

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

A549 İNSAN AKCIĞER KANSER HÜCRELERİNİN
ENERJETİK KULLANIMININ ALLOSTERİK GLİKOLİZ
ENZİMLERİ DÜZEYİNDE 3D VE 2D KÜLTÜR ORTAMINDA
KARŞILAŞTIRMALI ARAŞTIRILMASI

BİLGEHAN AKAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-21040 ve TÜBİTAK tarafından 2220217 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilgehan AKARbu doktora tezini 100/2000 YÖK Doktora Bursiyeri olarak tamamlamıştır.

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Funda KIRAL, Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ, Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK ve Dr. Öğr. Üyesi Gamze Sevri EKREN AŞICI'ya, ayrıca desteğini esirgemeyen Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Araş. Gör. Üyesi Emrah İPEK'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için eşim Araş. Gör. Dilek CANLAR AKAR ve aileme ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. Kanserin Karakteristik Özellikleri	4
2.3. Hücresel Metabolizma.....	6
2.3.1. Normal Hücrelerde Glikoz Metabolizması.....	6
2.3.2. Normal Hücrelerde Glikoliz	6
2.3.3. Pentoz Fosfat Yolu	8
2.3.4. Trikarboksilik Asit Siklusu	10
2.3.4. Glutamin Metabolizması	11
2.4. Kanser Hücrelerinde Metabolizma	12
2.4.1. Kanser Hücrelerinde Glikoz Metabolizması.....	13
2.4.2. Kanser Hücrelerinde Glutamin Metabolizması	15
2.5. Kanser Enerji Metabolizmasının Kontrolünde Rol Oynayan Allosterik Enzimler	19

2.5.1. Hekzokinaz	19
2.5.2. Fosfofruktokinaz	20
2.5.3. Pirüvat Kinaz	21
2.5.4. Pirüvat Dehidrojenaz Kompleksi	23
2.5.5. Sitrat Sentaz	25
2.5.6. İzositrat Dehidrojenaz	25
2.5.7. α -Ketoglutarat Dehidrojenaz (2-Oksoglutarat Dehidrojenaz)	26
2.5.8. Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz.....	27
2.5.9. Glutamat Dehidrojenaz.....	28
2.6.2 Hücre Kültürü	29
2.6.1. 3D Hücre Kültürü.....	30
2.6.2. 3D Sferoidlerin Özellikleri	31
2.6.2.1. Sferoidlerde Heterojenite ve Hücre-Hücre Sinyalleşmesi.....	31
2.6.2.2. Sferoidlerin Yapısı	32
2.6.2.4. Ekstrasellüler Matris-Hücre ve Hücre-Hücre Etkileşimleri.....	33
2.6.2.5. Büyüme kinetiği	33
2.6.2.6. Gen Ekspresyonu.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Gereç	35
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	35
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. A549 hücresi	36
3.1.2. Hücre Kültürü Ortamı.....	36
3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması	37
3.1.5. Hücre Sayımı	37

3.1.6 Hücrelerin 2D Yöntem ile Farklı Ortamlarda İnkübasyonu	38
3.1.7. Hücrelerin 3D Yönteme Hazırlanması ve Farklı Ortamlarda İnkübasyonu	38
3.1.7. Hücre Canlılık Testi (MTT).....	39
3.1.8. Enzimlerin ELISA (Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay) ile Tayini	40
3.1.9. İstatistiksel Değerlendirme	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Sferoitlerin Oluşturulması ve Morfolojisi	43
4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	44
4.3. Enzim Miktarlarının Değerlendirilmesi	47
4.3.1. ELISA ile Elde Edilen Hekzokinaz Sonuçları	47
4.3.2. ELISA ile Elde Edilen Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Sonuçları	51
4.3.3. ELISA ile Elde Edilen Fosfofruktokinaz Sonuçları	56
4.3.4. ELISA ile Elde Edilen Pirüvat Kinaz Sonuçları	60
4.3.5. ELISA ile Elde Edilen Pirüvat Dehidrojenaz Sonuçları.....	65
4.3.6. ELISA ile Elde Edilen Sitrat Sentaz Sonuçları.....	69
4.3.7. ELISA ile elde edilen İzositrat Dehidrojenaz Sonuçları	74
4.3.8. ELISA ile Elde Edilen α -Ketoglutarat Dehidrojenaz Kompleksi Sonuçları	78
4.3.9. ELISA ile Elde Edilen Glutamat Dehidrojenaz Sonuçları	83
5.TARTIŞMA.....	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR.....	98
BİLİMSEL ETİK BEYANI	120
ÖZ GEÇMİŞ.....	121

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2D: 2 Boyutlu

2-HG: 2-hidroksiglutarat

3D: 3 Boyutlu

ADP: Adenozin difosfat

α -KG: Alfa-ketoglutarat

α -KGDC: Alfa-ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi / 2-Oxoglutarat Dehidrojenaz

AKT: Protein kinaz B

ALT: Alanin amino transferaz

AST: Aspartat amino transferaz

ATP: Adenozin trifosfat

Bax: Bcl-2 ilişkili X protein

CAD: Karbamoil fosfat aspartat diyamiltransferaz

CO₂: Karbondioksit

CS: Sitrat sentaz

CTP: Sitidin trifosfat

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ECM: Ekstrasellüler matriks

EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş

ELISA: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay

ETC: Elektron taşıma zinciri

F1,6BP: Fruktoz 1,6-bisfosfat

F2,6BP: Fruktoz-2,6-bisfosfat

F6P: Fruktoz 6-fosfat

FADH₂: Flavin adenin dinükleotid

G3P: Gliseraldehit-3-fosfat

G6P: Glikoz-6-fosfat

G6PDH: Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz

GDH: Glutamat dehidrojenaz

Gln-PRPP: Glutamin fosforibozilpirofosfat amidotransferaz

GLS: Glutaminaz

GMP: Guanozin monofosfat

GPI: Glikoz fosfat izomeraz

GSH: İndirgenmiş glutatyon

GSSG: Oksitlenmiş glutatyon

HBP: Heksozamin biyosensetik yolu

HCC: Hepatosellüler karsinom

HIF1: Hipoksi indüklenebilir faktör 1

HK: Hekzokinaz

IDH: İzositrat dehidrojenaz

KoA: Koenzim A

ME: Malik enzim

mTORC: Memeli hedefli rapamisin kompleks

MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür dimetil sülfoksit

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NEAA: Non esansiyel aminoasit

N-GlcNAc: N-bağılı β-N-asetilglikozamin

NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

OAA: Okzaloasetat

O-GlcNAc: O-bağlı β -N-asetilglikozamin

OGT: O-GlcNAc transferazı

PBS: Fosfat Tamponu Çözeltisi

PC: Pirüvat karboksilaz

PDHC: Pirüvat dehidrojenaz kompleksi

PDK: Pirüvat dehidrojenaz kinaz

PDP: Pirüvat dehidrojenaz fosfataz

PEP: Fosfoenol pirüvat

PFK-1: Fosfofruktokinaz 1

PFKFB/PFK-2: fruktoz-2,6-bifosfataz

PGM: Fosfogliserat mutaz

Phe: Fenilalanin

PK: Pirüvat kinaz

PPP: Pentoz fosfat yolu

PRA: Fosforibozil- β -amin

PSAT: Fosfoserin transaminaz

R5P: Riboz-5-fosfat

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

Ru5P: Ribuloz-5-fosfat

S6K: S6 kinaz

SAICAR: "5'-Phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole

SER: Serin

TCA: Trikarboksilik asit

TPI: Trioz fosfat izomeraz

N-GlcNAc: N-asetilglukozamin

ULA-pleyt: Ultra low attachment pleyt

UDP: Uridin difosfat

UTP: Uridin trifosfat

VDAC: Voltaj bağımlı anyon kanalları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri	5
Şekil 2. Glikolizin metabolik adımları.....	8
Şekil 3. Pentoz fosfat yolu	9
Şekil 4. Warburg etkisi	14
Şekil 5. Prolifere hücrelerde glutamin metabolizması.....	18
Şekil 6. PKM2'nin yüksek ve düşük aktivite arasında allosterik düzenlenmesi	22
Şekil 7. Pirüvat Dehidrojenaz kompleksinin allosterik düzenlenmesi	24
Şekil 8. α -KG metabolik akıbeti.....	27
Şekil 9. Sferoid Yapısı	32
Şekil 10. Hemositometrenin mikroskopik görüntüsü	38
Şekil 11. MTT testinin çalışma prensibi	39
Şekil 12. A549 akciğer kanser hücrelerinin 2D yöntemiyle glutaminli ve glikozlu medyumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	46
Şekil 13. A549 akciğer kanser hücrelerinin 3D yöntemiyle glutaminli ve glikozlu medyumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	46
Şekil 14. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi	48
Şekil 15. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi	49
Şekil 16. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi.....	50
Şekil 17. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi.....	50
Şekil 18. Akciğer kanser hücrelerinin Glikozlu medyum 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi	51

Şekil 19. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH aktivitesi.....	53
Şekil 20. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH aktivitesi.....	53
Şekil 21. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim miktarı düzeyleri	54
Şekil 22. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim miktarı düzeyleri	55
Şekil 23. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim miktarı düzeyleri	55
Şekil 24. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri.	57
Şekil 25. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri.	58
Şekil 26. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri	59
Şekil 27. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri.....	59
Şekil 28. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri.....	60
Şekil 29. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri	62
Şekil 30. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri	62
Şekil 31. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri	63
Şekil 32. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri	64
Şekil 33. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri	64

Şekil 34. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.....	66
Şekil 35. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.....	67
Şekil 36. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.....	68
Şekil 37. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.....	68
Şekil 38. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.....	69
Şekil 39. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.....	71
Şekil 40. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.....	71
Şekil 41. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.....	72
Şekil 42. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.....	73
Şekil 43. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.....	73
Şekil 44. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.....	75
Şekil 45. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.....	76
Şekil 46. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.....	77
Şekil 47. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.....	77
Şekil 48. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.....	78

- Şekil 49.** Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri 80
- Şekil 50.** Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri 80
- Şekil 51.** Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri .. 81
- Şekil 52.** Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri 82
- Şekil 53.** Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri 82
- Şekil 54.** Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri..... 84
- Şekil 55.** Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri..... 84
- Şekil 56.** Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri. 85
- Şekil 57.** Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri..... 86
- Şekil 58.** Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri..... 86

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Farklı medyumlarda yukarıdan aşağıya sırası ile 24, 48, 72. saatlere ait sferoid görüntüleri	44
--	----

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında glikozlu-glutaminli medyuma göre 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık ve standart hata değerleri.	45
Tablo 2. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi (mU/mL) ve standart hata değerleri.	47
Tablo 3. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim aktivite (mU/mL) ve standart hata değerleri.	52
Tablo 4. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK (ng/mL) enzim miktarları ve standart hata değerleri.	56
Tablo 5. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite (U/ml) ve standart hata değerleri.	61
Tablo 6. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarları (ng/mL) ve standart hata değerleri.	65
Tablo 7. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS seviyeleri ve standart hata değerleri. ...	70
Tablo 8. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarları (ng/ml) ve standart hata değerleri.	74
Tablo 9. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarları (ng/ml) ve standart hata değerleri.	79
Tablo 10. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite (U/L) ve standart hata değerleri.	83

ÖZET

A549 İNSAN AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNİN ENERJETİK KULLANIMININ ALLOSTERİK GLİKOLİZ ENZİMLERİ DÜZEYİNDE 3D VE 2D KÜLTÜR ORTAMINDA KARŞILAŞTIRMALI ARAŞTIRILMASI

Akar, B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Doktora Tezi, Aydın 2024.

Amaç: A549 kanser hücrelerinin 3D kültür yöntemi ile 2D kültür yönteminde glikoz ve glutamin kullanımındaki farklılığın, glikoliz ve TCA allosterik enzimleriyle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: A549 hücreleri, klasik hücre kültürü yöntemi ve 3D yöntemle, glikoz ve glutamininden ikisini veya birini içeren medyumlarda belirli sürelerde (24, 48, 72 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hazırlanan hücre lizatlarında, ELISA kitleri kullanılarak enzim seviyeleri ölçüldü. Canlılık değerlendirmesi için MTT testi uygulandı. Verilerin istatistiksel analizi için, IBM SPSS Statistics 21 programı kullanıldı.

Bulgular: Glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D kültürlerde 24. saatte HK, PK, PDH, CS, IDH, α -KGDC enzim konsantrasyonlarında anlamlı farklılık belirlenmiştir. Glutaminli medyumdaki HK, 2D ve 3D kültürlerde tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık gösterirken, PFK 24 ve 72. saatlerde 3D kültürde daha yüksek konsantrasyona sahiptir. G6PDH ve α -KGDC'de 48 ve 72. saatlerde, CS'de 24 ve 72. saatlerde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Glikozlu medyumdaki 2D ve 3D kültürlerde HK, G6PDH, PFK, IDH enzimlerinde tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. G6PDH ise tüm zaman aralıklarında 2D yönteminde yüksek konsantrasyona sahiptir. PK, PDH, CS, α -KGDC ve GDH enzim konsantrasyonlarında 2D ve 3D kültür ortamlarında anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

Sonuç: 2D ve 3D yöntemler arasındaki canlılık ve enzim miktarındaki farklılıkların inkübasyon sürelerine bağlı olduğu görülmüştür. 2D ve 3D ortamlarının hücrenin metabolik aktivitesinde farklılıklara neden olduğunu, hücre kültürü çalışmalarının bu bağlamda ayrıntılı çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: 3D hücre kültürü, Glikoz, Glikoliz allosterik enzimleri, Glutamin, TCA allosterik enzimleri

ABSTRACT

COMPARISON OF ENERGETIC UTILIZATION OF A549 HUMAN LUNG CANCER CELLS AT THE LEVEL OF ALLOSTERIC GLYCOLYSIS ENZYMES IN 3D AND 2D CULTURE ENVIRONMENTS

Akar, B. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Biochemistry Program, Doctoral Thesis, Aydın 2024.

Objective: Illustrate variations in glucose and glutamine utilization within A549 cancer cells cultivated using both 3D and 2D methods, focusing on the allosteric enzymes involved in glycolysis and the tricarboxylic acid (TCA) cycle.

Materials and Methods: A549 cells were incubated using both 2D and 3D method in media containing either glucose, glutamine, or a combination of both for specific durations (24, 48, 72 hours). Following incubation, enzyme levels were measured in cell lysates using ELISA kits. MTT test was used for viability tests. For statistical analysis, the IBM SPSS Statistics 21 software was used.

Results: In the glucose-glutamine containing medium, significant differences were observed in the concentrations of HK, PK, PDH, CS, IDH, and α -KGDC enzymes between 2D and 3D cultures at the 24th hour. In the glutamine medium, HK showed significant differences in both 2D and 3D cultures at all time intervals, while PFK exhibited higher concentrations in 3D cultures at the 24th and 72nd hours. Significant differences were observed in G6PDH and α -KGDC at the 48th and 72nd hours, and CS at the 24th and 72nd hours. In the glucose medium, significant differences were detected in HK, G6PDH, PFK, and IDH enzymes between 2D and 3D cultures at all time intervals. G6PDH, however, exhibited higher concentrations in the 2D method at all time intervals. Significant differences have been found in the concentrations of PK, PDH, CS, α -KGDC, and GDH enzymes between 2D and 3D culture methods.

Conclusion: The disparities in cell viability and enzyme concentrations between 2D and 3D methods appear to be influenced by the incubation durations. These findings suggest that 2D and 3D culture methods have different effects on cellular metabolic activity, emphasizing the importance of detailed investigations in cell culture studies.

Keywords: 3D cell culture, Glucose, Glycolysis allosteric enzymes, Glutamine, TCA allosteric enzymes

1. GİRİŞ

Yüksek insidansı ve mortalitiesi nedeniyle kanser, en sık araştırılan hastalıkların başında gelmektedir. Dünya sağlık örgütünün 2020 verilerine göre kanser kaynaklı ölümlerin sayısı yaklaşık olarak 10 milyondur. Bununla birlikte her yıl yaklaşık olarak 400 bin çocuk kansere yakalanmaktadır. 2020 verileri ayrıntılı olarak incelendiğinde kanser vakaları arasında en sık teşhis edilen türlerin meme, akciğer, kolon ve rektum, prostat, deri ve ağız kanseri olduğu görülmektedir. Bu vakalar arasından yaklaşık 1,8 milyon kişiyle en çok ölüme neden olan kanser türü ise akciğer kanseridir. (World Health Organization, 2022).

Kanserin ayırt edici özellikleri arasında, kanser hücresinin metabolizmasını yeniden programlaması, hücrelerinin değişen ortam koşullarına karşı adaptasyonunda kilit bir rol oynamaktadır. Tümörler için karakteristik olan metabolik değişikliklerle ilgili ilk gözlemler yaklaşık bir asır önce yapılırken, kanser metabolizması alanı son yıllarda tekrardan ilgilenilen konu haline gelmiştir. Glikoz ve glutamin, kanser hücrelerinin çoğalmaları ve büyümeleri için kullandıkları en önemli iki besin maddesidir. Bu moleküllerin katabolizması ile kanser hücreleri hem karbon içeren ara ürünleri yapı taşı olarak kullanır hem de makromoleküllerin ve ATP üretimi için indirgeyici güç sağlar. Kanser hücrelerinde glikoz kullanımının 5-10 kat arttığı, ayrıca yeterli oksijen varlığında glikozu önemli ölçüde laktata çevirdiği 1920'lerde Otto Warburg tarafından keşfedilmiştir. Glikoz metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilgili bu keşif 'Warburg etkisi' olarak anılır ki kanser metabolizmasının anlaşılması ve tedavi hedeflerine yönelik çok fazla sayıda araştırmaya da ışık tutmuştur (Warburg, 1927). Kanser dokularında meydana gelen artan glikoz alımı, nükleotidlerin ve amino asitlerin üretimine katkıda bulunarak enerji üretimi için hızlı bir yol oluşturur. (Granchi ve diğerleri, 2014; Salamon ve diğerleri, 2017). Warburg etkisi sonucu oluşan laktat, bu süreçte sadece atık ürün değil, aksine hücre göçünü, yeni damar oluşumu, immun sistemden kaçışı ve radyoaktif direnci geliştirerek tümör invazyonunu arttıran bir ajan olarak rol oynamaktadır (Draoui ve diğerleri, 2013; Salamon ve diğerleri, 2017). Glikoz katabolizması, değişmiş kanser metabolizmasına atfedilmiş belirleyici marker olmasına rağmen, bu metabolizmadaki değişikliğin tek başına hücre büyümesinin metabolik ihtiyaçlarını karşıladığı söylenemez. Son yıllarda glutaminin proliferasyonda önemli ölçüde enerji sağlayan kritik besin olduğu anlaşılmıştır. Glutamin, kan dolaşımında en bol bulunan esansiyel olmayan aminoasitlerden biridir ve çoğalan hücrelerde neredeyse her biyosentetik yola katkıda bulunur. Tümör hücreleri, glikoz metabolizmasındaki

metabolik sapmalarının neden olduğu kayıp trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ara ürünlerini glutaminden oluşturulan α -ketoglutarat (α -KG) ile telafi edebilirler (Jeong ve diğerleri, 2016). Bunun dışında glutaminden üretilen glutamat, glutasyon sentezinde kullanılabilir. Glutasyon hücrenin bağışıklık savunması, besin metabolizması ve hücre işlevleri için hayati önem taşıyan bir antioksidandır (G. Wu ve diğerleri, 2004). Ayrıca mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisizleştirilmesinde önemli bir rol oynar. Dahası, pürin ve pirimidin sentezinde bir azot donörü vericisi olarak görev alır (De Berardinis ve Cheng, 2010). Bu sebepten kanser hücreleri birçok temel molekülün biyosentezini sürdürmek için glutaminolizi tercih edebilmektedir. Bu durum glutamin bağımlılığı olarak bilinmektedir. Bazı tümör hücrelerinin glutamin yokluğunda öldükleri bildirilmektedir (Still ve Yuneva, 2017). Son çalışmalar, glutamin metabolizmasının inhibisyonunun, kanser hücrelerini tahrip edebilecek artan ROS üretimi ile sonuçlandığını göstermiştir (Elgogary ve diğerleri, 2016; Le ve diğerleri, 2012). Bu nedenlerle, kanser tedavisinde glikoz ve glutamin metabolizmasının hedeflenmesi, kanser hücrelerinin hayatta kalmalarını bir şekilde etkileyebileceğini düşündürmektedir (Erickson ve Cerione, 2010).

Hücre kültürleri, hücre mekanizmalarının anlaşılabilmesi için çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. İlk olarak Harrison'un 1907'de keşfettiği bu yöntem ilerleyen yıllarda kanser çalışmaları için kullanılmaya başlanmıştır (Harrison, 1907). Başlangıçta 2 boyutlu (2D) olarak uygulanan bu yöntem yeni tekniklerin geliştirilmesiyle son yıllarda yerini 3 boyutlu (3D) hücre kültürüne bırakmaya başlamıştır. Kanser çalışmaları için uygulanan 2D yöntemde hücreler düz yüzeyli kültür flaskları ya da petri kaplarında plastik yüzeye tutunarak tek tabakalı şekilde üremektedir (Kapałczyńska ve diğerleri, 2018). Bu yöntem başlangıçta kabul görmüş ve kanser hücrelerinin davranışı, metabolizması ve tedavi yöntemleri konusundaki anlayışımızı önemli ölçüde ilerletmiştir. Bununla birlikte 2D hücre kültürlerinin birçok dezavantajı vardır. Düz bir zeminde tek tabakalı şekilde üreyen hücreler ekstrasellüler matriksten yoksundurlar. 2D hücre kültürlerinde ekstrasellüler matriksin yokluğu nedeniyle, *in vivo* ortamdaki hücrelerin yapısal organizasyonunu, morfolojisini, buna bağlı olarak da hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler etkileşimleri taklit edememektedir. Bu etkileşimler hücrelerin differansiyonu, proliferasyonu, gen ve protein ekspresyonu, uyarılara yanıt ve diğer hücresel fonksiyonların düzenlenmesi için gereklidir (Brancato ve diğerleri, 2020; Habanjar ve diğerleri, 2021; Kapałczyńska ve diğerleri, 2018; F. Xu ve Burg, 2007). Birçok çalışma aynı hücreler 2D ve 3D kültürlendiğinde hücrelerin morfolojisi, hücre haberleşme, hücre göçü ve ilaç tepkilerinde farklılıklar gözlenmiştir (Muguruma ve diğerleri, 2020; Wanigasekara ve diğerleri, 2022). Dış ortamdaki

bu etkileşimlerin eksikliği hücrelerin polaritesini kaybetmesine, bu da hücrenin apoptoz mekanizmasına tepkisinin değişmesine neden olmaktadır (Meyers ve diğerleri, 2006; Weaver ve diğerleri, 2002). Ayrıca birçok çalışma 3D hücre kültürlerinin 2D'ye kıyasla birçok moleküler yolun yukarı regüle ya da baskılanabileceğini göstermektedir. Protein kinaz B (AKT) - memeli hedefli rapamisin kompleksi (mTOR) - S6 kinaz (S6K) metabolik yolununun 3D kültürlerde 2D kültürlerle göre daha az aktive olduğu görülmüştür (Riedl ve diğerleri, 2017). Bir diğer dezavantaj ise 2D kültüründe, tek tabakalı üreyen hücreler, oksijen, besinler, metabolitler ve sinyal molekülleri gibi bileşenler sınırsız erişime sahiptir. İn vivo kanser hücrelerinde ise, bu durum besin maddeleri ve oksijen gibi maddelerin kullanılabilirliği, tümör yapısının doğal organizasyonu sebebiyle daha değişkendir (Pampaloni ve diğerleri, 2007).

Tüm bunlar ele alındığında en yaygın araştırma modeli hala 2D kültür sistemidir. Bununla birlikte, 2D kültürlerdeki sınırlamalar nedeniyle, hücresel metabolizma ve tepkilerle ilişkili süreçleri incelemek için verimsiz bir model olarak görülmektedir. 3D modeller, yeni biyobelirteçler ve yeni tedavi stratejileri arayışında potansiyel olarak daha iyi bir yaklaşımdır. Bununla birlikte değişmiş tümör metabolizmasını hedeflemek, kanser tedavisi için ortaya çıkan bir terapötik stratejidir. Kanser tedavisi, teşhisi ve prognozundaki temel hedef kanser hücresi ile normal hücre arasındaki metabolik farklara dayanmaktadır ve farklılıklar yaratmaktadır. Son yıllarda kanser hücresinde metabolik yollarda yer alan moleküler hedefler tedavi açısından ön plana çıkmaya başlamıştır. Tez çalışması sonuçları A549 insan akciğer kanser hücresinin glikoz ve glutamin kullanımının aydınlatılması üzerine yapılan araştırmalara katkı sağlayacağı gibi 2D ile 3D hücre kültür ortamında glikoz ve glutaminden yararlanma bakımından bir fark olup olmadığının ortaya konulması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen karmaşık ve yaygın bir hastalıktır. Vücutta kontrolsüz bir şekilde büyüyen ve yayılan anormal hücrelerle karakterizedir. Kanser, herhangi bir organ veya dokuda gelişebilir ve kan dolaşımı veya lenfatik sistem aracılığıyla yakındaki dokulara yayılma veya vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeline sahiptir.

2.2. Kanserin Karakteristik Özellikleri

Kanserin gelişmesini ve ilerlemesini sağlayan bir dizi edinilmiş özellik veya özellikler kanserin ayırt edici özellikleridir. Bu ayırt edici özellikler ilk olarak 2000 yılında Douglas Hanahan ve Robert A. Weinberg tarafından önerilmiş ve 2011 yılında güncellenmiştir. Kanserin 10 karakteristik özelliği vardır (Şekil 1) (Hanahan ve Weinberg, 2011):

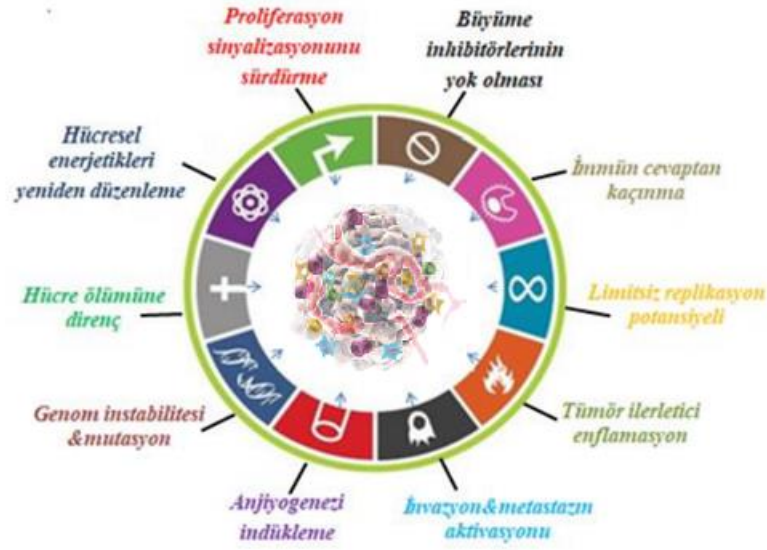
1. Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik: Kanser hücreleri büyümek için kendi sinyallerini üretme yeteneğine sahiptir, bu da onların dış sinyaller olmadan çoğalmalarını sağlar.

2. Büyüme karşıtı sinyallere karşı duyarsızlık: Kanser hücreleri normalde hücre büyümesini önleyen sinyalleri görmezden gelerek, bölünmeye ve kontrolsüz bir şekilde büyümeye devam etmelerine izin verebilir.

3. Doku istilası ve metastazı: Kanser hücreleri birincil tümörden ayrılarak yakındaki doku ve organları istila etme ve ayrıca kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılma yeteneğine sahiptir.

4. Sınırsız çoğalma potansiyeli: Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerin ömrünü sınırlayan normal hücresel yaşlanma ve hücre ölüm süreçlerinden kaçınarak süresiz olarak bölünme ve çoğalma yeteneğine sahiptir.

5. Sürekli anjiyogenez: Kanser hücreleri büyümek, hayatta kalmak, ihtiyaç duydukları oksijen ve besinleri sağlamak için yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik edebilir.



Şekil 1. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri (Hanahan, 2022).

6. Hücre ölümüne karşı direnç: Kanser hücreleri normalde hasarlı veya anormal olan hücreleri ortadan kaldıran programlanmış hücre ölümünden (apoptozdan) kaçınabilir.

7. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması: Kanser hücreleri glikoz ve glikoz dışındaki kaynaklardan enerji elde etmek için metabolizmalarını değiştirebilirler. Bu durum da onların düşük besinli ortamlarda bile büyümeye ve bölünmeye devam etmelerini sağlar.

8. İmmün sistemden kaçınma: Kanser hücreleri bağışıklık sisteminin tespitinden ve saldırısından kaçarak büyümeye ve yayılmaya devam edebilirler.

9. Genom istikrarsızlığı ve mutasyon: Kanser hücrelerinin büyüme ve hayatta kalma yeteneklerine katkıda bulunabilecek mutasyonları biriktirmeye eğilimli kararsız bir genomu vardır.

10. Tümörü teşvik eden iltihaplanma: İnflamatuar hücreler ve moleküller kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyebilir ayrıca tümörü destekleyen bir mikro ortamın gelişimine katkıda bulunabilir.

Kanserin ayırt edici özelliklerini anlaşılması, kanseri önleme, teşhis ve tedavi için yeni stratejiler geliştirmek için önemlidir.

2.3. Hücresel Metabolizma

Hücresel metabolizma, canlı organizmalarda yaşamın sürdürülmesi için gerçekleşen kimyasal reaksiyonların tümüdür. Bu kimyasal reaksiyonlar proteinler, karbonhidratlar, lipitler gibi temel makromoleküllerin sentezi ve besin maddelerinin parçalanmasını içerir. Metabolik reaksiyonlar sırasında hücrelerin büyüme, hareket ve üreme gibi çeşitli fonksiyonları için kullanılan enerji üretilir. Hücrenin enerji birimi olan adenosin trifosfat (ATP) üreten metabolik yollar olan glikoliz, sitrik asit siklusu, oksidatif fosforilasyon gibi metabolik yollar hücresel metabolizmaya dahildir (Bonora ve diğerleri, 2012).

2.3.1. Normal Hücrelerde Glikoz Metabolizması

Glikoz metabolizması, birçok organizma için temel bir enerji üretim yoldur. Glikoz, öncelikle glikoliz adı verilen bir süreçle pirüvat moleküllerine dönüştürülür. Pirüvat daha sonra, oksijen varlığında mitokondriyal solunum yolu aracılığıyla karbondioksit (CO_2), su ve ATP üretmek için kullanılır. Oksijen yokluğunda ise pirüvat, laktata dönüştürülür (Nelson ve Cox, 2017).

Glikoz ayrıca hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan yapı taşlarının üretilmesinde de önemli bir rol oynar. Örneğin; glikoz, hücre zarı ve nükleik asit gibi birçok biyomolekülün sentezi için kullanılır (Nelson ve Cox, 2017a).

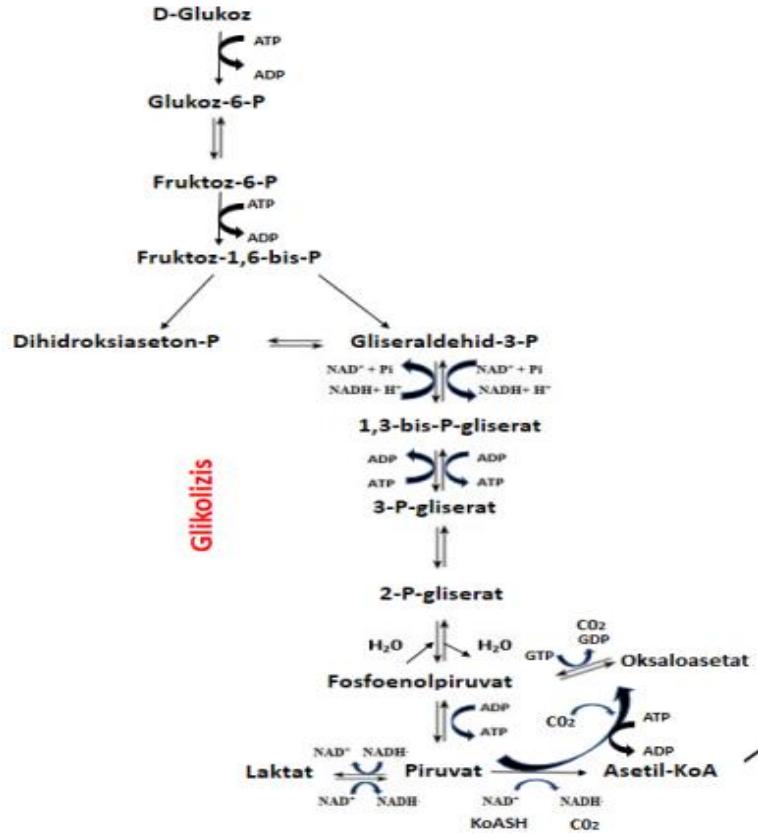
Kanser hücreleri, benzersiz metabolizmalarından dolayı normal hücrelere kıyasla daha yüksek miktarda glikoza ihtiyaç duyarlar, bu durum glikoz metabolizmasını kanser gelişimi ve ilerlemesi için önemli bir faktör haline getirir. Kanser hücrelerinde glikoz metabolizması, glikoliz, pentoz fosfat yolu ve TCA döngüsü de dahil olmak üzere çeşitli yolların aktive olmasını içerir (Gill ve diğerleri, 2016).

2.3.2. Normal Hücrelerde Glikoliz

Glikoliz karbonhidratların, özellikle glikozun, hücre içinde yıkılarak enerji elde etmek için kullanıldığı bir metabolik yoldur. Bu yolda glikoz 10 basamakta 2 adet pirüvat molekülüne

dönüştürülür (Şekil 2). Glikozun pirüvata parçalanması sitoplazmada gerçekleşir, oksijen varlığından bağımsız olarak ATP üretilir ve glikoliz olarak adlandırılır (Nelson ve Cox, 2017a).

Glikolizin ilk adımında, ATP fosfat donörü olarak kullanılarak glikoz, heksokinaz (HK) tarafından glikoz-6-fosfata (G6P) fosforile edilir. Bu geri dönüşümsüz bir reaksiyondur ve dolayısıyla glikolizin hız sınırlayıcı reaksiyonlarından biridir. G6P daha sonra glikoz fosfat izomeraz (GPI) tarafından fruktoz-6-fosfata (F6P) dönüştürülür. Sonra F6P, fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) aracılığıyla bir ATP kullanarak fruktoz-1,6-bisfosfata (F1,6BP) fosforile edilir. PFK-1, fizyolojik koşullarda işlevsel olarak etkin değildir ve aktive edilmesi için fruktoz-2,6-bisfosfat gerektirir. Bu reaksiyon, glikolitik yolun diğer bir hız sınırlayıcı reaksiyonudur. Aldolaz, F1,6BP'yi iki trioz fosfata, gliseraldehid-3-fosfat ve dihidroksi aseton fosfata ayırır. Gliseraldehid-3-fosfat ve dihidroksi aseton fosfat, trioz fosfat izomeraz (TPI) enzimi tarafından birbirine dönüştürülür. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı enzim gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz, gliseraldehid-3-fosfatı (G3P) 1,3-bisfosfogliserate dönüştürür. Fosfogliserat kinaz, 1,3-bisfosfogliserattan bir fosfat grubunu adenozin difosfata (ADP) transfer ederek ATP ve 3-fosfogliserat oluşturur. Glikoz molekülü başına bu aşamada iki trioz fosfat molekülü oluşturulduğundan, bu aşamada glikoz molekülü başına 2 ATP molekülü oluşur. Fosfogliserat mutaz (PGM), 3-fosfogliseratı 2-fosfogliserata dönüştürür. Enolaz, 2-fosfogliserati fosfoenol pirüvata (PEP) dönüştürür. Pirüvat kinaz enzimi, PEP'ten ADP'ye bir fosfat grubunun transferini katalize ederek, pirüvat ve 2 ATP molekülü üretir. Oksijensiz koşullarda, pirüvat sitoplazmada laktata indirgenir ve bu reaksiyon laktat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Ancak aerobik koşullarda, pirüvat mitokondriye alınır ve pirüvat dehidrojenaz kompleksi ile geri dönüşümsüz bir reaksiyonla asetil koenzim A'ya (asetil-KoA) dönüştürülür. Asetil-KoA daha ileriki aşamalarda trikarboksilik asit (TCA) döngüsü aracılığıyla oksidasyona uğrar. Glikoliz sonuç olarak net 2 ATP, 2 (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid) NADH üretir, 2 molekül NADH de pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümü sırasında elde edilir. (Alfarouk ve diğerleri, 2014; Nelson ve Cox, 2017a; Yu ve diğerleri, 2016).



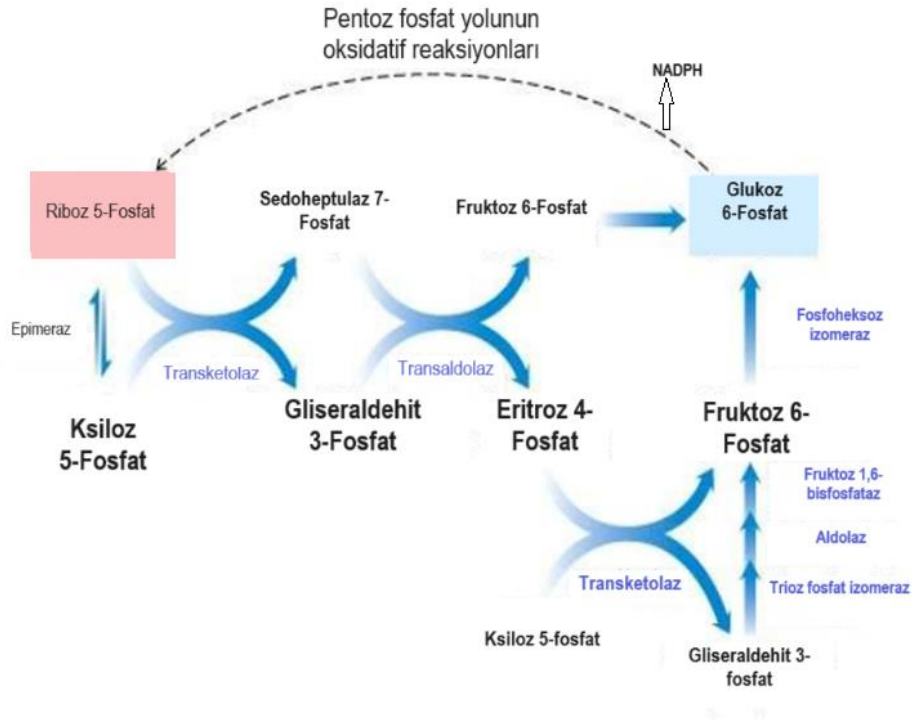
Şekil 2. Glikolizin metabolik adımları (Alam ve diğerleri, 2016)

Glikoliz, hücrenin sitoplazmasında gerçekleşen metabolik bir yoldur. Bu metabolik yol, oksijen kullanmadan ATP oluşturur, ancak oksijen varlığında da gerçekleşebilir. Aerobik solunumu ana enerji kaynağı olarak kullanan hücrelerde, glikoliz yolundan oluşan pirüvat, sitrik asit döngüsünde kullanılabilir ve oksidatif fosforilasyon sürecinden geçerek karbondioksit ve suya oksitlenebilir. Hücrelerin başlıca oksidatif fosforilasyon kullandığı durumlarda, glikoliz enerji acil durumları için yedek olarak veya oksidatif fosforilasyon öncesinde hazırlık adımı olarak işlev görebilir (Chaudhry ve Varacallo, 2023).

2.3.3. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu (PPP), fosfoglukonat yolu veya heksoz monofosfat şantı olarak da bilinen glikolize paralel bir metabolik yoldur (Patra ve Hay, 2014).

Pentoz fosfat yolu sitozolde gerçekleşir ve iki geri dönüşümsüz oksidatif reaksiyonu takiben bir dizi geri dönüşümlü reaksiyon içerir. PPP oksidatif ve oksidatif olmayan yolak olmak üzere ikiye ayrılır. Oksidatif yol, G6P'ı glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimi ile başlayan ribuloz-5-fosfat (Ru5P), CO₂ ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'a dönüştürür. NADPH, redoks dengesini korumak için stres koşullarında hayati öneme sahiptir ve hücrelerin hızla çoğalmasında önemlidir. Oksidatif olmayan yol ise, glikolitik ara ürünler F6P, G3P ve sedoheptuloz şekerleri, amino asit sentezi için şeker fosfat öncülleri ve nükleik asit sentezi için gerekli olan riboz-5-fosfat (R5P)'ı üretir (Jin ve Zhou 2019; P. Jiang ve diğerleri, 2014).



Şekil 3. Pentoz fosfat yolu (Nelson ve Cox, 2017a).

Pentoz fosfat yolu, birincil olarak G6PD enzimi ile düzenlenir. G6PD, G6P'nin geri dönüşümsüz olarak 6-fosfoglukonolaktona oksidasyonunu katalizler ve bu sırada NADPH molekülü üretilir (Jin ve Zhou 2019; P. Jiang ve diğerleri, 2014). G6PD, PPP'deki hız sınırlayıcı enzimdir ve NADPH/NADP oranına göre düzenlenir (Stanton, 2012). G6PD aktivitesi aynı zamanda direkt olarak oksidatif PPP'nin aktivitesini yansıtır (Jin ve Zhou 2019; P. Jiang ve diğerleri, 2014; Stanton, 2012).

