

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA GLUKOZ VE
FRUKTOZ TRANSPORT MEKANİZMALARININ
MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Hazırlayan
Ayça LEKESİZCAN

Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Doktora Tezi

Haziran 2019
KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA GLUKOZ VE
FRUKTOZ TRANSPORT MEKANİZMALARININ
MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Ayça LEKESİZCAN**

**Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK-2017-7212 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ayça LEKESİZCAN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Farklı Kanser Hücre Hatlarında Glukoz ve Fruktöz Transport Mekanizmalarının Moleküler Düzeyde İncelenmesi” adlı **Doktora** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ayça LEKESİZCAN

Danışman

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Birkan YAKAN

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR danışmanlığında Ayça LEKESİZCAN tarafından hazırlanan “Farklı Kanser Hücre Hatlarında Glukoz ve Fruktoz Transport Mekanizmalarının Moleküler Düzeyde İncelenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2019

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR (Histoloji Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Birkan YAKAN (Histoloji Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Harun ÜLGER (Anatomi AD)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Halime TOZAK YILDIZ (Histoloji Embriyoloji AD)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Erkin AYDIN (Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen ve bana her daim yol gösteren sayın danışman hocam Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a,

Lisansüstü eğitim dönemim boyunca engin bilgileriyle her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Birkan YAKAN'a,

Akademik hayatım boyunca bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan, yol gösteren, her zaman duruş ve tutumunu örnek aldığım sayın hocam Prof. Dr. Cemil Yıldırım TÜRK'e,

Tez dönemim boyunca bilgilerinden faydalandığım sayın hocam Prof. Dr. Harun ÜLGER'e

Tez çalışmam sırasında bana laboratuvarlarını açarak destek olan sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Aysun CEBECİ AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi Erkin AYDIN'a,

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarım ve asistan arkadaşlarıma, Tez çalışmamın istatistiksel analizlerinde yardımcı olan ve her zaman gönülden destek sağlayan Doç. Dr Gökmen ZARARSIZ'a,

Çalışmam boyunca yardım ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Dr. Öğretim Üyesi Yeliz SÜRME'ye

Her öğüdüyle bana vatan sevgisini aşıl原因an dedem **Osman ŞAHİN**e..

Yaşadığım her bir güne anlam katan ve benimle birlikte bu süreci paylaşan yakından veya uzaktan, her zaman sevgi ve dualarıyla yanımda olan, güç veren, iyi ki varlar diye şükrettiğim büyük **güzel ailem Rafet KARA, Hayriye KARA, Ayla KARA ÇOBAN, Özgün ÇOBAN, Tahsin LEKESİZCAN, Muteber LEKESİZCAN, Serkan LEKESİZCAN, Feyza SOMTAŞ LEKESİZCAN, çiçeğim Özün'e ve kıymetli dostlarım Fatma ŞAHİN, Zehra ELGÜN, Selen İLGÜN'e**

Birlikte nefes aldığım sevgili **eşim Hamdi LEKESİZCAN** ve **canım oğlum Mert'e** tüm kalbimle teşekkür ederim.

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA GLUKOZ VE FRUKTOZ TRANSPORT MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Ayça LEKESİZCAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

Doktora Tezi, Haziran 2019

Danışman: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

ÖZET

Kanser hücreleri büyümek, proliferere olmak ve başka organlara metastaz yapabilmek için glukozu çok iyi metabolize eder. Fruktoz birçok besin maddesinde bulunan altı karbonlu bir monosakkarittir. Fruktoz, glukozdan farklı olarak insülininden bağımsız metabolize edilir. Bu çalışmada in vitro koşullarda farklı kanser hücrelerinin yüksek glukoz (HG) ve yüksek fruktoz (HF) içeren ortamlarda şekeri kullanma kapasiteleri değerlendirilerek, bu durumun rapamisininin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı üzerinden hücre proliferasyonuna etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada 4T1, HEPG2 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları kullanıldı. Hücreler HG, HF ve DMEM olmak üzere üç farklı besiyerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler, glikolitik yolağı ağıt GLUT1, GLUT2, HK1 ve proliferasyonda etkin olan pS6 antikorları ile immünofluoresan boyandı. Her gruptan on farklı alandan fotoğraf çekilerek rastgele yüz tane hücrenin yoğunluğu Image J programında ölçüldü. Ayrıca GLUT5 ve S6 antikorları ile western blot analizleri yapıldı. MDA-MB-231 hücre hattında HG gruplarında protein ekspresyon yoğunlukları daha yüksekti. 4T1 hücre hattında 48 ve 72. saatlerde, HEPG2 hücre hattında ise 72. saatte HF gruplarında pS6 ekspresyonunda anlamlı artış gözlendi. HEPG2 hücrelerinde GLUT5'in en yüksek ekspresyon yoğunluğu, DMEM ve HG gruplarına kıyasla, hem gruplar arasında hem de 24., 48., ve özellikle 72. saatlerde en fazla HF grubunda, hem gruplar arasında hem de 24., 48., ve özellikle 72. saatlerde edilmiştir. DMEM, HG ve HF deney gruplarında zamana bağılı olarak ortalama ekspresyon yoğunluklarına bakıldığında HF gruplarında 48. saatte diğeri grupların aksine ekspresyon yoğunluklarında anlamlı olarak artış gözlendi. Sonuç olarak bu çalışmada yüksek fruktozun kanser türüne bağılı olarak kanserin ilerlemesinde proliferasyonu teşvik edebileceğı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Glukoz, Fruktoz, mTOR, GLUT

