, 148(1), 401-10.

Rogozina OP, Bonorden MJ, Grande JP, Cleary MP. Serum insulin-like growth factor-I and mammary tumor development in ad libitum-fed, chronic calorie-restricted, and intermittent calorie-restricted MMTV-TGF-alpha mice. *Cancer Prevention Research* 2009, 2(8), 712-9.

Rogozina OP, Bonorden MJ, Seppanen CN, Grande JP, Cleary MP. Effect of chronic and intermittent calorie restriction on serum adiponectin and leptin and mammary tumorigenesis. . *Cancer Prevention Research* 2011, 4(4), 568-81.

Rogozina OP, Nkhata KJ, Nagle EJ, Grande JP, Cleary MP. The protective effect of intermittent calorie restriction on mammary tumorigenesis is not compromised by consumption of a high fat diet during refeeding. *Breast Cancer Research and Treatment* 2013, 138(2), 395-406.

Romieu I, Lajous M. The role of obesity, physical activity and dietary factors on the risk for breast cancer: Mexican experience. *Salud Publica de Mexico* 2009, 51(2), s172-80.

Romon M, Lebel P, Velly C, Marecaux N, Fruchart JC, Dallongeville J. Leptin response to carbohydrate or fat meal and association with subsequent satiety and energy intake. *American Journal of Physiology* 1999, 277, E855–61.

- Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M.** The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutation Research* 2008, 659(3), 284-92.
- Rous P.** The influence of diet on transplanted and spontaneous mouse tumors. *Journal of Experimental Medicine* 1914, 20(5), 433-51.
- Ruan W, Kleinberg DL.** Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* 1999, 140(11), 5075–81.
- Russo J, Russo IH.** Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2000, 5(2), 187-200.
- Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J.** Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia* 2005, 48(10), 2119-30.
- Saad MF, Khan A, Sharma A, Michael R, Riad- Gabriel MG, Boyadjian R, Jinagouda SD, Steil GM, Kamdar V.** Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 1998, 47, 544–9.
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan CA, Kuhn RW.** Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *Journal of Gerontology* 1991, 46(5), B171-9.
- Saleh AD, Simone BA, Palazzo J, Savage JE, Sano Y, Dan T, Jin L, Champ CE, Zhao S, Lim M, Sotgia F, Camphausen K, Pestell RG, Mitchell JB, Lisanti MP, Simone NL.** Caloric restriction augments radiation efficacy in breast cancer. *Cell Cycle* 2013, 12(12), 1955-63.
- Saminathan M, Rai RB, Dhama K, Ranganath GJ, Murugesan V, Kannan K, Pavulraj S, Gopalakrishnan A, Suresh C.** Histopathology and Immunohistochemical Expression of N-Methyl-N-Nitrosourea (NMU) Induced Mammary Tumors In Sprague-Dawley Rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 2014, 9(10), 621-640.
- Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL.** Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *Journal of National Cancer Institute* 2002, 94(13), 972-80.
- Sauter ER, Garofalo C, Hewett J, Hewett JE, Morelli C, Surmacz E.** Leptin expression in breast nipple aspirate fluid (NAF) and serum is influenced by body mass index (BMI) but not by the presence of breast cancer. *Hormone and Metabolic Research* 2004, 36(5), 336-40.
- Schairer C, Hill D, Sturgeon SR, Fears T, Pollak M, Mies C, Ziegler RG, Hoover RN, Sherman ME.** Serum concentrations of IGF-I, IGFBP-3 and c-peptide and risk of hyperplasia and cancer of the breast in postmenopausal women. *International Journal of Cancer* 2004, 108(5), 773-9.

Schernhammer ES, Holly JM, Hunter DJ, Pollak MN, Hankinson SE. Insulin-like growth factor-I, its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), and growth hormone and breast cancer risk in The Nurses Health Study II. *Endocrine Related Cancer* 2006, 13(2), 583-92.

Schornack PA, Gillies RJ. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* 2003, 5, 135–145.

Schwartz MW, Peskind E, Boyko EJ, Porte Jr D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine* 1996, 2, 589–93.