2.3.4. Trikarboksilik Asit Siklusu

TCA döngüsü (Krebs döngüsü, sitrik asit döngüsü), oksijenli solunum yapan canlıların karbonhidratlardan, yağlardan ve proteinlerden elde ettikleri asetil-KoA'yı okside ederek NADH ve flavin adenin dinükleotid (FADH₂) üreten kimyasal tepkimeler bütünüdür. TCA döngüsü, sadece glikoz değil aynı zamanda yağ asitleri, amino asitler ve keton cisimcikleri de dahil olmak üzere birden fazla substratın beslenebileceği bir merkez olarak kabul edilir. TCA döngüsü sırasında üretilen ara maddeler, amino asitler ve nükleotidlerin biyosentezi gibi diğer anabolik yollarda da kullanılır (Sekine ve diğerleri, 2008).

Aerobik solunum için kritik öneme sahip olan TCA döngüsü 8 enzimatik reaksiyonu içerir. TCA döngüsü, asetil-KoA ve oksaloasetatın sitrat sentaz aracılığıyla birleşmesi ve sitrat oluşumuyla başlar. Bu reaksiyonun ardından akonitazın etkisiyle izomeri olan izositrata dönüştürülür. Daha sonra izositrat, izositrat dehidrojenaz ile oksidatif dekarboksilasyona uğrar ve α -ketoglutarat ile CO₂ ve NADH üreterek ayrışır. α -ketoglutarat daha sonra α -ketoglutarat dehidrojenaz enzim kompleksi aracılığıyla dekarboksile edilir ve süksinil-KoA'ya dönüşür, bu da başka bir CO₂ ve NADH molekülü üretir. Süksinil-CoA daha sonra Süksinil-KoA sentetaz aracılığıyla süksinata dönüştürülür, bu işlem sırasında bir ATP molekülü üretilir. Süksinat sonrasında süksinat dehidrojenaz enzimi tarafından fumarata oksitlenir, bu sırada süksinattan FADH₂'ye elektron transferi gerçekleşir. Fumarat, fumaraz tarafından hidrate edilir ve malata dönüştürülür. Son olarak malat, malat dehidrojenaz enzimi tarafından okside edilir ve NADH üretir, bu da oksaloasetatı oluşturur. Bu aşamada döngü tamamlanmıştır ve oluşan oksaloasetat yeni bir asetil-KoA molekülüyle birleşerek yeni döngüyü başlatabilir. (Cardaci ve Cirilio 2012; Martinez-Reyes ve Chandel, 2020).

Ökaryotik hücrelerde, hücresel solunum öncelikle aerobiktir, ancak hücreler glikolitik fermantasyon yoluyla anaerobik olarak da enerji üretebilir. Glikoliz yolunda glikozdan 2 adet pirüvat elde edilir. Aerobik koşullar altında pirüvat mitokondriye girer ve TCA döngüsü üzerinden oksidatif fosforilasyonla net 36 ATP üretilir. Anaerobik koşullar altında ise pirüvat sitozolde kalır ve laktata dönüştürülür. Bu durumda glikoliz basamağında net 2 ATP, TCA siklusundan 2 ATP, elektron transport zincirinden oksidatif fosforilasyon yoluyla 32 ATP üretilir (Nelson ve Cox, 2017b; Roy ve diğerleri, 2017). Normal hücre metabolizmasında enerjinin %90'ı mitokondriyal solunum üzerinden elde edilirken, yalnızca %10'u glikolizden elde edilir (Gill ve diğerleri, 2016).

2.3.4. Glutamin Metabolizması

Glutamin hücrel metabolizmada önemli rol oynayan ve plazmada en bol bulunan non-esansiyel amino asittir (NEAA). Normal hücrelerde glutamin metabolizması çeşitli önemli hücrel süreçlere katkıda bulunur. Glutamin TCA siklusu, NEAA sentezi, nükleotid sentezi ve oksidatif fosforilasyon dahil olmak üzere birçok metabolik yol için karbon ve azot kaynağı olarak kullanılır.

Glutamin solute carrier ailesine dahil olan, SLC1A5, SLC38A1 ve SLC38A217 gibi plazma zarı glutamin taşıyıcıları aracılığıyla hücrelere taşınır ve ardından sitoplazmada heksozamin, nükleotidler ve asparajin biyosentezi için kullanılabilir. Mitokondriyal glutaminoliz için sitoplazmik glutaminin SLC1A5 aracılığıyla iç mitokondriyal membranı geçmesi gerekmektedir. Daha sonra glutamin glutaminaz (GLS)'lar tarafından glutamata dönüştürülür ve amonyum iyonu açığa çıkar. Bu katabolik yol aracılığıyla üretilen mitokondriyal glutamat SLC25A18 ve SLC25A22 taşıyıcıları aracılığıyla mitokondriden sitoplazmaya transfer edilebilir ve sitoplazmik glutamat daha sonra glutatyon ve diğer NEAA'ların (alanin, prolin, aspartat, asparajin ve arginin) sentezinde kullanılır (Yoo ve diğerleri, 2020). Mitokondri içerisinde kalan glutamat ise 2 farklı yol ile α -KG'ye dönüştürülür. Bunlardan ilki glutamat dehidrogenaz (GDH) aracılığıyla gerçekleşir ve NADPH veya NADH üretir. İkincisi ise alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST) ve fosfoserin transaminaz (PSAT) dahil olmak üzere transferazlar tarafından gerçekleştirilir ve sırasıyla aspartat, alanin gibi NEAA'lar ve fosfoserin sentezini gerçekleştirir. Böylece oluşan α -KG, TCA döngüsüne girer ve oksidatif fosforilasyon yolunu destekleyebilir (De vitto ve diğerleri, 2016, L. Yang ve diğerleri, 2017, Yoo ve diğerleri, 2020). Ayrıca α -KG sitoplazmaya alınarak izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1)'in aracılık ettiği redüktif karboksilasyon yolu ile sitrat haline karboksile edilebilir ve de novo yağ asidi sentezi için asetil-KoA'ya dönüştürülebilir (Nguyen ve Durán, 2018; L. Yang ve diğerleri, 2017; Wei ve diğerleri, 2021).

Ayrıca glutamin heksozamin biyosentetik yolu (HBP) için amino grupları da sağlayabilir. Fruktoz-6-fosfat aminotransferaz enzimi, glutaminin amino grubunu alarak fruktoz-6-fosfatı ve ardından N-bağlı ve O-bağlı glikozilasyon reaksiyonları da dahil olmak üzere posttranslasyonel modifikasyon için önemli bir metabolit olan glikozamin-6-fosfatı oluşturur. Bu reaksiyonlar modifiye proteinlerin ve lipidlerin sinyal iletimine, taşıma/salgılama ve diğer süreçlere katılımı için gereklidir (De vitto ve diğerleri, 2016; Jin ve diğerleri, 2016; L. Yang ve diğerleri, 2017).

Nükleotidler genetik bilginin aktarımı için temel olan DNA ve RNA'nın yapı taşlarıdır. Nükleotid sentezi glutamin dahil olmak üzere çeşitli amino asitlere ihtiyaç duyan bir süreçtir. Glutamin hem pürinlerin hem de pirimidinlerin de novo sentezi için gerekli olan bir azot vericisidir ve dolayısıyla hücre çoğalması sırasında nükleotidlerin üretimi için önemlidir. Pürin biyosentezinde iki adet glutamin molekülünün γ -azotları pürin halkasına eklenir ve üçüncü bir glutamin ksantin monofosfatın guanozin monofosfata (GMP) dönüşümünde kullanılır. Diğer azotlar glisin ve aspartat tarafından sağlanır ancak bunların birçoğu da başlangıçta glutaminin α -azotundan türetilir (DeBerardinis ve Cheng 2010; L. Yang ve diğerleri, 2017; Yoo ve diğerleri, 2020; Wei ve diğerleri, 2021; J. Zhang ve diğerleri, 2017). Pirimidin biyosentezinde ise bir glutamin molekülü karbamoil fosfat sentetaz enzimi tarafından kullanılır. Bir glutamin molekülü uridin trifosfat (UTP) üzerinden sitidin trifosfat (CTP) sentezlemek için kullanılır (DeBerardinis ve Cheng 2010; L. Yang ve diğerleri, 2017; Yoo ve diğerleri, 2020; Wei ve diğerleri, 2021; J. Zhang ve diğerleri, 2017).

2.4. Kanser Hücrelerinde Metabolizma

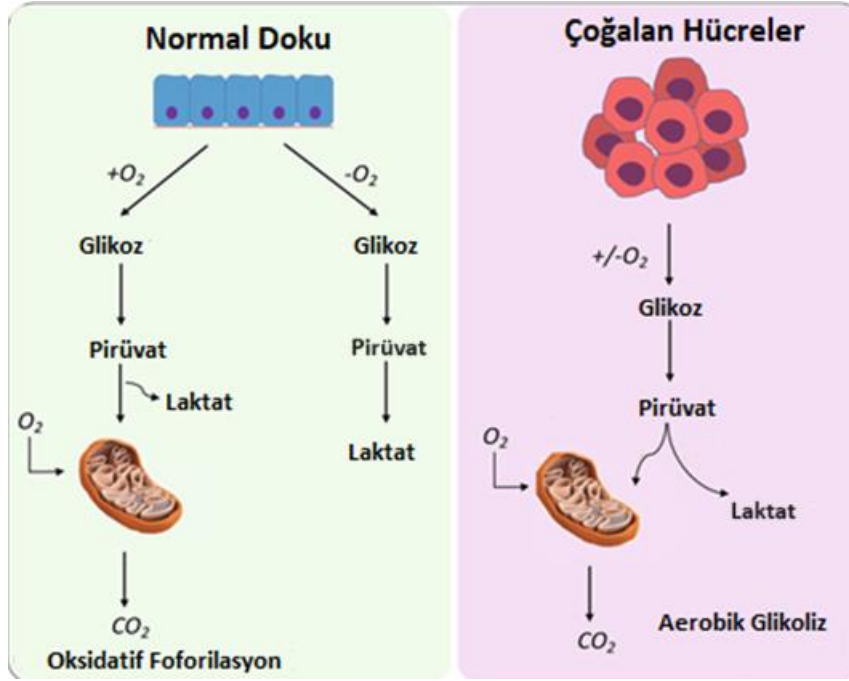
Kanser biyolojisinin en eski araştırma alanlarından biri kanser metabolizmasıdır. Temel prensip metabolik faaliyetlerin kanser hücrelerinde normal hücrelere göre değiştiği ve bu değişikliklerin malign özelliklerin kazanılmasını ve sürdürülmesini desteklediği şeklindedir. Bazı değiştirilmiş metabolik özellikler birçok kanser hücresinde genel olarak gözlemlendiğinden yeniden programlanmış metabolizma kanserin tipik özellikleri arasındadır (Hanahan ve Weinberg 2011). Metabolizmanın kanser hücrelerinde nasıl yeniden programlandığı, etkin hale getirilen fonksiyonlarının veya malign özelliklerinin ne olduğu ve metabolik değişikliklerin terapötik fayda sağlamak için nasıl kullanılabileceği bu alanda yapılan araştırmaların temel soruları arasındadır.

Pavlova ve Thompson (2016), kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlamanın tümör oluşumu ve gelişimindeki rolünü sistematik olarak anlamak için kanser metabolizmasının altı özelliğini özetlemiştir. Bunlar; (1) Düzenlenmemiş glikoz ve amino asit alımı, (2) fırsatçı beslenme stratejilerinin kullanımı, (3) biyosentez ve NADPH üretimi için glikoliz/TCA döngüsü ara ürünlerinin kullanımı, (4) artan azot talebi, (5) metabolit tarafından yönlendirilen gen düzenlemelerinde değişiklikler ve (6) mikroçevre ile metabolik etkileşimlerdir.

Araştırmacılar kanser metabolizmasında glikoz ve glutamin katabolizmasının biyosentetik yolların devamlılığını sağlamak amacıyla metabolik yollardaki hücre içi adaptasyonların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığını ifade etmektedir.

2.4.1. Kanser Hücrelerinde Glikoz Metabolizması

Normal hücreler glikozu, glikoliz yoluyla pirüvata dönüştürür sonrasında sitrik asit döngüsü ve elektron taşıma zinciri aracılığıyla enerji üretir. Kanser hücreleri ise enerji üretimi için alternatif bir yol izler. Otto Warburg kanser hücrelerinin normal hücrelere göre çok daha fazla glikoz tükettiğini ve oksijen varlığında bile pirüvatı TCA döngüsüne yönlendirmek yerine laktata dönüştürdüğünü 1920'lerde keşfetti. Bu fenomen, 'Aerobik glikoliz veya Warburg etkisi' olarak bilinir (şekil 4) (Warburg, 1927). Warburg, sonrasında bu durumun oksidatif metabolizmanın bozulması olarak yorumlamıştır (Warburg, 1956). Ancak birçok araştırmacı tarafından oksidatif metabolizmadan aerobik glikolize geçişin alternatif bir yol olduğu, kanser tipine göre değiştiği ve oksidatif metabolizmanın bozulmasının söz konusu olmadığı gösterilmiştir. Örneğin meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve glioma hücrelerinde ATP üretiminin %80'inin oksidatif yol ile %20'sinin ise glikoliz ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Guppy ve diğerleri, 2002; Martin ve diğerleri, 1998; Pasdois ve diğerleri, 2003; Zu ve Guppy, 2004).



Şekil 4. Warburg etkisi (Bose ve diğerleri, 2021)

Aerobik glikoliz ile glikoz molekülü başına sonucunda elde edilen enerji çok azdır ancak bu süreç bazı avantajlar ile kompanse edilir. Birincisi aerobik glikoliz çok daha hızlı gerçekleşir. Tümör mikro çevresinin ekstrasellüler ortamında glikoz bulunduğu sürece glikoz alımı artar ve birim zamanda aerobik glikoliz yoluyla TCA döngüsüne göre çok daha hızlı şekilde yeterli enerjiyi üretebilir. İkincisi glikolitik akışın yüksek olması bazı ara ürünlerin glikolitik yolun farklı noktalarında lipid, protein ve nükleik asit sentezi yönünde sapmasına neden olur. Bu moleküller proliferatif tümör hücreleri tarafından bol miktarda ihtiyaç duyulan maddelerdir. Glikolitik akışın artması hızlı çoğalan hücrelerin metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için oldukça önemlidir (DeBerardinis ve diğerleri, 2008; Rodriguez ve diğerleri, 2021; Yu ve diğerleri, 2016). Üçüncüsü TCA döngüsü sonucunda oluşan NADH ve ATP üretimi glikolizin negatif düzenleyicisidir. Kanser hücreleri fazla pirüvatı laktata dönüştürerek hem sitozolik NADH birikimini önler hem de ATP üretimini azaltır. Böylece hücreler mitokondriyal ATP üretiminin fazlalığından kaynaklanan negatif geri besleme baskısından bağımsız olarak sitozolik glikoz metabolizmasını sürdürebilirler (Pavlova ve Thompson 2016).

Yüksek glikolitik akış sebebiyle biriken glikolitik ara ürünler dallanan yollara yönlendirilerek çeşitli biyosentetik prekürsörlerin sentezlenmesini sağlar. Bu yoldaki ilk dal olan PPP, NADPH ve riboz-5-fosfat sentezini sağlar. NADPH, lipid, nükleotit ve amino asit biyosentezi için bir indirgeyici madde olarak görev yaparken riboz-5-fosfat ise nükleik asitlerin

biyosentezi için gerekli yapısal şekerdir. PPP birçok kanser tipinde aktive olmakla birlikte G6PD'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (NSCLC) hastalarda yüksek ekspresyona edildiği ve hastaların sağkalım oranının yüksek ekspresyon düzeyine sahip olmayan hastalara göre önemli derecede az olduğu görülmüştür (Nagashio ve diğerleri, 2019).

Bir diğer glikolitik ara ürün olan dihidroksiaseton fosfat, gliserol-3-fosfata dönüştürülür ve hücre zarlarının oluşumu için gereken fosfolipitlerin ve triaçilgliserollerin biyosentezinde kullanılır. Ayrıca NADPH hücresel glutasyon (GSH) havuzlarının indirgenmiş formlarının yeterli düzeylerini korumak için kanser hücrelerinde kemoterapötik ajanlara karşı direnci sağlamak için kullanılır (Pavlova ve Thompson, 2016).

Alt glikolitik yolda üretilen 3-fosfoglisarat, fosfoglisarat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile serin biyosentezine yönlendirilebilir. Kanser hücreleri için serin sadece proteinlerin yapımı için bir yapı taşı olarak değil aynı zamanda plazma membranı oluşumu için fosfatidilserin içeren fosfolipitler, nükleotid üretimi için karbon donörü olarak ve mitokondriyal NADPH üretimi için elektron kaynağı olarak da gereklidir. F6P de, glikolizden ayrılarak heksozamin biyosentezi için bir substrat olarak kullanılabilir. Biyosentez için kullanılmayan fazla glikolitik akış ise tercihen pirüvatı laktat dehidrojenaz ile laktata dönüştürür, böylece glikolizin devamlılığı için NAD^+ havuzu korunur ve aynı zamanda mitokondriye NADH akışını azaltarak TCA döngüsünün baskılanmasını engeller (Pavlova ve Thompson 2016). Buna rağmen bir kısım pirüvat mitokondriye girer ve sitrat oluşturur. TCA döngüsünde oluşan sitratın büyük bir kısmı mitokondriyal trikarboksilat taşıyıcısı ile sitoplazmaya salınır. Sitoplazmaya ulaştığında, sitrat ATP sitrat liyaz aracılığıyla asetil-KoA ve oksaloasetate dönüştürülür. Sitrat kökenli asetil-KoA, lipid sentezi ve protein asetilasyonu için bir öncül olarak kullanılır (Shi ve Tu, 2015).

Sonuç olarak, glikolitik ara ürünleri, çeşitli biyosentetik reaksiyonlara katılmak için glikolizden ayrılır; bu nedenle, glikoliz dallanma yollarındaki hız sınırlayıcı enzimler sıklıkla tümörlerde yukarı regüle edilir (İorio ve diğerleri, 2019).

2.4.2. Kanser Hücrelerinde Glutamin Metabolizması

Birçok kanser hücresinde ikinci önemli metabolik değişiklik glutamin metabolizmasında görülür. Organlar arasında azot taşıyıcısı olarak görev alan ve plazmada en bol miktarda bulunan amino asit olan glutamin oksidatif metabolizma ve ATP üretimi; proteinlerin, lipidlerin

ve nükleik asitlerin biyosentezi; redoks homeostazı ve sinyal iletim yollarının düzenlenmesi gibi birçok hücrel süreç için önemli bir amino asittir (Şekil 5). Çoğu memeli hücresi glutamin sentezleme yeteneğine sahip olsa da hızlı çoğalma sırasında glutamin talebi artabilir ki bu durumda ek hücre dışı kaynağa ihtiyaç duyulur; bu nedenle glutamin koşullu olarak esansiyel olarak kabul edilir (Lukey ve diğerleri, 2013). Kanser hücrelerinde yüksek glutamin ihtiyacı ilk olarak Eagle tarafından belirlenmiştir. Eagle, HeLa hücrelerinde glutamin ihtiyacının diğer amino asitlere kıyasla 10-100 kat daha fazla olduğunu tespit etmiştir (Eagle, 1955). Klinik çalışmalarda farklı tümör tiplerinde plazma glutamin konsantrasyonunun sağlıklı bireylerdeki glutamin konsantrasyonuna oranla önemli ölçüde düşük olduğu görülmüştür (Bode ve Souba 1999; Ling ve diğerleri, 2019).

Birçok kanser hücresinin artan glutamin talebi literatürde 'glutamin bağımlılığı' olarak adlandırılmaktadır. Glutamin bağımlılığının önemli bir nedeni anaplerozdur. Anapleroz hücrelerin TCA döngüsünde yer alan metabolik ara maddelerin eksikliğini veya azalmasını telafi etmek için başka yollardan bu ara maddelerin yerini doldurma sürecidir. Anapleroz glutaminin α -ketoglutarata dönüşümü ve pirüvatın pirüvat karboksilaz (PC) aracılığıyla oksaloasetat (OAA) karboksilasyonu olmak üzere iki temel yol üzerinden gerçekleştirilir. Glutamin bağımlısı olmayan kanser hücreleri daha yüksek PC ifadesine sahiptir bu durumda ortamda glutamin yokluğunda anaplerozisinin sürdürülebilirliğini sağlar (Cheng ve diğerleri, 2011; Seller ve diğerleri, 2015). Bunun aksine glutamin bağımlı hücre hatları OAA'nın %90'ını glutaminoliz ile glutaminden üretirler (DeBerardinis ve diğerleri, 2007).

Glutaminoliz, hücrelerin glutamini çeşitli enzimlerin etkinliği aracılığıyla TCA döngüsü metabolitlerine dönüştürdüğü bir süreçtir. Glutamin kökenli karbonun TCA döngüsüne girişi glutamatın α -ketoasit formu olan α -ketoglutarata dönüştürülmesi yoluyla gerçekleşir. Glutamin önce glutaminaz (GLS/GLS2) aracılığıyla glutamata dönüştürülür. Glutamat daha sonra iki ayrı yol üzerinden α -ketoglutarata dönüştürülür. İlk yol, glutamat dehidrogenaz (GDH) etkinliği aracılığıyla gerçekleşir. İkinci yol ise glutamat-oksaloasetat transaminaz (AST), glutamat-pirüvat transaminaz (ALT) ve fosfoerin transaminaz (PSAT) gibi bir grup transaminazın etkinliğiyle gerçekleşir. GDH üzerinden olan akış, potansiyel otofaji indükleyici amonyak ve kofaktör NADH veya NADPH üretir. Bununla birlikte transaminazlar aspartat, alanin ve fosfoerin dahil olmak üzere diğer esansiyel olmayan amino asitlerin sentezini sağlar. Böylece oluşan α -ketoglutarat TCA döngüsünde bir anaplerotik substrat olarak kullanılabilir. Ayrıca glutaminden türetilen OAA, asetil-KoA ile kondense olduğunda sitrat oluşturabilir. Sitrat ATP-sitrat liyaz ve yağ asidi sentetaz aracılığıyla mitokondriyal metabolizmayı de novo lipogeneze

bağlar. Ayrıca yapılan çalışmalar, hipoksik koşullarda veya mitokondriyal defektlere veya Von Hippel-Lindau tümör baskılayıcısının kaybına sahip kanser hücrelerinde glutamin kökenli α -KG, IDH1 veya IDH2 tarafından redüktif karboksilasyona uğrar ve oluşan sitrat mitokondriden dışarıya alınır. Daha sonra ATP sitrat liyaz ile asetil-KoA ve OAA'ya dönüştürülür. Glutamin karbonlarından elde edilen TCA döngüsü metabolitleri, mitokondriyal taşıyıcılar ve mekanizmalar aracılığıyla sitoplazmaya salınabilir. Örneğin; mitokondriyal malat-aspartat taşıma sistemi AST aracılığıyla türetilmiş aspartatı mitokondrilerden sitoplazmaya taşır ve burada aspartat malik enzim (ME) aracılığıyla sitoplazmik malata dönüştürülerek NADPH üretimi için kullanılır (L. Yang ve diğerleri, 2017).

Yukarıda bahsedildiği üzere GLS tarafından glutamata deaminasyonu sonrası glutamin, sitoplazmik aminotransferaz ailesi tarafından farklı α -ketoasitlere aktarılabilir. ALT, AST ve PSAT tarafından amino azotunun transferi sonucunda sırasıyla alanin, aspartat ve fosfoserin üretilir. Fosfoserin glutatyon sentezi için gerekli glisin ve sisteinin öncüsüdür. Ayrıca glisin, pürin halkasındaki belirli karbon ve azot atomlarının kaynağıdır. Aspartat da aynı zamanda asparajin sentezinin bir öncüsüdür ve bir protein yapı taşı olarak kullanılmasının yanında pürin ve pirimidinlerin sentezinde kullanılır (Nguyen ve Durán, 2018; Vanhove ve diğerleri, 2019).

Glutamin TCA döngüsü anaplerozisinde ve protein sentezindeki rolünün yanı sıra, pürin ve pirimidin sentezi için gereklidir. Kanser hücreleri hızlı bölünme ve büyüme yetenekleri nedeniyle yoğun bir nükleotid sentezi gereksinimine sahiptir. Nükleotidler DNA ve RNA'nın yapı taşlarıdır ve hücre bölünmesi, protein sentezi ve diğer metabolik süreçler için temel öneme sahiptir. Glutamin bu sentezlerde azot donörü olarak görev alır (Bott ve diğerleri, 2019).

Pürin sentezi sırasında, glutaminin γ -azotu, glutamin fosforibozilpirofosfat amidotransferaz (Gln-PRPP amidotransferaz) enzimi tarafından kullanılır. Bu enzim, glutaminin amid grubunu alarak fosforibozil- β -amin (PRA) oluşturur. PRA daha sonra diğer reaksiyonlarla birleşerek pürin nükleotitlerinin sentezine katkıda bulunur. Pirimidin sentezi sürecinde glutamin hem CAD (karbamoil fosfat aspartat diyamiltransferaz) hem de sitidin trifosfatı (CTP) sentetaz enzimleri tarafından kullanılır. CAD enzimi glutaminin γ -azotunu karbamoil fosfatın aspartatla birleşerek karbamoil aspartatı oluşturmasında kullanır. Karbamoil aspartat daha sonraki reaksiyonlarda pirimidin nükleotitlerinin sentezine katkıda bulunur. CTP sentetaz enzimi ise glutaminin γ -azotunu kullanarak UTP'den CTP oluşturulmasında rol oynar. Bu süreçlerde glutaminin α -azotu kullanılmaz sadece γ -azotu önemlidir. İnsan akciğer kanseri örneklerinin ex vivo kültüründe ekzojen glutaminin nükleotid sentezi için kullanıldığı gözlenmiştir (Sellers ve diğerleri, 2015).

ilerlemesini teşvik ettiği görülmüştür (Nie ve Yi, 2019). Akciğer kanserinde ise OGT'nin artmış ifadesini ve yüksek O-GlcNAc görülmüştür. Buna karşılık OGA seviyeleri kanser dokusu ile benzer normal doku arasında önemli farklılık göstermemiştir (Mi ve diğerleri, 2011).

Glutamin metabolizması hücrel ROS homeostasisinin korunmasında önemli bir rol oynar. Süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi ROS molekülleri hücrel metabolizmanın doğal yan ürünleri olup aşırı miktarda bulunduğu zararlı olabilirler. Tümörögenез sırasında kanser hücreleri değişmiş metabolizma ve çevresel faktörler nedeniyle artan ROS üretimi yaşarlar. Glutaminin ROS kontrolünü sağlamadaki en iyi bilinen rollerinde biri glutatyon sentezi aracılığıyla gerçekleşir. Glutatyon glutamin kökenli glutamattan glutamat-sistein ligaz ve glutatyon sentetaz aracılığıyla sistin ve glisin ile kondense edilerek sentezlenir. İndirgenmiş glutatyon (GSH) glutamat, glisin ve sisteinin üçlü bir peptididir ve kanser hastalarının sitozolünde sentezlenirken, küçük bir yüzdesi mitokondriye taşınır ve mitokondriyal oksidatif metabolizma sırasında oluşan ROS'a karşı bir temizleyici olarak işlev görür. Yüksek ROS seviyeleri hücre ölümü sinyal yollarını aktive eder ve hidroksil radikallerinin üretimine yol açar bu da doğrudan DNA, protein ve lipit moleküllerinin hasar görmesine neden olabilir. Toksik ROS seviyelerini önlemek için tümör hücreleri antioksidan kapasitelerini arttırırlar. GSH, glutatyon peroksidaz enziminin desteğiyle ROS'yi nötralize eder. Bunun karşılığında, oksitlenmiş glutatyon (GSSG), NADPH ve glutatyon redüktaz tarafından indirgenerek GSH'yi yeniden oluşturur. Tümör hücrelerinin antioksidan kapasitesi, hızla çoğalan ve agresif kanser hücrelerinin hipoksi ve aşırı ROS seviyelerine uyum sağlaması için gereklidir (Vanhove ve diğerleri, 2019). Meme, over, akciğer, baş ve boyun kanser tiplerinde GSH seviyelerinin yükseldiği gözlenmiştir (Kennedy ve diğerleri, 2020).

2.5. Kanser Enerji Metabolizmasının Kontrolünde Rol Oynayan Allosterik Enzimler

2.5.1. Hekzokinaz

Glikoz taşıyıcıları aracılığıyla hücrelere giren glikoz (glikoz veya fruktoz), hekzokinaz (HK)'lar tarafından heksoz fosfatına fosforile edilir. HK basamağı glikolizin ilk düzenleyici adımındır ve ürünü olan glikoz-6-fosfat (G6P) tarafından geri besleme ile inhibe edilir (Chen ve Russo, 2012). Glikozun G6P'a fosforile edilmesi glikolitik yol, PPP veya glikojen sentezi için başlangıç noktasıdır. HK'nin dört izoformu vardır; HK I, II, III ve IV (hepatositlerde bulunan

glukokinaz) veya A, B, C ve D olarak adlandırılır. Çoğu kanserde HK1 ve HK2 en yüksek afiniteye sahip olan glikoz taşıyıcılarına sahiptir ve antitümör etkinliği ve tümör prognozunun düzenlenmesinde önemli roller oynadıkları düşünülmektedir (M. Jiang ve diğerleri, 2021)

Fosforile HK-II'ler, dış mitokondriyal zar üzerinde bulunan voltaj bağımlı anyon kanallarına (VDAC) bağlanabilir ve bu bağlanma mitokondride üretilen ATP'ye erişim imkânı sağlar. Ayrıca HKII'nin mitokondriye bağlanması G6P'nin HK üzerindeki negatif geri beslemesini azaltarak tümörlerde glikoliz aracılığıyla glikoz metabolizmasını artırır (Lincet ve İcard 2014). Glikoliz dışında HK'ler başka fonksiyonlara da sahiptirler; anti-apoptotik aktivite için mitokondriyal dış zara taşınırlar ve Bcl-2 ilişkili X protein (Bax) ve VDAC ile etkileşime girerek sitokrom c salınımını ve kaspaz-9 bağımlı apoptozu engellerler (Abbaszadeh ve diğerleri, 2020).

Hekzokinazlar arasında HK-II, çoğu kanser türü tarafından sergilenen Warburg etkisinin gelişiminde önemli bir rol oynar. HK-II izoformu başlıca iskelet kası ve yağ dokusunda bulunur. HK-II'nin aşırı ifadesi bazı tümör dokularında da görülür ve kötü prognozla ilişkilendirilir (M. Jiang ve diğerleri, 2021). HK-II beyin tümörleri ve kolorektal kanser dışında baskın izoform gibi görünmektedir. Beyin ve kolorektal kanser tümörlerinde ise HK-I aşırı ifade edilen izoformdur (Moreno-Sanchez ve diğerleri, 2007). Hepatosellüler karsinoma (HCC) hastalarında ise artan HK2 ifadesi, düşük genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Lai ve diğerleri, 2022)

2.5.2. Fosfofruktokinaz

Fosfofruktokinaz-1 (PFK-1), glikolizdeki ikinci bağlanma adımını gerçekleştiren F6P'yi F1,6BP'ye dönüştüren enzimdir. PFK-1 glikolizin en önemli hız sınırlayıcı enzimidir. PFK-1 ADP/AMP tarafından uyarılırken; sitrat, uzun zincirli yağ asitleri, laktat ve ATP PFK-1'in güçlü inhibitörleridir ve glikolitik hız için negatif geri besleme sağlar. Bununla birlikte hipoksiye yanıt olarak O-GlcNAc'nin post-translasyonel modifikasyonu dinamik olarak PFK1'in Ser529 pozisyonunda indüklenir ve böylece aktivitesini inhibe eder. Bu düzenleme glikoz akışının büyük bir kısmını PPP yoluyla yeniden yönlendirir ve lipojenez için temel bir kofaktör olan NADPH'nin artmasına neden olur. Ayrıca GSH'ye katkıda bulunarak indirgeme gücü yenilenmesini artırır ve kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlar (Lincet ve İcard, 2014). PFK1'nin en güçlü allosterik aktivatörü ise fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP)'tir. F2,6BP ATP

varlığında bile PFK-1 aktivitesini indükler, bu da onun birçok tümörde PFK1'in aktivitesini artıran bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. PFK-1'in kaslarda PFKM, karaciğerde PFKL ve trombositlerde PFKP alt birimleri vardır (Lai ve diğerleri, 2022). PFKP'nin meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyede eksprese edildiği görülmüştür (L. Zhang ve diğerleri, 2019). İnsan akciğer kanseri dokularında ve A549 hücrelerinde PFK mRNA'nın normal dokularla karşılaştırıldığında aşırı miktarda eksprese edildiğini gözlemlemiştir (Minchenko ve diğerleri, 2005).

F2,6BP'nin sentezi ve parçalanması fruktoz-2,6-bifosfataz (PFK-2/PFKFB) tarafından sağlanır ve bu enzim hem kinaz hem de fosfataz aktivitelerini içerir. Dört memeli PFKFB izoenzimi bulunmaktadır (PFKFB 1-4). PFKFB3 izoenzimi en yüksek kinaz/fosfataz aktivite oranına sahiptir ve bu nedenle yüksek F2,6BP seviyelerine yol açar, bu da yüksek glikolitik hızın sürdürülmesini sağlar. Buna karşılık F2,6BPaz'ın aşırı derecede ekspresyonunun F2,6BP miktarını azaltarak glikolizi engellediği gösterilmiştir. PFK-2 ekspresyonunun, kolorektal kanser, meme kanseri ve servikal kanser dahil olmak üzere çeşitli invaziv primer tümörlerde yüksek olduğu bulunmuştur (Atsumi ve diğerleri, 2002).

2.5.3. Pirüvat Kinaz

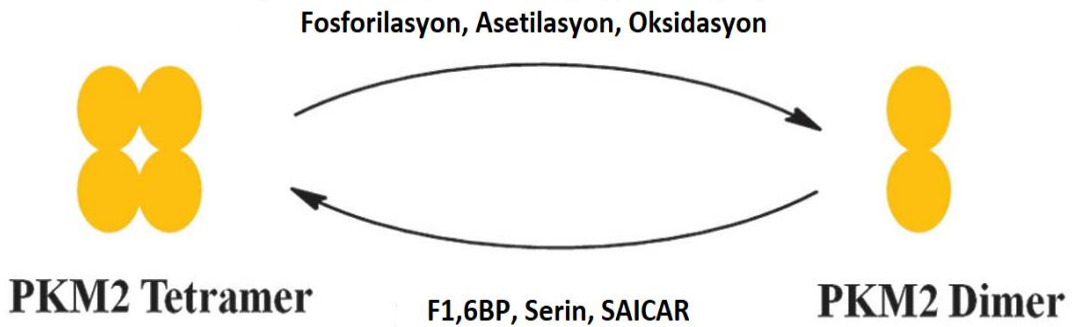
Pirüvat kinaz (PK) glikolizin onuncu ve son reaksiyonunu katalize eden enzimdir. Bu reaksiyon fosfoenolpirüvatın pirüvata dönüşümünü katalizleyen ve ATP moleküllerinin üretimini sağlayan bir glikolitik enzimdir. Bu reaksiyon aynı zamanda geri dönüşümsüz bir reaksiyondur (Lincet ve İcard 2014).

Memelilerde PK; PKM1, PKM2, PKL ve PKR gibi dört izoenzime sahiptir. PKL genel olarak karaciğer, böbrek ve ince bağırsak gibi aktif glukoneojenezi olan dokularda ifade edilirken PKR, kırmızı kan hücrelerinde; PKM1 kas, beyin, kalp ve iskelet kası gibi yüksek enerji tüketimi olan dokularda; PKM2 ise embriyonik hücrelere ve proliferatif hücrelerde ve özellikle de tümör hücrelerinde eksprese edilir (Zhou ve diğerleri, 2021). PKM1 normal dokularda başlıca izoenzimdir. Normal dokular kanserleştiğinde PKM1 azalır ve PKM2 seviyeleri artar (Lai ve diğerleri, 2022).

PKM2'nin dimer ve tetramer olmak üzere iki formu vardır. Normal çoğalan hücrelerde PKM2 genellikle tetramerik formdadır ancak tümör hücrelerinde PKM2 genellikle dimerik formdadır (Zhou ve diğerleri, 2021). Tetramerik PKM2 yüksek katalitik aktiviteye sahiptir ve

hücrelerde ATP sentezi ve katabolik metabolizma ile ilişkilidir. Dimerik PKM2 ise düşük katalitik aktiviteye sahip olan ve glikolitik ara ürünlerin üretimini kolaylaştıran PKM2'nin daha az aktif hali olup ara metabolitlerin gliserol sentezi ve pentoz fosfat yolu gibi yan yollarına girmesine izin verir. Bu yollar ROS üretimini baskılamak için NADPH üretir ve nükleotid sentezine dahil olur (Dong ve diğerleri, 2016).

PKM2'nin dimer ve tetramer arasındaki değişimini kontrol eden çeşitli faktörler rapor edilmiştir (Şekil 6). F1,6-BP PKM2'nin iyi karakterize edilmiş bir aktivatörüdür. Allosterik olarak PKM2'ye bağlanır ve aktif tetramerin oluşumunu kolaylaştırır. PKM2 ayrıca serin tarafından da düzenlenir. Serin PKM2'ye bağlanarak onu aktive eder. Serin seviyesindeki azalma ise hücrede PKM2'nin katalitik aktivitesini azaltır (Zahra ve diğerleri, 2020; G. Dong ve diğerleri, 2016). "5'-Fosforibozil-4-(N-süksinookarboksiamid)-5-aminoimidazol (SAICAR), de novo pürin nükleotid sentezi yolunun bir ara ürünüdür ve PKM2 aktivitesini uyarır. SAICAR'ın PKM2 ile etkileşimi tümör hücrelerinin glikoz sınırlı koşullarda gelişmesine olanak tanır (Zahra ve diğerleri, 2020).



Şekil 6. PKM2'nin yüksek ve düşük aktivite arasında allosterik düzenlenmesi (G. Dong ve diğerleri, 2016)

Fenilalanin (Phe) PK'nin PEP'e olan affinitesini azaltarak hem PKM1 hem de PKM2 aktivitesini azaltan bir allosterik inhibitördür. Phe bağlanma bölgesi aktif bölge ve F1,6-BP bağlanma bölgesinden farklıdır ve F1,6-BP yalnızca Phe ile bağlanmış PKM2'yi kısmen aktive edebilir. Phe bağlanma bölgesine aynı zamanda alanin de bağlanabilir. Alanin PKM2'nin allosterik bir inhibitördür ancak PKM1 için değildir. Fenilalanin inhibisyonundan farklı olarak alanin inhibisyonu PKM2'nin dimerik forma ayrılmasını destekler durumdadır (İsraelsen ve Haiden, 2016). PKM2 aktivitesi ayrıca fosforilasyon, asetilasyon ve oksidasyon gibi post-

translasyonel değişikliklerle de düzenlenir ve bu değişiklikler PKM2'nin dimerik oluşumunu sağlar (G. Dong ve diğerleri, 2016).

PKM2 gastrointestinal kanser, hepatosellüler karsinom (HCC) ve akciğer kanseri gibi birçok tümör tipin patolojik süreçlerinde yer alır. PKM2 bir enzim olarak doğrudan tümör hücre metabolizmasını veya bir nükleer transkripsiyon kofaktörü olarak farklı sinyal yollarını düzenleyerek tümör büyümesini, metastazını ve kemoterapi direncini teşvik edebilir (X. Chen ve diğerleri, 2020; Christofk ve diğerleri, 2008).

Pirüvat kinaz neredeyse her tür kanserde aşırı derecede eksprese edildiği rapor edilen bir enzimdir. Mazurek ve diğerleri (2005), çoğalan hücrelerin ve özellikle tümör hücrelerinin her ikisinin de PKM2'yi ifade ettiğini ancak farklı formlarda eksprese ettiğini bildirmiştir. Örneğin; normal akciğer çoğalan hücrelerinde PKM2'nin tetramerik formu pirüvat üretmek için kullanılan yüksek aktiviteli bir formdur. Ancak akciğer kanseri hücrelerinde dimerik form her zaman baskındır (X.B. Li ve diğerleri, 2015).