**INVESTIGATION OF MOLECULAR LEVEL OF GLUCOSE AND FRUKTOZ
TRANSPORT MECHANISMS IN DIFFERENT CANCER CELL LINES**

Ayça LEKESİZCAN

Erciyes University, Depertmant of Histology and Embryoloji

PHD Thesis, June 2019

Advisor: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

ABSTRACT

Cancer cells metabolize glucose very well to grow, proliferate and metastasize to other organs. Fructose is a six-carbon monosaccharide found in many nutrients. Unlike glucose, fructose is metabolized independently of insulin. In this study, it was aimed to evaluate the ability of different cancer cells to use sugar in high glucose (HG) and high fructose (HF) media in in vitro conditions and to investigate the effect of this condition on cell proliferation via mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. In the study, 4T1, HepG2 cells and MDA-MB-231 cancer cell lines were used. Cells were incubated on high glucose, high fructose and DMEM media for 24, 48 and 72 hours. Cells were stained with immunoflourescent GLUT1, GLUT2, HK1 antibodies of the glycolytic pathway, and pS6 antibodies that are active in proliferation by phosphorylation in the mTOR signaling pathway. The intensity of one hundred cells was measured at Image J program by taking photographs from ten different areas of each group. Cell lysate was also prepared and western blot analysis was performed using GLUT5 and S6 antibodies. The MDA-MB-231 cells showed higher protein expression intensity in high glucose groups. A significant increase in pS6 expression was observed in high fructose groups at 48th and 72th hours in 4T1 cell line and in HEPG2 cell line at 72th hour. Highest GLUT5 expression levels in the HEPG2 cells was observed in HF groups both between groups and at 24th, 48th, especially at 72 hours, in comporison to DMEM and HG groups. In the DMEM, HG and HF groups, a significant increase in expression intensity was observed in the HF groups at 48 hours compared to the other groups, according to the time-dependent mean protein expression density graph. In conclusion, in this study, it was shown that high fructose can promote proliferation in cancer progression depending on the cancer type.

Key Words: Cancer, Glucose, Fructose, mTOR, GLUT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.KARBONHİDRATLAR	3
2.1.1. Glukoz Taşıyıcıları.....	4
2.1.2. Glikolitik Enzimler	6
2.1.3. Glukoz Metabolizması	7
2.1.4 Glikoliz.....	7
2.1.5 Fruktoz Metabolizması.....	10
2.2.KANSER.....	13
2.2.1.Büyüme Sinyallerinde Kendine Yeterlilik	14
2.2.2.Büyüme Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık.....	14
2.2.3.Apoptozisten Kaçınma.....	15
2.2.4.Sınırsız Bölünme Yeteneği	16
2.2.5. Sürdürülebilir Anjiyogenez	17
2.2.6.Doku İnvazyonu ve Metastaz.....	17
2.3. KANSER METABOLİZMASI.....	18
2.3.1. Kanserde Glukoz Metabolizması	18
2.4.mTOR SİNYAL YOLAĞI.....	21
2.5. KANSER HÜCRE HATLARI.....	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. GEREÇLER.....	25
3.1.1. Demirbaş Malzemeler Aletler.....	25
3.1.2 Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	25
3.2. YÖNTEM	26
3.2.1. Hücre Kültürü	26
3.2.1.1. Hücre Hatları	26
3.2.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması.....	27
3.2.1.3. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	28
3.2.1.4. Hücrelerin Sayılması ve Pasajlanması	28
3.2.1.5. Hücrelerinin Dondurulması.....	29
3.2.2. İmmünflouresan Boyamalar.....	30
3.2.3 Western Blot	30
3.2.4 İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. İmmünflouresan Bulgular	33
4.2. Western Blot Bulgular.	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	63
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