Sell C. Caloric restriction and insulin-like growth factors in aging and cancer. *Hormone and Metabolic Research* 2003, 35, 705–711

Shepel LA, Gould MN. The genetic components of susceptibility to breast cancer in the rat. *Progress in Experimental Tumor Research* 1999, 35, 158-69.

Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* 2002, 51(6), 1737-44.

Shpilberg Y, Connor MK, Riddell MC. The direct and indirect effects of corticosterone and primary adipose tissue on MCF7 breast cancer cell cycle progression. *Hormone Molecular Biology Clinical Investigation* 2015, 22(2), 91-100.

Siegel I, Liu TL, Nepomuceno N, Gleicher N. Effects of short-term dietary restriction on survival of mammary ascites tumor-bearing rats. *Cancer Investigation* 1988, 6, 677– 80.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *A Cancer Journal for Clinicians* 2015, 65, 5-29.

Simone BA, Champ CE, Rosenberg AL, Berger AC, Monti DA, Dicker AP, Simone NL. Selectively starving cancer cells through dietary manipulation: methods and clinical implications. *Future Oncology* 2013, 9, 959–976.

Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mechanisms of Ageing and Development* 2005, 126, 987–1002.

Singh A, Hamilton-Fairley D, Koistinen R, Seppälä M, James VH, Franks S, Reed MJ. Effect of insulin-like growth factor-type I (IGF-I) and insulin on the secretion of sex hormone binding globulin and IGF-I binding protein (IBP-I) by human hepatoma cells. *The Journal of Endocrinology* 1990, 124(2), R1-3.

Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and noninsulin- dependent diabetes mellitus subjects. *Journal of Clinical Investigations* 1996, 97, 1344–7.

Skulachev VP. Chemiosmotic concept of the membrane bioenergetics: what is already clear and what is still waiting for elucidation? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1994, 26(6), 589-98.

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson WL, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Potter JD, Rohan TE, Speizer FE, Toniolo P, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ. Intake of fruits and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Journal of the American Medical Association* 2001, 285(6), 769-76.

Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiological Reviews* 2009, 89(3), 1025-78.

Stuart JA, Karahalil B, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB Journal* 2004, 18(3), 595-7.

Surmacz E, Koda M. Leptin as a Novel Marker in Breast and Colorectal Cancer. In: *Leptin and Leptin Antagonists*, Medical Intelligence Unit, Gertler A (Ed), Landes Bioscience, Texas, 2009, s 63-72.

Swartz SL, Dluhy RG. Corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 1978, 16(3), 238-55.

Takahata C, Miyoshi Y, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Demonstration of adiponectin receptors 1 and 2 mRNA expression in human breast cancer cells. *Cancer Letters* 2007, 250(2), 229-36.

Tannenbaum A. The dependence of the genesis of induced skin tumors on the fat content of the diet during different stages of carcinogenesis. *Cancer Research* 1944, 4, 683-687.

Tannenbaum A. The Initiation and Growth of Tumors: Introduction. I. Effects of Underfeeding. *The American Journal of Cancer* 1940, 38, 335-350.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995, 83(7), 1263-71.

Tessitore L, Vizio B, Jenkins O, De Stefano I, Ritossa C, Argiles JM, Benedetto C, Mussa A. Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *International Journal of Molecular Medicine* 2000, 5(4), 421-6.

Thomas JA, Antonelli JA, Lloyd JC, Masko EM, Poulton SH, Phillips TE, Pollak M, Freedland SJ. Effect of intermittent fasting on prostate cancer tumor growth in a mouse model. *Prostate Cancer Prostatic Diseases* 2010, 13(4), 350-5.

Thompson H, Sporn MB. Mammary Cancer in Rats. In: *Tumor Models in Cancer Research*, Teicher BA (Ed), Human Press, New Jersey, 2002, s 173-181.

Thompson HJ, Meeker LD. Induction of Mammary Gland Carcinomas by the Subcutaneous Injection of 1-Methyl-1-nitrosourea. *Cancer Research* 1983, 43, 1628-1629.