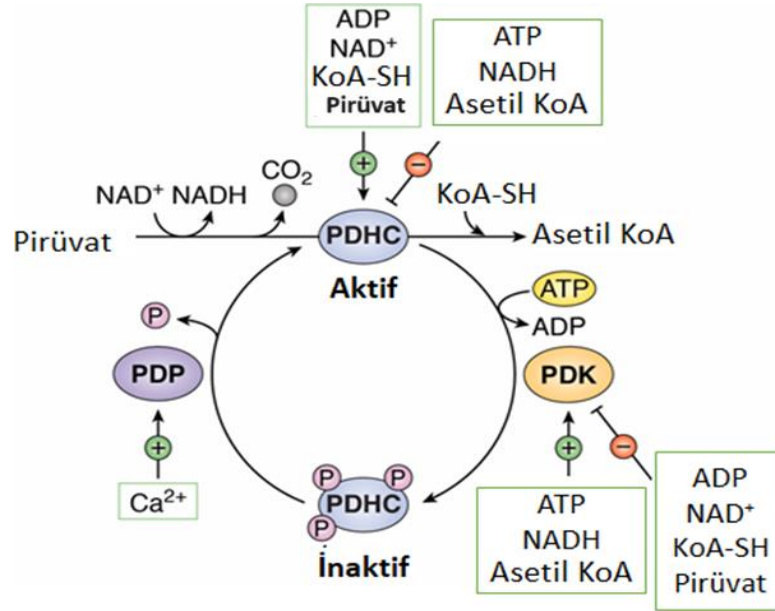
2.5.4. Pirüvat Dehidrojenaz Kompleksi

Pirüvat dehidrojenaz kompleksi (PDHC) kompleksi pirüvatı dekarboksilasyon ile asetil-KoA'ya dönüştüren reaksiyonu katalizler. Reaksiyon sonucu CO₂ ve NADH açığa çıkar. Asetil-KoA daha sonra oksidatif fosforilasyon için TCA döngüsünde kullanılabilir. Dolayısıyla PDHC glikoliz metabolik yolunu TCA döngüsüne bağlar ve NADH aracılığıyla enerji metabolizmasına katkıda bulunur (Chen ve Russo, 2010). PDHC kompleksi pirüvat dehidrojenaz (E1), dihidrolipoil transasetilaz (E2) ve dihidrolipoil dehidrojenaz (E3) olmak üzere üç enzim içerir. Her bir enzimden birden fazla kopyada bulunur (Patel ve diğerleri, 2014).

Pirüvat dehidrojenaz kinazlar (PDK'ler), glikoz metabolizmasının başlıca düzenleyicisidir. PDK'nın dört izoformu PDK1, PDK2, PDK3, PDK4 olarak isimlendirilir. İzoformlar farklı dağılıma, özgül bağlanma bölgesi ve değişen bağlanma affinitesine sahiptir. PDK ve pirüvat dehidrojenaz fosfataz (PDP) olmak üzere iki tip enzim pirüvat dehidrojenazın E1α alt birimindeki serin kalıntılarının fosforilasyonu (inhibisyon) ve defosforilasyonu (aktivasyonu) yoluyla PDHC aktivitesini sıkı bir şekilde düzenlerler (Şekil 7) (Wang ve diğerleri, 2021). PDHC, çoklu koenzimlerden, KoA dahil olmak üzere, çok adımlı reaksiyonu sırasında kullanır. PDHC, ADP, NAD⁺, KoA ve substratı olan pirüvatın artmış seviyeleri tarafından aktive edilir. Bununla birlikte, PDHC, ATP, NADH ve ürünü olan asetil-KoA'nın

yüksek seviyeleri tarafından allosterik olarak inhibe edilir. PDHC'nin üç serin kalıntısının herhangi birinin pürüvat dehidrogenaz kinazları (PDK'lar) tarafından fosforile edilmesi, kompleksi etkisiz hale getirir. PDK'lar, ATP, NADH ve asetil-KoA'nın yüksek seviyeleri tarafından aktive edilir ve yüksek enerji durumunda PDHC akışının kapatılmasını güçlendirir. Buna karşılık, PDK'lar ADP, NAD⁺, KoA-SH ve pürüvat tarafından inhibe edilir. PDHC'nin inhibisyon fosforilasyonu geri dönüşümlüdür ve mitokondriyal kalsiyum tarafından aktive edilen pürüvat dehidrogenaz fosfatazları (PDP'ler) tarafından kaldırılabilir (Arnold ve Finley, 2023).

PDK'ların tüm izoformları, PDHC ve oksidatif fosforilasyonun inhibe edilmesine ve dolayısıyla laktat üretiminin hızlanmasına neden olur. Tümördeki laktat konsantrasyonu 10-20 mM'ye kadar yükselebilir ve tümör proliferasyonu, nüks etme ve sağkalım ile ters orantılıdır (Anwar ve diğerleri, 2021).



Şekil 7. Pirüvat Dehidrojenaz kompleksinin allosterik düzenlenmesi (Arnold ve Finley, 2023).

PDK 1-3'ün yüksek ekspresyonları farklı kanser türlerinde gösterilmiştir. Ayrıca daha yüksek hücre çoğalması, migrasyonu, metastazı ve en önemlisi tedavi dirençleri ile ilişkilendirilmiştir. PDK4 ise yüksek oksidatif fosforilasyon aktivitesine ve/veya yüksek miktarda TCA döngü ara ürünlerine bağımlı kanserlerde tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir bunun örneği prostat kanserinde görülmüştür. Ayrıca, NSCLC ve HCC gibi kanserlerde düşük PDK4 düzeylerinin daha agresif tümörlere ve tedavi direncine yol açtığı bildirilmiştir (Atas ve diğerleri, 2020).

2.5.5. Sitrat Sentaz

Sitrat sentaz (CS), TCA döngüsünün ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. Oksaloasetattan sitrat sentezini katalizler. TCA döngüsünün yanı sıra sitrat aynı zamanda yağ asitlerinin ve membran lipitlerinin de novo sentezi için bir karbon kaynağı sağlar (Peng ve diğerleri, 2022).

Sitratın oluşumu, allosterik efektörler tarafından düzenlenir. Hücre tipine bağlı olarak süksinil-KoA, NADH, ATP veya uzun zincirli yağ açıl-KoA, sitrat sentazın negatif allosterik düzenleyicisi olarak işlev görür. Sitrat oluşumu ayrıca substratların bulunabilirliği tarafından da düzenlenir ve sitrat CS'nin allosterik bir inhibitördür. Sitrat yağ asit sentezi için öncüleri (asetil-KoA, NADPH) sağlar ve uzun zincirli yağ asidi sentezinin başlatılmasında yer alan asetil-KoA karboksilazının pozitif allosterik düzenleyicisidir ve PFK aktivitesinin negatif modülasyonu ile glikolizi düzenler (Bhagavan ve Ha, 2015).

Sitrat sentazın tümörözenezisteki mutasyonel rolleri literatürde derinlemesine incelenmemiştir. Bununla birlikte HeLa, MCF7 ve PC-3 gibi farklı kanser hücre tiplerinde sitrat sentazının kanser metabolizmasındaki işlevsel rolü rapor edilmiştir. Sitrat sentazın baskılanmasıyla metabolizmanın mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan glikolize doğru kaydığını gösterilmiştir. Ayrıca sitrat sentaz eksikliğinin epitelyum mezenkimal geçişi indüklediği ve tümörlerin malign davranışını artırdığını belirtilmektedir (Lin ve diğerleri, 2012). Buna karşılık pankreas, böbrek ve over kanserinde sitrat sentazın neoplastik olmayan hücrelere kıyasla yüksek ifade edildiği gösterilmiştir (L. Chen ve diğerleri, 2014; Schlichtholz ve diğerleri, 2005). Ayrıca over kanseri hücre hatlarında sitrat sentazın baskılanmasıyla hücre proliferasyonunun, invazyonunun ve migrasyonunun *in vitro* olarak inhibe olduğu görülmüştür (L. Chen ve diğerleri, 2014).

2.5.6. İzositrat Dehidrojenaz

İzositrat dehidrojenaz (IDH), TCA döngüsünün üçüncü enzimidir ve iki aşamalı bir reaksiyonu katalizler. İlk adımda, izositrat oksitlenerek oksalosüksinata dönüştürülür ve daha sonra dekarboksile edilerek 2-oxoglutarata (α -KG) dönüştürülür (Ciccarone ve diğerleri, 2019). IDH1, IDH2 ve IDH3 olmak üzere IDH'nin üç izoformu tanımlanmıştır. IDH1 ve IDH2 sırasıyla sitoplazmada ve mitokondriyal matrisde bulunan NADP⁺ bağımlı homodimerlerdir. IDH3 ise NAD⁺ bağımlı heterotetramerik bir mitokondriyal enzimdir. IDH3'ün katalizlediği

reaksiyon, fizyolojik koşullarda TCA döngüsünde hız sınırlayıcı adımı temsil eder ve ADP tarafından aktive edilirken ATP ve NADH tarafından inhibe edilir. IDH1 ve IDH2 ise hipoksi durumu veya elektron transport zincirinin disfonksiyonunda tetiklenir ve α -KG'nin redüktif karboksilasyonunu katalizler (Sicagliola ve diğerleri, 2020).

Belirli tümörlerde, IDH1 ve/veya 2'de monoallelik aktivasyon mutasyonları tekrarlayan genetik değişiklikler olarak belgelenmiş ve yüksek tanısal ve prognostik değere sahiptir. Öte yandan IDH3 alt birimlerinde birçok mutasyon farklı türdeki tümör örneklerinden elde edilmiş olmasına rağmen bu mutasyonların hiçbiri IDH 1 ve 2 aktivasyon mutasyonları kadar tekrarlayan olarak bulunmamıştır. Ayrıca bu IDH 3 mutasyonlarının önemi veya kanserojenik rolleri henüz kanıtlanmamıştır (Al-Khallaf, 2017).

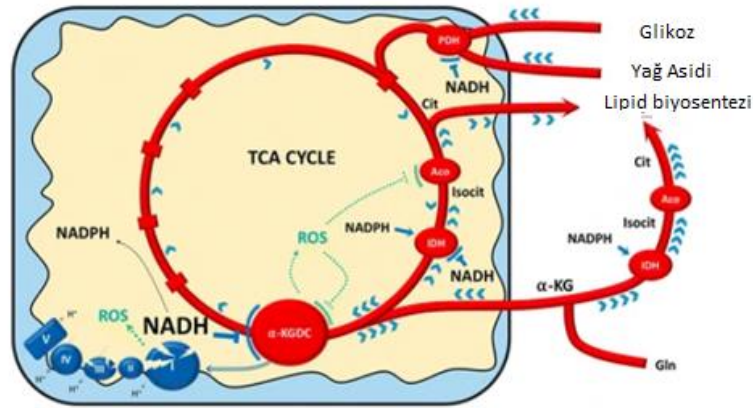
IDH1 ve IDH2 mutasyonları farklı kanser tiplerinde görülmektedir (Amary ve diğerleri, 2011; Balss ve diğerleri, 2008; Cairns ve diğerleri, 2012; Mardis ve diğerleri, 2009; Marucci ve diğerleri, 2010; Mi ve diğerleri, 2009; Parsons ve diğerleri, 2008; Yan ve diğerleri, 2009; Ye ve diğerleri, 2018). Bu mutasyonlar α -KG'yi onkometabolit olarak adlandırılan 2-hidroksiglutarata (2-HG) çeviren bir 'yeni tip' bir reaksiyonu teşvik eder (P.S. Ward ve diğerleri, 2010). 2-HG'nin yüksek seviyelerinin *in vivo* olarak gliomaların oluşumuna ve malign ilerlemesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Dang ve diğerleri, 2009).

2.5.7. α -Ketoglutarat Dehidrojenaz (2-Oksoglutarat Dehidrojenaz)

α -Ketoglutarat dehidrojenaz kompleksi (α -KGDC) pirüvat dehidrojenaz kompleksinin analogudur ve üç enzimden oluşur: α -ketoglutarat dehidrojenaz, dihidrolipol transüksinilaz ve dihidrolipol dehidrojenaz (iki kompleks için de aynı). Genel reaksiyon pirüvat dehidrojenaz kompleksi gibi karmaşık bir düzenleyici mekanizmaya sahip değildir. Aktivitesi ATP/ADP, süksinil-KoA/KoA ve NADH/NAD oranlarının yüksek olduğu durumlarda inhibe olurken kalsiyum tarafından uyarılır (Bhagavan ve Ha, 2015).

Kanser hücreleri ayrıca yeni hücreler için lipid biyosentezine bağımlıdır (Hatzivassiliou ve diğerleri, 2005). Yağ asitleri biyosentezinin önemli bir öncüsü geleneksel olarak glikoz ve glutamin metabolizması aracılığıyla ileri doğru işleyen bir TCA döngüsü tarafından sağlanan sitrattır. Bunun yerine hipoksik koşullarda veya elektron taşıma zinciri (ETC) kusurları varlığında kanser hücrelerinde sitrat glutaminden türetilen α -KG'nin redüktif karboksilasyonu yoluyla oluşur ve sitoplazmik ve mitokondriyal NADPH'ye bağımlı IDH1 ve 2 tarafından

sentezlenir (Mullen ve diğerleri, 2011; Wise ve diğerleri, 2011). α -KG'nin izositrate dönüşümü daha düşük α -KGDC aktivitesini veya α -KG/sitrat oranının yüksekliğini ifade eder. Bu da TCA döngüsünün ters yönde çalışmasını sağlar ve sonuçta yeni oluşturulan yağ asitlerinin sentezini destekler ve tümör büyümesini kolaylaştırır (Mullen ve diğerleri, 2011). α -KGDC aktivitesi hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF1) aracılığıyla E1 alt biriminin bir kesit varyantının parçalanması yoluyla azaltılır ve bunun önlenmesi kanser hücrelerini sitrat veya dış lipidlere bağımlı hale getirirken *in vivo* tümör büyümesini engeller. HIF1 malign kanser hücrelerinde hipoksik yanıtın ana düzenleyicisi olup, PDHC aktivitesini inhibe ederek ve dolayısıyla sitrat oluşumunu engelleyerek α -KG/sitrat oranını artırabileceği düşünülmektedir (Kim ve diğerleri, 2006). Bu bulgular, HIF1'in TCA metabolitlerinin düzeylerini düzenleme ve α -KG'nin oksidatif metabolizmadan redüktif metabolizmaya yeniden yönlendirilmesinde önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır. Bu bağlamda normal oksijen koşullarında, sürekli HIF1'in aktivasyonunun tek başına α -KG'nin redüktif karboksilasyonunu teşvik edebildiği gösterilmiştir (Metallo ve diğerleri, 2011).



Şekil 8. α -KG metabolik akıbeti

2.5.8. Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) PPP'nin ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. PPP kanser hücrelerinin hayatta kalması ve büyümesinde kilit rollerde bulunan nükleik asit sentezi, yağ asidi sentezi ve ayrıca indirgenmiş GSH'nin üretimi için NADPH sağlar (Patra ve Hay, 2014). G6PDH'nin ifadesi ve aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenir. G6PDH aktif olmayan bir monomer veya aktif bir dimer olarak bulunabilir. Tümör hücreleri G6PDH'yi nispeten yüksek düzeyde ifade eder. Aktivite düzenlemesi açısından $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranı bu enzimin ana

düzenleyicilerinden biridir. NADPH G6PDH'nin aktivitesini negatif olarak düzenlerken, NADP⁺ ise enzimatik aktivitesi ve uygun konformasyonu için gereklidir (P. Jiang ve diğerleri, 2014; Patra ve Hay, 2014).

Çok sayıda çalışma mesane kanseri, endometrium karsinomu, prostat kanseri, böbrek kanseri, mide kanseri, kolanjiyokarsinoma, kolon adenokarsinomu, akciğer kanseri, servikal kanser, over karsinomu, HCC, gliom, pankreas kanseri ve melanom dahil olmak üzere birçok kanser türünde G6PDH aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir (R. Li ve diğerleri, 2020).

Akciğer kanseri ile ilgili olarak G6PDH NSCLC'de aşırı ifade edilmekte olup G6PDH enziminin aşırı ifadesine sahip hastaların sağkalım oranının aşırı ifadesine sahip olmayan hastalara göre önemli ölçüde daha kötü olduğu görülmüştür (Giatromanolaki ve diğerleri, 2017; Nagashiove diğerleri, 2019).

2.5.9. Glutamat Dehidrojenaz

Glutaminaz enzimi glutaminin deaminasyonunu gerçekleştirerek glutamat ve amonyağa dönüştürür. Glutamat daha sonra α -KG, ATP, amino asitler, nükleotitler ve lipidlerin sentezi için anabolik karbonlar üretmek amacıyla TCA döngüsü ara ürünlerine dönüştürülür. Mitokondride glutamatın α -KG'ye dönüştürülmesinde birkaç enzim yer alır. Bunlar GDH1, GOT2 ve GPT2'dir. Yapılan bir çalışmada GDH1'in RNA interferenz aracılığıyla susturulmasının GPT2 veya GOT2, α -KG üretiminde önemli ölçüde azalma, anabolik glutamin bağımlı RNA biyosentezinde azalmaya ve yüksek ROS seviyelerine neden olduğu bildirilmiştir (Jin ve diğerleri, 2015). Bu çalışmalar GDH aktivasyonunun artan glutaminoliz ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu desteklemekte olup, GDH'nin glutamin metabolizmasının kritik bir düzenleyicisi olduğunu desteklemektedir. Glutamattan α -KG'ye dönüşüm oksidatif deaminasyon yoluyla GDH tarafından gerçekleştirilir. GDH'nin iki izoformu bulunmaktadır: GDH1 yaygın olarak ifade edilirken, GDH2 sadece retina, testis ve beyinde bulunmuştur. Memeli GDH en karmaşık düzenlemeye sahip olan allosterik enzimlerden biridir. Aktivitesi hücrenin metabolik durumuna bağlı olarak karmaşık bir şekilde düzenlenir. Palmitoil KoA, GTP ve ATP GDH aktivitesini inhibe edebilirken, ADP ve lösin allosterik aktivatörler olarak görev yapar. Allosterik düzenlemenin yanı sıra GDH'nin post-translasyonel modifikasyon yoluyla düzenlendiği de bilinmektedir. Daha önceki raporlar mitokondriyal bir enzim olan Sirtuin-4'ün, NAD'yi kullanarak GDH aktivitesini ADP-ribozile ederek ve düşürerek

düzenlediğini göstermiştir. Sirtuin-4'ün kaybı GDH'yi aktive eder ve böylece amino asit uyarılı insülin salgısını teşvik eder (Jin ve diğerleri, 2015).

Yüksek GDH seviyeleri farklı kanser tiplerinde gözlenmiştir. Meme kanserinde yüksek GDH seviyeleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2015). Ayrıca glioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada GDH'nin inhibe edilmesinin hücre büyümesini engellediği görülmüştür (J. Zhang ve diğerleri, 2016).

2.6.2 Hücre Kültürü

Hücre kültürü ilaç keşfi, kanser araştırmaları ve kök hücre çalışmaları gibi alanlarda önemli ve gereklidir. İki boyutlu (2D) hücre kültürü, 1900'lerin başından beri hücrelerin kültürlenmesinde kullanılan bir yöntemdir ve araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Hücre kültürleri hücre biyolojisini, doku morfolojisini, hastalık mekanizmalarını, ilaç etkisini, protein üretimini ve doku mühendisliğinin gelişimini anlamamızı sağlar. Bu kültürler sıklıkla birçok ilacın prelinik araştırmalarında, kanser araştırmalarında ve gen fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Kanser araştırmaları alanında en uygun hücre kültürü yöntemlerinin seçimi, tümör biyolojisini daha iyi anlaşılmasını ve dolayısıyla radyoterapi ve kemoterapinin optimize edilmesi veya yeni tedavi stratejileri geliştirilmesini sağlayabilir (Kapałczyńska ve diğerleri, 2018). Bu avantajlar bir yana 2D hücre bu sistemin aynı zamanda birçok dezavantajı vardır. İlk olarak, 2D kültürdeki hücreler, doğal doku veya tümör formasyonunu taklit etmezler. Bu kültür yönteminde, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler çevre etkileşimleri, tümör kütlelerinde olduğu gibi temsil edilmez. Bu etkileşimler, hücre farklılaşması, proliferasyonu, canlılığı, gen ve protein ifadesi, uyarılara tepki, ilaç metabolizması ve diğer hücre fonksiyonları için sorumludur (Costa ve diğerleri, 2016; Pampaloni, 2007). Hücreler izole edilip 2D koşullara transfer edildikten sonra, hücrelerin morfolojisi ve hücre bölünme şekli değişir. 2D kültürle birlikte çeşitli fenotip kaybı da ortaya çıkar. Hücrelerin değişen morfolojisi, fonksiyonlarını, hücre içindeki yapıların organizasyonunu, salgıyı ve hücre sinyalleşmesini etkileyebilir (Kapałczyńska ve diğerleri, 2018). Adherent hücreler, dış çevre ile etkileşimlerindeki bozukluklar nedeniyle polaritelerini kaybederler, bu da bu hücrelerin apoptoza vb. çeşitli olaylara tepkilerini değiştirir. 2D kültürün bir diğer dezavantajı, hücrelerin oksijen, besin maddeleri, metabolitler ve sinyal molekülleri gibi ortamın bileşenlerine sınırsız erişime sahip olmasıdır. İn vivo kanser hücreleri için ise besin, oksijen vb. olanaklar, tümör

kütlesinin doğal mimarisi nedeniyle daha değişkendir. Ayrıca, 2D sistemde gen ekspresyonu, topoloji ve hücrenin biyokimyası değiştii gözlemlenmiştir (Kapałczyńska ve diğerleri, 2018). 2D sistemlerin birçok dezavantajı nedeniyle, doğal bir tümör kütesini daha iyi taklit edebilen alternatif modeller bulma ihtiyacı doğmuştur.

2.6.1. 3D Hücre Kültürü

Çoğu 3D kültür tekniği, non-adherent plâterler, yoğunlaştırılmış medyumda veya jel benzeri maddelerde kültürler ve iskeleli 3D kültür sistemleri olarak kategorize edilir (W.J. Ho ve diğerleri, 2010). Ancak, mevcut olarak bu teknikler 2D'deki tüm eksiklikleri kapatamamaktadır. 3D sistemlerin kendi güçlü yanları ve sınırlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle, belirli bir uygulama için en uygun 3D hücre kültür modelini seçmek gerekmektedir. Örneğin, iskele tabanlı modeller hücre-ECM etkileşimlerini daha iyi taklit ederken, belirli bir boyuta sahip iskelesiz sferoidler hücrenel ve fizyolojik gradyanlara daha uygun hale gelmektedir (Langhans, 2018).

3D küresel şekilli sıkıca bağlı hücrenel agregatlar olan sferoidler, ilk olarak 1970'lerin başlarında Sutherland ve meslektaşları tarafından tanıtıldı (Sutherland ve diğerleri 1970). İskele olmadan yapılan 3D kültür yöntemleri, hücrelerin asılı damla mikropalakaları, ultra-düşük yapışma kaplamalı düşük yapışma plakaları veya mikropatentli plakalar gibi özel kültür plakalarında kendi kendine toplanmasına dayanır. Bu yöntemler, sferoid oluşumunu teşvik eden ultra-düşük yapışma kaplamalı düşük yapışma plakaları veya mikroakışkan hücre kültürü için mikropatentli plakalar gibi özel olarak tasarlanmış kültür plakalarında hücrelerin bir araya gelmesini sağlar (Langhans, 2018).

Düz, U veya V şeklinde alt tabanlara sahip sferoid plakaları, hücre yapışmasını engellemesinden yararlanarak hücre toplanmasını ve sferoid oluşumunu teşvik etmektedir. Ancak, asılı damla tekniğinin aksine, sferoidlerin uzun süreli kültür veya deneysel işlemler için farklı bir plakaya aktarılması genellikle gerekli değildir. 96 veya 384 kuyulu plakalar, damlacıklara kıyasla daha yüksek bir hacim kapasitesine sahiptir ve sferoidleri manipüle etme ihtiyacını ortadan kaldırır. Düşük yapışma plakaları genellikle polistiren malzemedan yapılmış olup hidrofilik veya hidrofobik kaplamalarla işlenir, örneğin yapışmayan polimer poli(2-hidroksietil metakrilat (Ivascu ve Kubbies, 2006) veya agaroz gibi doğal polimerlerdir (Q. Li ve diğerleri, 2011). Kaplama, hücrelerin tercihen sferoid oluşturmak için bir araya gelmesini

sağlayacak şekilde hücrelerin yüzeye bağlanmasını azaltır. Daha büyük hacimleri sayesinde düşük yapışma plakaları çok hücreli kültür için uygundur ve sıklıkla tümör hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılır. Örneğin, kitozan-hiyalüronan substratları üzerinde yetiştirilen iki NSCLC hücresinden oluşan çok hücreli sferoidler, daha fazla kök hücre benzeri özellikler, hücre hareketliliğinde artış, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) için işaretleyicilerin ifadesinde artış ve kök hücre benzeri hücrelerin 2D hücre kültürlerine kıyasla çoklu ilaç direnci sergilemiştir (Langhans, 2018). Hastadan elde edilen meme kanseri hücrelerinin sferoidleri, hipoksi, dormantlik, anti-apoptotik özellikler ve ilaç direnci gibi *in vivo* tümör özelliklerini simüle ettiği görülmüştür (Imamura ve diğerleri, 2015).

2.6.2. 3D Sferoidlerin Özellikleri

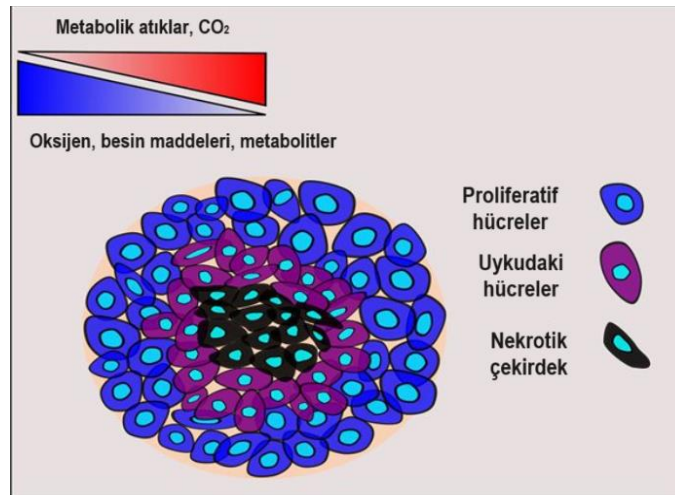
3D tümör sferoid hücre kültürleri, farklı kanser türlerinin *in vitro* modellerini oluşturmak için yaygın olarak kullanılan mikro boyutta hücresel birleşimlerdir. Oluşumlarının ardından, bu *in vitro* modeller, katı tümörlerin çeşitli özelliklerini taklit etme yeteneği kazanırlar (Nunes ve diğerleri, 2019).

2.6.2.1. Sferoidlerde Heterojenite ve Hücre-Hücre Sinyalleşmesi

Tümör sferoidleri, yalnızca kanser hücrelerinden (homotipik sferoidler) veya kanser hücrelerinin diğer hücre tipleriyle (heterotipik sferoidler) kültüre edilebilirler. Heterotipik sferoidlerde kanser ve stromal hücreler arasındaki farklı oranlar kullanılarak, katı tümörlerde bulunan hücresel heterojeniteyi daha iyi taklit etmek mümkündür (Costa ve diğerleri, 2014). 3D sferoidlerde tüm hücreler yakın temas halinde büyür, bu da tümörlerde gözlenen fiziksel iletişim ve sinyal yollarının etkinliğini sağlar (Hanahan ve Coussens, 2012). Ayrıca Kanser-stromal hücre sinyalleşmesi kemoterapiye dirençli bir ortamın oluşturulması açısından önemlidir. (Correia ve Bissell, 2012; McMillin ve diğerleri, 2013).

2.6.2.2. Sferoidlerin Yapısı

Sferoidlerdeki yapı, katı tümörlerde olduğu gibi farklı hücre tabakalarından oluşur (Şekil 9). Dış tabaka, yüksek çoğalma oranlarına sahip hücrelerden oluşurken, orta tabaka esas olarak yaşlanmış hücrelerden oluşur ve çekirdek ölü hücreleri içerir (Han ve diğerleri, 2021; Mehta ve diğerleri, 2012). Sferoidin çevresindeki hücrelerin yüksek çoğalma hızının nedeni, oksijen ve besinlere daha kolay erişimdir. Buna paralel olarak, sferoidlerin içindeki hücreler oksijen ve besinlerin eksikliği nedeniyle yaşlanmış veya nekrotik bir durumdadırlar (Han ve diğerleri, 2021; Matsuaki ve diğerleri, 2014). Bununla birlikte hipoksik ortamlarda kanser hücreleri, enerji elde etmek için pirüvatı laktata dönüştürür ve sferoidlerde laktat birikimi, iç kısmın asidifikasyonundan sorumludur. Bu durum aynı zamanda *in vivo* katı tümörlerde de gözlenmektedir (Koppenol ve diğerleri, 2011; Trédan ve diğerleri, 2007).



Şekil 9. Sferoid Yapısı (Acland ve diğerleri, 2018)

Sferoidlerdeki hücre tabakalarının organizasyonu, antikanser ilaçların veya ilaç yüklü nano taşıyıcıların tedavi etkinliğinde sorunlara neden olur. Sferoidin iç tabakasında, yani hipoksik bölgede, anti-kanser ilaçların tedavi etkinliğinin daha düşük olduğu görülmüştür. (Trédan ve diğerleri, 2007). Kanser hücreleri üzerinde etkili olan ilaçlar, sferoidlerin iç bölgelerinde yaşlanmış ve nekrotik hücrelerden oluştuğu için terapötik etkinliği daha azdır (Minchinton ve Tannock, 2006; Trédan ve diğerleri, 2007). Ayrıca, sferoidin iç kısmının karakteristik düşük pH'sı, ilacın, net yükünü değiştirebilir ve tümör penetrasyonunu ve hücre içi alımını etkileyebilir (Minchinton ve Tannock, 2006). Ek olarak, düşük çevresel pH'ya yanıt

olarak, kanser hücreleri hipoksi indükleyici faktör ailesinin üyelerinin ekspresyonunu sağlar. Bu da kanser hücrelerinde proliferasyonunu artırır ve sağ kalımı destekler (Harris, 2002; Vaupel, 2004).

2.6.2.4. Ekstrasellüler Matriks-Hücre ve Hücre-Hücre Etkileşimleri

3D sferoidler, kollajen (örneğin kollajen IV), laminin, fibronectin, proteoglikanlar, tenaskin gibi hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerini biriktirir (Chan ve diğerleri, 2013; Yeon ve diğerleri, 2013). Sferoidlerdeki ECM-hücre ($\alpha 5$ - ve $\beta 1$ -integrin) ve hücre-hücre fiziksel teması antikanser bileşiklerin tümör kütledeki penetrasyonunu ve dağılımını sınırlayan bir engel oluşturur (Tannock ve diğerleri, 2002, Trédan ve diğerleri, 2007). Öte yandan, ECM proteinlerinin birikimi sferoid yoğunluğunu artırır ve interstisyel sıvı basıncını yükseltir. Bu durum, tümör hücrelerinin ECM'nin organizasyonunu ve protein birikimini değiştirerek, ilaç penetrasyonunu sınırlayan bir fiziksel engel oluşturmasının yanı sıra, ECM proteinlerinin konveksiyon yoluyla sıvı basıncını artırarak da etki gösterebilir (Hamilton ve Rath, 2019; Minchinton ve Tannock, 2006; Najafi ve diğerleri, 2019; Sangaletti ve diğerleri, 2017). Buna ek olarak, ECM ile ilişkili sinyal yolları (yani ECM-hücre etkileşimleri), tümör ilerlemesini etkileyebilmektedir. (Popova ve Jücker; 2022; Van Dijk ve diğerleri, 2013). Özellikle, ECM-hücre etkileşimleri, ECM yapısını değiştirebilen proteinazların (metalloproteinazlar gibi) ekspresyonundan sorumlu olabilir ve bu da kanser hücrelerinin metastazını mümkün kılar (P. Lu ve diğerleri, 2012; Van Dijk ve diğerleri, 2013).

2.6.2.5. Büyüme kinetiği

Katı tümörlerin büyümesi, genellikle iki ana aşamada özetlenebilir. İlk büyüme döneminde, katı tümörün hacmi üstel olarak artar. Bu, avasküler büyüme evresidir (J.P. Ward ve King, 1997). Sonrasında, hücresel büyüme uyku fazında sürdürülür ve daha sonra pro-anjiojenik faktörlerin salgılanmasıyla yeni damarların oluşumuyla başlayan vasküler büyüme ve proteazlar aracılığıyla ECM şekillenmesi evresi başlar (Van Dijk ve diğerleri, 2013). Sonrasında, kanser hücreleri invazif özellikler kazanır ve uzak bölgelere metastaz yapar. Benzer bir büyüme şekli sferoidlerde de bulunur, yani erken aşamalarda sferoid hacmi üstel olarak artar ve genellikle çapı 200-500 μm 'ye ulaşana kadar devam eder. Daha sonra hacim büyüme hızı

azalmaya başlar ve sferoidin hacmi sabit kalır (Byrne, 2010, Costa ve diğerleri, 2014; Ward ve King, 1997). Bu büyüme profili, sferoidlerin katmanlı bir yapıya sahip olmasından dolayı önemlidir (Ward ve King, 1997).

2.6.2.6. Gen Ekspresyonu

Hücrel gen ifade profilleri, mikrodokuların karakteristik 3D hücrel organizasyonu tarafından güçlü bir şekilde etkilenir. Sferoidlerdeki gen ifadesi, *in vivo* katı tümörlerde gözlemlenen gen ifadesi ile karşılaştırılabilir. Melanom hücrelerinde yapılan bir araştırmada 2D ve 3D sferoid kültürlerinde kemokinler, pro-anjiojenik faktörler ve hücre adezyon moleküllerini kodlayan 179 genin ifadesini analiz edilmiş ve karşılaştırmışlardır. Sonuçlar, birçok genin 3D sferoidlerde aşırı ifade edildiğini göstermiştir (Ghosh ve diğerleri, 2005). İlginç bir şekilde, aşırı miktarda ifade edilen genler, deri kanserinin ilerlemesi, invazyonu ve metastazında önemli roller oynadığı görülmüştür (Ghosh ve diğerleri, 2005). Ayrıca, kolorektal, mezotelyoma, karaciğer hepatoselüler karsinom sferoidleri için benzer sonuçlar bildirilmiştir (Barbone ve diğerleri, 2016; Chang ve Hughes-Fulford, 2009; Luca ve diğerleri, 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan buzdolabı/derin dondurucu (Bosch KDV4200NE, Almanya), santrifüj (Nüve NF800 R, Türkiye), distile su cihazı (Nüve NS103, Türkiye), elisa okuyucu (Optic ivymen system 2100-C, İspanya), sıcak su banyosu (Nüve ST 402, Türkiye) ve spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Çin) -80° derin dondurucu (Nuarie, USA), 96'lı ultra low attachment pleyt (Greiner Bio one, Almanya), laminar akımlı kabin (Nükleon, Türkiye) hemositometre (Marienfield, Almanya), CO₂ inkübatörü (Nüve EC160, Türkiye), ışık mikroskobu (Olympus CX31, Japonya) invert mikroskop (Euromax oxion inversio, Hollanda) şarjlı pipetör (Capp controller, Danimarka), mikropipet (Microcult, Avusturalya), kriyo tüp (Microcult), pipet ucu 1ml, 200µL (Microcult), steril filtre (microcult), 75 cm² flask (Spl lifescience, Kore), 96'lı ve 24'li hücre kültürü pleyti (Spl lifescience, Kore), falkon tüp 15 ve 50 ml (Labsselect, Çin), steril enjektör (Ayset, Türkiye), orbital shaker (Dlab, Çin) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hücre kültürü medyumu (Serox, SLD-526-500, Almanya), (Elabscience, EP-CM-L0093, EP-CM-L0040, EP-CM-L0035, Çin), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Serva, 180770) non-esansiyel amino asit çözeltisi (W/o glutamin, Serox, SRM-813-500), fosfat tamponu çözeltisi (PBS) (Sigma), penisilin-streptomisin Gibco (15140122), etil alkol (İsolab, Almanya), fetal sığır serumu (Serox, SRX 181H-500), %0,25 Tripsin-EDTA (Serox, SLTE-586-100), etil alkol (İsolab, Almanya) elisa tetleri için Bioassay Tecnology Laboratory'den (BT LAB, Kore) satın alınan insan heksokinaz (HK, BT LAB, E0888Hu), Fosfofruktokinaz (PFK, BT LAB, E2097Hu), glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH, BT LAB, E2206Hu), piruvat kinaz (PK, E0728Hu) ve piruvat dehidrojenaz E1 (PDHC-E1, E0889Hu),

sitrat sentaz (CS, E0705Hu), isositrat dehidrojenaz (İCD, E0823Hu), α -ketoglutarat dehidrojenaz veya diğer adıyla 2-oxoglutarat dehidrojenaz (OGDH, E7589Hu), glutamata dehidrojenaz (GDH, E1376Hu) ELISA kitleri kullanıldı

3.2. Yöntem

3.2.1. A549 hücresi

A549 hücreleri, akciğer adenokarsinomundan türetilen bir epitelyal hücre hattıdır. A549 hücreleri ilk kez 1972 de D.J. Giard tarafından 58 yaşındaki Kafkas bir erkekten alınmıştır (Giard ve diğerleri 1973). Çalışmada ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı stoklarında bulunan 16. Pasaj A549 hücre hattı kullanıldı.

3.1.2. Hücre Kültürü Ortamı

Hücre kültürü çalışması steril laminar akışlı kabin içerisinde yürütüldü. A549 akciğer kanseri hücre hattı; 25mM glikoz, %10 FBS, 1mM sodyum piruvat, 4 mM L-Glutamin, 10 U/mL penisilin ve 10 μ g/mL streptomisin içeren DMEM besiyerinde 37 °C sıcaklıktaki %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı.

3.1.3. Hücrelerin Çözülmesi

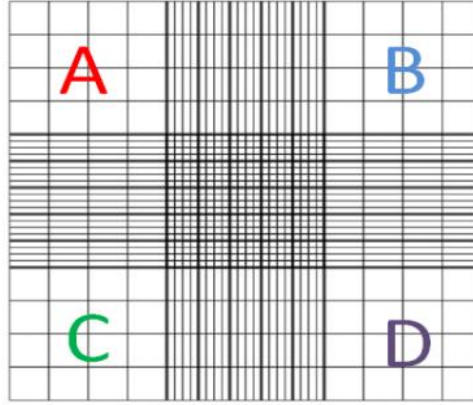
Hücre kültürünün başlangıcında, donmuş hücreler sıvı nitrojen veya -80 °C derin dondurucudan alındı ve 37 °C'deki su banyosunda çözdürüldü. Çözünen hücre süspansiyon 5-6 mL taze vasat içeren 15 ml'lik falkona aktarılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. DMSO içeren süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelere bir miktar taze besiyeri ilave edilerek yeni bir flaska aktarıldı. Hücreler %80-%90 konfluent olana kadar gelişimleri izlendi ve konflüente ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi (Noel ve Barry, 2022).

3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler 75 cm² 'lik flaslara ekildi ve her iki-üç günde bir yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandı. Hücreleri pasajlamak için flask içindeki vasat uzaklaştırıldı, hücreler fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile iki kez yıkanıp PBS uzaklaştırıldıktan sonra, 3 mL Tripsin-EDTA ilave edilerek 7 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler tutunduğu yüzeyden ayrılması mikroskopta kontrol edildikten sonra tripsinin inhibisyonu için tripsin-EDTA'nın iki katı miktarda besiyeri eklendi. 15 mL hacimli falkonlara alınan hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere yeni vasat ilave edildi. Hücreler sayım işleminin ardından yoğunluğuna göre 1:2 veya 1:3 oranlarında yeni flaslara ayrıldı ve invert mikroskopta inceledikten sonra %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre kaldırıldı (Noel ve Barry, 2022).

3.1.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı ışık mikroskobu altında hemositometre kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 10). Hücre süspansiyonunun 20 µL'si PBS ile 10 kat seyreltildi. Bu karışımdan 25 µL alınarak hemositometreye aktarılarak hücreler sayıldı. Hücre sayısı $C = N \times \text{sulandırma faktörü} \times 10^4$ formülü kullanılarak hesaplandı. Formülde C, mL başına düşen hücre sayısı; N, ortalama hücre sayısı ve 10^4 , 1 mm² için hacim dönüşüm faktörüdür. Burada hücreler 10 kat oranında seyreltildiği için sulandırma faktörü 10'dur. Hesaplama sonucunda 1 mL ortamda ne kadar hücre olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılacak toplam hücre sayısı bu formüle uygun şekilde hazırlandı (Noel ve Barry 2022).



Şekil 10. Hemositometrenin mikroskopik görüntüsü

Şekil 10'daki A, B, C ve D alanlarındaki hücreler sayıldı ve dörde bölünerek ortalamaları hesaplandı. Toplam hücre sayısı metinde belirtilen formüle göre hesaplandı.

3.1.6 Hücrelerin 2D Yöntem ile Farklı Ortamlarda İnkübasyonu

Hücreler yaklaşık %80-90 konfluent olduklarında tripsin-EDTA ile kaldırılarak sayım işlemleri yapıldı ve deneysel çalışmaya göre yeni flasklara veya plakalara aktarıldı. Hücrelerin tutunması için 24 saat beklendi. Hücrelerin tutunması mikroskopta teyit edildikten sonra üzerlerindeki vasat 1-) glikoz (25mM) ve L-glutamin (4mM) içeren rutin hücre kültürü medyumu (EP-CM-L0040) 2-) glikoz içermeyen, L-glutamin (4mM) içeren hücre kültürü medyumu (EP-CM-L0093) 3-) L-glutamin içermeyen, glikoz (25mM) içeren rutin hücre kültürü medyumunda (EP-CM-L0035) 24, 48 ve 72 saat boyunca %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi. Deneyler 3 tekrarlı çalışıldı.