O ₂	:	Oksijen
CO ₂	:	Karbondioksit
ATP	:	Adenozin tri fosfat
mTOR	:	Rapamisinin memeli hedefi
GLUT	:	Glukoz transporter
HK	:	Hekzokinaz
G6P	:	Glukoz-6-fosfat
F6P	:	Fruktoz-6-fostat
F1,6-BP	:	Fruktoz1-6-bisfosfata
PFK1	:	Fosfofruktokinaz1
KHK	:	Ketoheksokinaz
F1P	:	Fruktoz-1fosfat
DHAP	:	Dihidroksiaseton fosfat
G3P	:	Gliseraldehit 3-fosfat
NADH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
ADP	:	Adenosin difosfat
ETS	:	Elektron taşıma sistemi
H ₂ O	:	Dihidrojen monoksit
NAD ⁺	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
mM	:	Milimolar
PFK	:	Fosfofruktokinaz
G3P	:	Gliserol-3-fosfat
GA3P	:	Gliseraldehit-3-fosfata
AMP	:	Adenosin monofosfat

uμ	:	Mikrometre
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
LDHA	:	Laktik asit dehidrojenaz-A
MCT	:	Monokarboksilat taşıyıcı
TGF-β	:	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
IL-1	:	İnterlökin-1
HIF-1 α	:	Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1α
FKBP12	:	FK506 bağlayıcı protein 12
PI3K	:	Fosfoinositid 3-kinaz
4EBP	:	eIF4E Bağlayıcı Protein
PDK1	:	Fosfoinositide bağımlı kinaz-1
SREBP	:	Sterol yanıt veren element bağlayıcı protein
CAD	:	Karbamoil-fosfat sentetaz
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
HG	:	Yüksek glukoz
HF	:	Yüksek fruktoz
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
NNM	:	N-nitrosomorfolin
DNA	:	Deoksiribo Nükleik asit
eNOS	:	Epitelyal nitrik oksit sentaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Glikolizin aşamaları	9
Şekil 2.2: Glukoz ve fruktozun kimyasal yapısı (10).	10
Şekil 2.3: Fruktoz Metabolizması.	12
Şekil 2.4: Kansere hücrelerinin kazanılmış yetenekleri.	14
Şekil 2.5: Normal hücreler ve kanser hücreleri arasındaki metabolik farklılıklar gösterilmiştir.	20
Şekil 2.6: mTOR kinazının domain yapısı ve protein komplekslerinin bileşenleri (132).	22
Şekil 3.1: Thoma Lamı.	29
Şekil 4.1: 4T1 deney gruplarına ait pS6 immünofluoresan boyama. pS6 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, pS6 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm	34
Şekil 4.2: HEPG2 deney gruplarına ait pS6 immünofluoresan boyama. pS6 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, pS6 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	34
Şekil 4.3: MDA-MB-231 deney gruplarına ait pS6 immünofluoresan boyama. pS6 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, pS6 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	35
Şekil 4.4: 4T1 deney gruplarına ait GLUT1 antikoru immünofluoresan boyama. GLUT1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	35
Şekil 4.5: HEPG2 Deney gruplarına ait GLUT1 antikoru immünofluoresan boyama. GLUT1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	36
Şekil 4.6: MDA-MB-231 deney gruplarına ait GLUT1 antikoru immünofluoresan boyama. GLUT1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	36

Şekil 4.7:	4T1 deney gruplarına ait GLUT2 antikoru immünoflouresan boyama. GLUT2 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT2 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	37
Şekil 4.8:	HEPG2 deney gruplarına ait GLUT2 antikoru immünoflouresan boyama. GLUT2 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT2 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	37
Şekil 4.9:	MDA-MB-231 deney gruplarına ait GLUT2 antikoru immünoflouresan boyama. GLUT2 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT2 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	38
Şekil 4.10:	4T1 deney gruplarına ait HK1 antikoru immünoflouresan boyama. HK1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, HK1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	38
Şekil 4.11:	HEPG2 deney gruplarına ait HK1 antikoru immünoflouresan boyama. HK1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, HK1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	39
Şekil 4.12:	MDA-MB-231 deney gruplarına ait HK1 antikoru immünoflouresan boyama. HK1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, HK1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.	39
Şekil 4.13:	pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin hücre hatlarına göre dağılım grafiği.	42
Şekil 4.14:	pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.	44
Şekil 4.15:	4T1 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.	47