Thompson HJ, Adlakha H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Research* 1991, 51(13), 3411-5.

Thompson HJ, McGinley JN, Rothhammer K, Singh M. Rapid induction of mammary intraductal proliferations, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually immature female rats with 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis* 1995, 16(10), 2407-11.

Thompson HJ, McGinley JN, Spoelstra NS, Jiang W, Zhu Z, Wolfe P. Effect of dietary energy restriction on vascular density during mammary carcinogenesis. *Cancer Research* 2004, 64(16), 5643-50.

Tran TT, Gupta N, Goh T, Naigamwalla D, Chia MC, Koohestani N, Mehrotra S, McKeown-Eyssen G, Giacca A, Bruce WR. Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlations with aberrant crypt foci promotion in rats. *Cancer Epidemiological Biomarkers and Prevention* 2003, 12(1), 47-56.

Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV. Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1999, 22-8.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 2002, 53(4), 865-71.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324, 1029–1033.

Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007, 86, 7-13.

Varady KA, Roohk DJ, McEvoy-Hein BK, Gaylinn BD, Thorner MO, Hellerstein MK. Modified alternate-day fasting regimens reduce cell proliferation rates to a similar extent as daily calorie restriction in mice. *FASEB Journal* 2008, 22(6), 2090-2096.

Varady KA, Hellerstein MK. Do calorie restriction or alternate-day fasting regimens modulate adipose tissue physiology in a way that reduces chronic disease risk? *Nutrition Reviews* 2008, 66(6), 333-42.

Varady KA, Roohk DJ, Hellerstein MK. Dose effects of modified alternate-day fasting regimens on in vivo cell proliferation and plasma insulin-like growth factor-1 in mice. *Journal of Applied Physiology* 2007, 103(2), 547-51.

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001, 107(2), 149-59.

Vegh I, de Salamanca RE. Prolactin, TNF alpha and nitric oxide expression in nitroso-N-methylurea-induced-mammary tumours. *Journal of Carcinogenesis* 2007, 6, 18.

Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007, 275(1-2), 43-61.

Vicennati V, Vottero A, Friedman C, Papanicolaou DA. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2002, 26(7), 905-11.

Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 2005, 70, 363–374.

Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats. *FASEB Journal* 2003, 17, 1133– 4.

Wang W, Guan KL. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 2009, 196(1), 55-63.

Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *The Biochemical Journal* 2008, 409(3), 623-33.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956, 123(3191), 309-14.

Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochemische Zeitschrift* 1924, 152, 309–44.

Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *European Journal of Endocrinology* 2000, 143(3), 293-311.

Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, Halter JB, Ramsey JJ, Richardson A, Roth GS, Spindler SR. Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. *The Journals of Gerontology* 2001,1, 20–33.

Weinstein SP, Paquin T, Pritsker A, Haber RS. Glucocorticoid-induced insulin resistance: dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non-insulin-related stimuli. *Diabetes* 1995, 44(4), 441-5.

Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, Fontana L, Steger-May K, Schechtman KB, Klein S, Ehsani AA, Holloszy JO. Lower extremity muscle size and strength and aerobic capacity decrease with caloric restriction but not with exercise-induced weight loss. *Journal of Applied Physiology* 2007, 102(2), 634-40.

Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000, 43, 1498–1506.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 323(2), 630-5.

Wolthers T, Grofte T, Norrelund H, Poulsen PL, Andreassen F, Christiansen JS, Jorgensen JO. Differential effects of growth hormone and prednisolone on energy metabolism and leptin levels in humans. *Metabolism* 1998, 47, 83–8.

Woo HY, Park H, Ki CS, Park YL, Bae WG. Relationships among serum leptin, leptin receptor gene polymorphisms, and breast cancer in Korea. *Cancer Letters* 2006, 237(1), 137-42.

Woodside B, Abizaid A, Walker C. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Hormones and Behaviour* 2000, 37(4), 353-65.