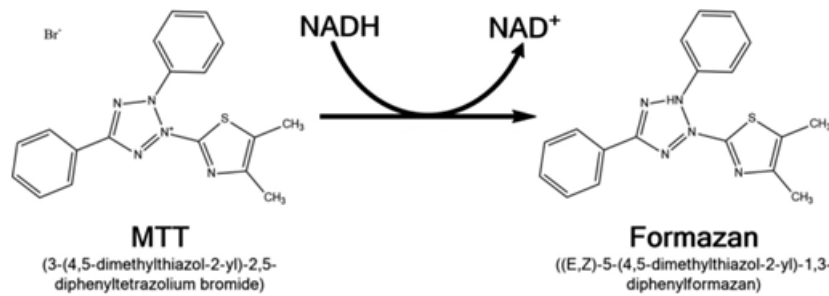
3.1.7. Hücrelerin 3D Yönteme Hazırlanması ve Farklı Ortamlarda İnkübasyonu

Sferoid oluşumu corning sferoid oluşturma protokolü modifiye edilerek kullanıldı. 2D hücreler yaklaşık %80-90 konfluent olduklarında tripsin-EDTA ile kaldırılarak sayım işlemleri yapıldı ve ULA-pleytlere aktarıldı. Farklı sayıdaki hücreler ve farklı inkübasyon zamanları ile yapılan denemeler sonucunda hücrelerin 25000 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekilmesine

ve sferoid oluşumu için 48 saat izin verilmesine karar verildi. Hücreler ekildikten sonra 48 saat boyunca %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. 48 saat sonunda sferoidlerin oluşumu mikroskop ile teyit edildikten sonra ortamdaki DMEM uzaklaştırılıp, hücreler 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra Elabscience'tan satın alınan 1-) glikoz(25mM) ve L-glutamin(4mM) içeren rutin hücre kültürü medyumunu (EP-CM-L0040) 2-) glikoz içermeyen, L-glutamin (4mM) içeren hücre kültürü medyumunu (EP-CM-L0093) 3-) L-glutamin içermeyen, glikoz (25mM) içeren rutin hücre kültürü medyumunda (EP-CM-L0035) üç farklı medyumda 24, 48 ve 72 saat boyunca %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi. Deneyler 3 tekrarlı çalışıldı.

3.1.7. Hücre Canlılık Testi (MTT)

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sarı renkli bir formazan tuzdur. Prolifere hücreler artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile MTT'yi mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürür (Şekil 11). Oluşan bu kristaller dimetil sülfoksit (DMSO)'da veya izopropil alkolde çözünür. Daha sonra hücre canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenir ve uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücelere göre yüzde (%) olarak belirlenir.



Şekil 11. MTT testinin çalışma prensibi (Kamiloglu ve diğerleri, 2020)

MTT testi için Ho'nun makalesinde kullanılan metodu modifiye edilerek kullanılmıştır (W.Y. Ho ve diğerleri, 2012). Aynı sayıdaki hücreler (25000 hücre/kuyu) 2D yöntemi için 24'lü pleytlere, 3D için 96'lı ULA-pleytlere ekilmiştir. MTT testi için hücreler önceden belirtilen 3 farklı medyum ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa üzerindeki vasat uzaklaştırılarak, her grup için kendi grup vasatında hazırlanmış

%10'luk MTT (5mg/ml) solüsyonundan ilave edildi. Pleytler 4 saat boyunca 37 °C %5'lik CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonu kuyucuklardaki vasatlar bertaraf edildi. 3D yöntem için oluşan fomazan kristalleri uygun miktardaki DMSO'da çözdürüldü. 2D yöntem için ise formazan kristalleri uygun miktarda DMSO'da çözdürüldükten sonra sıvının 200 µl'si 24'lük pleytten 96'lık pleyte aktarıldı. Daha sonra pleytlerin 570 nm'de spektrofotometrik ölçümü gerçekleştirildi.

Hesaplamalarda % canlılık değerini bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\% \text{ canlılık} = (\text{Örnek/Kontrol}) \times 100$$

Kontrol: 25 mM Glikoz (+) ve 4 mM Glutamin (+) içeren DMEM uygulanan kuyucuğun absorbansı

Örnek: Glikoz içermeyen 4 mM glutamin içeren veya Glutamin içermeyip 25 mM glikoz içeren kuyucuktaki testin absorbansı

3.1.8. Enzimlerin ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile Tayini

Çalışmada spesifik antikorların antijen ile etkileşmesi ve oluşan antijen-antikor kompleksinin enzim işaretli antikor ile bağlanarak enzim aktivasyonunun ölçülmesi esasına dayanan sandviç elisa yöntemi kullanıldı. Renkli ürün oluşumu enzim miktarıyla doğru orantılıdır.

Hazırlanan hücre lizatlarında tamamı Bioassay Tecnoogy Laboratory'den (BT LAB) satın alınan insan heksokinaz (HK, BT LAB, E0888Hu), Fosfofruktokinaz (PFK, BT LAB, E2097Hu), glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH, BT LAB, E2206Hu), piruvat kinaz (PK, E0728Hu) ve piruvat dehidrojenaz E1 (PDHC-E1, E0889Hu), sitrat sentaz (CS, E0705Hu), isositrat dehidrojenaz (İCD, E0823Hu), α-ketoglutarat dehidrojenaz veya diğer adıyla 2-oxoglutarat dehidrojenaz (OGDH, E7589Hu), glutamat dehidrojenaz (GDH, E1376Hu) enzimleri ELISA kiti ile analiz edildi.

3.1.8.1. Hücre lizatlarının Hazırlanışı

1. 2D yönteminde farklı medyumlar ile muamele edilen hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda, tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

2. 3D yönteminde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda her grup için 25'li sferoid havuzları oluşturuldu ve steril ependorflara aktarıldı. Sferoidlerin üzerine 200 µL tripsin-EDTA ilave edildi ve inkübatör içerisine yerleştirilen orbital shakerda 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin tekli hücreler haline geldiğinden emin olmak için nazıkçe pipetaj yapıldı (Saleh ve diğerleri 2020). Sonrasında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

3. Santrifüj sonrasında süpernatantlar atılarak hücre pelletleri belirli miktarda PBS'de çözüldü ve sayım işlemleri yapıldı.

4. Bu aşamadan itibaren ELISA prosedüründe yer alan talimatlar takip edilmiştir. Hücre sayımı sonrasında hücreler 10^6 hücre/mL olacak şekilde PBS ile çözüldü ve ependorflara alındı.

5. Hücrelerin lize etmek amacıyla dondur-çöz işlemi uygulandı. -80 derin dondurucuda dondurulduktan sonra, 37 °C'lik su banyosunda çözdürülen hücrelere üçer kez hızlı dondur-çöz işlemi uygulanarak lizis işlemi gerçekleştirildi.

6. Lizis tamamlanınca 3,000 rpm'de 20 dakika santrifüj işlemi uygulandı.

7. Santrifüj işleminin ardından süpernatantlar farklı ELISA analizleri için daha önceden etiketlenen ependorflara paylaştırıldı ve daha sonra analizi yapılmak üzere -80 derin dondurucuya kaldırıldı.

3.1.8.2 ELISA Yöntemi Prosedürü

1. Çalışma öncesinde örnekler ve kitler oda sıcaklığına getirildi.

2. Standartlar kit prosedürüne uygun şekilde hazırlandı.

3. Pleyt içindeki standart olarak belirlenen kuyucuklara 50 µL standart çözeltisi sırasıyla eklendi.

4. Örnek olarak belirlenen kuyucuklara 40 µL örnek eklendi.

5. Daha sonra örnek kuyucuklarının herbirine 10 µL Biotinylated antibody eklendi.

6. 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonu standart ve örnek kuyucuklarına eklendi ve pleyt yapışkan strip ile üzeri kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

7. Her bir kuyucuk tamamen boşaltılıp 300 µL yıkama solüsyonu eklendi. Bu işlem 5 kez tekrar edildi ve her yıkama aşamasında solüsyonun 45 saniye boyunca kuyucukta bekletildi.

8. Yıkama işleminin ardından kör dahil bütün kuyucuklara önce 50 µL Substrat A solüsyonu ardından 50 µL substrat B solüsyonu eklendi ve 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi.

9. Son olarak bütün kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklenerek maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi ve 450 nm’de ölçüm yapıldı.

3.1.9. İstatistiksel Değerlendirme

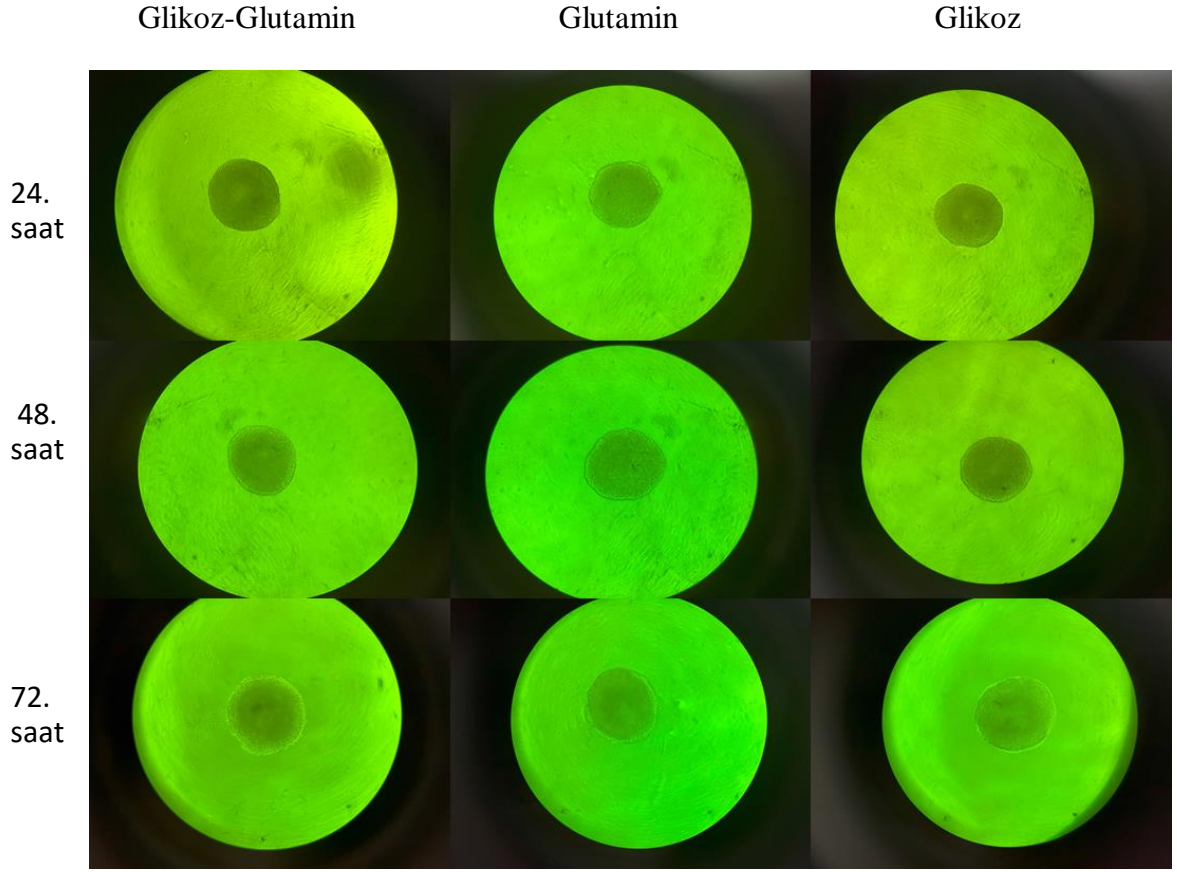
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (Statistical Packag for Social Sciences) for Windows 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren gruplar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA)’yla ve gruplar arası farkların önem kontrolü ise post hoc Tukey testi ve Tamhane testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen gruplar Kruskall Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. Tekrarlı testlerde normal dağılım gösteren gruplarda tekrarlı ANOVA, normal dağılım göstermeyen gruplarda Friedman testi yapıldı. $p < 0.05$ değeri önemli kabul edildi. Tüm veriler ortalama ve \pm standart hata olarak verildi.

MTT testlerinde glikozlu-glutaminli medyum kontrol grubu olarak kabul edildi. Normal dağılım gösteren grupların istatistiksel değerlendirmesinde bağımsız gruplar için t-testi, normal dağılım göstermeyen gruplarda ise Mann Whitney U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Sferoidlerin Oluşturulması ve Morfolojisi

A549 akciğer kanser hücrelerinden sferoidlerin oluşturulması amacıyla başlangıçta 200 µl vasat ile ULA pleytlere 5000, 10000, 25000, 50000 hücre/kuyucuk oranında ekilmiştir. 5000 ve 10000 hücre/kuyucuk oranında ekilen hücreler 2 gün sonunda iyi sferoid yapıları oluşturmadığı görülmüştür. 50000 hücre/kuyucuk ekilen hücreler 2 gün sonunda iyi sferoid yapıları oluşturmuş ancak hücreler %0,25 tripsin-EDTA ile tekli hücreler haline getirilip trypan blue ile boyanarak canlılıkları incelendiğinde canlılık oranının ortalama %65 olarak tespit edilmiştir. 25000 hücre/kuyucuk oranında ekilen hücreler 2 gün sonunda en iyi sferoid formlarını oluşturmuş ve trypan blue ile boyanarak hemositometre ile sayılan hücreler yaklaşık 27000 canlı hücre tespit edilmiş ve canlılık oranı ortalama %85 olarak belirlenmiştir. Bu sebeplerden 25000 hücre/kuyucuk konsantrasyonu bu tez çalışmasında tercih edilmiştir. 2 gün sferoid oluşumuna izin verildikten sonra hücreler farklı medyumlara alınmış ve 24, 48 ve 72. saatlerde görüntülenmiştir (Resim 1). Sferoid büyüklükleri 24-72. saat aralıklarında ölçülmüş, zamana bağlı olarak sferoidlerin çap uzunlukları belirli miktarda artmakla birlikte, farklı medyumlar arası karşılaştırmada aynı zaman aralıklarında benzer sferoid çap uzunlukları elde edilmiştir. Sferoidlerin çapları belirlenmesi amacıyla Olympus SZX7 stereo mikroskop ve Olympus EP50 kamera kullanılmıştır ve çapları 250-340 µm olarak ölçülmüştür. Bunun yanında sferoidler 24, 48, 72. saatlerde tek hücreli süspansiyon haline getirilip sayıldıklarında glikozlu-glutaminli medyumda elde edilen canlı hücre sayısı diğer gruplara bir miktar daha düşük olduğu görülmüştür (24. Saat ~26000, 48. Saat ~28000, 72. Saat ~32000). Bunun yanında glutaminli ve glikozlu ortamlardan alınan sferoidlerin hücre sayımında aynı saatlerde benzer hücre sayıları elde edilmiştir (24. Saat ~26000, 48. Saat ~29000 72. Saat ~35000).



Resim 1. Farklı medyumlarda yukarıdan aşağıya sırası ile 24, 48, 72. saatlere ait sferoid görüntüleri (10x büyütme).

4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

A549 akciğer kanser hücreleri farklı yöntemlerle ve inkübasyon süresine bağlı değişen proliferasyon oranlarını belirlemek amacıyla hücreler glikozlu-glutaminli, glutaminli ve glikozlu olmak üzere üç farklı medyumda 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi ve canlılık oranları MTT hücre canlılık testi kullanılarak ölçüldü.

2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen hücrelerde, glikozlu-glutaminli medyumdaki canlılık değeri 100 kabul edilerek diğer medyumlardaki canlılık değeri bu değere oranlanmış ve % canlılık oranı olarak verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında glikozlu-glutaminli medyuma göre 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık ve standart hata değerleri.

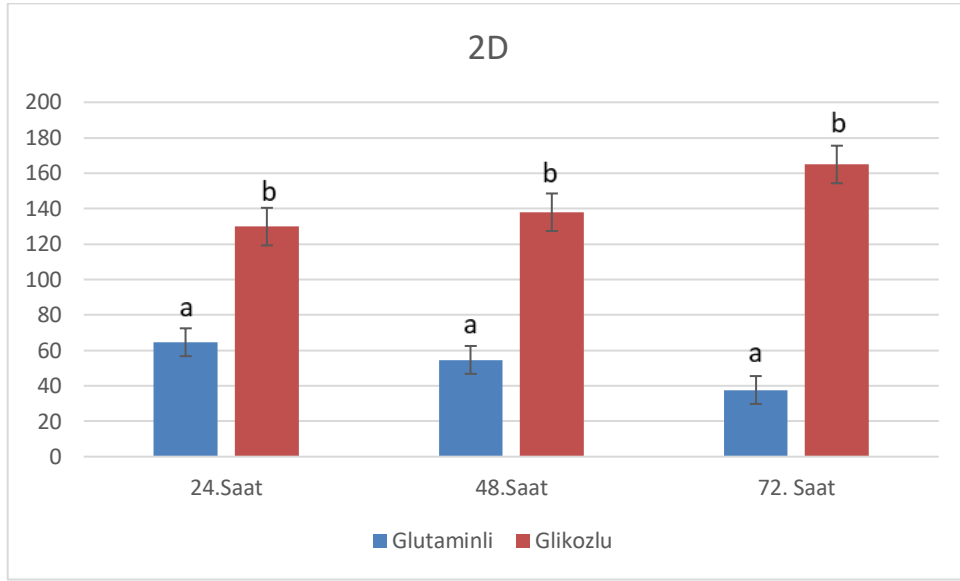
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glutaminli medyum 2D % Canlılık	64,58±3,00 ^B	54,61±7,19 ^B	37,63±1,45 ^B
Glikozlu medyum 2D % Canlılık	129,85±2,54 ^A	137,95±4,85 ^A	164,92±1,54 ^A
	24.Saat	48.Saat	72. Saat
Glutaminli medyum 3D %Canlılık	114,21±6,13 ^A	144,65±9,24 ^A	166,75±7,78 ^A
Glikozlu Medyum 3D %Canlılık	113,39±5,68 ^A	142,57±2,82 ^A	173,25±11,11 ^A

AB aynı sütunda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

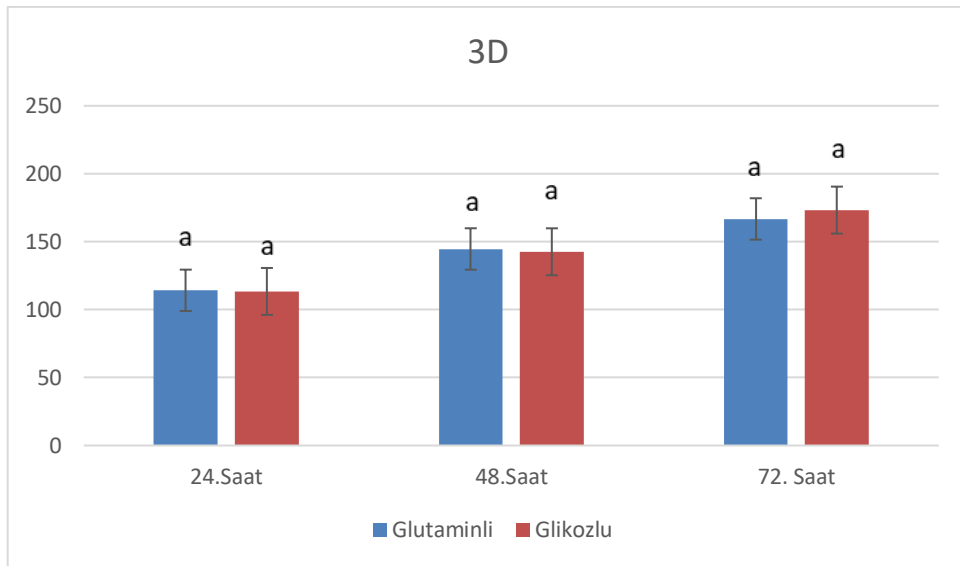
2D yönteminde glutaminli medyumda kontrol grubuna göre zamana bağlı olarak canlılık oranlarında azalma tespit edildi. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında glutaminli medyumda kontrol grubuna göre % canlılık oranlarının 24. saatte %64, 48. saatte %54, 72. saatte %37'si oranında olduğu görüldü (Tablo 1). 3D yönteminde ise glutaminli medyumda kontrol grubuna göre % canlılık oranının arttığı tespit edildi. Canlılık oranları zamana göre karşılaştırıldığında, 24. Saatte %14, 48. Saatte %37, 72. Saatte ise %66 oranında yüksek olduğu görüldü (Tablo 1).

2D yönteminde glikozlu medyum kontrol grubuna göre zamana bağlı değişimi incelendiğinde, canlılık oranlarının 24. Saatte %29, 48. saatte %37, 72. saate ise %64 oranında yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 1). 3D yöntemde glikozlu medyumdaki canlılık oranları kontrole göre karşılaştırıldığında, 24. Saatte %13, 48. saatte %42, 72. saatte ise %73 oranında artmış canlılık tespit edildi (Tablo 1).

2D yönteminde glutaminli ile glikozlu medyumdaki canlılık oranları karşılaştırıldığında, glikozlu medyumda canlılık oranlarının 24. Saatte 2 kat, 48. Saatte 2,5 kat, 72. saatte 4,4 kat fazla olduğu belirlendi. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık olduğu görüldü (p<0,001) (Tablo 1) (Şekil 12). 3D yönteminde glikozlu ile glutaminli medyumdaki canlılık oranları karşılaştırıldığında tüm zaman aralıklarında oldukça yakın canlılık oranları görülmüş olup, 24 ve 48. saatlerde sırası ile glutaminli medyumda 1,007 ve 1,01 kat yüksek, 72. Saatte ise glikozlu medyumda 1,05 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark tespit edilmemiştir (p>0,05) (Tablo 1) (Şekil 13).



Şekil 12. A549 akciğer kanser hücrelerinin 2D yöntemiyle glutaminli ve glikozlu medyumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 13. A549 akciğer kanser hücrelerinin 3D yöntemiyle glutaminli ve glikozlu medyumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3. Enzim Miktarlarının Değerlendirilmesi

Üç farklı medyumda 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen A549 hücreleri 2D ve 3D yöntemlerinde kültüre salgıladığı HK, G6PDH, PFK, PDHC-E1, CS, İDH, OGDH, GDH enzim miktarı ELISA yöntemi ile tespit edildi.

Elde edilen verilerin karşılaştırılması 3 farklı şekilde değerlendirildi.

- 1- 2D yöntemindeki enzim miktarının zamana ve medyumlara göre karşılaştırılması
- 2- 3D yöntemindeki enzim miktarının zamana ve medyumlara göre karşılaştırılması
- 3- 2D ve 3D yöntemlerindeki, enzim miktarının karşılaştırılması

4.3.1. ELISA ile Elde Edilen Hekzokinaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak HK aktivitesinin (mU/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 2).

Tablo 2. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi (mU/mL) ve standart hata değerleri.

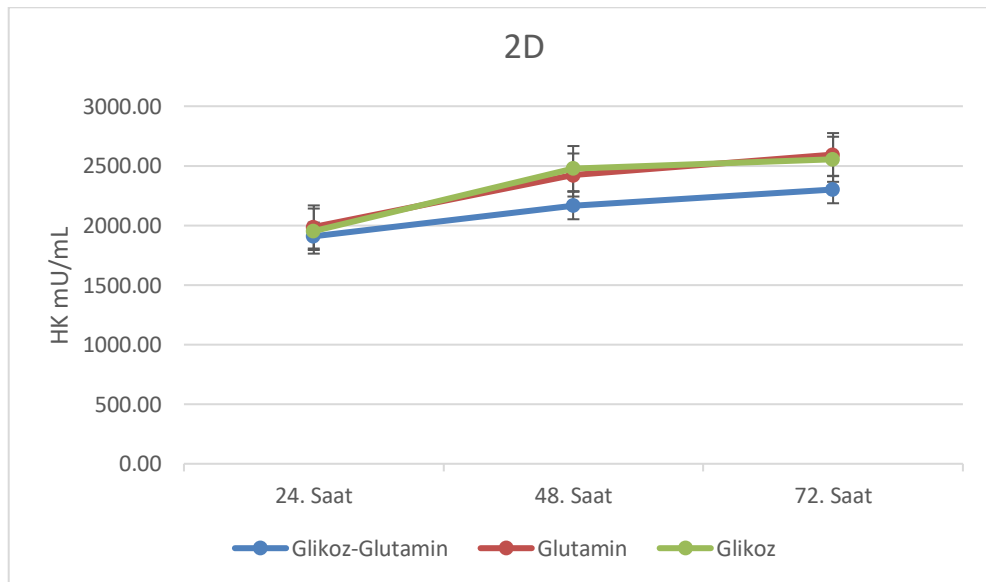
2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	1908,83±14,55 ^{aA}	2166,63±220,79 ^{aA}	2301,07±292,66 ^{aA}
Glutamin	1987,07±98,13 ^{aA}	2422,91±42,51 ^{bA}	2594,05±32,23 ^{bA}
Glikoz	1952,43±85,90 ^{aA}	2476,89±91,11 ^{bA}	2554,78±58,94 ^{bA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	2620,29±87,62 ^{aB}	2225,31±20,18 ^{bA}	2283,44±13,74 ^{bA}
Glutamin	2901,83±71,14 ^{aA}	2138,47±59,08 ^{bA}	2307,94±57,40 ^{bA}
Glikoz	2563,86±66,90 ^{aB}	2073,35±65,53 ^{bA}	1927,81±90,63 ^{bB}

ab aynı satırda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

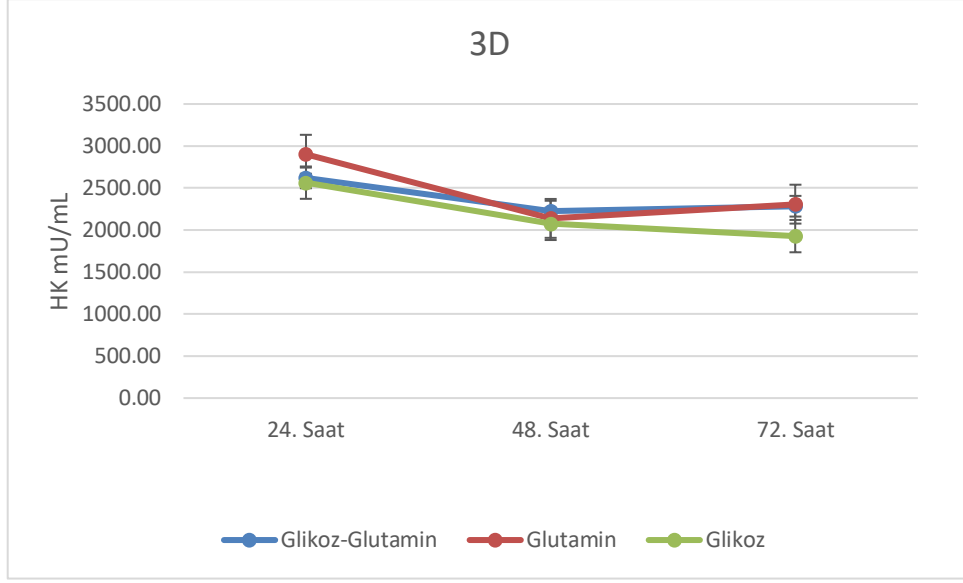
AB aynı sütunda farklı harfler p<0,01 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki HK aktiviteleri karşılaştırıldığında, 2D yönteminde tüm zamanlarda glikozlu ve glutaminli medyumda glikozlu-glutaminli medyuma göre yüksek HK aktivitesi gözlemlendi. Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Tablo 2) (Şekil 14). 3D yönteminde glutaminli medyumda diğer medyumlara göre 24. ve 72. saatlerde daha yüksek HK aktivitesi tespit edilmiş olup, 72. Saat sonunda en düşük seviye glikozlu medyumda elde edilmiştir. Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatte glikozlu ile glutaminli medyumlarda arasında ($p<0,01$); 72. saatte glikozlu ile glutaminli ve glikozlu-glutaminli ile glikozlu medyumlarda arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,01$) (Tablo 2) (Şekil 15).

Hekzokinazın 2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyumlardaki enzim aktivitesinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde 2D yöntemde farklı medyumlarda 24-72. saatlerde enzim aktivitesinde artış gözlemlendi. Glikoz-glutaminli ortamda zamana bağlı olarak anlamlı farklılık tespit edilmezken ($p>0,05$), glutaminli ve glikozlu medyumlarda 24 ve 72. saatler arasında anlamlı farklılık ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Tablo 2) (Şekil 14). 3D yönteminde glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumlarda 48. saate kadar azalma 48. saatten sonra hafif bir artış, glikozlu medyumda 24-72. saatler arasında ise azalış gözlemlendi. 3D yöntemde tüm medyumlarda 24 ile 48 ve 24 ile 72. saatler arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 2) (Şekil 15).

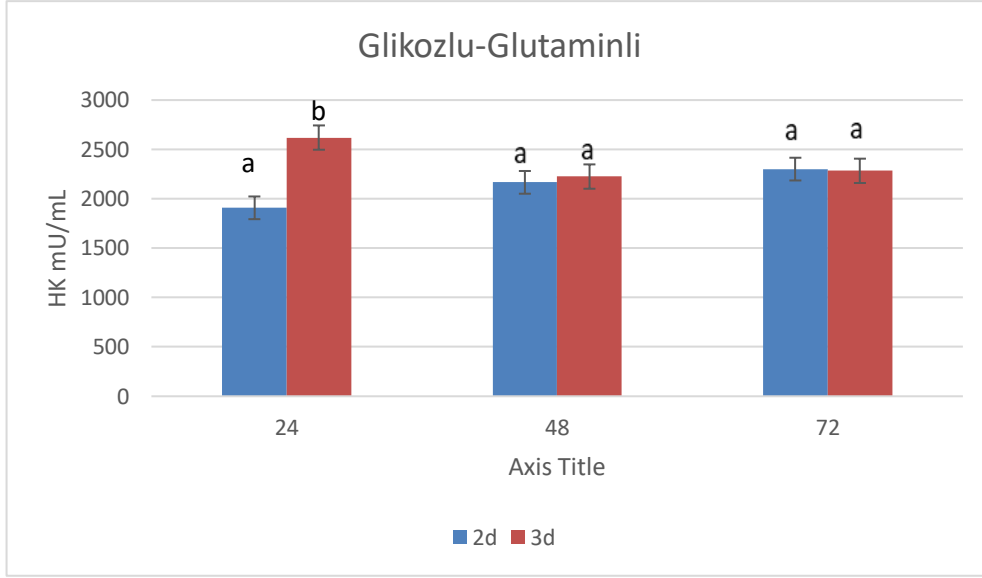


Şekil 14. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi.

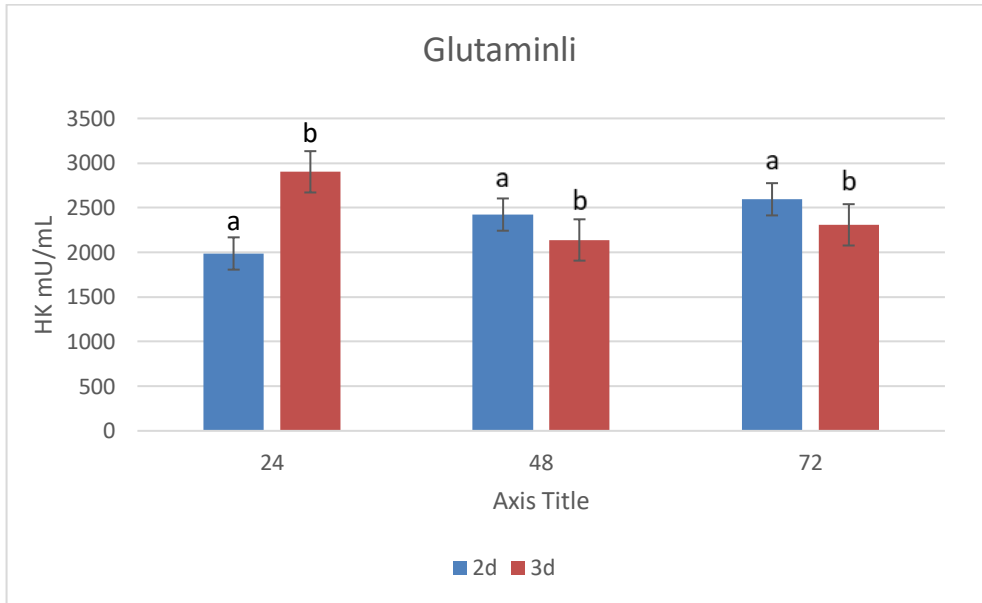


Şekil 15. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi.

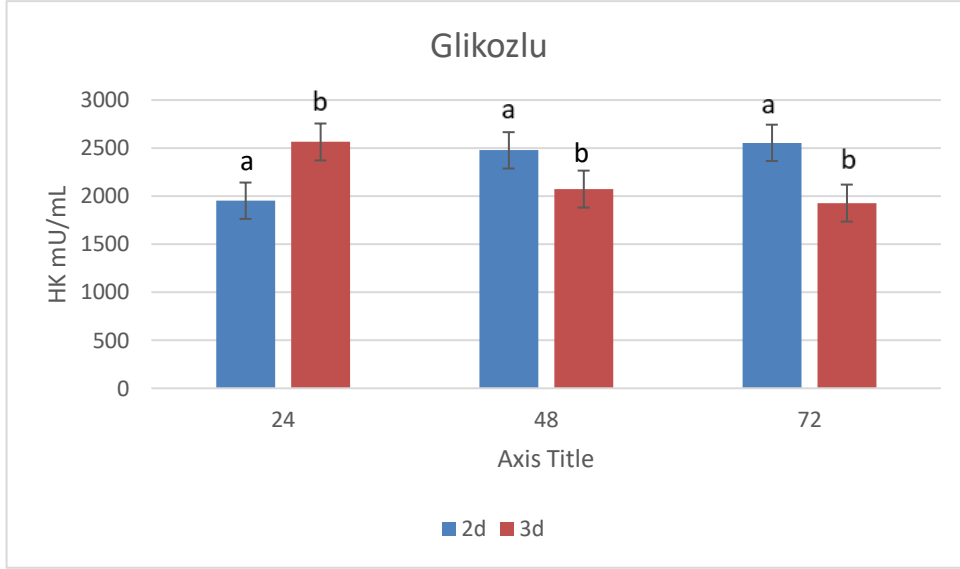
2D ve 3D yöntemindeki aynı medyum ile muamele edilen A549 hücrelerinin eş zamanlı HK enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında glukoza-glutaminli medyumda 24. ve 48. saatte 3D yönteminde HK aktivitesinin 2D yöntemine kıyasla daha yüksek olduğu, 72. saatte ise 2D yönteminde bir miktar daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 16). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatteki değişimlerde anlamlılık olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). Glutaminli medyumda HK aktivitesinin 24. saatte 3D yönteminde daha yüksek olduğu, 48. ve 72. saatlerde ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 17). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 2). Glukoza medyumda medyumda HK aktivitesinin 24. saatte 3D yönteminde daha yüksek olduğu, 48. ve 72. saatlerde ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 18). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 2).



Şekil 16. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 17. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 18. Akciğer kanser hücrelerinin Glikozlu medyum 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK aktivitesi. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.2. ELISA ile Elde Edilen Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak G6PDH aktivitesinin (mU/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 3).

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki G6PDH aktiviteleri karşılaştırıldığında, G6PDH aktivitelerinin 24 ve 72. saatlerde glikozlu medyumda diğer medyumlara göre, 48. Saatte ise glikozlu-glutaminli medyumda diğer medyumlara göre yüksek G6PDH aktiviteleri kaydedildi. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu medyum ve 72. saatte glikozlu ile glutaminli medyum arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,01$) (Tablo 3) (Şekil 19). 3D yönteminde eş zamanlı enzim aktiviteleri farklı medyumlarda karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p\geq 0,05$) (Tablo 3) (Şekil 20).

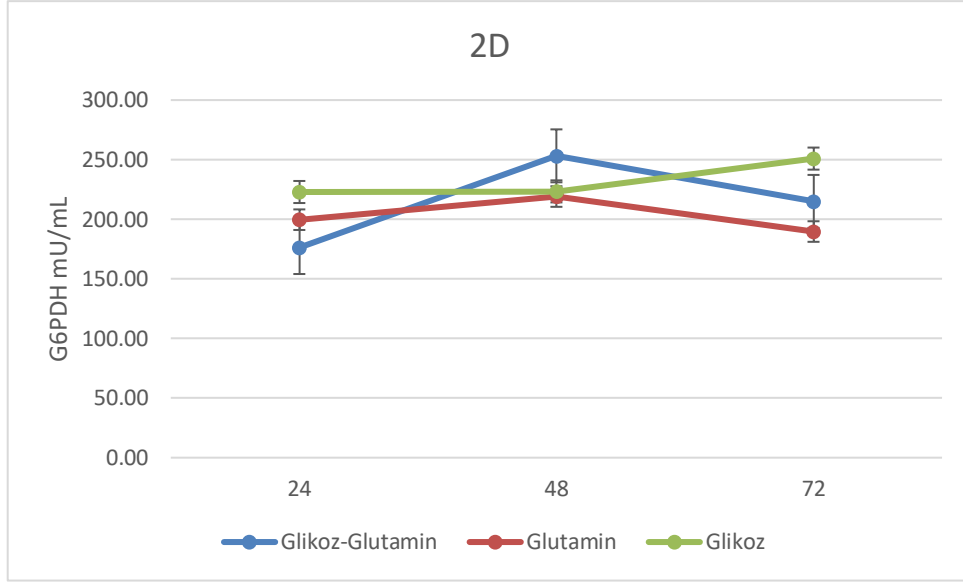
Tablo 3. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim aktivite (mU/mL) ve standart hata değerleri.

2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	176,28±4,16 ^{ab}	253,22±12,19 ^{ba}	215,00±24,70 ^{abAB}
Glutamin	199,65±27,69 ^{aA}	219,08±3,56 ^{aA}	189,71±11,83 ^{ab}
Glikoz	222,88±6,00 ^{aA}	223,4±18,41 ^{abA}	250,91±10,09 ^{ba}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	205,69±13,93 ^{aA}	176,71±5,99 ^{aA}	206,05±8,14 ^{aA}
Glutamin	195,86±15,54 ^{aA}	168,30±4,86 ^{aAB}	227,12±7,78 ^{aA}
Glikoz	194,65±12,88 ^{aA}	139,77±9,35 ^{ba}	202,90±4,95 ^{aA}

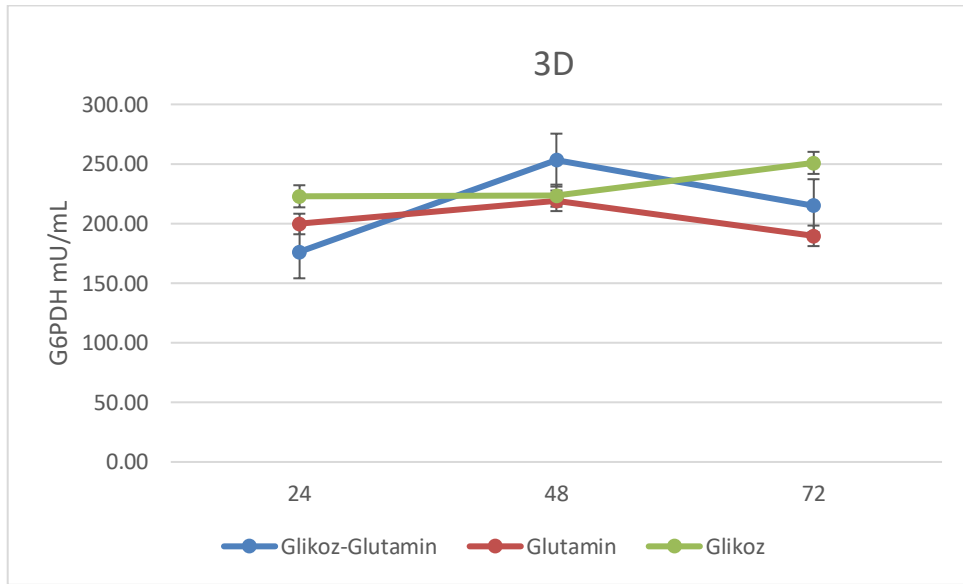
ab aynı satırda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

AB aynı sütunda farklı harfler p<0,01 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

G6PDH'nin 2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyumlardaki enzim aktivitelerinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde; 2D yönteminde glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumlarda 48. saate kadar enzim aktivitesinde artış 48. saatten 72 saate kadar azalış olduğu, glikozlu medyumda ise 24.-72. saatlerde enzim düzeyinde arasında artış tespit edildi (Tablo 3) (Şekil 19). 2D yönteminde zamana bağlı olarak glutaminli ortamda anlamlı farklılık tespit edilmezken (p>0,05), glikoz-glutaminli ve glikozlu medyumlarda anlamlı farklılık olduğu tespit edildi. Glikoz-glutaminli medyumda 24. ve 48. saatler arasında görülürken, glikozlu medyumda 24. ve 72 saatler arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0,05) (Tablo 3) (Şekil 19). 3D yönteminde tüm medyumlarda 48. saate kadar enzim düzeyinde azalış 48. ve 72. saatler arasında ise artış tespit edildi (Tablo 3) (Şekil 20). 3D yönteminde zamana bağlı olarak glikoz-glutaminli ve glutaminli ortamda anlamlı farklılık tespit edilmezken (p>0,05), glikozlu medyumda 24 ile 48. saatler ve 48 ile 72. saatler arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (p<0,05) (Tablo 3) (Şekil 20).