Şekil 4.16:	HEPG2 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.	49
Şekil 4.17:	MDA-MB-231 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.	51
Şekil 4.18:	Zamana bağlı olarak DMEM, HG ve HF deney gruplarındaki ortalama yoğunluklar gösterilmiştir.	52
Şekil 4.19:	BCA analizinde okuma için hazırlanan 96 kuyucuklu plate görüntüsü.	53
Şekil 4.20:	Proteinlerin miktar tayini için yapılan BCA'da standart eğri R ² grafiği (y= 0,000976353x - 0,0120412 R ² : 0,994).	54
Şekil 4.21:	Western blot analizi için proteinlerin membrana transferinden sonra yapılan Ponceau S boyama ile membranda protein bantlarının görünümü.	54
Şekil 4.22:	HEPG2 hücre hattında GLUT5 protein ekspresyonun western blot analizi ile gösterilmesi. Kontrol S6 protein ekspresyonu ile gösterilmiştir.	55
Şekil 4.23:	HEPG2 hücre hattında DMEM, HG ve HF gruplarında 24., 48., ve 72. saatlerde GLUT5 proteininin ekspresyon grafiği.	55

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1: Deney grupları ve besiyeri içerikleri.	28
Tablo 4.1: Zaman hücre hattı ve uygulama değişkenlerinin üç yönlü anova kullanılarak karşılaştırılması.	40
Tablo 4.2: pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin hücre hatlarına göre dağılımı.	41
Tablo 4.3: pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı.	43
Tablo 4.4: 4T1 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı.	46
Tablo 4.5: HEPG2 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı.	48
Tablo 4.6: MDA-MB-231 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı.	50

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması ile ortaya çıkan ölümcül bir hastalıktır. İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır. Kanserde yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Ancak günümüzde kişiye özel moleküler düzeyde tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir (1). Kanser metabolizmasına yönelik tedavi yaklaşımları ise özellikle son 10 yılda çarpıcı bir şekilde artmıştır. Kanser hücreleri, sıklıkla besin sıkıntısı çektiklerinden dolayı normal hücrelerden farklı davranarak stresli bir mikro çevrede hayatta kalmayı ve çoğalmayı sağlamak için metabolizmalarını yeniden düzenlerler. Metabolik değişiklikler, adenosin tri fosfat (ATP) üretimi için katabolik yolları etkilerken öncü moleküllerin biyokütle sentezi için ise anabolik yolları etkiler (2,3). Normal hücrelerde besin kaynağı olarak glukoz, oksijen (O_2) varlığında glikolizis yoluyla pirüvata parçalanır ve daha sonra oluşan pirüvatin büyük çoğunluğu oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondride tamamen okside edilerek karbondioksit (CO_2) dönüştürülür. Anaerobik koşullarda ise hücreler glikolitik pirüvatı mitokondrial oksidasyona yönlendirmez ve büyük ölçüde laktata indirger (4). Hızlı proliferasyon yapan kanser hücrelerinin bir molekül glukozdan üretilen ATP miktarı çok az olmasına rağmen glukozu aerobik ortamda laktata dönüştürmesi "Warburg Etkisi" ya da "Aerobik Glikolizis" olarak adlandırılır (2,4,5). Kanser hücrelerinin bu davranışları, proliferasyon yapan hücrelerin hipoksik şartlara duyarlılığını ortadan kaldırarak hayatta kalmaları için avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle kanser dokularında meydana gelen oldukça artmış glukoz alımı, enerji üretimi için hızlı bir yol oluşturmaktadır (6,7). Ayrıca proliferatif kanser hücreleri, nükleik asit biyosentezi için yeterli riboz 5-fosfat sentezlemeli ve membran lipid yapıları için yağ asitleri üretmelidir. Bu iki işlem içinde glukoz gibi bir karbonhidrat, karbon kaynağı