Wu Y, Cui K, Miyoshi K, Hennighausen L, Green JE, Setser J, LeRoith D, Yakar S. Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. *Cancer Research* 2003, 63(15), 4384-8.

Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 316(3), 924-9.

Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR, Richardson A. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *Journal of Nutrition* 1995, 125(2), 195-201.

Xue F, Michels KB. Calorie Restriction and Cancer. In: *Cancer and Energy Balance, Epidemiology and Overview*, Berger NA (Ed), Springer, New York, 2010, s 181-199.

Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013, 144(6), 1252-61.

Yamashita T, Murakami T, Otani S, Kuwajima M, Shima K. Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 246(3), 752-9.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003, 423(6941), 762-9.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 2002, 8(11), 1288-95.

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 2007, 13(3), 332-9.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* 2001, 7(8), 941-6.

Yan L, DeMars LC. Effects of dietary fat on spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma in mice. *Clinical and Experimental Metastasis* 2010, 27 (8), 581-590.

Yankuzo HM, Emilia ST, Shaari R, Yaacob NS. Correlation of tumour response with starting tumour size and dose of tamoxifen in an N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-induced rat mammary cancer model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014, 15(16), 6721-6.

Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radical Biology and Medicine* 1996, 21, 651–668.

Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *The Journals of Gerontology* 1985, 40(6), 657-70.

Yuri T, Nikaido Y, Shimano N, Uehara N, Shikata N, Tsubura A. Effects of prepubertal zeranol exposure on estrogen target organs and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 2004, 18(6), 755-61.

Zainal TA, Oberley TD, Allison DB, Szweda LI, Weindruch R. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB Journal* 2000, 14, 1825-1836.

Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ, Ross RJ. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *The Journal of Immunology* 2001, 167(8), 4593-9.

Zetter, B. Preface. In: *The Tumor Microenvironment*, Bagley R (Ed), Springer, New York, 2010, s v-vi.

Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 300(2), 247-52.

Zhu QC, Gao RY, Wen W, Guo BM, Peng JY, Qin HL. Effect of high-fat diet in development of colonic adenoma in an animal model. *World Journal of Gastroenterology* 2014, 20(25), 8119-8129.

Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 2008, 454, 345-349.

Zhu Z, Haeghele AD, Thompson HJ. Effect of caloric restriction on pre-malignant and malignant stages of mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997, 18(5), 1007-12.

Zhu Z, Jiang W, McGinley J, Wolfe P, Thompson HJ. Effects of dietary energy repletion and IGF-1 infusion on the inhibition of mammary carcinogenesis by dietary energy restriction. *Molecular Carcinogenesis* 2005, 42(3), 170-6.

Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Price JM, Gao B, Thompson HJ. Effects of dietary energy restriction on gene regulation in mammary epithelial cells. *Cancer Research* 2007, 67, 12018-12025.



EKLER

Ek 1- Canlı ağırlıklar için önemlilikler tablosu (ikili karşılaştırmalar)

Canlı Ağırlıklar	P	Canlı Ağırlıklar	P
CA 0 – CA 1	0,102	CA 1 – CA 11	0,000
CA 0 – CA 2	0,038	CA 1 – CA 12	0,000
CA 0 – CA 3	0,127	CA 2 – CA 3	0,038
CA 0 – CA 4	0,072	CA 2 – CA 4	0,002
CA 0 – CA 5	0,036	CA 2 – CA 5	0,002
CA 0 – CA 6	0,006	CA 2 – CA 6	0,000
CA 0 – CA 7	0,332	CA 2 – CA 7	0,051
CA 0 – CA 8	0,000	CA 2 – CA 8	0,000
CA 0 – CA 9	0,001	CA 2 – CA 9	0,000
CA 0 – CA 10	0,000	CA 2 – CA 10	0,000
CA 0 – CA 11	0,000	CA 2 – CA 11	0,000
CA 0 – CA 12	0,000	CA 2 – CA 12	0,000
CA 1 – CA 2	0,917	CA 3 – CA 4	0,797
CA 1 – CA 3	0,005	CA 3 – CA 5	0,336
CA 1 – CA 4	0,030	CA 3 – CA 6	0,134
CA 1 – CA 5	0,006	CA 3 – CA 7	0,915
CA 1 – CA 6	0,001	CA 3 – CA 8	0,024
CA 1 – CA 7	0,092	CA 3 – CA 9	0,012
CA 1 – CA 8	0,001	CA 3 – CA 10	0,004
CA 1 – CA 9	0,000	CA 3 – CA 11	0,000
CA 1 – CA 10	0,000	CA 3 – CA 12	0,001