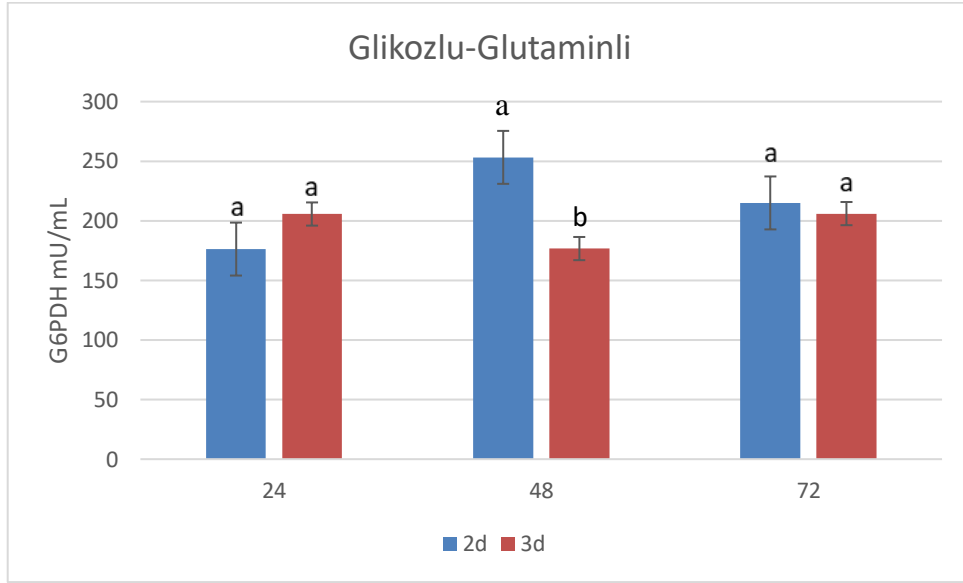
Şekil 19. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH aktivitesi.



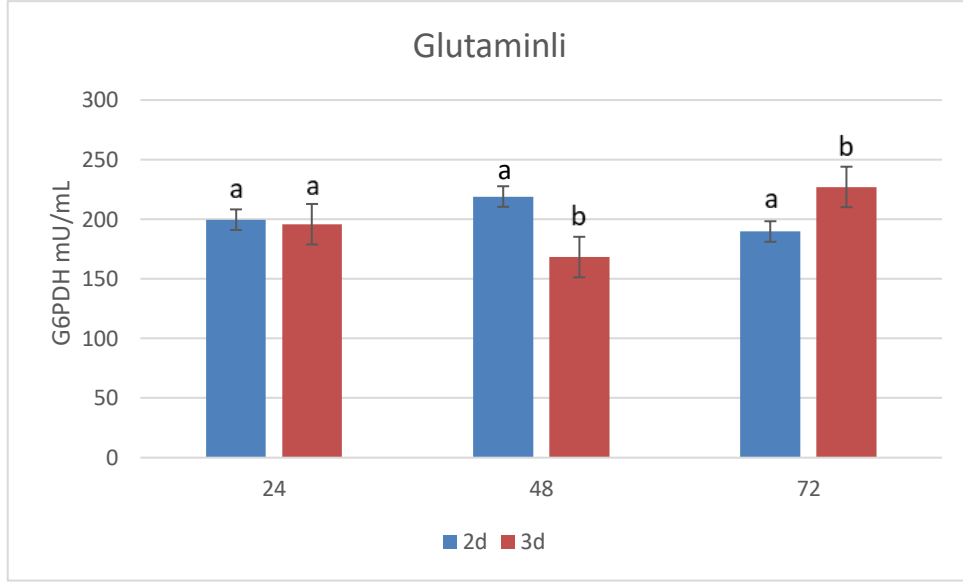
Şekil 20. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH aktivitesi.

Farklı medyumlardaki G6PDH enzim konsantrasyonları 2D ve 3D yönteminde karşılaştırıldığında glukoza-glutaminli medyumda 24. saatte 3D yönteminde G6PDH aktivitesinin 2D yöntemine kıyasla daha yüksek olduğu, 48. ve 72. saatte ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 48. saatte anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 3) (Şekil 21). Glutaminli medyumda

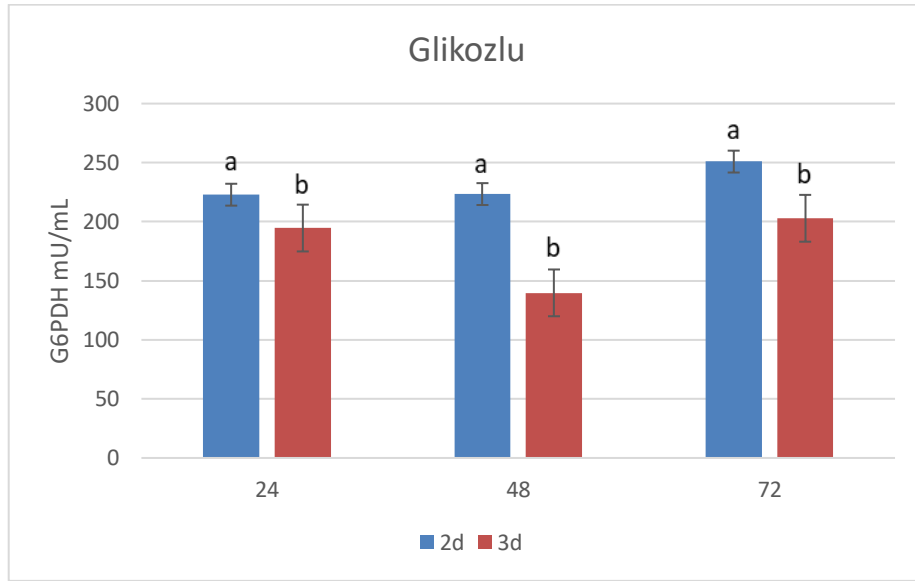
G6PDH aktivitesinin 24. ve 48. saatte 2D yönteminde daha yüksek olduğu, 72. saatte ise 3D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü. Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 48. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 3) (Şekil 22). Glikozlu medyumda G6PDH aktivitesinin tüm saat aralıklarında 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü. Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık, tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 3) (Şekil 23).



Şekil 21. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 22. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 23. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.3. ELISA ile Elde Edilen Fosfofruktokinaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak PFK düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 4).

Tablo 4. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK (ng/mL) enzim miktarları ve standart hata değerleri.

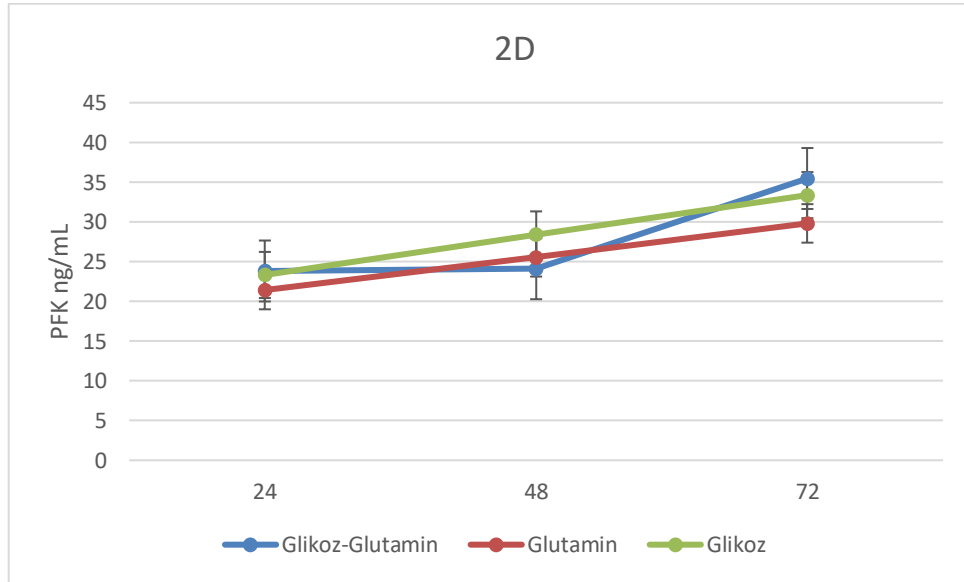
2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	23,82±1,41 ^{aA}	24,10±1,10 ^{abB}	35,46±1,37 ^{bA}
Glutamin	21,42±1,63 ^{aA}	25,54±1,05 ^{abAB}	29,81±0,79 ^{bB}
Glikoz	23,32±1,85 ^{aA}	28,42±1,37 ^{bA}	33,37±0,80 ^{cA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	28,43±0,57 ^{aA}	27,18±0,46 ^{aA}	27,25±1,56 ^{aB}
Glutamin	27,81±1,70 ^{aA}	29,36±1,82 ^{aA}	32,02±0,45 ^{aA}
Glikoz	30,75±2,61 ^{aA}	22,69±1,22 ^{aB}	24,92±0,67 ^{aB}

abc aynı satırda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

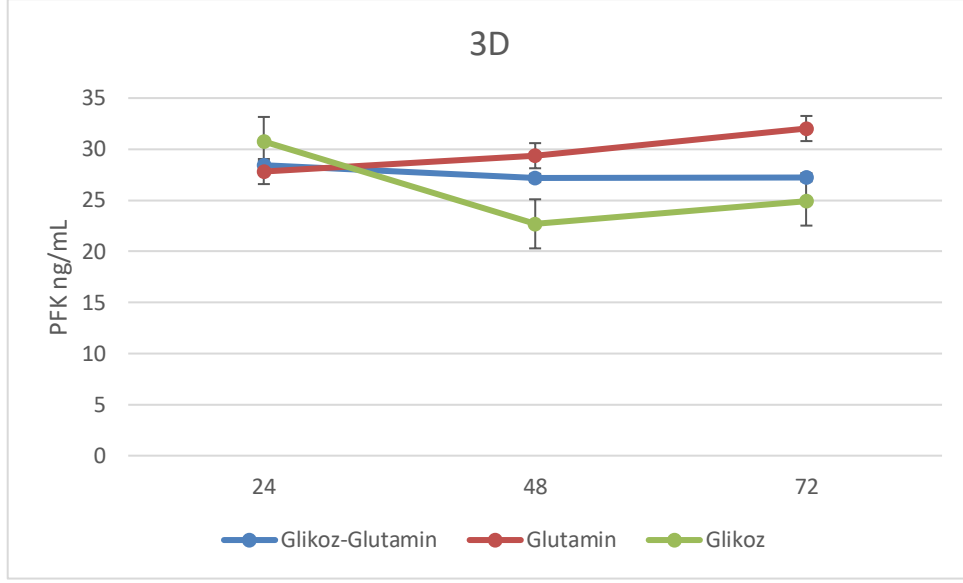
AB aynı sütunda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki PFK seviyeleri karşılaştırıldığında, 24 ve 72. saatlerde glutaminli medyumda diğer medyumlara göre daha düşük PFK seviyeleri kaydedildi. Glikozlu medyumda 48. saatte diğer medyumlara göre daha yüksek PFK konsantrasyonları tespit edilirken, 72. saatte glikozlu-glutaminli medyumda diğer medyumlara göre yüksek olduğu tespit edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 48. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu medyum, 72. saatte glikozlu-glutaminli ile glutaminli medyum ve glikozlu ile glutaminli medyum arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 4) (Şekil 24). 3D yönteminde 48. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu medyum ve glikozlu ile glutaminli medyumlar arasında, 72. saatte glikozlu ile glutaminli medyum arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 4) (Şekil 25).

PFK'nin 2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyumlardaki enzim konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi incelendiğinde; 2D yönteminde tüm medyumlarda enzim konsantrasyonu 24-72. saatler arasında artış göstermiştir. 2D yöntemde tüm medyumlarda anlamlı farklılık olduğu görüldü. Glikoz-glutaminli ve glutaminli medyumda 24 ile 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edilirken, glikozlu medyumda tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 4) (Şekil 24). 3D yöntemde enzim miktarlarında zamana bağlı değişim incelendiğinde; glikozlu-glutaminli medyumda 24-72. Saatler arasında az miktarda bir düşüş tespit edildi. Glutaminli medyumda 24-72. saatler arasında artış tespit edilirken, glikozlu medyumda 24-48. Saatler arası düşüş, 48-72. saatler arasında ise artış tespit edildi. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde farklı medyumlarda zamana bağlı değişimde anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p > 0,05$) (Tablo 4) (Şekil 25).

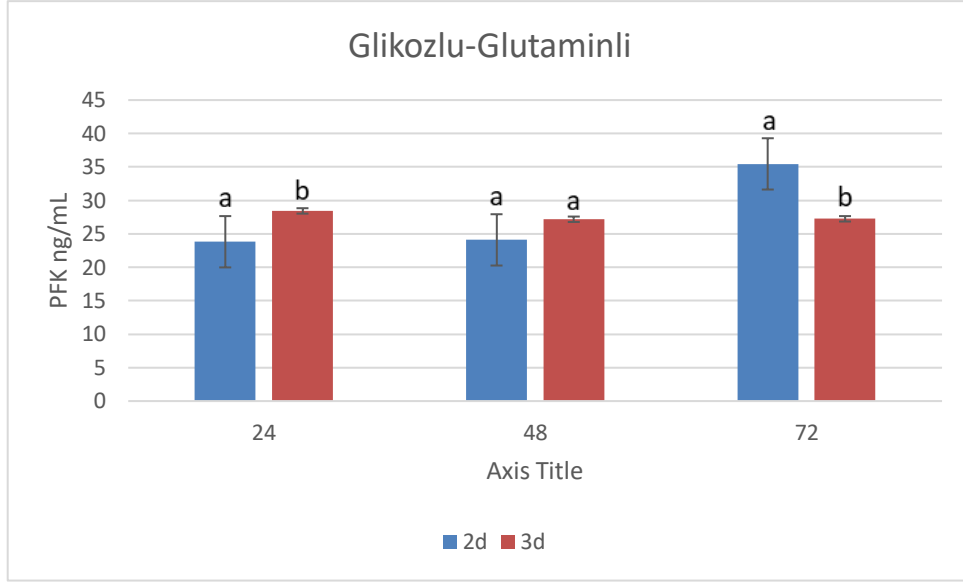


Şekil 24. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri.

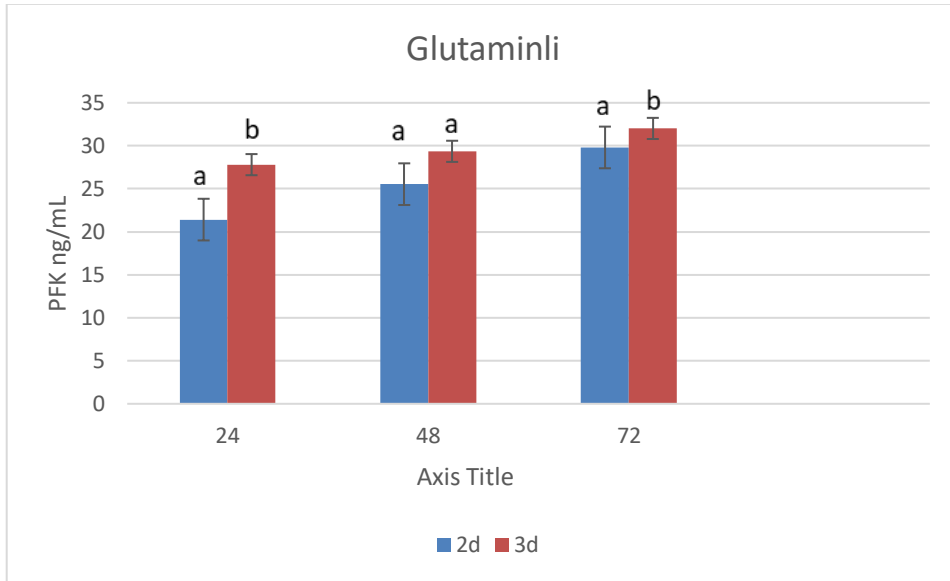


Şekil 25. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri.

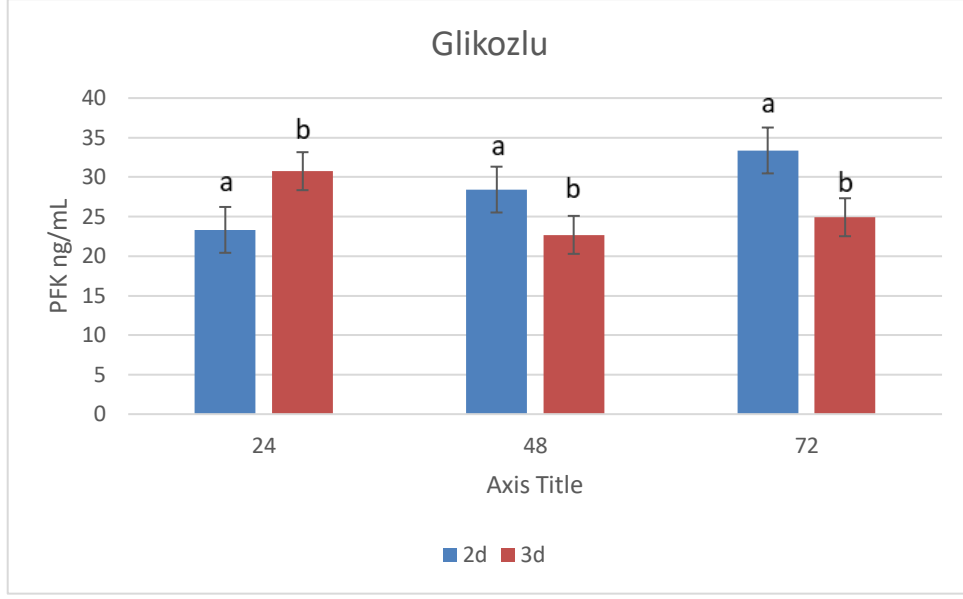
Farklı medyumlardaki 2D ve 3D yöntemindeki PFK enzim konsantrasyonları karşılaştırıldığında glukozlu-glutaminli medyumda 24. ve 48. saatte PFK enzim konsantrasyonunun 3D yönteminde, 72. saatte ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 26). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. ve 72. saatlerde anlamlılık olduğu tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 4). PFK enzim konsantrasyonunun glutaminli medyumda tüm zaman aralıklarında 3D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 27). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$). Glukozlu medyumda PFK enzim konsantrasyonunun 24. saatte 3D yönteminde, 48. ve 72. saatte 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü. Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 4) (Şekil 28).



Şekil 26. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 27. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı a, b harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 28. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFK enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.4. ELISA ile Elde Edilen Pirüvat Kinaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak PK aktivitelerinin (U/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 5).

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki PK aktiviteleri karşılaştırıldığında 24. saatte glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumun glikozlu medyuma göre yüksek PK aktiviteleri tespit edildi. 48 ve 72. saatlerde ise glutaminli medyuma diğer medyumlara göre düşük PK aktivitesi kaydedildi. Veriler değerlendirildiğinde 24. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu medyum, 48. ve 72. saatte glikozlu ile glutaminli medyum arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,01$) (Tablo 5) (Şekil 29). 3D yönteminde PK aktivitesinin, glikozlu medyuma 24.saat; glutaminli medyuma ise 48. ve 72. saatlerde diğer ortamlara göre daha düşük olduğu görülmüştür ($p > 0,05$) (Tablo 5) (Şekil 30).

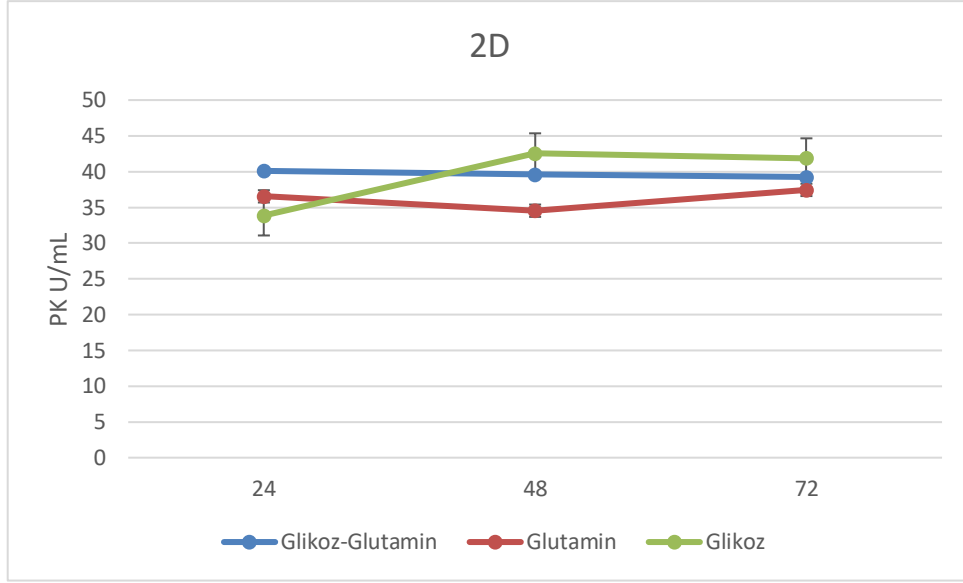
Tablo 5. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite (U/ml) ve standart hata değerleri.

2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	40,10±1,09 ^{aA}	39,59±0,80 ^{aAB}	39,25±0,40 ^{aAB}
Glutamin	36,54±0,51 ^{aA}	34,53±2,21 ^{aB*}	37,44±0,59 ^{aB}
Glikoz	33,86±1,20 ^{aB*}	42,56±1,14 ^{bA}	41,86±0,88 ^{bA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	38,37±0,99 ^{aA}	38,40±1,22 ^{aA}	38,46±0,60 ^{aA}
Glutamin	38,78±1,36 ^{aA}	35,22±1,58 ^{aA}	38,41±0,57 ^{aA}
Glikoz	37,74±0,95 ^{aA}	34,73±0,30 ^{aA}	37,46±1,52 ^{aA}

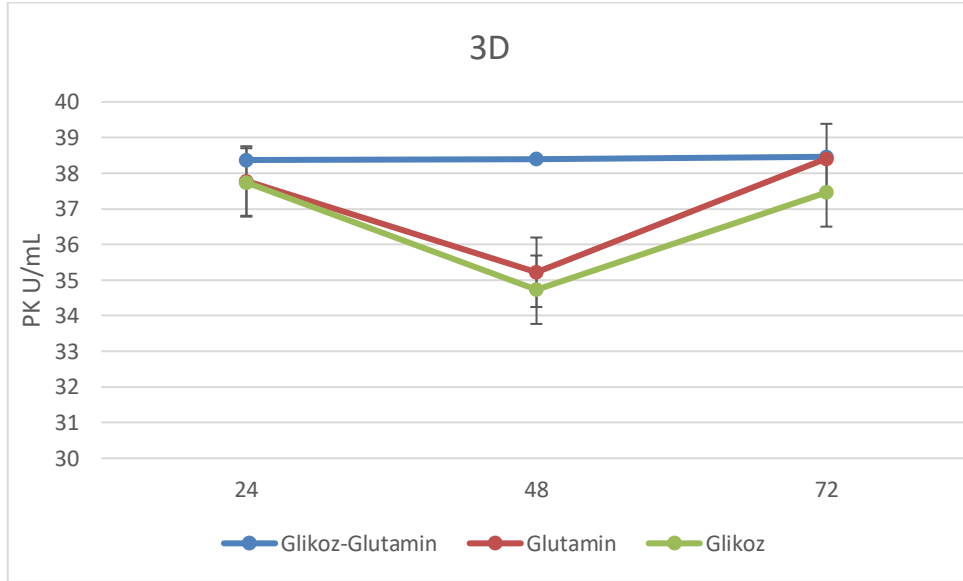
ab aynı satırda farklı harfler $p<0,05$ düzeyinde önemi ifade etmektedir.

AB aynı sütunda farklı harfler $p<0,05$; *, $p<0,01$ düzeyinde önemi ifade etmektedir.

PK'nin 2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyumlardaki enzim aktivitelerinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde; glikozlu-glutaminli ortamda 24-72. saatler arasında az miktarda bir düşüş gözlenirken, glutaminli medyumda 24-48. saatler arası arasında enzim aktivitelerinde bir azalma 48-72. saatler arasında ise artış görülmüştür. 2D yöntemde yalnızca glikozlu medyumda anlamlı farklılık tespit edildi ve farklılığın 24 ile 48. ve 24 ile 72. saatler arasında olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 5) (Şekil 29). 3D yöntemde glikozlu-glutaminli medyumda zamana bağlı olarak enzim aktivitelerinde belirgin bir değişim gözlenmezken, glutaminli ve glikozlu medyumda 24-48. saatler arasında bir azalma 48-72. saatler arasında bir artış tespit edildi. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde farklı medyumlarda zamana bağlı değişimde anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Tablo 5) (Şekil 30).



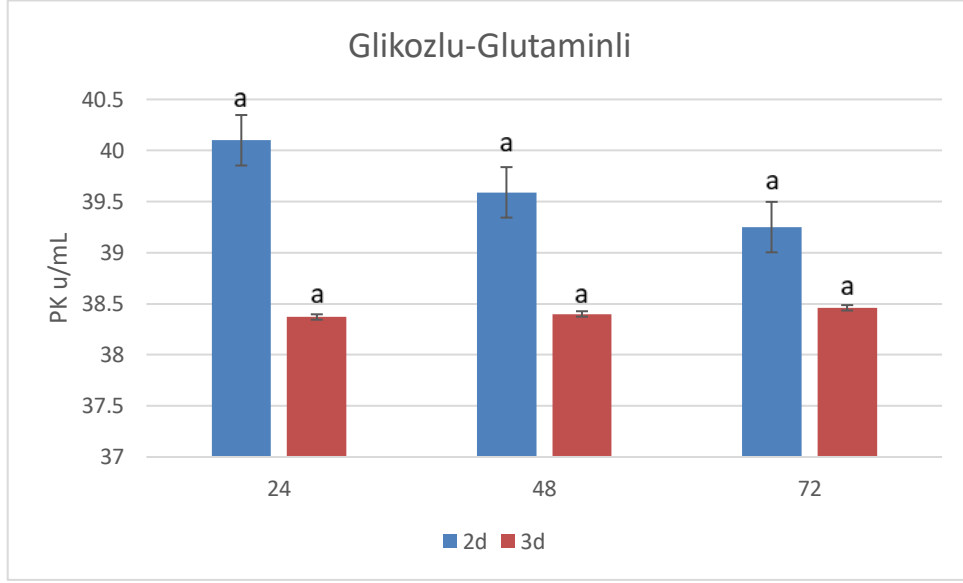
Şekil 29. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri.



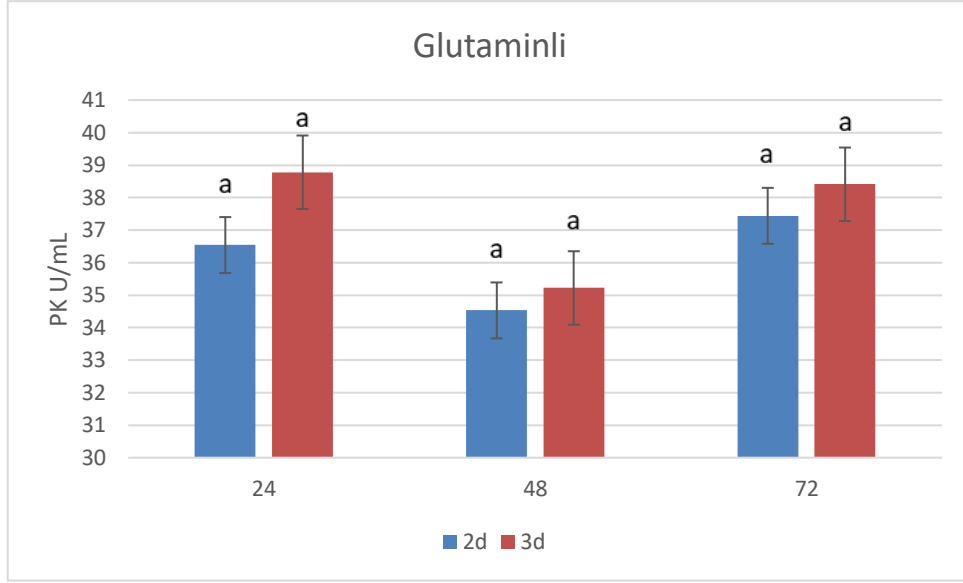
Şekil 30. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri.

Farklı medyumlardaki 2D ve 3D yöntemindeki PK enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında glikozlu-glutaminli medyumda tüm saat aralıklarında 2D yönteminde PK enzim aktivitesinin 3D yöntemine kıyasla daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 31). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yöntemler arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,05$) (Tablo 5). Glutaminli medyumda PK enzim aktivitesi tüm zaman aralıklarında 3D medyumda daha

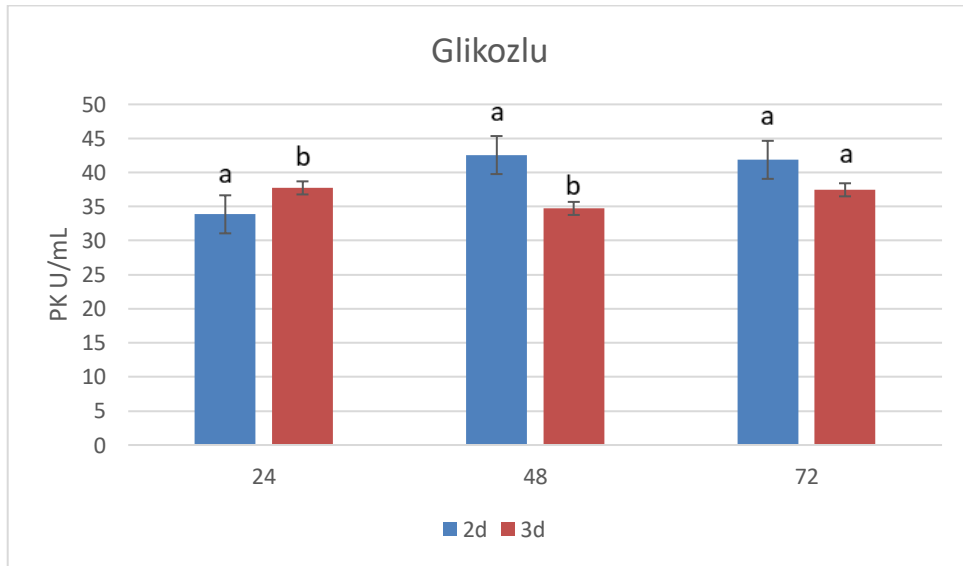
yüksek olduğu görüldü (Şekil 32). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında yöntemler arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,05$) (Tablo 5). Glikozlu medyumda PK enzim aktivitesinin 24. saatte 3D yönteminde daha yüksek olduğu, 48. ve 72. saatlerde ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 33). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24 ve 48. Saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 5).



Şekil 31. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri.



Şekil 32. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri.



Şekil 33. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PK enzim aktivite düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.5. ELISA ile Elde Edilen Pirüvat Dehidrojenaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyalara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyalara bağlı olarak PDH düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 6).

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki PDH seviyeleri zamana göre karşılaştırıldığında, 24. saatte glikozlu ortamda, 48. ve 72. saatlerde glutaminli medyumda diğer medyalara göre düşük PDH seviyeleri kaydedildi. 24 ve 72. saatlerde glikozlu-glutaminli medyumda, 48. saatte ise glikozlu medyumda diğer medyalara göre yüksek PDH seviyeleri tespit edildi (Şekil 34). Bu veriler incelendiğinde yalnızca 48. saatte glikozlu medyum ile diğer medyumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$) (Tablo 6). 3D yönteminde medyalara bağlı olarak PDH seviyelerinde farklılık gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$) (Tablo 6) (Şekil 35).

Tablo 6. 2D ve 3D yöntemde farklı medyalara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarları (ng/mL) ve standart hata değerleri.

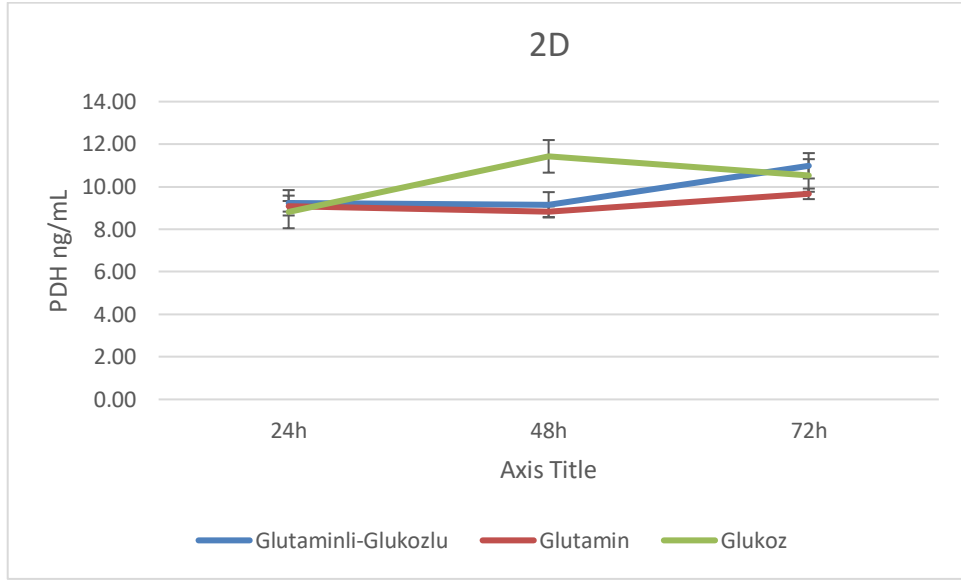
2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	9,24±0,38 ^{aA}	9,14±0,3 ^{aB}	10,98±0,48 ^{aA}
Glutamin	9,07±0,46 ^{aA}	8,82±0,46 ^{aB}	9,66±0,34 ^{aA}
Glikoz	8,81±0,48 ^{aA}	11,42±0,35 ^{ba*}	10,52±0,31 ^{abA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	11,12±0,3 ^{aA}	9,83±0,46 ^{abA}	9,47±0,33 ^{ba}
Glutamin	10,76±0,79 ^{aA}	9,75±0,49 ^{aA}	9±0,38 ^{aA}
Glikoz	12,26±0,56 ^{aA}	11,35±0,74 ^{aA}	8,98±0,41 ^{ba}

ab aynı satırda farklı harfler $p < 0,05$, düzeyinde önemi ifade etmektedir.

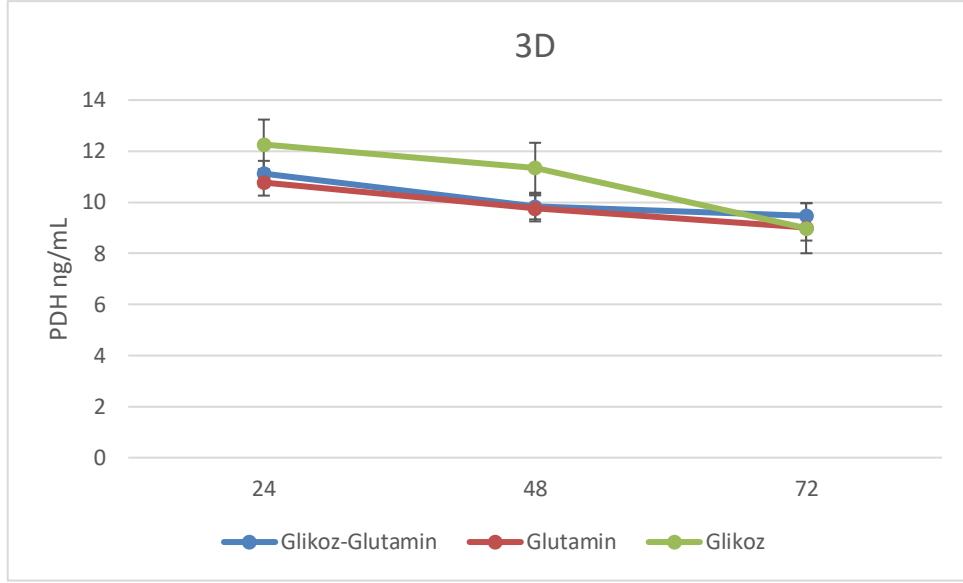
AB aynı sütunda farklı harfler $p < 0,05$; *, $p < 0,001$ düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Pirüvat dehidrojenazın 2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyalardaki enzim konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi incelendiğinde, 2D yöntemde glikozlu medyumda 24 ile 48. arasında bir artış tespit edildi ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. ($p < 0,05$) (Tablo 6) (Şekil 34). Glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumda 24-48.

saatler arasında enzim seviyelerinde bir azalma 48-72. saatler arasında artış görüldü fakat veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 6) (Şekil 34). 3D yöntemde tüm medyumlarda 24-72. saatler arasında enzim seviyelerinde düşüş gözlemlendi. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glikozlu-glutaminli medyumda 24 ile 72. saatler arasında ve glikozlu medyumda 24 ile 72. saatler ve 48 ile 72. saatler arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 6) (Şekil 35).

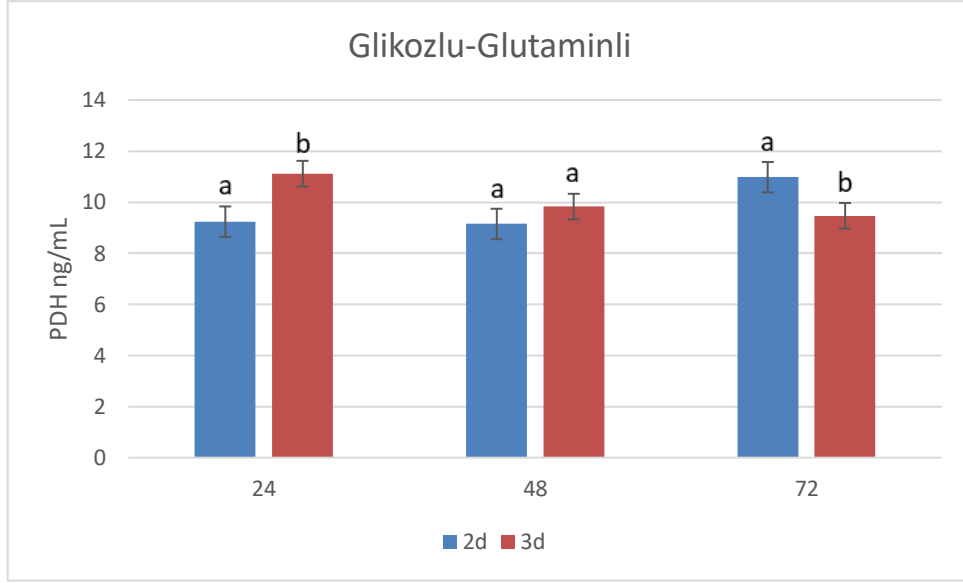


Şekil 34. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.

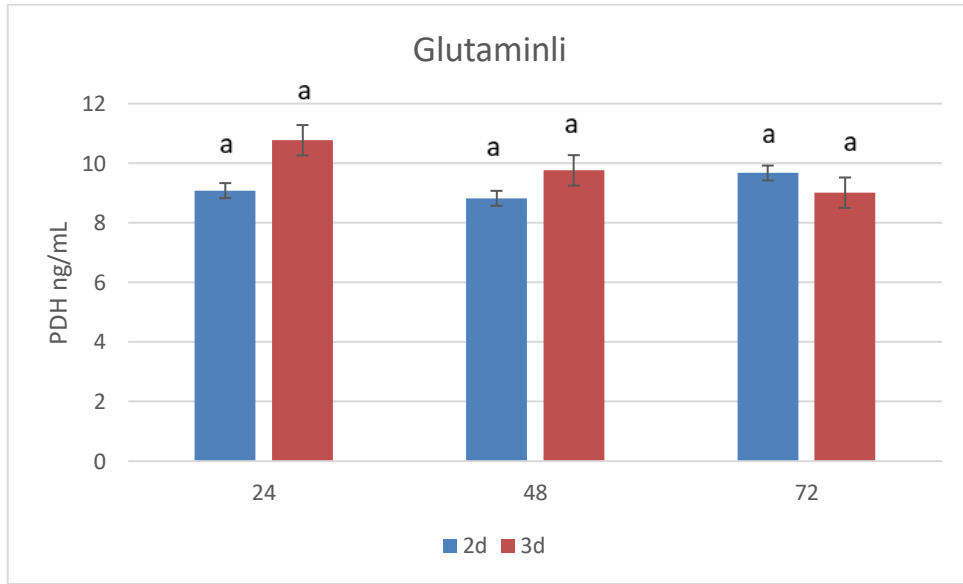


Şekil 35. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri.

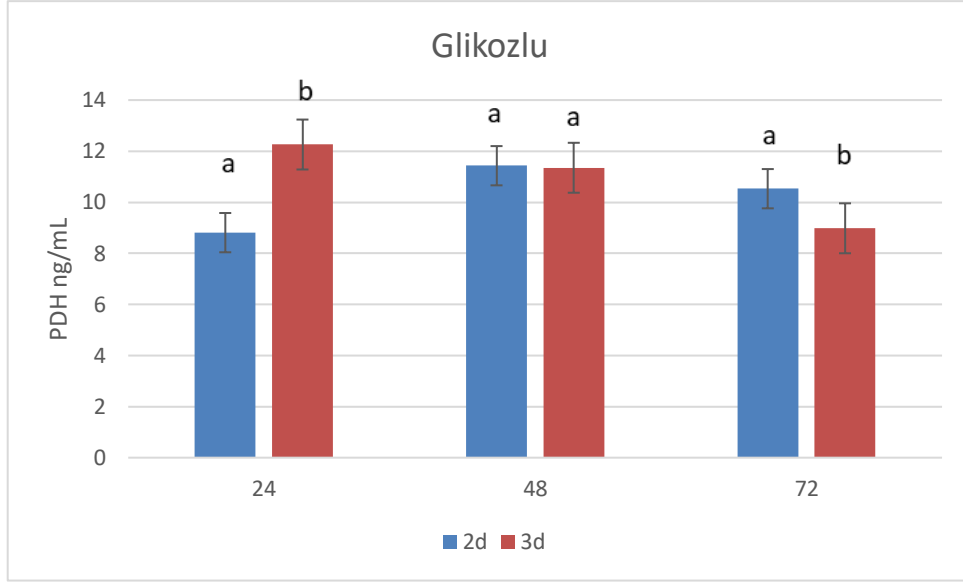
Farklı medyumlardaki 2D ve 3D yöntemindeki PDH enzim konsantrasyonları karşılaştırıldığında glukoza-glutaminli medyumda 24. ve 48.saatlerde 2D yönteminde PDH enzim konsantrasyonunun 3D yöntemine kıyasla daha yüksek; 72. saatte düşük olduğu görüldü (Şekil 36). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 6). Glutaminli medyumda PDH enzim konsantrasyonunun tüm zaman aralıklarında 3D medyumda daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 37). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında yöntemler arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$) (Tablo 6). Glukoza medyumda PDH enzim konsantrasyonunun 24. saatte 3D yönteminde daha yüksek olduğu, 48. ve 72. saatlerde ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 38). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm 24. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 6).



Şekil 36. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 37. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 38. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.6. ELISA ile Elde Edilen Sitrat Sentaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak CS düzeylerinin (pg/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 7).

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki CS seviyeleri karşılaştırıldığında, 24. saatte en yüksek CS seviyeleri glikozlu medyumda görülürken ($p > 0,05$), 48. saatte en yüksek CS seviyeleri glikozlu-glutaminli medyumda ve 72. saatte ise glikozlu medyumda elde edilmiştir (Tablo 7) (Şekil 39). Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 48. saatte glikozlu-glutaminli ile diğer medyumlar arasında, 72. saatte glikozlu ile glutamin ve glikoz-glutaminli medyumlar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,01$) (Tablo 7). 3D yönteminde CS konsantrasyonlarında farklılık tespit edilse de medyumlar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 7) (Şekil 40).

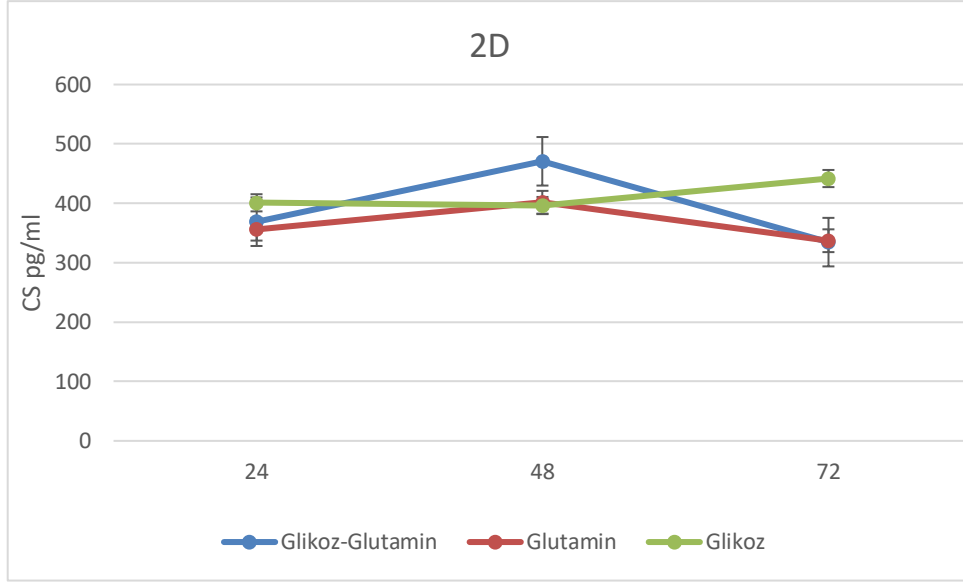
Tablo 7. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS seviyeleri ve standart hata değerleri.

2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	369,04±18,87 ^{aA}	470,75±1,32 ^{bA}	334,67±15,90 ^{aB}
Glutamin	356,42±16,41 ^{aA}	401,78±6,81 ^{bB}	337,01±4,58 ^{aB}
Glikoz	400,88±8,23 ^{aA}	396,26±11,31 ^{aB}	441,73±6,11 ^{bA*}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	292,52±20,01 ^{aA}	375,82±9,24 ^{abA}	394,88±11,11 ^{bA}
Glutamin	315,41±16,85 ^{aA}	386,20±16,61 ^{aA}	408,75±13,71 ^{aA}
Glikoz	325,24±18,22 ^{aA}	373,33±15,90 ^{abA}	408,21±19,84 ^{bA}

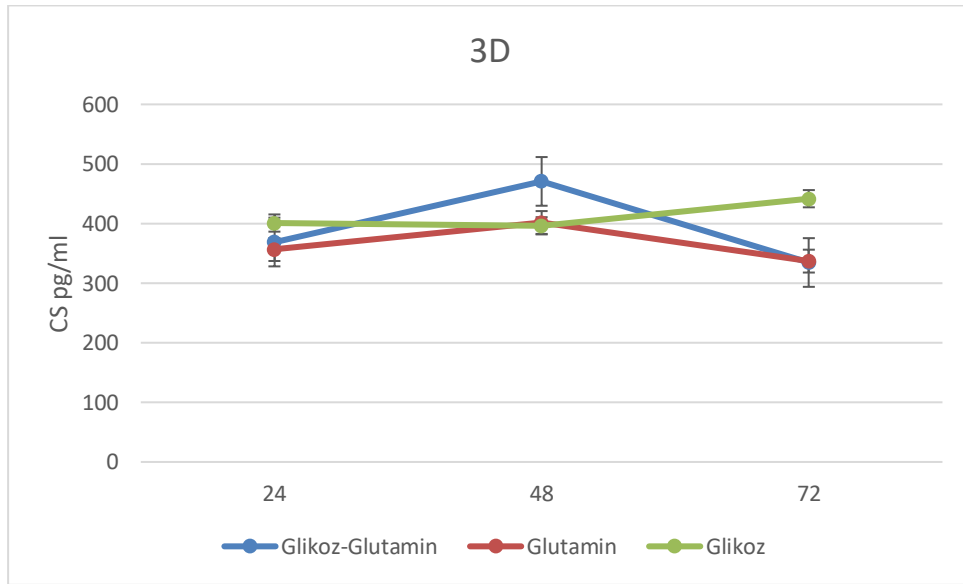
ab aynı satırda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

AB aynı sütunda farklı harfler p<0,05; *, p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

2D ve 3D yöntemleriyle farklı medyumlardaki CS enzim konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi incelendiğinde 2D yönteminde glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumda 24-72. saatler arasında artış görüldü. Glikozlu medyumda 24-48. saatler arasında CS konsantrasyonunda bir miktar azalma gözlemlense de 72. saatte tekrar artış gözlemlenmiştir (Şekil 39). Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glikoz-glutaminli ve glutaminli medyumda 24 ile 48. saatler ve 48 ile 72. saatler arasında; glikozlu medyumda 24 ile 72. ve 48 ile 72. saatler arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0,05) (Tablo 7). 3D yönteminde tüm medyumlarda zamana bağlı olarak CS seviyelerinde bir artış gözlemlendi (Şekil 40). Bu değişimler incelendiğinde glikoz-glutaminli ve glikozlu medyumlarda 24 ile 72. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi (p<0,05) (Tablo 7).



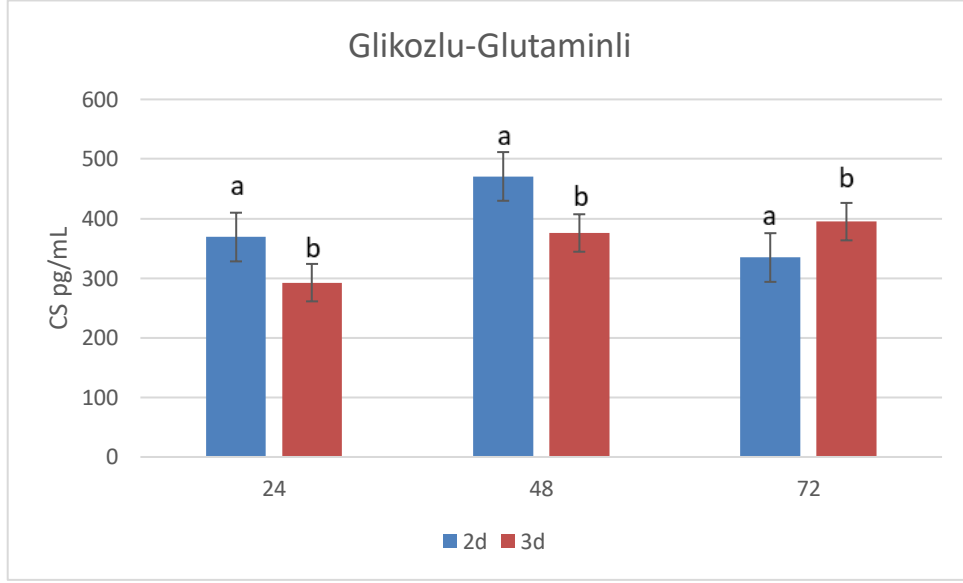
Şekil 39. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.



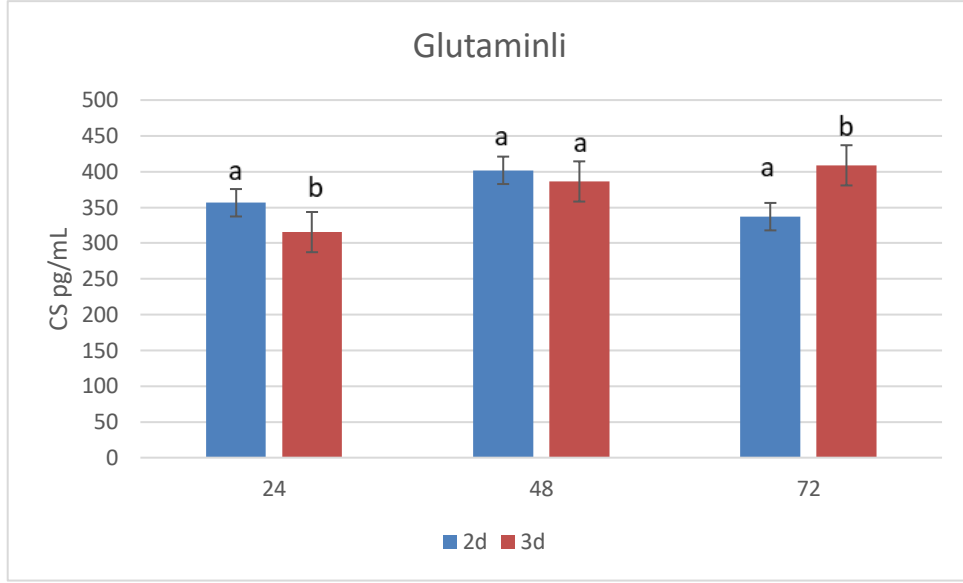
Şekil 40. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri.

Farklı medyumlardaki 2D ve 3D yöntemindeki CS enzim konsantrasyonları karşılaştırıldığında enzim konsantrasyonunun glikozlu-glutaminli medyuma 24. ve 48. saatlerde 2D yönteminde 72. saatte ise 3D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 41). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 7). Glutaminli medyuma CS enzim konsantrasyonunun 24. ve

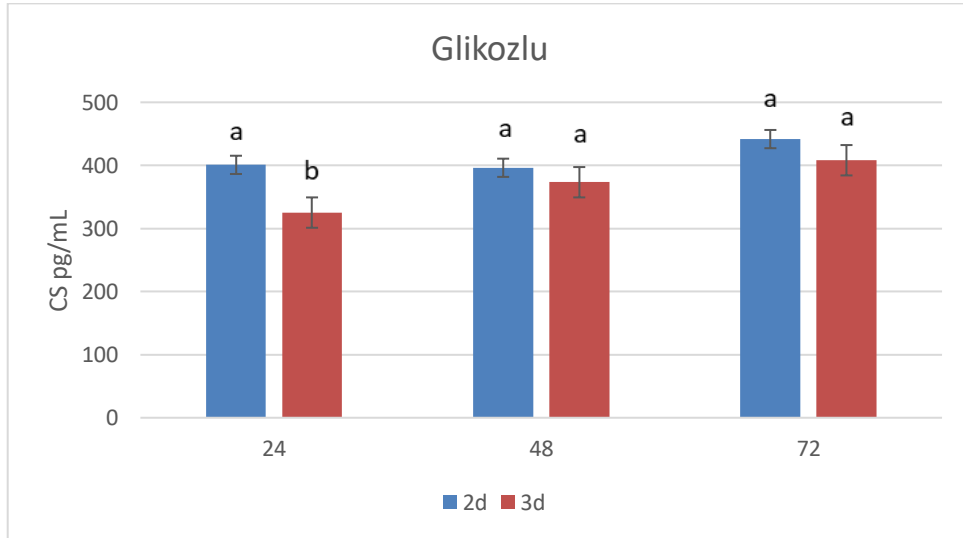
48. saatlerde 2D yönteminde 72. saatte ise 3D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 42). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Glikozlu medyunda CS enzim konsantrasyonunun tüm zaman aralıklarında 2D yöntemde daha yüksek olduğu görüldü. Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24. saatte anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,01$) (Şekil 43).



Şekil 41. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 42. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 43. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen CS enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.7. ELISA ile elde edilen İzositrat Dehidrojenaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak İDH düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 8).

Tablo 8. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarları (ng/mL) ve standart hata değerleri.

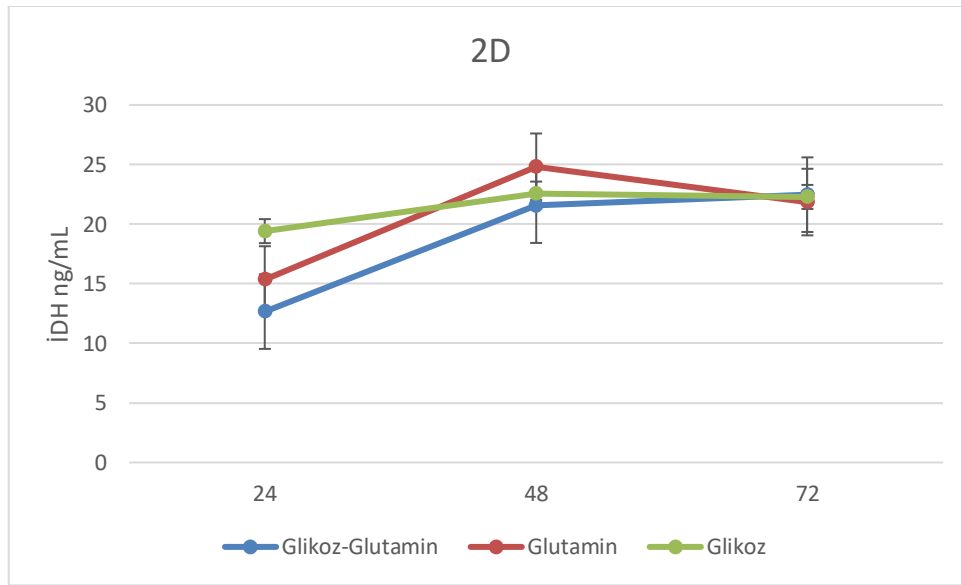
2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	12,66±0,78 ^{aC}	21,55±0,90 ^{bB}	22,47±0,95 ^{bAB}
Glutamin	15,35±0,84 ^{aB}	24,81±0,57 ^{bA}	21,85±0,53 ^{bB}
Glikoz	19,41±0,62 ^{aA}	22,56±0,75 ^{bAB}	24,28±0,31 ^{cA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	21,48±0,36 ^{aB}	19,84±1,37 ^{aA}	29,46±3,59 ^{aA}
Glutamin	30,43±2,53 ^{aA}	18,45±0,83 ^{bA}	21,52±1,30 ^{abA}
Glikoz	28,76±0,78 ^{aA}	20,42±0,61 ^{bA}	22,14±0,70 ^{baA}

ab aynı satırda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

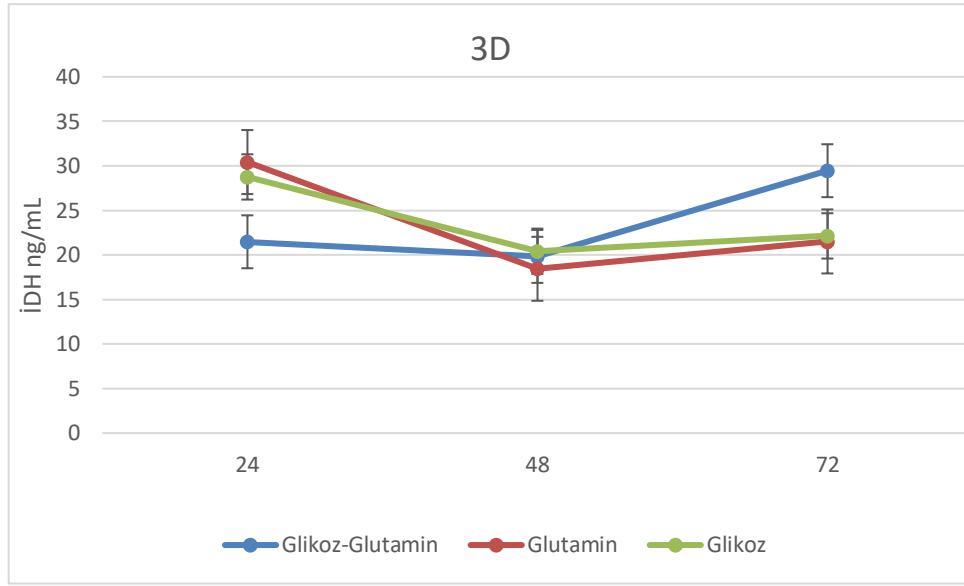
ABC aynı sütunda farklı harfler p<0,01 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki İDH seviyeleri karşılaştırıldığında 24. saatte glikozlu ortamda diğer medyumlara göre daha yüksek İDH konsantrasyonları tespit edilirken, glutaminli ortamda da glikozlu-glutaminli ortama göre yüksek İDH seviyeleri tespit edildi. 48. saatte glutaminli ortamda İDH konsantrasyonunda belirgin bir artış gözlenirken, 72. saatte bu artış glikozlu ortamda tespit edilmiştir. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu ve glikozlu ile glutaminli medyumlar arasında, 48. saatte glikozlu-glutaminli ile glutaminli medyum ve 72. saatte glikozlu ile glutaminli medyumlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,01) (Tablo 8) (Şekil 44). 3D yönteminde medyumlar arası karşılaştırmada İDH konsantrasyonu 24. Saatte en düşük glikozlu-glutaminli ortamda kaydedilmesine karşın 72. saatte en yüksek seviyede olduğu görüldü. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 48. ve 72. saatte anlamlı farklılık tespit edilmezken (p>0,05), 24. Saatte glikozlu-glutaminli ile glutaminli ve glikozlu-glutaminli ile glikozlu ortamlar arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0,01) (Tablo 8) (Şekil 45).

İzositrat dehidrojenazın farklı medyumlarda enzim konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi incelendiğinde 2D yöntemde glikozlu-glutaminli ve glikozlu medyumlarda zamana bağlı olarak 24-72. saatler arasında artış gözlenmiş olup, glutaminli medyumda 24-48. saatler arasında artış; 48-72. saatler arasında azalma görülmüştür (Şekil 44). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumda 24 ile 48. saatler ve 48 ile 72. saatler arasında; glikozlu medyumda ise tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 8). 3D yöntemde tüm medyumlarda İDH konsantrasyonlarında 24.-48. saat arasında kadar bir azalma, 48-72. Saatler arasında artış olduğu görüldü (Şekil 45). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glutaminli medyumda 24 ile 48. saatler arasında ve glikozlu medyumda 24 ile 48. saatler ve 24 ile 72. saatler arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 8).

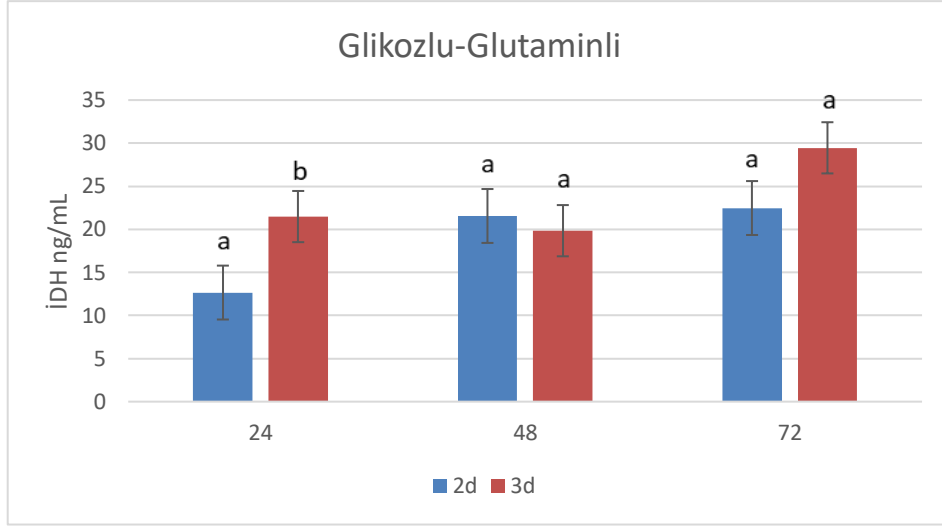


Şekil 44. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.

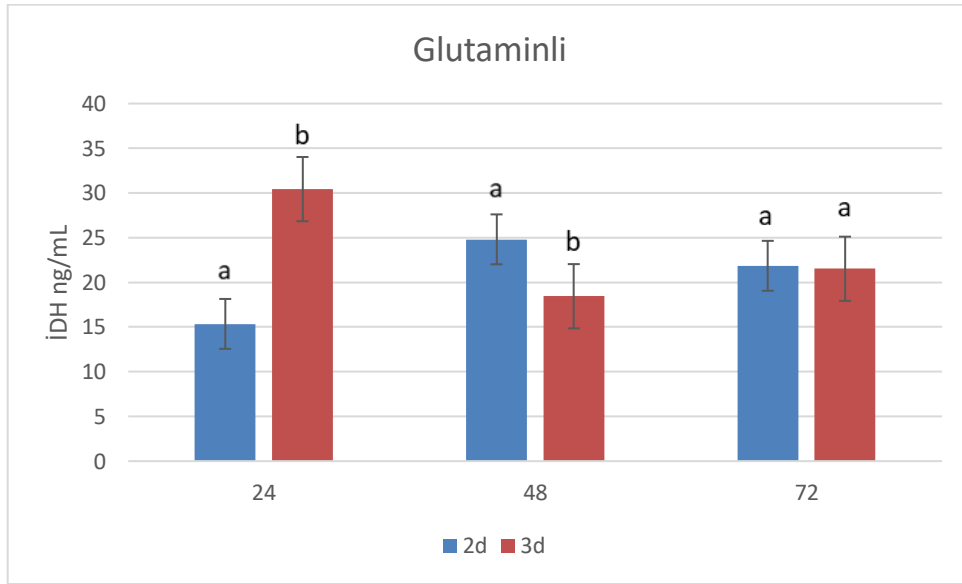


Şekil 45. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri.

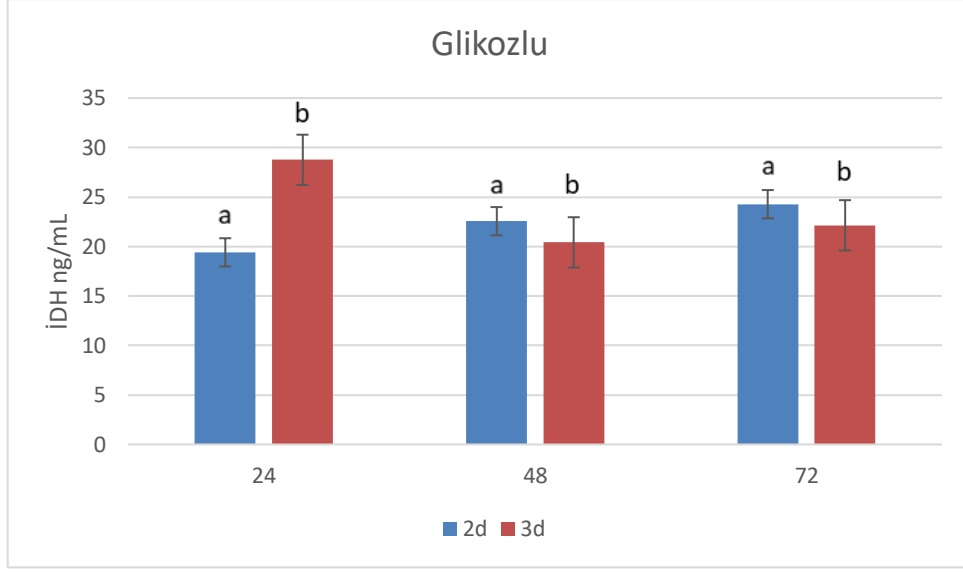
Farklı medyumlardaki 2D ve 3D yöntemindeki İDH enzim konsantrasyonları karşılaştırıldığında glikozlu-glutaminli medyunda 24. ve 72. saatlerde 3D yönteminde, 48. saatte ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 46). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatte anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,01$). Glutaminli medyunda İDH enzim konsantrasyonunun 24. saatte 3D yönteminde, 48. saatte ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 47). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). Glikozlu medyunda CS enzim konsantrasyonunun 24. saatte 3D yöntemde, 48. ve 72. saatlerde ise 2D yöntemde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 48). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,05$).



Şekil 46. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 47. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 48. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen İDH enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.8. ELISA ile Elde Edilen α -Ketoglutarat Dehidrojenaz Kompleksi Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyumlara bağlı olarak α -KGDC düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 9).

Tablo 9. 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarları (ng/ml) ve standart hata değerleri.

2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	11,42±0,79 ^{ab}	16,34±0,40 ^{bB}	19,60±0,86 ^{cA}
Glutamin	14,49±1,18 ^{abAB}	16,62±0,41 ^{ab}	11,71±0,63 ^{bB*}
Glikoz	14,78±0,71 ^{aA*}	21,15±0,45 ^{bA*}	20,29±1,37 ^{abA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	14,58±0,47 ^{aA}	14,39±1,43 ^{aA}	15,09±0,74 ^{aA}
Glutamin	12,39±0,59 ^{ab}	15,06±0,30 ^{bA}	16,15±0,77 ^{bA}
Glikoz	12,63±0,71 ^{aAB}	15,62±0,38 ^{bA}	17,45±1,12 ^{abA}

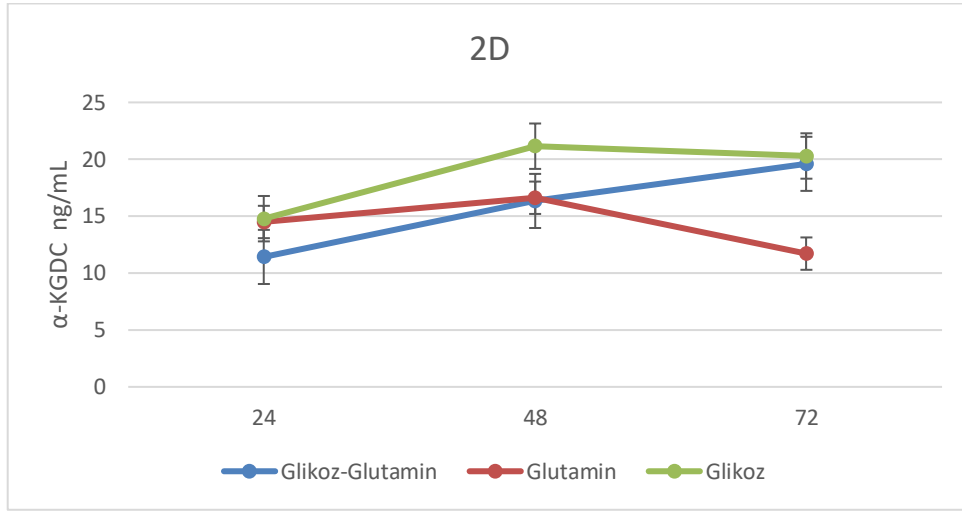
abc aynı satırda farklı harfler p<0,05; *, p<0,01 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

AB aynı sütunda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

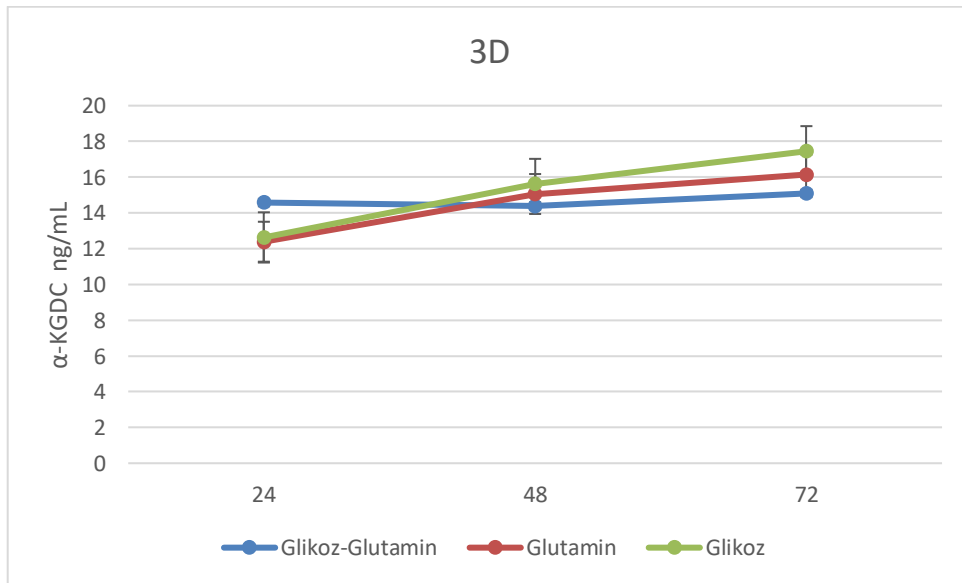
Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki α -KGDC seviyeleri karşılaştırıldığında, 24. saatte glutaminli ve glikozlu medyumda glikozlu-glutaminli medyuma göre daha yüksek α -KGDC konsantrasyonları kaydedildi. Glikozlu medyumda 48 ve 72. saatte diğer medyumlara göre yüksek α -KGDC konsantrasyonu tespit edilirken, 72. saate en düşük α -KGDC seviyeleri glutaminli ortamda görüldü (Şekil 49). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu, 48. saatte glikozlu ile glikozlu-glutaminli ve glikozlu ile glutaminli medyumlar arasında, 72. saatte glikozlu-glutaminli ile glutaminli ve glikozlu ile glutaminli medyumlar arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0,01) (Tablo 9). 3D yönteminde medyumlar arası karşılaştırmada, 48 ve 72. saatlerde glikozlu medyumda diğer medyumlara göre yüksek α -KGDC seviyeleri tespit edilse de medyumlar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (p>0,05) (Tablo 9) (Şekil 50). 24. saatte α -KGDC konsantrasyonu glikozlu-glutaminli medyumda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi (p<0,05) (Şekil 50).

Farklı medyumlardaki α -KGDC enzim konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi incelendiğinde 2D yöntemde glikoz-glutaminli medyumda tüm zaman aralıklarında artış tespit edildi. Glutaminli ve glikozlu medyumda ise 24-48. saatler arasında bir artış görülürken 48 ile 72. saatler arasında azalma görüldü. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glikozlu-glutaminli medyumda tüm zaman aralıklarında glutaminli medyumda 48 ile 72.

saatler, glikozlu medyumda 24 ile 48. saatler arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 9) (Şekil 49). 3D yöntemde ise tüm medyumlarda zamana bağlı olarak artış görüldü. Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glutaminli medyumda 24 ile 48. ve 24 ile 72. saatler arasında ve glikozlu medyumda 24 ile 48. saatler arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi($p<0,05$) (Tablo 9) (Şekil 50).

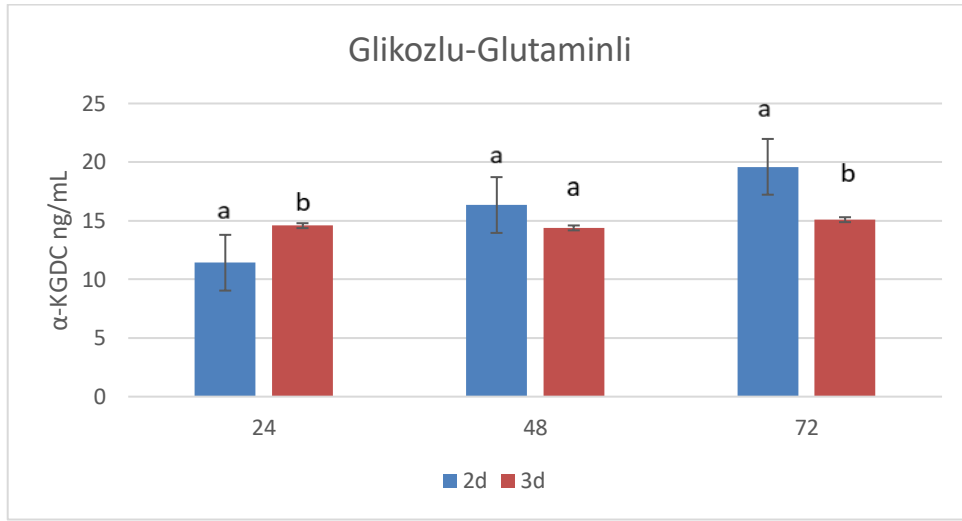


Şekil 49. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri.

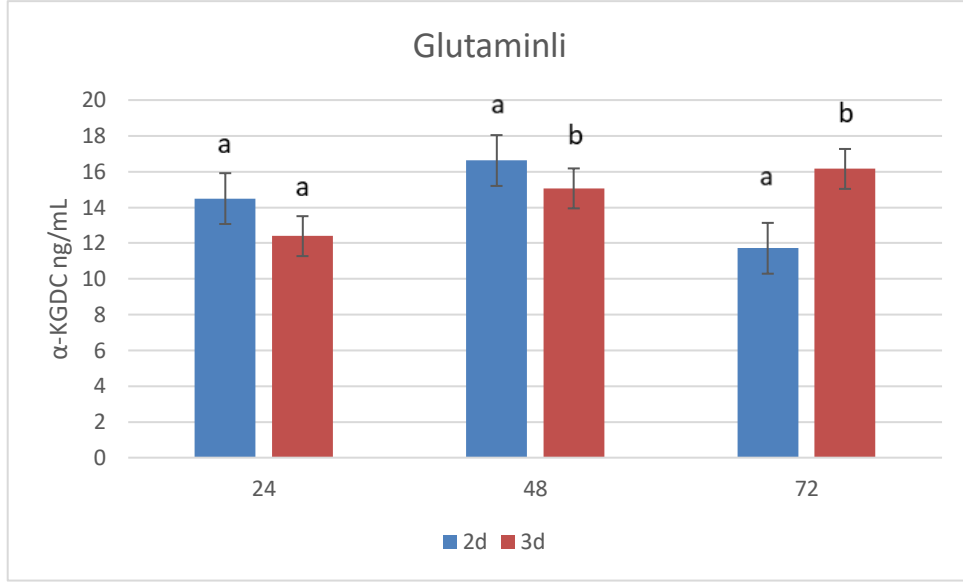


Şekil 50. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri.

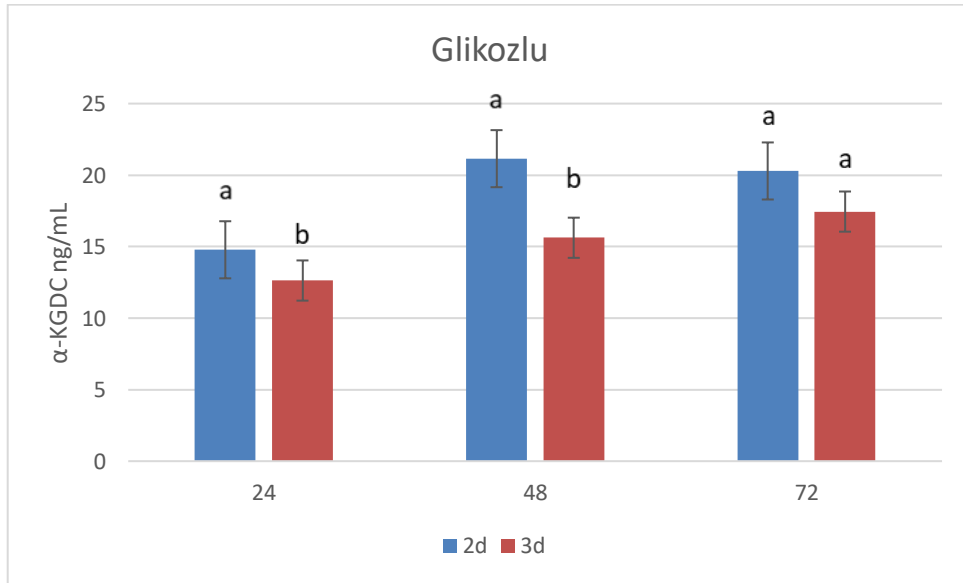
Farklı medyumalarda 2D ve 3D yöntemindeki elde edilen α -KGDC enzim konsantrasyonları karşılaştırıldığında glikozlu-glutaminli medyumda 24. saatte 3D yönteminde, 48. ve 72. saatlerde ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 51). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,01$). Glutaminli medyumda α -KGDC enzim konsantrasyonunun 24. ve 48. saatlerde 2D yönteminde, 72. saatte ise 3D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 52). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 48. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,01$). Glikozlu medyumda α -KGDC enzim konsantrasyonunun tüm zaman aralıklarında 2D yöntemde daha yüksek olduğu görüldü. Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 53).



Şekil 51. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 52. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 53. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyuma 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen α -KGDC enzim miktarı düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

4.3.9. ELISA ile Elde Edilen Glutamat Dehidrojenaz Sonuçları

2D ve 3D yöntemde farklı medyalara maruz bırakılan A549 akciğer kanser hücre hattında zamana ve farklı medyalara bağlı olarak GDH aktivitesinin (U/L) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 10).

Medyum farklılığına bağlı incelenen 2D yöntemdeki GDH aktiviteleri karşılaştırıldığında medyumlar arasında konsantrasyon farkı tespit edildi fakat istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 10) (Şekil 54). 3D yönteminde farklı medyumlarda 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,01$) (Tablo 10). 3D yönteminde glikozlu-glutaminli medyumda diğer medyalara göre tüm zaman aralıklarında yüksek GDH aktiviteleri görüldü ve 48. saatte glikozlu-glutaminli ile glikozlu medyumlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,01$) (Tablo 10) (Şekil 55).

Tablo 10. 2D ve 3D yöntemde farklı medyalara maruz bırakılan uygulama gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite (U/L) ve standart hata değerleri.

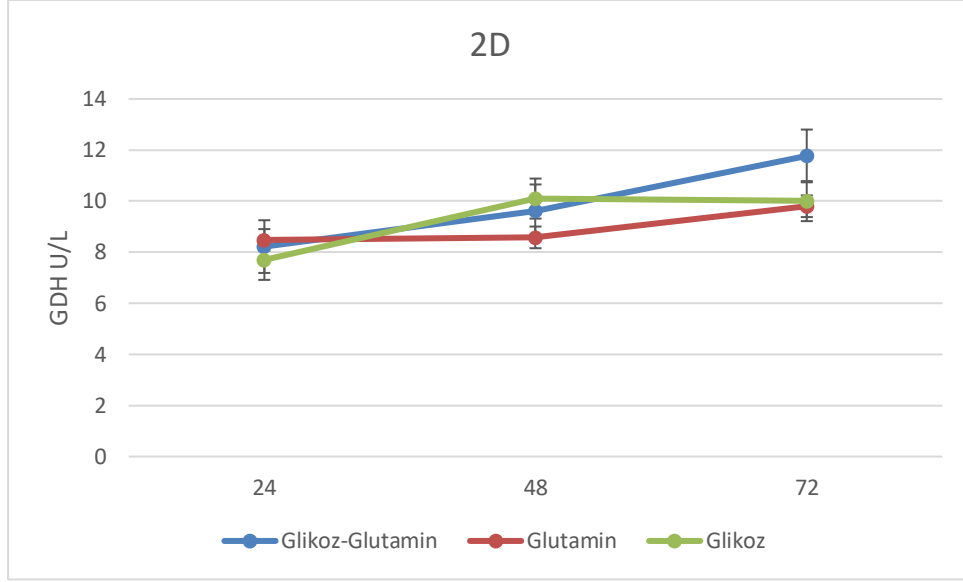
2D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	8,22±0,51 ^{aA}	9,62±0,31 ^{aA}	11,77±1,17 ^{aA}
Glutamin	8,48±0,80 ^{aA}	8,58±0,44 ^{aA}	9,80±0,39 ^{aA}
Glikoz	7,70±0,44 ^{aA}	10,10±0,64 ^{bA}	10,00±0,51 ^{bA}
3D	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glikoz-Glutamin	10,84±0,60 ^{aA}	11,00±0,64 ^{aA}	9,09±0,40 ^{aA}
Glutamin	8,77±0,49 ^{aA}	9,42±0,48 ^{aAB}	8,65±0,54 ^{aA}
Glikoz	9,60±0,81 ^{aA}	7,88±0,58 ^{aB}	8,20±0,63 ^{aA}

ab aynı satırda farklı harfler $p<0,05$ düzeyinde önemi ifade etmektedir.