Canlı Ağırlıklar	P	Canlı Ağırlıklar	P
CA 4 – CA 5	0,207	CA 7 – CA 8	0,229
CA 4 – CA 6	0,020	CA 7 – CA 9	0,064
CA 4 – CA 7	0,944	CA 7 – CA 10	0,037
CA 4 – CA 8	0,011	CA 7 – CA 11	0,031
CA 4 – CA 9	0,007	CA 7 – CA 12	0,039
CA 4 – CA 10	0,000	CA 8 – CA 9	0,230
CA 4 – CA 11	0,005	CA 8 – CA 10	0,064
CA 4 – CA 12	0,000	CA 8 – CA 11	0,065
CA 5 – CA 6	0,563	CA 8 – CA 12	0,011
CA 5 – CA 7	0,397	CA 9 – CA 10	0,484
CA 5 – CA 8	0,472	CA 9 – CA 11	0,287
CA 5 – CA 9	0,006	CA 9 – CA 12	0,394
CA 5 – CA 10	0,012	CA 10 – CA 11	0,989
CA 5 – CA 11	0,008	CA 10 – CA 12	0,734
CA 5 – CA 12	0,019	CA 11 – CA 12	0,780
CA 6 – CA 7	0,274		
CA 6 – CA 8	0,798		
CA 6 – CA 9	0,158		
CA 6 – CA 10	0,043		
CA 6 – CA 11	0,056		
CA 6 – CA 12	0,005		

Ek 2- Tümör toplam hacimleri için önemlilikler tablosu (ikili karşılaştırmalar)

Tümör Hacimleri	P	Tümör Hacimleri	P
TH 0 – TH 1	0,416	TH 1 – TH 11	0,107
TH 0 – TH 2	0,039	TH 1 – TH 12	0,128
TH 0 – TH 3	0,090	TH 2 – TH 3	0,721
TH 0 – TH 4	0,035	TH 2 – TH 4	0,177
TH 0 – TH 5	0,359	TH 2 – TH 5	0,813
TH 0 – TH 6	0,256	TH 2 – TH 6	0,867
TH 0 – TH 7	0,131	TH 2 – TH 7	0,755
TH 0 – TH 8	0,197	TH 2 – TH 8	0,871
TH 0 – TH 9	0,101	TH 2 – TH 9	0,567
TH 0 – TH 10	0,159	TH 2 – TH 10	0,410
TH 0 – TH 11	0,086	TH 2 – TH 11	0,248
TH 0 – TH 12	0,109	TH 2 – TH 12	0,230
TH 1 – TH 2	0,041	TH 3 – TH 4	0,193
TH 1 – TH 3	0,107	TH 3 – TH 5	0,908
TH 1 – TH 4	0,020	TH 3 – TH 6	0,799
TH 1 – TH 5	0,370	TH 3 – TH 7	0,874
TH 1 – TH 6	0,258	TH 3 – TH 8	0,992
TH 1 – TH 7	0,184	TH 3 – TH 9	0,666
TH 1 – TH 8	0,270	TH 3 – TH 10	0,483
TH 1 – TH 9	0,138	TH 3 – TH 11	0,301
TH 1 – TH 10	0,192	TH 3 – TH 12	0,263