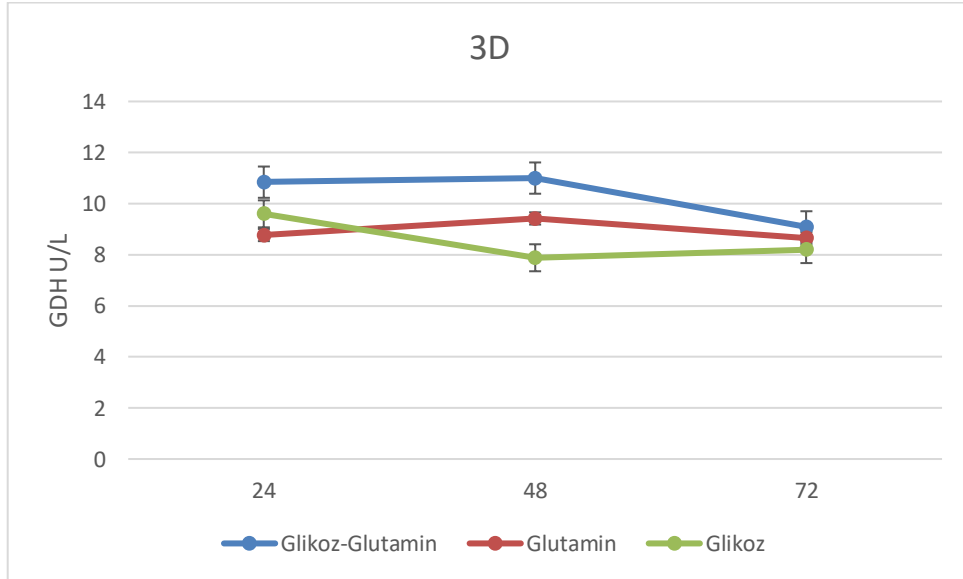
AB aynı sütunda farklı harfler $p<0,01$ düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Farklı medyumlardaki GDH enzim aktivitesinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde, 2D yönteminde glikozlu-glutaminli ve glutaminli medyumda 24-72. saatler arasında artış gözlenmiştir fakat istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 10) (Şekil 54). Glikozlu medyumda ise 48. saate kadar bir artış, 48-72. saatler arasında belirgin bir değişim tespit edilmedi. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde glikozlu

medyumda 24 ile 48. ve 24 ile 72. saatler arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 10). 3D yönteminde farklı medyumlarda zamana bağlı değişimler gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 10) (Şekil 55).

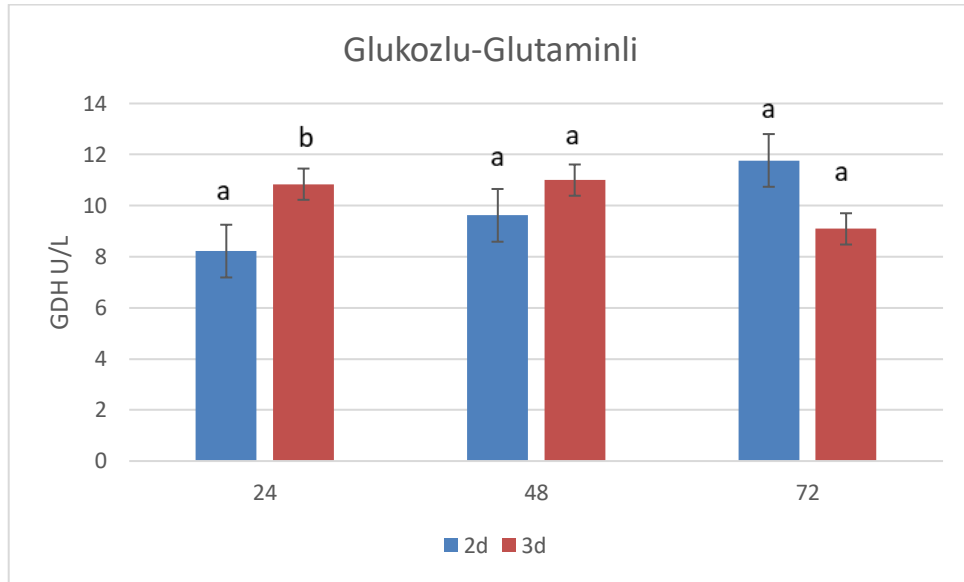


Şekil 54. Akciğer kanser hücrelerinin 2D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri.

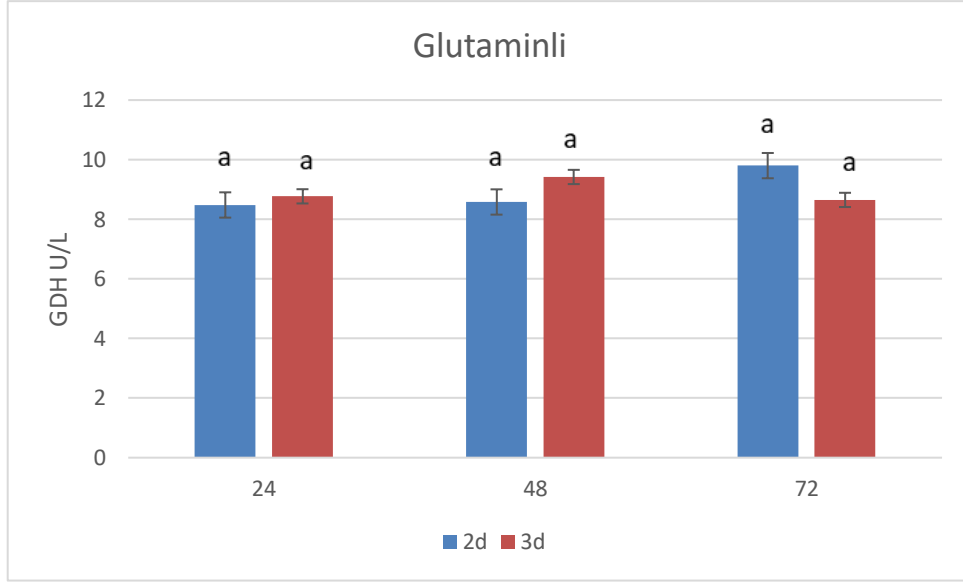


Şekil 55. Akciğer kanser hücrelerinin 3D yönteminde farklı medyum gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri.

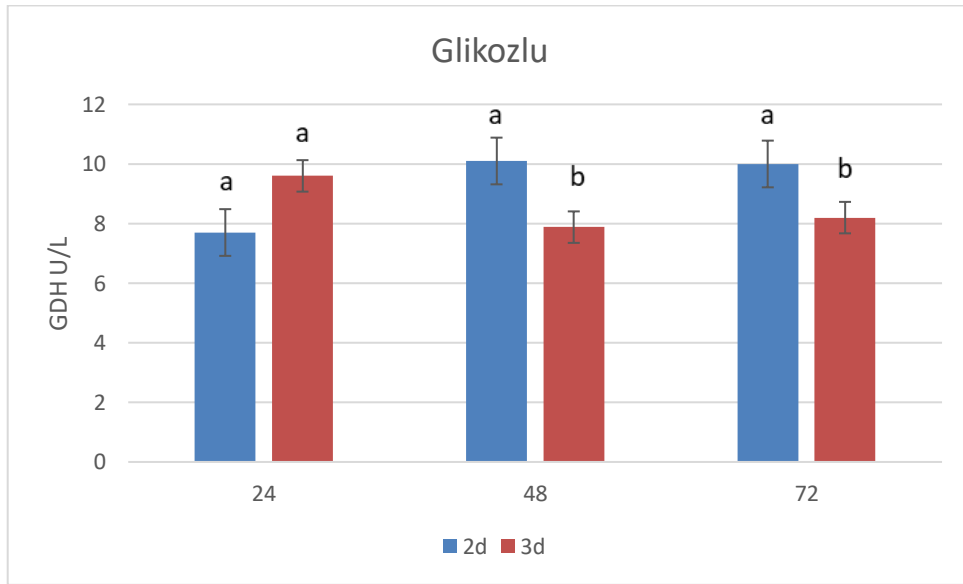
Farklı medyumlardaki 2D ve 3D yöntemindeki GDH enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında glikozlu-glutaminli medyumda 24. ve 48. saatlerde 3D yönteminde, 72. saatte ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 56). Bu değişimler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 24. saatte anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,01$) (Tablo 10). Glutaminli medyumda GDH enzim aktivitesi 24. ve 48. saatlerde 3D yönteminde, 72. saatte ise 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 57). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmadı (Tablo 10) ($p>0,05$). Glikozlu medyumda GDH enzim aktivitesi 24. saatte 3D yönteminde 48. ve 72. Saatte 2D yönteminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 58). Değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 48. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 10).



Şekil 56. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu-glutaminli medyumda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p<0,01$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.



Şekil 57. Akciğer kanser hücrelerinin glutaminli medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri.



Şekil 58. Akciğer kanser hücrelerinin glikozlu medyunda 2D ve 3D yöntemlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucu elde edilen GDH enzim aktivite düzeyleri. Aynı saatlerdeki farklı ab harfleri $p < 0,05$ düzeyindeki önemi ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

İki boyutlu (2D) kültür sistemlerinde hücreler, doğal tümörlerde bulunan hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinden yoksun, düz katı yüzey üzerinde tek tabakalar halinde büyütülür. Hücreler 2 boyutun getirdiği dezavantajla yapay bir polarite gösterirler ve bu da anormal seviyede gen ve protein ekspresyonuna neden olur (Cukierman ve diğerleri, 2001; Delarue ve diğerleri, 2014; Kelm ve diğerleri, 2003). Buna karşılık, üç boyutlu (3D) kültür sistemleri, kanser hücrelerini tek başına veya çeşitli hücre türlerini çeşitli matrisler kullanarak birlikte kültüre edebilir, böylece tümörlerin doğal ortamını yakından taklit eden hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimleri teşvik edilir. Bu etkileşimler, 3 boyutlu kültürlenmiş hücrelerin *in vivo* tümörlerle ilgili morfolojik ve hücresel özellikler kazanmasına neden olur (Ma ve diğerleri, 2012).

2D hücre kültürü birçok eksikliği olmasına rağmen ucuz ve kolay uygulanabilirlik sebebiyle kanser araştırmalarında en çok kullanılan yöntemdir (Costa ve diğerleri, 2016; Kapalczyńska ve diğerleri, 2018). 3D yöntemin 2D'ye göre en önemli avantajı fizyolojik koşulları daha iyi taklit etmesidir. 3D hücre kültürü sistemleri, ilaç denemeleri, sitotoksisite, genotoksisite, hücre büyümesi, apoptozis, hayatta kalma, gen ve protein ifadeleri, farklılaşma ve gelişimsel değişiklikler gibi birçok önemli alan için mükemmel modellerdir (Ravi ve diğerleri, 2016).

Glikoza ek olarak, çoğalan kanser hücreleri diğer bir önemli enerji kaynağı ve yapı taşı olarak glutamin kullanmaktadır. Glutaminden türetilen α -ketoglutarat, TCA döngüsünü beslediğinden, kanser hücreleri birçok temel molekülün biyosentezini sürdürmek için glutaminolizi tercih edebilmektedir. Bu durum glutamin bağımlılığı olarak bilinmektedir. Bazı tümör hücrelerinin glutamin yokluğunda öldükleri bildirilmiştir. Glutamin, kan dolaşımında en bol bulunan esansiyel olmayan aminoasitlerden biridir ve çoğalan hücrelerde neredeyse her biyosentetik yola katkıda bulunur (Still ve Yuneva, 2017).

Bu çalışmada 3D kültür yöntemlerinden biri olan ULA-pleyt yöntemi ile 2D hücre kültürü ortamında kültüre edilen A549 insan akciğer kanser hücrelerinin enerji kaynağı olarak glikoz ve glutamin kullanımının, glikoliz yolu ve TCA siklusu allosterik enzimlerin aktivitesi ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan araştırmada, 2D yöntem ile glikozun hücre proliferasyonunun zamana bağlı etkisi incelendiğinde glikozlu ortamda hücre proliferasyonu 24. saatten itibaren zamana bağlı olarak artış göstermiştir ve en yüksek canlılık oranları 72. saatte tespit edilmiştir. Glikozlu (Glikoz 25mM-glutamin 0 mM) ortam kontrole (Glikoz 25mM-glutamin 4mM) göre karşılaştırıldığında canlılık oranlarının 24, 48, 72. saatlerde (%29, %37, %64) arttığı gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre kanser hücreleri 2D yöntemde en yüksek hücre proliferasyon oranının 72. Saatte glikozlu ortamda olduğu belirlenmiştir. Bu veriler A549 hücrelerinin 2D yöntemde eksojen glutamine bağımlı olmadığını aksine yalnız glikoz (25mM) içeren ortamda hücre proliferasyonun arttığını göstermektedir. Yapılan benzer çalışmalarda, farklı kolorektal, meme, baş ve boyun skuamöz karsinom hücre hatlarında glutaminsiz ortamda inkübe edilen hücrelerde zamana bağlı olarak canlılık oranlarında düşüş gözlemlenmiştir (Gwangwa ve diğerleri, 2019; Sandulache ve diğerleri, 2011; Spada ve diğerleri, 2023). Farklı NSCLC hücre hatlarında yapılan araştırmada A549 hücreleri özelinde 72. saatlik inkübasyon sonucunda glikozlu ortamda kontrole göre proliferasyon oranı yaklaşık %15 daha yüksek tespit edilmiştir (Van Den Heuvel ve diğerleri, 2012). Bu çalışmada kullanılan vasat içerisinde 11 mM glikoz bulunmaktadır. Buradan yola çıkararak, yapılan kendi araştırmamızdan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, glikoz miktarının 25 mM'ye yükseltilmesinin A549 hücrelerinin proliferasyonunu %66 arttığı grlmştir. Bu da vasat içerisindeki glikoz miktarındaki artışın A549 hücrelerinde proliferasyonu arttırdığına işaret etmektedir.

2D yöntemde, glutaminli (Glikoz 0 mM - Glutamin 4mM) ortam ve kontrol arasında zamana bağlı bir karşılaştırma yapıldığında 24, 48, 72. saatlerde hücre canlılık oranlarının sırası ile %64, %54, %37'si oranında olduğu tespit edildi (Tablo 1). A549 hücrelerinde yapılan çalışmada hücreler düşük glikoz (5mM) içeren ortamda 24 saat inkübe edilmiş ve 24. saat sonunda hücre canlılığının azaldığı grlmştir (etiner ve Terzi, 2022). Bu açıdan araştırmamız literatürde bulunan benzer çalışmaya paralellik göstermektedir. Farklı çalışmalarda farklı kanser hücre hatlarının glikoz yokluğuna veya açlığına tepkisi farklılık göstermektedir. Örneğin baş ve boyun skuamöz karsinom hücre hatlarında yapılan çalışmada 12 farklı hücre hattından 7 tanesinin, glikoz yokluğunda (Glikoz 0 mM- glutamin 4 mM) azalmış bir hücre üremesi sergilediği grlmştir (Sandulache ve diğerleri, 2011). Başka bir araştırmada HeLa hücreleri de düşük ve yüksek glikoz ortama maruz bırakılmıştır. Düşük glikoz ortamında yüksek glikoz ortamına göre proliferasyon yeteneklerinde belirgin bir azalma grlmştir (Marin-Hernandes ve diğerleri, 2014). Bu açıdan değerlendirildiğinde A549 hücreleri de glikoz yokluğunda azalmış proliferasyon yeteneği göstermiştir.

3D yöntem ile A549 hücrelerinin glikozlu ve glutaminli ortamın hücre proliferasyonunun zamana bağlı etkisi incelendiğinde hem yalnız glikoz içeren ve de yalnız glutamin içeren ortam kontrole göre (glikozlu-glutaminli medyum) canlılık oranlarında zamana bağlı olarak 2 grupta da benzer oranlarda arttığı görülmüştür. Bu artış glutaminli medyumda 24, 48, 72. saatlerde sırası ile %14, %44, %66, glikozlu ortamda sırası ile %13, %42, %73'ü oranında olduğu belirlendi (Tablo 1). Elde edilen sonuçlarda A549 hücrelerinin 2D yöntemde en yüksek canlılık oranı glikozlu medyumda görülürken, 3D yöntemde glikozlu ve glutaminli medyumda canlılık oranlarının kontrole göre yükseldiği ve benzer olduğu görülmüştür. Bu durum 3D yöntemde kanser hücrelerinin glikoza bağımlı olmadığını göstermektedir. Konu ile ilgili ileri zamanlı çalışmalar ile araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

3D hücre kültürlerinde gözlenen azalmış hücre canlılığı, büyüme alanının varlığına bağlı olarak değişebilir. 2D hücreler genellikle, yeterli alana sahip olduğu sürece sürekli olarak çoğalır, ancak 3D kültürler aynı büyüme modeline sahip değildir. Hücrelerin 3D formasyonunda büyümesi sferoid yapısı nedeniyle, merkezdeki hücreler dış tabakadaki hücrelere göre oksijen veya besin maddelerine erişimi sınırlıdır. Bu nedenle bu hücreler ölebilir ve bunun sonucunda nekrotik bir çekirdek oluşabilir. Bir sferoidin dış tabakasındaki hücreler proliferasyon gösterebilirken, orta tabakadaki hücrelerin genellikle durgun veya uykuda hücrelerden oluştuğu bildirilmiştir (Costa ve diğerleri, 2016). Sonuç olarak, 2D ve 3D'ye aynı sayıda hücre eklenebilse de muhtemelen her bir 2D hücresinin alan bulunduğu sürece bölünmeye devam etmesi beklenmektedir. 3D hücre kültürlerinin ise sadece dış tabakasını oluşturan hücrelerin proliferasyon gösterebileceği belirtilmektedir. Bu şekilde, 3D hücrelerimizin canlılığının, 2D kültürlü hücrelere kıyasla önemli ölçüde azalabileceği düşünülmektedir. 2D'ye göre 3D'deki azalmış canlılık, başka çalışmalar tarafından da rapor edilmiştir. Örneğin MCF-7 meme kanseri hücreleri, kollajen jel kullanılarak 3D yöntem ile yetiştirildiğinde, 2D yöntemde yetiştirilen hücrelere kıyasla büyük ölçüde azalmış proliferasyon gösterdiği görülmüştür (Fallica ve diğerleri, 2012). Başka bir çalışmada çeşitli kolon kanseri hücre hatlarının (Caco-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LoVo, COLO-205 ve COLO-206f) Matrigel kullanılarak 3D yöntem yetiştirildiğinde, 2D hücrelerdeki büyümeye kıyasla proliferasyonu azaldığı rapor edilmiştir (Luca ve diğerleri, 2013). Meme kanseri hücre hatları yapılan başka bir çalışmada BT474 ve HCC1954 hücrelerinin 3D (sferoid) ve 2D canlılık oranları karşılaştırıldığında 3D'de yetişen hücrelerin 2D'de yetiştirilen hücrelere göre azalmış bir proliferasyona sahip olduğu görülmüştür (Breslin ve O'Driscoll, 2016). Ancak yukarıda sunulan araştırma sonuçlarından farklı olarak mevcut çalışmada glutaminli ortamda 3D hücre

kültür hücrelerinin canlılık sonuçları 2D hücre kültürünün canlılık oranlarından daha yüksek bulunmuştur. Ortama ilave edilen glutaminden 3D ortamında proliferen olan hücrelerin daha fazla faydalanmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca elde edilen bilgiler ışığında A549 hücreleri her iki yöntemde de glutamine bağımlı olmadığını göstermektedir.

Hekzokinaz, genellikle kanser hücrelerinde Warburg etkisi nedeniyle yükselen glikolitik yolda önemli bir role sahip olan enzimdir. Özellikle HK2 izoformu olmak üzere hekzokinaz, bu süreçte kritik bir öneme sahiptir çünkü glikolizinin ilk adımını katalizler (Anderson ve diğerleri, 2016). Kanser hücrelerinde HK2'nin ekspresyon seviyeleri A549 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada 2D yönteminde hekzokinaz seviyeleri tüm medyumlarda 24-72. saatler arasında artış tespit edilmiştir. 3D yöntemde ise 24-72. saatler arasında (Glutaminli hariç) hekzokinaz seviyelerinde azalma gözlenmiştir. 2D yöntemde Glikozlu ve glutaminli medyuma glikozlu-glutaminli medyuma göre benzer ve daha yüksek hekzokinaz seviyeleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar A549 hücrelerinin 2D yöntemde yüksek glikozlu (25mM) veya glutaminli (0 mM Glikoz) medyuma hekzokinaz aktivitesinin arttığını göstermektedir. Ayrıca 3D yöntemde 72. saat sonunda en yüksek hekzokinaz seviyeleri yine glutaminli (0 mM Glikoz) medyuma olduğu görülmüştür. Bu durum MiaPaCa2, PCI-43, BxPC-3, HepG2 ve HeLa hücre hatlarında gerçekleştirilen araştırmalarda hücreler düşük glikoza maruz bırakıldığında HK2 ekspresyon düzeylerinde artışa sebep olduğunu göstermiştir. (Marín-Hernández ve diğerleri, 2014; Natsuizaka ve diğerleri, 2007). Bu açıdan değerlendirildiğinde A549 hücreleri de aynı metabolik davranışı sergilemektedir.

İto ve diğerleri'nin (2021) yaptığı çalışmada, A549 hücreleri 2D ve 3D hücre kültürü yöntemleri kullanılarak yüksek (25 mM) ve düşük (5 mM) glikoz konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada, araştırmacılar HK1 seviyelerinin 2D hücre kültürü yönteminde düşük glikozlu ortamda önemli ölçüde yüksek bulunduğunu, PFK1 ve G6PDH'nin ise yüksek glikozlu ortamda önemli ölçüde yüksek bulunduğunu belirtmişlerdir. İto ve diğerleri (2021) A549 hücrelerini yüksek (25 mM) ve düşük (5 mM) konsantrasyonda glikoz içeren medyumlara 2D ve 3D hücre kültürü yöntemleri ile maruz bırakmıştır. Araştırmacılar HK1 seviyesini 2D hücre kültürü yönteminde düşük glikozlu medyuma anlamlı derecede yüksek bulunurken, PFK1 ve G6PDH yüksek glikozlu medyuma anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 3D hücre kültüründe enzim seviyeleri açısından anlamlı farklılık tespit etmemişlerdir. Yapılan tez çalışmasında, HK enzim değerlerinde aktivitesinde 2D hücre kültürü yönteminde farklı medyumlarda anlamlı farklılık bulunmaz iken 3D yöntemde anlamlı farklılık mevcuttur. Bu açıdan değerlendirildiğinde tez sonuçları araştırmacıların bulguları ile paralellik

göstermemektedir (İto ve diğerleri, 2021). G6PDH çalışmamızda farklı saat aralıklarında dalgalı bir artış-azalış göstermekle beraber, 2D hücre kültürü yönteminde anlamlı değişimler tespit edilmiştir. Mevcut araştırmanın G6PDH sonuçları ise yapılan tez çalışması ile paralellik göstermektedir (İto ve diğerleri, 2021). PFK enzim miktarları tez çalışmasında 2D ve 3D yöntemde farklı medyumlarda farklı zaman aralıklarında anlamlılık göstermektedir ve araştırma tez çalışmamız ile kısmi paralellik göstermektedir. İki çalışma arasındaki farklılık kullanılan glikoz konsantrasyonlarının birbirinden farklı olmasına bağlanabilir.

PFK-1 glikolizde görevli kilit bir enzimdir ayrıca kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir role sahiptir. PFK-1'in anormal ekspresyonu meme, kolon, akciğer ve karaciğer kanser tiplerinde gözlenmiştir. Marín-Hernández ve diğerleri (2014) 2D yöntemle kültürlenmiş HeLa hücrelerinin hipoglisemik ortamda hiperglisemik ortama göre PFK-1 enzim seviyesinde azalış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sunulan bu tez çalışmasında da PFK'in-1 en düşük seviyeleri glutaminli ortamda elde edilmiştir. Ayrıca elde edilen değişimler HK seviyeleriyle paralellik göstermektedir. Bu iki enzimin glikolizde birbirini destekleyerek çalıştığını düşündürmektedir.

Hızlı büyüme ve proliferasyon, kapsamlı biosentez ve ROS'den korunmayı gerektirir. Kanser hücreleri, hızlı replikasyonu sürdürmek ve devasa esansiyel hücresel bileşenlerin sentezini teşvik etmek için hücre içi metabolik yolu ele geçirir. Metabolik yolda hayati rol oynayan PPP hem nükleotid sentezi için R5P hem de redoks denge için NADPH sağlayabilir. Bu nedenle PPP'nin ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olan G6PDH kanser gelişiminde önemli bir rol oynar. G6PDH'nin aşırı ifadesi, DNA sentezi, DNA onarımı, hücre döngüsü düzenlemesi, redoks denge, proliferasyon, invazyon ve metastazı etkiler ve kanser hücreleri için avantajlı bir durum sağlar. G6PDH birçok kanserde artmaktadır ve G6PDH'nin aşırı ekspresyonu kanserin derecesi ve evresi ile ilişkilidir (Song ve diğerleri, 2022). Dahası, G6PDH ayrıca klinik prognozu ve kemoterapi direncini yansıtmada çeşitli kanserlerde bir biyobelirteç olarak hareket eder. G6PDH, hücre büyümesi, hücre ölümü ve kanser dahil olmak üzere bir dizi biyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Araştırmalar, G6PDH'nin tümör büyümesini intraselüler redoks homeostazını koruyarak artırdığını göstermiştir. G6PDH aktivitesinin mesane, meme, endometriyal, özofagus, prostat, mide, böbrek, karaciğer, kolorektal, serviks, akciğer ve yumurtalık kanserleri, glioblastomalar ve lösemi ile gliomlar dahil olmak üzere birçok kanser türünde arttığı görülmüştür (H.C. Yang ve diğerleri, 2019). Hipergliseminin G6PDH aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu çeşitli araştırmalarda diyabetik hastalar üzerinde gösterilmiştir (Saeed ve diğerleri, 1985; Y. Xu ve diğerleri, 2005; Z. Zhang ve diğerleri, 2000). Araştırmamızda G6PDH'nin 2D ve 3D yöntemde farklı zaman aralıklarında farklı

medyumlarda değişken seviyelerde tespit edilmiştir. 2D yöntem ile elde edilen sonuçlarda 72. saat sonunda en düşük G6PDH seviyeleri glutaminli ortamda elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar glutamin ile G6PDH ile arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde glutamin tüketiminin artması G6PDH aktivitesinde düşüğe neden olduğu rapor edilmiştir (Benito ve diğerleri, 2017). Başka bir çalışma kolon kanseri hücre hatları olan HT29 ve HCT116 glutaminsiz ortama maruz bırakıldığında G6PDH ekspresyonu ve aktivitesinde artış görülmüştür (Polat ve diğerleri, 2021). Bu açıdan değerlendirildiğinde çalışmamız ile paralellik göstermektedir. Bu durum özellikle kanser hücrelerinin ROS'nin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak adına NADPH üretimiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Çünkü glutamin üzerinden malik enzim etkisiyle NADPH üretebilir. Yalnız glutamin içeren (glikozsuz) ortamda NADPH üretimini ağırlıklı olarak malik enzim üzerinden gerçekleştirebileceğinden G6PDH seviyelerinin azalmasına neden olabileceğini düşünmek mantıksız değildir.

PK, glikolizin son reaksiyonunu katalizleyen enzimdir. Memeli piruvat kinazın 4 izoformu bulunmaktadır (PKM1, PKM2, PKR, PKL). Araştırmalar, PKM2'nin tümör oluşumunda potansiyel bir rolünün olduğunu göstermektedir. Tümörlerde PKM2 baskın olmakla birlikte birden fazla kanser türünde yüksek miktarda eksprese edilmektedir (Cristofk ve diğerleri, 2008; Desai ve diğerleri, 2012; T. Dong ve diğerleri, 2015; W. Yang ve diğerleri 2012). Ayrıca PKM2 susturulması akciğer adenokarsinomunda tümör büyümesini azalttığı görülmüştür (Sun ve diğerleri 2015). Bunun dışında PKM2'nin, doğrudan tümör hücre metabolizmasını düzenleme, tümör büyümesini, metastazı ve kemoterapi direncini artırabileceği belirtilmektedir (Guo ve diğerleri, 2018; Zahra ve diğerleri, 2020). Yapılan araştırmalar PKM2'nin farklı kanser tiplerinde, farklı sonuçlara yol açtığını göstermektedir. Tez çalışmasında 3D yönteminde 24-72. saatlerde medymlar arası karşılaştırmada PK seviyelerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$). 72. saat sonunda en yüksek PK seviyeleri glikozlu ortamda, en düşük PK seviyeleri ise glutaminli medymda elde edilmiştir. Bu durum 2D yöntemde yüksek glikozlu ortamda glikolitik akışın yüksek olması nedeniyle PK'nin daha aktif olduğunu, glikozun olmadığı ortamda daha az aktif olduğunu işaret göstermektedir. Yapılan çalışmalarda PK'nin yüksek ekspresyonun 2D yöntem ile pankreas kanseri ve HeLa hücre hattında yapılan bir çalışmada düşük glikoz ortamında PKM2 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Marin-Hernandes ve diğerleri, 2014; X. Li ve diğerleri, 2018). Bu açıdan sunulan araştırmanın bulguları çalışmamız ile paralellik göstermektedir. Başka bir araştırmada, PKM2'nin farklı kanser hücre hatlarında HK ve PFK-1'ye göre çok daha

yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada PKM2'nin aktivitesinin yüksek olduğu ve PKM2'nin hız sınırlayıcı bir basamak olmadığına dair kanıtlar sunulmaktadır (Keller ve diğerleri, 2022).

PDH oksidatif glikoz metabolizmasının merkezinde bulunur. TCA döngüsünde kullanılacak asetil-CoA'yı pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonu ile üreten enzimdir. Glikoliz ve TCA döngüsünü birbirine bağlayan bu reaksiyon glikoz metabolizmasında önemli bir düzenleyici adımdır. Tümörlerde aerobik glikoliz ile oksidatif metabolizma arasındaki ilişki, bir mekanizma tarafından kontrol edilir ve her iki sürecin de değişken derecelerde aynı anda gerçekleşmesine olanak tanır. Metabolizmanın bu tür esnek düzenlenmesi, kanserin hayatta kalma ve büyüme açısından birçok fayda sağlar (Stacpoole, 2017). PDH kompleksinin inhibisyonu pirüvat dehidrojenaz kinazlar (PDK) tarafından sağlanır. PDK'ların 4 izoformu (PDK-1, PDK-2, PDK-3, PDK-4) bulunmaktadır. Anwar ve diğerleri'nin (2021) raporuna göre, farklı kanser tiplerinde farklı izoformların upregüle edilmesi, bu durumun PDH aktivitesini azaltarak Warburg etkisine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Ancak, tez çalışmasının 3D yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlarında, glikoz ve glutaminin varlığı veya yokluğunun PDH seviyeleri üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür.

Farklı kanser tiplerinde farklı izoformların yukarı regüle edildiği buna bağlı olarak da PDH aktivitesinin azaltılarak Warburg etkisine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. (Anwar ve diğerleri, 2021). Çalışmamızda 3D yöntemde elde edilen sonuçlarda glikoz ve glutamin varlığı/yokluğu PDH seviyeleri üzerinde anlamlı bir fark yaratmamıştır. 2D yöntem incelendiğinde 48. Saatte gözükten anlamlı farklılık hücrenin metabolik ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla PDH seviyelerinde değişiklikler görülmekle birlikte ilerleyen süreçte bir önemli olmadığı görülmüştür. C.A. Wu ve diğerlerinin (2013) bir araştırmasında HeLa and A431 hücreleri glikoz açlığına maruz bırakılmış ve bu durumun PDH aktivitesini azalttığı görülmüştür. Bu durum çalışmamızla kısmen paralellik göstermektedir.

Sitrat sentaz (CS), hücresel enerji üretiminin ana yolu olan Krebs döngüsünün ilk adımını katalizleyen ve genellikle döngünün akış hızını kontrol eden önemli bir mitokondriyal enzimdir. CS, asetil CoA ve oksaloasetatın birleşerek sitratın oluşmasını katalize eder. Bu reaksiyon, Krebs döngüsünün başlangıcıdır ve hücredeki enerji üretiminin seviyesini belirler. Aynı zamanda döngünün genel hızını da belirler. Bu nedenle, CS'nin aktivitesi, hücresel enerji üretimi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bunun yanında CS etkisiyle oluşan sitrat lipid sentezinde de kullanılabilir. CS'nin, tümör hücre büyümesi, çoğalma ve tümör oluşumu üzerinde kanser tipine özgü farklı rolleri olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır (L. Chen ve

diğerleri, 2014; Lin ve diğerleri, 2012; Schlichtholz 2005). CS'nin aktivitesi, bazı kanser türlerinde, örneğin pankreas, yumurtalık ve prostat kanserlerinde normal dokulara kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Cai ve diğerleri, 2020; L. Chen ve diğerleri, 2014; Schlichtholz 2005). Fakat, MCF-7 meme kanseri hücre hattı, Hela, Siha ve Cx gibi bazı serviks kanseri hücre hatlarında CS aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür (Lin ve diğerleri, 2012).

Bu bağlamda, yürütülen çalışmada A549 hücrelerinin 3D yöntemle farklı medyumlarda muamele edilmesi sonucunda 24-72. saatler arasında CS seviyelerinde artış gözlenmiş, ancak medyumlar arasında istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). 3D yöntem ile farklı medyumlarda muamele edilen A549 hücrelerinde 24-72. Saatler arasında artış gözlenmiştir ve medyumlar arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0,05$). 2D yönteminde ise en yüksek CS seviyeleri 48. saatte glikozlu-glutaminli medyumda ($p<0,05$), 72. saatteki en yüksek CS seviyeleri ise glikozlu medyumda gözlenmiştir. Elde edilen yüksek veya düşük CS verileri, hücresel biyoenerjiğin glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasında metabolik geçiş ile ilişkilendirilmiştir. Bu değerler, hücresel biyoenerjiğin glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasındaki metabolik geçiş ile ilişkilendirilebilir. Bu durum oksidatif fosforilasyon sonucunda üretilen ROS'nin zararlı etkilerinin azaltılması için gerekli NADPH ve hücrelerin çoğalması için gerekli olan riboz şekerlerinin sentezinin sağlanması da gereklidir. Elde edilen CS değerleri, G6PDH verileri ile de paralellik göstermektedir; bu da oksidatif fosforilasyon sonucunda üretilen reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltmak ve hücre çoğalması için gerekli riboz şekerlerinin sentezi için gereklidir. Bu açıdan değerlendirildiğinde elde edilen CS değerleri, G6PDH verileri ile de paralellik göstermektedir. Bu bulgular, El-Ashmawy ve diğerleri'nin (2014) fare hepatosellüler karsinom dokusunda yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. Başka bir çalışmada ise 2D yöntemle A549 hücreleri farklı glikoz-glutamin dozlarında inkübe edilmiş ve 72. saatte CS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Öğünç Keçeci ve İncesu 2022). Ayrıca, Lin ve diğerleri (2012) tarafından yapılan bir çalışma, farklı hücre hatlarında CS ekspresyonlarının değişik seviyelerde olduğu ve azalan CS ekspresyonunun enerji metabolizmasının aerobik glikolize geçişi ile bağdaştırılmıştır.

İzositrat dehidrojenaz (IDH), özellikle IDH1 ve IDH2 izoformları, çeşitli kanserlerde türlerinde yüksek ekspresyon veya mutasyonlarla ilişkilendirilen önemli bir enzimdir. IDH1 ve IDH2 izoformları genellikle glioblastom, akut miyeloid lösemi (AML) ve diffüz büyük hücreli lenfoma gibi çeşitli kanser türlerinde yüksek ekspresyon veya mutasyonlarla ilişkilendirmiştir (Dang ve diğerleri, 2016). Ancak, akciğer adenokarsinomlarında IDH mutasyonlarının görülme

sıklığının oldukça düşük olduğu rapor edilmiştir (Toth ve diğerleri, 2018). Bu sonuçlar, kanser hücrelerinde metabolik regülasyonun karmaşıklığını ve hücrelerin çeşitli koşullara adaptasyon yeteneğini vurgulamaktadır. Yani, hücre metabolizması, belirli bir zamanda enerji üretimi veya diğer biyokimyasal süreçler için IDH enziminin düzeylerini ayarlamaktadır. IDH'nin saatlere bağlı değişen aktivitesi, hücre metabolizmasının dinamik ve kompleks doğasına işaret eder ve hücrenin enerji ihtiyaçlarına anlık yanıtlar verme kapasitesini yansıtabilir.

α -KGDH kompleksi, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde hız sınırlayıcı bir enzimdir. Mide kanseri, glioma gibi bazı tümörlerde α -KGDH ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmüştür (X. Lu ve diğerleri, 2019). Çalışmamızda 2D yöntemde α -KGDH seviyeleri glikoz bulunan gruplarda glutaminli gruba göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Glutamin içeren ortamda daha düşük α -KGDH seviyeleri elde edilmesi, hücrelerin alfa-ketoglutarat/sitrat oranının artmasıyla reduktif karboksilasyon yolunun tercih edildiğini düşündürmektedir. Farklı hücre hatlarında (59 adet) yapılan başka bir çalışma KGDH enziminin susturulmasının hücrelerin büyümesinde farklı etkilere neden olmuştur. A549 özelinde, 2D hücrelerde hücre büyümesinde güçlü bir negatif etki oluşturduğu belirtilirken 3D (soft-agar) yönteminde daha zayıf bir negatif etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Allen ve diğerleri, 2016). Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen sonuçlar, 2D yönteminde KGDH aktivitesinin düşük olduğu durumda canlılık oranının azaldığını ve bu durumun literatürdeki benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

GDH glutamatu α -ketoglutarat ve amonyağa dönüştürülen, TCA döngüsüne anaplerozu destekleyen enzimdir. TCA döngüsü havuzu dolu olduğunda GDH, bu reaksiyonun tersine gerçekleşmesini gerçekleştirmesine izin vererek hücre metabolizmasını düzenler. Bazı kanser tipleri glutamin bağımlılığı sebebiyle artan GDH seviyeleri ve ekspresyonu sergilemektedir (C. Yang ve diğerleri, 2009; Zhou ve diğerleri, 2022). Yapılan tez çalışmasının 2D yönteminden elde edilen sonuçlar, farklı medyumların GDH aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte en yüksek GDH aktivitesi tüm zaman aralıklarında glikozlu-glutaminli medyumda meydana gelmiştir. Glioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada glikoz yokluğunda GDH aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (C. Yang ve diğerleri, 2009). Glioma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada düşük glikoz ortamında GDH aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2019). Bu bağlamda, çalışmamızda A549 hücreleri glutaminli ortamda daha düşük GDH seviyeleri göstermiş, bu da glioma hücrelerine benzer özellikler göstermediğini ortaya koymaktadır. Bu durum aynı zamanda yüksek glikozlu ortamda TCA siklusunda ara maddelerin bolluğundan dolayı reaksiyonun α -ketoglutarattan

glutamat oluşturulması nedeniyle yüksek aktivite gösterdiği düşünülebilir. 3D yönteminde elde edilen sonuçlarda ise benzer örüntü gözlenmiştir.

2D ve 3D hücre kültürü ortamında hücrelerin enzim düzeyleri karşılaştırıldığında, glikozlu-glutaminli medyumda inkübe edilen hücrelerde metabolizma enzimlerinden HK, PK, PDH, CS, IDH, α -KGDC konsantrasyonlarında 2D ve 3D kültür ortamlarında 24. saatte anlamlı farklılıklar bulunmuştur. HK, PDH, IDH, α -KGDC, GDH 3D ortamında yüksek bulunurken PK, CS daha düşük miktarda tayin edilmiştir. Enzim miktarları arasındaki farklılıklar 48. saat analiz sonuçlarında da benzerdir, ancak 72. saatte CS, IDH, α -KGDC dışında diğer enzim konsantrasyonlarında düşüş tespit edilmiştir. Glutamin ve glikoz ilave edilen ortamlarda 3D ve 2D hücre kültürlerinde elde edilen enzim sonuçları arasında farklılıklar görülmüştür. Glutaminli medyumda HK 2D ve 3D kültürde tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık göstermiştir ve 24.-48. saatlerde 2D kültür ortamında daha yüksek konsantrasyona sahiptir. PFK 24. ve 72. saatlerde anlamlı farklılık göstermiş olup bu zaman aralıklarında 3D ortamda yüksek konsantrasyona sahiptir. G6PDH ve α -KGDC'de 48. ve 72., CS'de 24. ve 72., IDH'de 24. ve 48. saatlerde anlamlı farklılık tespit edilmiştir. PK, PDH ve GDH'de tüm zaman aralıklarında glutaminli ortamda anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Glikozlu medyumda 2D ve 3D kültür ortamlarında HK, G6PDH, PFK, IDH enzimlerinin tüm zaman aralıklarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. HK, PFK ve IDH'ta 3D hücre kültüründe 24. saatte enzim konsantrasyonları daha yüksekken, 48. ve 72. saatlerde 2D ortamda enzim konsantrasyonları daha yüksek tespit edilmiştir. G6PDH ise tüm zaman aralıklarında 2D ortamda daha yüksek konsantrasyona sahiptir. PK, PDH, CS, α -KGDC ve GDH enzim konsantrasyonlarında 2D ve 3D kültür ortamlarında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Farklılıklar PK'de 24. ve 48. saatlerde, PDH'de 24. ve 72. saatlerde ve 24. saatte 3D kültürde konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. CS ise 24. saatte, α -KGDC 24. ve 48. saatlerde, GDH'de ise 48. ve 72. saatlerde anlamlı farklılıklar bulunmuş olup anlamlı farklılıkların bulunduğu zaman aralıklarında 2D kültür ortamında daha yüksek konsantrasyonda oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar 2D ve 3D ortamlarının hücrenin metabolik aktivitesinde farklılıklara neden olduğunu, hücre kültürü çalışmalarının bu bağlamda ayrıntılı çalışılması gerektiğini düşündürmektedir. Hücrelerin üç boyutlu yapıya sahip olduğu, diğer hücreler ile etkileşim içinde olduğu göz önüne alındığında 3D kültürler önem kazanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enerji metabolizması, kanser hücrelerinde önemli ölçüde farklılıklar gösterir. Çok sayıda çalışma, kanser hücrelerinin metabolizmalarını yeniden programlayabildiklerini ve kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edildiğini göstermiştir. Kontrolsüz hücre çoğalması, kanser hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biridir ve bu temel özellik yalnızca hücre çoğalmasının düzensiz kontrolüne yol açmakla kalmaz, aynı zamanda enerji metabolizmasının düzenlenmesini de sağlayarak bu özel durumda gereken enerjinin temin edilmesini sağlar. Bu adaptasyonda önemli yeri olan yollar aerobik glikoliz ve glutaminolizdir. 3D hücre kültürü, *in vivo* tümörleri daha iyi taklit edebilmesinden dolayı kanser çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Birçok kanser hücresi, 3D yapıda farklı tepkiler gösterir. Dolayısıyla 3D yöntemi metabolizmanın gerçek tümörlere daha iyi temsil etmesiyle daha etkin bir şekilde enerji metabolizması yolağının içerisinde yer alan enzimlerin tedavide hedefleyen yeni nesil antikanser ajanlarının kanser araştırmalarında daha etkili bir yaklaşım sağlamaya yardımcı olacaktır.

Sunulan tez çalışmasında,

2D ve 3D yöntemlerde hücrelerin yapısal farklılıklardan dolayı, proliferasyon ve sağ kalım oranlarının değiştiği gözlenmiştir. Tüm inkübasyon sürelerinde hücrelerin canlılık oranları 2D yönteminde 3D ortamına göre yüksek olduğu görülmüştür. 2D yönteminde 72. saatin sonunda en yüksek canlılık oranı glikozlu ortamda gözlenmiştir. 3D yönteminde ise yalnız glutamin içeren ve yalnız glikoz içeren ortamlarda canlılık oranları birbirine yakın olmakla birlikte glutaminli-glikozlu ortamdakinden yüksektir. Bu durum 3D yönteminde iki molekülden (glikoz ve glutamin) birisinin bulunmasının A549 hücrelerinin proliferasyon yeteneğini artırdığını göstermektedir. Bu aynı zamanda 3D yöntemde hücrelerin farklı tepkiler verdiğini ve A549 hücrelerinin iki molekülden birinin yokluğunda bile benzer miktarda proliferasyon olabildiğini göstermektedir.

Farklı medyumlar ilave edilen ortamlarda 3D ve 2D hücre kültürlerinde elde edilen enzim sonuçları arasında farklılıklar görülmüştür. Bu sonuçlar 2D ve 3D ortamlarının hücrenin metabolik aktivitesinde farklılıklara neden olmasından dolayı hücre kültürü çalışmalarında kültür ortamı tercihinin doğru yapılması gerektiği düşünüldü. Ayrıca bu bağlamda konuyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abbaszadeh Z., Çeşmeli S., Avcı B.Ç. (2020). Crucial players in glycolysis: Cancer progress. *Gene*, 726:144158.
- Acland, M., Mittal, P., Lokman, N.A., Klingler-Hoffmann, M., Oehler, M.K., Hoffmann, P. (2018). Mass Spectrometry Analyses of Multicellular Tumor Spheroids. *Proteomics. Clinical Applications*, 12(3), e1700124. doi:10.1002/prca.201700124
- Alam, M.M., Lal, S., FitzGerald, K.E., Zhang, L. (2016). A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. *Clinical and Translational Medicine*, 5(1), 3. doi:10.1186/s40169-016-0082-9
- Alfarouk, K.O., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A.K., Adil, H.H., Elhassan, G.O., ... Harguindey, S. (2014). Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*, 1(12), 777–802. doi:10.18632/oncoscience.109
- Al-Khallaf H. (2017). Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight, *Cell & Bioscience*, 7, 37.
- Allen, E.L., Ulanet, D.B., Pirman, D., Mahoney, C.E., Coco, J., Si, Y., ... Smolen, G.A. (2016). Differential Aspartate Usage Identifies a Subset of Cancer Cells Particularly Dependent on OGDH. *Cell Reports*, 17(3), 876–890. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.052
- Amary, M.F., Damato, S., Halai, D., Eskandarpour, M., Berisha, F., Bonar, F., ... Flanagan, A.M. (2011). Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nature Genetics*, 43(12), 1262–1265. doi:10.1038/ng.994
- Anderson, M., Marayati, R., Moffitt, R., Yeh, J.J. (2016). Hexokinase 2 promotes tumor growth and metastasis by regulating lactate production in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 8(34), 56081–56094. doi:10.18632/oncotarget.9760
- Anwar S., Shamsi A., Mohammad T., Islam A., Hassan M.I. (2021). Targeting pyruvate dehydrogenase kinase signaling in the development of effective cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta: Reviews on Cancer*, 1876(1):188568. doi:10.1016/j.bbcan.2021.188568.

- Arnold P.K., Finley L.W.S. (2023). Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 299(2):102838.
- Atas E., Oberhuber M., Kenner L. (2020). The Implications of PDK1-4 on Tumor Energy Metabolism, Aggressiveness and Therapy Resistance, *Front Oncology*, 15;10:583217.
- Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., ... Bucala, R.(2002). High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Research*, 62(20), 5881–5887.
- Baker, B., Chen, C. (2012). Deconstructing the third dimension — how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, 125: 3015-24.
- Balss, J., Meyer J., Mueller W., Korshunov A., Hartmann C., von Deimling A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*, 116: 597–602.
- Barbone, D., Van Dam, L., Follo, C., Jithesh, P.V., Zhang, S.D., Richards, W.G., ... Broaddus, V.C. (2016). Analysis of Gene Expression in 3D Spheroids Highlights a Survival Role for ASS1 in Mesothelioma. *PloS One*, 11(3), e0150044. doi:10.1371/journal.pone.0150044
- Benito, A., Polat, I. H., Noé, V., Ciudad, C. J., Marin, S., Cascante, M. (2017). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and transketolase modulate breast cancer cell metabolic reprogramming and correlate with poor patient outcome. *Oncotarget*, 8(63), 106693–106706. doi:10.18632/oncotarget.21601
- Bhagavan, N.V., Ha, C. (2015). Carbohydrate Metabolism I: Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle. N.V. Bhagavan, C. Ha, (Eds.), *In Essential of Medical Biochemistry*, (2nd edition, pp. 165-185) Massachusetts: Academic Press.
- Bode, B.P., Souba, W.W. (1999). Glutamine transport and human hepatocellular transformation, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 23(5), 33–37.
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J.M., Bononi, A., ... Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, 8(3), 343–357. doi:10.1007/s11302-012-9305-8
- Bose, S., Zhang, C., Le, A. (2021). Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1311, 3–15. doi:10.1007/978-3-030-65768-0_1

- Bott, A.J., Maimouni, S., Zong, W.X. (2019). The Pleiotropic Effects of Glutamine Metabolism in Cancer. *Cancers*, 11(6), 770. doi:10.3390/cancers11060770
- Brancato, V., Oliveira, J.M., Correlo, V.M., Reis, R. L., Kundu, S. C. (2020). Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials*, 232, 119744. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119744.
- Breslin, S., O'Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*, 7(29), 45745–45756. doi:10.18632/oncotarget.9935
- Byrne H.M. (2010). Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model. *Nature Reviews. Cancer*, 10(3), 221–230. doi:10.1038/nrc2808
- Cai, Z., Deng, Y., Ye, J., Zhuo, Y., Liu, Z., Liang, Y., ... Zhong, W. (2020). Aberrant Expression of Citrate Synthase is Linked to Disease Progression and Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Cancer Management and Research*, 12, 6149–6163. doi:10.2147/CMAR.S255817
- Cairns, R.A., Iqbal, J., Lemonnier, F., Kucuk, C., de Leval, L., Jais, J. P., ... Mak, T. W. (2012). IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*, 119(8), 1901–1903. doi:10.1182/blood-2011-11-391748
- Cardaci, S., Ciriolo, M.R. (2012). TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 161837. doi:10.1155/2012/161837
- Chan, H.F., Zhang, Y., Ho, Y.P., Chiu, Y.L., Jung, Y., Leong, K.W. (2013). Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *Scientific Reports*, 3, 3462. doi:10.1038/srep03462
- Chang, T.T., Hughes-Fulford, M. (2009). Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Engineering. Part A*, 15(3), 559–567. doi:10.1089/ten.tea.2007.0434
- Chaudhry R, Varacallo M. (2024). Biochemistry, *Glycolysis*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing.

- Chen, J.Q., Russo, J. (2012). Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2), 370–384. doi:10.1016/j.bbcan.2012.06.004
- Chen, L., Liu, T., Zhou, J., Wang, Y., Wang, X., Di, W., Zhang, S. (2014). Citrate synthase expression affects tumor phenotype and drug resistance in human ovarian carcinoma. *PLoS One*, 9(12), e115708. doi:10.1371/journal.pone.0115708
- Chen, X., Chen, S., Yu, D. (2020). Protein kinase function of pyruvate kinase M2 and cancer. *Cancer Cell International*, 20(1), 523. doi:10.1186/s12935-020-01612-1
- Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A.R., Jin, E.S., Matés, J.M., DeBerardinis, R.J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8674–8679. doi:10.1073/pnas.1016627108
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., ... Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230–233. doi:10.1038/nature06734
- Ciccarone, F., Leo L.D., Ciriolo, M.R. (2019). TCA Cycle Aberrations and Cancer. Boffetta P., Hainaut P. (Eds). *Encyclopedia of Cancer* (3rd Edition, pp. 429-436), Massachusetts: Academic Press
- Correia, A.L., Bissell, M.J. (2012). The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries In Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 15(1-2), 39–49. doi:10.1016/j.drug.2012.01.006
- Costa, E.C., Gaspar, V.M., Coutinho, P., Correia, I.J. (2014). Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(8), 1672–1685. doi:10.1002/bit.25210
- Costa, E.C., Moreira, A.F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V.M., Carvalho, M.P., Correia, I.J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., Yamada, K.M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* (New York, N.Y.), 294(5547), 1708–1712.

doi:10.1126/science.1064829

- Çetiner, B.G., Terzi, M.Y. Effect of Glucose Starvation on Cell Viability Parameters in A549 and BEAS-2B Cell Lines. *Cytology and Genetics*. 56, 66–76 (2022).
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., ... Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739–744. doi:10.1038/nature08617
- Dang, L., Yen, K., Attar, E. C. (2016). IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(4), 599–608. doi:10.1093/annonc/mdw013
- De Vitto, H., Pérez-Valencia, J., Radosevich, J.A. (2016). Glutamine at focus: versatile roles in cancer. *Tumour Biology: The Journal of The International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(2), 1541–1558. doi:10.1007/s13277-015-4671-9
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19345–19350. doi:10.1073/pnas.0709747104
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002
- DeBerardinis, R.J., Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), 313–324. doi:10.1038/onc.2009.358
- Delarue, M., Montel, F., Vignjevic, D., Prost, J., Joanny, J.F., Cappello, G. (2014). Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical Journal*, 107(8), 1821–1828. doi:10.1016/j.bpj.2014.08.031
- Desai, S., Ding, M., Wang, B., Lu, Z., Zhao, Q., Shaw, K., Yung, W. K., Weinstein, J. N., Tan, M., Yao, J. (2014). Tissue-specific isoform switch and DNA hypomethylation of the pyruvate kinase PKM gene in human cancers. *Oncotarget*, 5(18), 8202–8210. doi:10.18632/oncotarget.1159

- Dong, G., Mao, Q., Xia, W., Xu, Y., Wang, J., Xu, L., Jiang, F. (2016). PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncology Letters*, *11*(3), 1980–1986. doi:10.3892/ol.2016.4168
- Dong, T., Yan, Y., Chai, H., Chen, S., Xiong, X., Sun, D., ... Cheng, F. (2015). Pyruvate kinase M2 affects liver cancer cell behavior through up-regulation of HIF-1 α and Bcl-xL in culture. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *69*, 277–284. doi:10.1016/j.biopha.2014.12.010
- Draoui, N., Schicke, O., Fernandes, A., Drozak, X., Nahra, F., Dumont, A., ... Riant, O. (2013). Synthesis and pharmacological evaluation of carboxycoumarins as a new antitumor treatment targeting lactate transport in cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *21*(22), 7107–7117. doi:10.1016/j.bmc.2013.09.010
- Eagle H. (1955). The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *The Journal of Experimental Medicine*, *102*(5), 595–600. doi:10.1084/jem.102.5.595
- El-Ashmawy, N.E., El-Bahrawy, H.A., Shamloula, M.M., El-Feky, O.A. (2014). Biochemical/metabolic changes associated with hepatocellular carcinoma development in mice. *Tumour Biology: The Journal of The International Society For Oncodevelopmental Biology And Medicine*, *35*(6), 5459–5466. doi:10.1007/s13277-014-1714-6
- Elgogary, A., Xu, Q., Poore, B., Alt, J., Zimmermann, S.C., Zhao, L., ... Le, A. (2016). Combination therapy with BPTES nanoparticles and metformin targets the metabolic heterogeneity of pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(36), E5328–E5336.
- Erickson, J.W., Cerione, R.A. (2010). Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism? *Oncotarget*, *1*(8), 734–740. doi:10.18632/oncotarget.208
- Fallica, B., Maffei, J.S., Villa, S., Makin, G., Zaman, M. (2012). Alteration of cellular behavior and response to PI3K pathway inhibition by culture in 3D collagen gels. *PloS One*. *7*:e48024.
- Ghosh, S., Spagnoli, G.C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., Reschner, A. (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression

profile: a high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), 522–531. doi:10.1002/jcp.20320

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417–1423. doi:10.1093/jnci/51.5.1417

Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Arelaki, S., Koukourakis, M.I. (2017). Expression of enzymes related to glucose metabolism in non-small cell lung cancer and prognosis. *Experimental Lung Research*, 43(4-5), 167–174. doi:10.1080/01902148.2017.1328714

Gill, K.S., Fernandes, P., O'Donovan, T.R., McKenna, S.L., Doddakula, K.K., Power, ... Forde, P.F. (2016). Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1866(1), 87–105. doi:10.1016/j.bbcan.2016.06.005

Granchi, C., Fancelli, D., Minutolo, F. (2014). An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(21), 4915–4925. doi:10.1016/j.bmcl.2014.09.041

Guo, C., Li, G., Hou, J., Deng, X., Ao, S., Li, Z., Lyu, G. (2018). Tumor pyruvate kinase M2: A promising molecular target of gastrointestinal cancer. *Chinese Journal Of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 30(6), 669–676. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2018.06.11

Guppy, M., Leedman, P., Zu, X., Russell, V. (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *The Biochemical Journal*, 364(Pt 1), 309–315. doi:10.1042/bj3640309

Gwangwa, M.V., Joubert, A.M., Visagie, M.H. (2019). Effects of glutamine deprivation on oxidative stress and cell survival in breast cell lines. *Biological Research*, 52(1), 15. doi:10.1186/s40659-019-0224-9

Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., Delort, L. (2021). 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12200. doi:10.3390/ijms222212200

Hamilton, G., Rath, B. (2019). Role of circulating tumor cell spheroids in drug resistance. *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*, 2(3), 762–772. doi:10.20517/cdr.2019.47

- Han, S.J., Kwon, S., Kim, K.S. (2021). Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*, 21(1), 152. doi:10.1186/s12935-021-01853-8
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanahan, D., Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Harris A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer*, 2(1), 38–47. doi:10.1038/nrc704
- Harrison, R.G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (N.Y.), 4:140–150.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., ...Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 8(4), 311–321. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.008
- Ho, W.J., Pham, E.A., Kim, J.W., Ng, C.W., Kim, J.H., Kamei, D.T., Wu, B.M. (2010). Incorporation of multicellular spheroids into 3-D polymeric scaffolds provides an improved tumor model for screening anticancer drugs. *Cancer Science*, 101(12), 2637–2643. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01723.x
- Ho, W.Y., Yeap, S.K., Ho, C.L., Rahim, R.A., Alitheen, N. B. (2012). Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PloS One*, 7(9), e44640. doi:10.1371/journal.pone.0044640
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., ... Minami, H. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, 33(4), 1837–1843. doi:10.3892/or.2015.3767
- Iorio, J., Petroni, G., Duranti, C., Lastraioli, E. (2019). Potassium and Sodium Channels and the Warburg Effect: Biophysical Regulation of Cancer Metabolism. *Bioelectricity*, 1(3), 188–200. doi:10.1089/bioe.2019.0017

- Israelsen, W.J., Vander Heiden, M.G. (2015). Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 43, 43–51. doi:10.1016/j.semcd.2015.08.004
- Ito, A., Nasako, H., Akizuki, R., Takashina, Y., Eguchi, H., Matsunaga, T., ... Ikari, A. (2021). Elevation of Chemosensitivity of Lung Adenocarcinoma A549 Spheroid Cells by Claudin-2 Knockdown through Activation of Glucose Transport and Inhibition of Nrf2 Signal. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6582. doi:10.3390/ijms22126582
- Ivascu, A., Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(8), 922–932. doi:10.1177/1087057106292763
- Jeong, S.M., Hwang, S., Park, K., Yang, S., Seong, R.H. (2016). Enhanced mitochondrial glutamine anaplerosis suppresses pancreatic cancer growth through autophagy inhibition. *Scientific Reports*, 6, 30767. doi:10.1038/srep30767
- Jiang, M., Liu, S., Lin, J., Hao, W., Wei, B., Gao, Y., ... Zhu, Y. (2021). A pan-cancer analysis of molecular characteristics and oncogenic role of hexokinase family genes in human tumors. *Life Sciences*, 264, 118669. doi:10.1016/j.lfs.2020.118669
- Jiang, P., Du, W., Wu, M. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein & Cell*, 5(8), 592–602. doi:10.1007/s13238-014-0082-8
- Jin, L., Alesi, G.N., Kang, S. (2016). Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 35(28), 3619–3625. doi:10.1038/onc.2015.447
- Jin, L., Li, D., Alesi, G. N., Fan, J., Kang, H. B., Lu, Z., ... Kang, S. (2015). Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. *Cancer Cell*, 27(2), 257–270.
- Jin, L., Zhou, Y. (2019). Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncology Letters*, 17(5), 4213–4221. doi:10.3892/ol.2019.10112
- Kamiloglu S., Sari G. Ozdal T., Capanoglu E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 1: 332– 349.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer

cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS*, 14(4), 910–919. doi:10.5114/aoms.2016.63743

Keller, K. E., Tan, I. S., Lee, Y. S. (2012). SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6110), 1069–1072. doi:10.1126/science.1224409

Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., Nielsen, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and bioengineering*, 83(2), 173–180. doi:10.1002/bit.10655

Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M. E., Cuperlovic-Culf, M. (2020). Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*, 10(10), 1429. doi:10.3390/biom10101429

Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177–185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002

Koppenol, W. H., Bounds, P. L., Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), 325–337. doi:10.1038/nrc3038

Lai, G. H., Wang, F., Nie, D. R., Lei, S. J., Wu, Z. J., Cao, J. X., Tang, L. L. (2022). Correlation of Glucose Metabolism with Cancer and Intervention with Traditional Chinese Medicine. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2022, 2192654. doi:10.1155/2022/2192654

Langhans S. A. (2018). Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers In Pharmacology*, 9, 6. doi:10.3389/fphar.2018.00006

Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., ... Dang, C.V. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metabolism*, 15(1), 110–121. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.009

Li, Q., Chen, C., Kapadia, A., Zhou, Q., Harper, M.K., Schaack, J., LaBarbera, D.V. (2011). 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. *Journal of Biomolecular Screening*, 16(2), 141–154. doi:10.1177/1087057110392995

- Li, R., Wang, W., Yang, Y., Gu, C. (2020). Exploring the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in cancer (Review). *Oncology Reports*, 44(6), 2325–2336. doi:10.3892/or.2020.7803
- Li, X.B., Gu, J.D., Zhou, Q.H. (2015). Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 6(1), 17–24. doi:10.1111/1759-7714.12148
- Li, X., Deng, S., Liu, M., Jin, Y., Zhu, S., Deng, S., Zhao, G. (2018). The responsively decreased PKM2 facilitates the survival of pancreatic cancer cells in hypoglycose. *Cell Death Disease*, 9, 133 doi:10.1038/s41419-017-0158-5
- Li, Y., Liang, R., Sun, M., Li, Z., Sheng, H., Wang, J., ... Shan, C. (2020). AMPK-dependent phosphorylation of HDAC8 triggers PGM1 expression to promote lung cancer cell survival under glucose starvation. *Cancer Letters*, 478, 82–92. doi:10.1016/j.canlet.2020.03.007
- Lin, C.C., Cheng, T.L., Tsai, W.H., Tsai, H.J., Hu, K.H., Chang, H.C., ... Chang, W.T. (2012). Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Scientific Reports*, 2, 785. doi:10.1038/srep00785
- Lincet, H., Icard, P. (2015). How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions?. *Oncogene*, 34(29), 3751–3759. doi:10.1038/onc.2014.320
- Ling, H.H., Pan, Y.P., Fan, C.W., Tseng, W.K., Huang, J.S., Wu, T.H., ... Chang, P.H. (2019). Clinical Significance of Serum Glutamine Level in Patients with Colorectal Cancer. *Nutrients*, 11(4), 898. doi:10.3390/nu11040898
- Liu, G., Zhu, J., Yu, M., Cai, C., Zhou, Y., Yu, M., ... Zeng, B. (2015). Glutamate dehydrogenase is a novel prognostic marker and predicts metastases in colorectal cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 13, 144. doi:10.1186/s12967-015-0500-6
- Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406. doi:10.1083/jcb.201102147
- Lu, X., Wu, N., Yang, W., Sun, J., Yan, K., Wu, J. (2019). OGDH promotes the progression of gastric cancer by regulating mitochondrial bioenergetics and Wnt/ β -catenin signal pathway. *OncoTargets and Therapy*, 12, 7489–7500. doi:10.2147/OTT.S208848
- Luca, A.C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.L., ... Stoecklein, N. H. (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR

inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS One*, 8(3), e59689. doi:10.1371/journal.pone.0059689

Lukey, M.J., Wilson, K.F., Cerione, R.A. (2013). Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Medicinal Chemistry*, 5(14), 1685–1700. doi:10.4155/fmc.13.130

Ma, H.L., Jiang, Q., Han, S., Wu, Y., Cui Tomshine, J., Wang, D., ... Liang, X.J. (2012). Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Molecular Imaging*, 11(6), 487–498.

Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.Z., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., ... Bloomfield, C.D. (2010). IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(14), 2348–2355. Doi: 10.1200/jco.2009.27.3730

Mardis, E. R., Ding, L., Dooling, D. J., Larson, D. E., McLellan, M. D., Chen, K., ... Ley, T. J. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England Journal of Medicine*, 361(11), 1058–1066.

Marín-Hernández, A., López-Ramírez, S.Y., Del Mazo-Monsalvo, I., Gallardo-Pérez, J.C., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E. (2014). Modeling cancer glycolysis under hypoglycemia, and the role played by the differential expression of glycolytic isoforms. *The FEBS Journal*, 281(15), 3325–3345. doi:10.1111/febs.12864

Martin, M., Beauvoit, B., Voisin, P.J., Canioni, P., Guérin, B., Rigoulet, M. (1998). Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine deprivation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(6), 565–578. doi:10.1023/a:1020584517588

Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1), 102. doi:10.1038/s41467-019-13668-3

Matsusaki, M., Case, C.P., Akashi, M. (2014). Three-dimensional cell culture technique and pathophysiology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 74, 95–103. doi:10.1016/j.addr.2014.01.003

- Mazurek, S., Boschek, C.B., Hugo, F., Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology*. 15(4):300-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.009. PMID: 15908230.
- McMillin, D.W., Negri, J.M., Mitsiades, C. S. (2013). The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(3), 217–228. doi:10.1038/nrd3870
- Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of The Controlled Release Society*, 164(2), 192–204. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.045
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., ... Stephanopoulos, G. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381), 380–384. doi:10.1038/nature10602
- Meyers, J., Craig, J., Odde, D. J. (2006). Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Current Biology: CB*, 16(17), 1685–1693. doi:10.1016/j.cub.2006.07.056
- Mi, W., Gu, Y., Han, C., Liu, H., Fan, Q., Zhang, X., Cong, Q., Yu, W. (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(4), 514–519. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.009
- Minchenko, O.H., Ogura, T., Opentanova, I.L., Minchenko, D.O., Ochiai, A., Caro, J., Komisarenko, S.V., Esumi, H. (2005). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal (1999)*, 77(6), 46–50.
- Minchinton, A. I., Tannock, I. F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews. Cancer*, 6(8), 583–592. doi:10.1038/nrc1893
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal*, 274(6), 1393–1418. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x
- Muguruma, M., Teraoka, S., Miyahara, K., Ueda, A., Asaoka, M., Okazaki, M., ... Ishikawa, T. (2020). Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochemical And*

- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.H., Sullivan, L.B., Cheng, T., ... DeBerardinis, R.J. (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*, 481(7381), 385–388. doi:10.1038/nature10642
- Najafi, M., Farhood, B., Mortezaee, K. (2019). Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *Journal of Cell Biochemistry*, 120, 2782–2790. doi:10.1002/jcb.27681.
- Nagashio, R., Oikawa, S., Yanagita, K., Hagiuda, D., Kuchitsu, Y., Igawa, S., ... Sato, Y. (2019). Prognostic significance of G6PD expression and localization in lung adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and proteomics*, 1867(1), 38–46. doi:10.1016/j.bbapap.2018.05.005
- Natsuizaka, M., Ozasa, M., Darmanin, S., Miyamoto, M., Kondo, S., Kamada, S., ... Kobayashi, M. (2007). Synergistic up-regulation of Hexokinase-2, glucose transporters and angiogenic factors in pancreatic cancer cells by glucose deprivation and hypoxia. *Experimental Cell Research*, 313(15), 3337–3348. doi:10.1016/j.yexcr.2007.06.013
- Nelson, D.E., Cox, M.M. (2017). Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway. *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th Edition, pp. 1379-1477) New York: W. H. Freeman and Company.
- Nelson, D.E., Cox, M.M. (2017). The Citric Acid Cycle. *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th Edition, pp. 1595-1643) New York: W. H. Freeman and Company.
- Nguyen, T.L., Durán, R.V. (2018). Glutamine metabolism in cancer therapy. *Cancer Drug Resistance*, 1(2), 126-138. <http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2018.08>
- Nie, H., Yi, W. (2019). O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 20(5), 437–448. doi:10.1631/jzus.B1900150
- Noel, V., Berry, M.D. (2022). Culture of Adherent Cancer Cell Lines. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2508, 19–29. doi:10.1007/978-1-0716-2376-3_3
- Nunes, A.S., Barros, A.S., Costa, E.C., Moreira, A F., Correia, I.J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, 116:206–226. doi:10.1002/bit.26845

- Ögünç Keçeci, Y., İncesu, Z. (2022). Mitochondrial oxidative phosphorylation became functional under aglycemic hypoxia conditions in A549 cells. *Molecular Biology Reports*, 49(9), 8219–8228. doi:10.1007/s11033-022-07400-6
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(10), 839–845. doi:10.1038/nrm2236
- Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C.H., Leary R.J., Angenendt P., ... Kinzler K.W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321: 1807–1812.
- Pasdois, P., Deveaud, C., Voisin, P., Bouchaud, V., Rigoulet, M., Beauvoit, B. (2003). Contribution of the phosphorylable complex I in the growth phase-dependent respiration of C6 glioma cells in vitro. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes*, 35(5), 439–450. doi:10.1023/a:1027391831382
- Patel, M.S., Nemeria, N.S., Furey, W., Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 16615–16623. doi:10.1074/jbc.R114.563148
- Patra, K.C., Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347–354. doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005
- Pavlova, N.N., Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*, 23(1), 27–47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Peng, Y., Liu, H., Liu, J., Long, J. (2022). Post-translational modifications on mitochondrial metabolic enzymes in cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 179, 11–23. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.264
- Polat, I.H., Tarrado-Castellarnau, M., Benito, A., Hernandez-Carro, C., Centelles, J., Marin, S., Cascante, M. (2021). Glutamine Modulates Expression and Function of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase via NRF2 in Colon Cancer Cells. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1349. doi:10.3390/antiox10091349
- Popova, N.V., Jücker, M. (2022). The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer. *Cancers*, 14(1), 238. doi:10.3390/cancers14010238

- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S.R., Anuradha, E., Solomon, F.D. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16–26. doi:10.1002/jcp.24683
- Riedl, A., Schleiderer, M., Pudelko, K., Stadler, M., Walter S., Unterleuthner, D., ... Ewald, A. (2017). Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. *Journal of Cell Science*, 130 (1), 203–218.
- Rodríguez, C., Puente-Moncada, N., Reiter, R. J., Sánchez-Sánchez, A. M., Herrera, F., Rodríguez-Blanco, J., ... Martín, V. (2021). Regulation of cancer cell glucose metabolism is determinant for cancer cell fate after melatonin administration. *Journal of Cellular Physiology*, 236(1), 27–40. doi:10.1002/jcp.29886
- Roy, D., Sheng, G.Y., Herve, S., Carvalho, E., Mahanty, A., Yuan, S., Sun, L. (2017). Interplay between cancer cell cycle and metabolism: Challenges, targets and therapeutic opportunities. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 89, 288–296. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.019
- Saeed, T.K., Hamamy, H.A., Alwan, A.A. (1985). Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with diabetes mellitus. *Diabetic Medicine: a Journal of The British Diabetic Association*, 2(2), 110–112. doi:10.1111/j.1464-5491.1985.tb00611.x
- Salamon, S., Podbregar, E., Kubatka, P., Büsselberg, D., Caprnda, M., Opatrilova, R., ... Podbregar, M. (2017). Glucose metabolism in cancer and ischemia: Possible therapeutic consequences of the warburg effect. *Nutrition and Cancer*, 69: 177-183.
- Saleh, F., Harb, A., Soudani, N., Zaraket, H. (2020). A three-dimensional A549 cell culture model to study respiratory syncytial virus infections. *Journal of Infection and Public Health*, 13(8), 1142–1147. doi:10.1016/j.jiph.2020.03.011
- Sandulache, V.C., Ow, T.J., Pickering, C.R., Frederick, M.J., Zhou, G., Fokt, I., ... Myers, J.N. (2011). Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer*, 117(13), 2926–2938. doi:10.1002/cncr.25868
- Sangaletti, S., Chiodoni, C., Tripodo, C., Colombo, M.P. (2017). The good and bad of targeting cancer-associated extracellular matrix. *Current Opinion in Pharmacology*, 35, 75–82. doi:10.1016/j.coph.2017.06.003.

- Scagliola, A., Mainini, F., Cardaci, S. (2020). The Tricarboxylic Acid Cycle at the Crossroad Between Cancer and Immunity. *Antioxidants & redox signaling*, 32(12), 834–852. doi:10.1089/ars.2019.7974
- Schlichtholz, B., Turyn, J., Goyke, E., Biernacki, M., Jaskiewicz, K., Sledzinski, Z., Swierczynski, J. (2005). Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 30(2), 99–104. doi:10.1097/01.mpa.0000153326.69816.7d
- Schlichtholz, B., Turyn, J., Goyke, E., Biernacki, M., Jaskiewicz, K., Sledzinski, Z., Swierczynski, J. (2005). Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 30(2), 99–104.
- Sekine, T., Miyazaki, H., Endou, H. (2008). CHAPTER 7 Solute Transport, Energy Consumption, and Production in the Kidney. Alpern R. J., Hebert C. (Eds.), *Seldin and Giebisch's The Kidney*, (4th edition, Pages 185-209). Massachusetts: Academic Press doi:10.1016/B978-012088488-9.50010-3
- Sellers, K., Fox, M. P., Bousamra, M., 2nd, Slone, S. P., Higashi, R. M., Miller, D. M., ... Fan, T. W. (2015). Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(2), 687–698. doi:10.1172/JCI72873
- Shi, L., Tu, B.P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 125–131. doi:10.1016/j.ceb.2015.02.003
- Song, J., Sun, H., Zhang, S., Shan, C. (2022). The Multiple Roles of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Tumorigenesis and Cancer Chemoresistance. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(2), 271. doi:10.3390/life12020271
- Spada, M., Piras, C., Diana, G., Leoni, V. P., Frau, D. V., Serreli, G., Simbula, G., Loi, R., Noto, A., Murgia, F., Caria, P., & Atzori, L. (2023). Glutamine Starvation Affects Cell Cycle, Oxidative Homeostasis and Metabolism in Colorectal Cancer Cells. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(3), 683. doi:10.3390/antiox12030683
- Stacpoole P. W. (2017). Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(11), 10.1093/jnci/djx071. doi:10.1093/jnci/djx071

- Stanton R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *Journal of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 64(5), 362–369. doi:10.1002/iub.1017
- Still, E.R., Yuneva, M.O. (2017). Hopefully devoted to Q: targeting glutamine addiction in cancer. *British Journal of Cancer*, 116(11), 1375–1381. doi:10.1038/bjc.2017.113
- Sutherland R.M., Inch W.R., McCredie J.A., Kruuv J. (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, 18, 491–495.
- Tannock, I.F., Lee, C.M., Tunggal, J.K., Cowan, D.S., Egorin, M.J. (2002). Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of The American Association for Cancer Research*, 8(3), 878–884.
- Toth, L.N., de Abreu, F. B., Tafe, L.J. (2018). Non-small cell lung cancers with isocitrate dehydrogenase 1 or 2 (IDH1/2) mutations. *Human Pathology*, 78, 138–143. doi:10.1016/j.humpath.2018.04.014
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441–1454. doi:10.1093/jnci/djm135
- van den Heuvel, A.P., Jing, J., Wooster, R.F., Bachman, K.E. (2012). Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biology & Therapy*, 13(12), 1185–1194. doi:10.4161/cbt.21348
- van Dijk, M., Göransson, S. A., Strömblad, S. (2013). Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. *Experimental Cell Research*, 319(11), 1663–1670. doi:10.1016/j.yexcr.2013.02.006
- Vanhove, K., Derveaux, E., Graulus, G.J., Mesotten, L., Thomeer, M., Noben, J.P., ... Adriaensens, P. (2019). Glutamine Addiction and Therapeutic Strategies in Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 252. doi:10.3390/ijms20020252
- Vaupel P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist*, 9 Suppl 5, 10–17. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-10

- Wang, X., Liu, R., Qu, X., Yu, H., Chu, H., Zhang, Y., ... Yang, W. (2019). α -Ketoglutarate-Activated NF- κ B Signaling Promotes Compensatory Glucose Uptake and Brain Tumor Development. *Molecular Cell*, 76(1), 148–162.e7. doi:10.1016/j.molcel.2019.07.007
- Wang, X., Shen, X., Yan, Y., Li, H. (2021). Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): an overview toward clinical applications. *Bioscience Reports*, 41(4), BSR20204402. doi:10.1042/BSR20204402
- Wanigasekara, J., Barcia, C., Cullen, P. J., Tiwari, B., Curtin, J.F. (2022). Plasma induced reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in glioblastoma 3D tumorspheres. *Plasma Processes and Polymers*, 19, e2100157. doi:10.1002/ppap.202100157
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), 309–314. doi:10.1126/science.123.3191.309
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530. doi:10.1085/jgp.8.6.519
- Ward, J.P., King, J.R. (1997). Mathematical modelling of avascular-tumour growth. *Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA*, 14(1), 39–69. doi:10.1093/imammb/14.1.39
- Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., ... Thompson, C. B. (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 17(3), 225–234. doi:10.1016/j.ccr.2010.01.020
- Weaver, V.M., Lelièvre, S., Lakins, J.N., Chrenek, M.A., Jones, J.C., Giancotti, F., Werb, Z., Bissell, M. J. (2002). Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, 2(3), 205–216. doi:10.1016/s1535-6108(02)00125-3
- Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W., Yi, P. (2021). Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 603837. doi:10.3389/fcell.2020.603837
- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., ... Thompson, C. B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 108(49), 19611–19616.
doi:10.1073/pnas.1117773108

World Health Organization [WHO]. (2022). *Cancer*. <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer> adresinden erişildi.

Wu, C. A., Chao, Y., Shiah, S. G., Lin, W.W. (2013). Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(5), 1147–1156.
doi:10.1016/j.bbamcr.2013.01.025

Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489–492.
doi:10.1093/jn/134.3.489

Xu, F., Burg, K. J. (2007). Three-dimensional polymeric systems for cancer cell studies. *Cytotechnology*, 54(3), 135–143. doi:10.1007/s10616-007-9065-4

Xu, Y., Osborne, B. W., Stanton, R. C. (2005). Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(5), F1040–F1047. doi:10.1152/ajprenal.00076.2005

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., ... Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 360(8), 765–773. doi:10.1056/NEJMoa0808710

Yang, C., Sudderth, J., Dang, T., Bachoo, R. M., McDonald, J. G., DeBerardinis, R. J. (2009). Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Research*, 69(20), 7986–7993. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2266

Yang, H.C., Wu, Y.H., Yen, W.C., Liu, H.Y., Hwang, T.L., Stern, A., Chiu, D.T. (2019). The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells*, 8(9), 1055. doi:10.3390/cells8091055

Yang, L., Venneti, S., Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19, 163–194. doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044546

- Yang, W., Xia, Y., Cao, Y., Zheng, Y., Bu, W., Zhang, L., ... Lu, Z. (2012). EGFR-induced and PKC ϵ monoubiquitylation-dependent NF- κ B activation upregulates PKM2 expression and promotes tumorigenesis. *Molecular Cell*, 48(5), 771–784. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.028
- Yang, W.H., Qiu, Y., Stamatatos, O., Janowitz, T., Lukey, M. J. (2021). Enhancing the Efficacy of Glutamine Metabolism Inhibitors in Cancer Therapy. *Trends in Cancer*, 7(8), 790–804. doi:10.1016/j.trecan.2021.04.003
- Ye, D., Guan, K.L., Xiong, Y. (2018). Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends in Cancer*, 4(2), 151–165. doi:10.1016/j.trecan.2017.12.005
- Yeon, S.E., No, D.Y., Lee, S.H., Nam, S.W., Oh, I.H., Lee, J., Kuh, H.J. (2013). Application of concave microwells to pancreatic tumor spheroids enabling anticancer drug evaluation in a clinically relevant drug resistance model. *PloS One*, 8(9), e73345. doi:10.1371/journal.pone.0073345
- Yoo, H.C., Yu, Y.C., Sung, Y., Han, J.M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), 1496–1516. doi:10.1038/s12276-020-00504-8
- Yu, L., Chen, X., Wang, L., Chen, S. (2016). The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*, 7(25), 38908–38926. doi:10.18632/oncotarget.7676
- Zahra, K., Dey, T., Ashish, Mishra, S. P., Pandey, U. (2020). Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 10, 159. doi:10.3389/fonc.2020.00159
- Zhang, J., Pavlova, N.N., Thompson, C.B. (2017). Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *The EMBO Journal*, 36(10), 1302–1315. doi:10.15252/embj.201696151
- Zhang, J., Wang, G., Mao, Q., Li, S., Xiong, W., Lin, Y., Ge, J. (2016). Glutamate dehydrogenase (GDH) regulates bioenergetics and redox homeostasis in human glioma. *Oncotarget*, 5.
- Zhang, L., Bailleul, J., Yazal, T., Dong, K., Sung, D., Dao, A., ... Vlashi, E. (2019). PK-M2-mediated metabolic changes in breast cancer cells induced by ionizing radiation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 178(1), 75–86. doi:10.1007/s10549-019-05376-9

- Zhang, Z., Apse, K., Pang, J., Stanton, R. C. (2000). High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40042–40047. doi:10.1074/jbc.M007505200
- Zhou, Y., Li, M., Zhu, M. (2021). Activation of the Warburg Effect by Pyruvate Kinase M2 Promotes the Occurrence and Development of Liver Cancer. *Gastroenterology & Hepatology Letters*, 3(2), 13-24. DOI: doi:10.18063/ghl.v3i2.276
- Zhou, Y., Yu, H., Cheng, S., Chen, Y., He, L., Ren, J., ... Li, F. (2022). Glutamate dehydrogenase 1 mediated glutaminolysis sustains HCC cells survival under glucose deprivation. *Journal of Cancer*, 13(3), 1061–1072. doi:10.7150/jca.64195
- Zu, X.L., Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3), 459–465. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.136