Tümör Hacimleri	P	Tümör Hacimleri	P
TH 4 – TH 5	0,123	TH 7 – TH 8	0,571
TH 4 – TH 6	0,494	TH 7 – TH 9	0,121
TH 4 – TH 7	0,902	TH 7 – TH 10	0,260
TH 4 – TH 8	0,742	TH 7 – TH 11	0,112
TH 4 – TH 9	0,778	TH 7 – TH 12	0,172
TH 4 – TH 10	0,489	TH 8 – TH 9	0,198
TH 4 – TH 11	0,274	TH 8 – TH 10	0,133
TH 4 – TH 12	0,250	TH 8 – TH 11	0,056
TH 5 – TH 6	0,488	TH 8 – TH 12	0,130
TH 5 – TH 7	0,316	TH 9 – TH 10	0,395
TH 5 – TH 8	0,508	TH 9 – TH 11	0,149
TH 5 – TH 9	0,202	TH 9 – TH 12	0,199
TH 5 – TH 10	0,264	TH 10 – TH 11	0,279
TH 5 – TH 11	0,124	TH 10 – TH 12	0,276
TH 5 – TH 12	0,145	TH 11 – TH 12	0,301
TH 6 – TH 7	0,422		
TH 6 – TH 8	0,660		
TH 6 – TH 9	0,227		
TH 6 – TH 10	0,277		
TH 6 – TH 11	0,112		
TH 6 – TH 12	0,138		

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YILDIRIM KOÇ, Ece
Uyruk : Türkiye
Doğum yeri ve tarihi : Ankara-19.04.1986
Telefon : 05057007881
E-mail : vetece04@hotmail.com.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	ADÜ Veteriner Fakültesi	
Lisans	ADÜ Veteriner Fakültesi	2009

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2011-	ADÜ Veteriner Fakültesi	Araş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Oğut S, Kilinc D, Yaman H, **Koc E**, Gokcimen A, Ozcelik H, Turgut C, Cesur G, Bircan C, Deniz B. An Investigation of Preventive Effects of Rose Water Containing Essential Rose Oil Against Toxicological Effects of Chlorpyrifos (Dursban 4) Ethyl in Rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2015, 24, 1009-1015.

2. PROJELER

Unsal H, Unsal C, **Koç E**, Erdogan MA, Belge F, Balkaya M. “*In vitro* Assessment of the Effects of Protein Fermentation Products on Rat Colon Contractility.” Adnan Menderes University Research Foundation (2009-).

Uner AG, **Koç E**, Unsal H, Unsal C, Belge F, Balkaya M, Erdoğan MA. „Farelerde Diyetle Oluşturulmuş Obezitede Hemostatik Faktörlerin Değişimleri ve Fibroblast Büyüme Faktörü-21’in Etkisi”. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi (2012-)

Balkaya M, **Koc E**. “Değişik kalori Kısıtlama Yöntemlerinin Deneysel Karsinoma ve Sarkoma Üzerine Etkileri ve Etki Mekanizmaları”. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Tez Projesi Birimi (2013-2016).

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Balkaya M, Unsal C, Unsal H, Uner AG, **Koç E**, Erdogan MA, Boylu NT. Effect of Calorie Restriction on Certain Plasma Coagulation Factors and Mitotic Index in Different Organs on Male Wistar Rats. Acta Physiologica, 2011, volume 203, supplement 686, Turkish-FEPS Physiology Congress, Istanbul, Turkey.

Balkaya M, Unsal C, Unsal H, Uner AG, **Koç E**, Erdoğan MA, Boylu NT. Effect of calorie restriction on certain plasma coagulation factors and mitotic index in different organs of male wistar rats". Acta physiologica, 2011, volume 203, supplement 686, Turkish-FEPS Physiology Congress, Istanbul, Turkey.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Uner AG, **Koç E**. Timerosalın Erişkin Ratlarda Motor Sinir İletim Hızı Üzerine Etkisi. TFBD 38. Ulusal Fiziyojji Kongresi, 2012, 016.

Unsal H, Unsal C, Kutu O, Erdogan MA, **Koç E**, Balkaya M, Belge F, Kiral F, Korkmaz D. Short-time effects of pomegranate saft at rats. 36. National Physiology Congress, 2010, Edirne, Turkey.