olarak kullanılmaktadır. Glukoz, monosakkaridleri temsil eden en önemli şekerdir. Metabolik olaylarda karbonhidratlar glukoza çevrilmek suretiyle kullanılır. Fruktoz ise birçok besin maddesinde bulunan altı karbonlu bir monosakkarittir. Glukoz ve fruktoz aynı kimyasal formüle ($C_6H_{12}O_6$) sahiptir ancak glukozun kimyasal yapısında asimetrik karbon atomu üzerinde aldehid grubu bulunurken fruktozda keton grubu bulunmaktadır (8). Fruktoz, glukozdan farklı olarak insülininden bağımsız metabolize edilir. Bu nedenle, metabolik kaderi ve eylemleri farklıdır. Basit yapısal farklılıklar fruktoz açısından emilim ve hastalık süreçlerinde farklı etkileri olan metabolik özellikler ile sonuçlanır (9).

Kanserde hücreleri maligniteye yönlendiren anormal gen ekspresyonuna paralel olarak, hücrel metabolik yollar artan tümör büyümesini ve yayılmasını destekleyecek şekilde değişmektedir. Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), hücre büyümesi, çoğalma ve hayatta kalma gibi temel hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahip bir sinyal yolağıdır. Özellikle tümörlerde yaygın olarak aktive edilir ve bir dizi anahtar metabolik enzimin ekspresyonunu ve/veya aktivitesini değiştirerek kanser hücresi metabolizmasını kontrol eder (2). Artan glikoz veya amino asit alımı gibi metabolik değişiklikler mTOR sinyal yolağını etkilemektedir. Son zamanlarda fruktoz gibi diğer şekerlerin kanser hücrelerinin çoğalması ve gelişimindeki rolünü anlamaya yönelik yapılan çalışmalar, metabolik işlemler için karbonhidratların kullanma şeklindeki temel farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, mTOR sinyal yolağı ve kanser metabolizması arasındaki etkileşim hakkında elde edilen yeni veriler, terapötik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Bu çalışmada in vitro koşullarda farklı kanser hücrelerinin yüksek glukoz veya yüksek fruktozlu ortamlarda şekeri kullanma kapasitelerinin değerlendirilmesi ve bu durumun mTOR sinyal yolağı üzerinden hücre proliferasyonuna etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KARBONHİDRATLAR

Karbonhidratlar doğada en bol bulunan makro moleküllerdendir. Her bir gram karbonhidrat 4 kaloridir. Belirli karbonhidratlar dünyanın birçok bölgesinde diyetin temel bir gıda maddesidir ve karbonhidratların oksidasyonu, fotosentetik olmayan birçok hücrede enerji elde edilen ana yoldur. Karbonhidratlar monosakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır. Glukoz, fruktoz, galaktoz birer monosakkarittir. Çay şekeri olan sükroz oligosakkarid, nişasta ise polisakkarittir. Monosakkarid ve oligosakkaridler beyaz renkli suda kolay çözünen ve tatlı tad veren maddelerdir. Karbonhidratlar aktif aldehid veya keton grubuna sahiptir (8).

Monosakkaritler basit şekerler olarak bilinirler. En az bir asimetrik karbon atomuna sahiptirler ve dolayısıyla stereoizomerik formları vardır. Yapılarında aldehid veya keton grubu taşımalarına göre aldo şekerler (aldoz) ve keto şekerler (ketoz) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Riboz, glukoz, fruktoz ve mannoz gibi doğal olarak oluşan şekerler D formundadır (8).

Karbonhidratların sindirimi sırasında, tüm disakkaritler ve kompleks karbonhidratlar, ince bağırsakta tamamen emilmemesine rağmen monosakaritlere bölünür. İlk olarak sindirim ağızda, çiğneme işlemi sırasında salgılanan amilazla başlar. Amilaz, tükürük bezlerinin seröz hücrelerinde sentezlenir ve pH'a duyarlı olduğu için midenin asidik ortamında inhibe edilir. Karbonhidratları yüksek miktarlarda tüketen insanlarda oral amilaz sekresyonunun artmasına neden olan bir pozitif geri besleme döngüsü vardır. Amilaz, kompleks karbonhidratların α -1,4 bağlarını hedef alırken terminal bağlarını veya α -1,6 bağlarını kıramaz. Nişasta, ince bağırsakta dallanmış amilopektinden (maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinler) türetilen basit bileşenlere sindirilir. Nişastaların,

maltoz ve polisakaritlere dönüşümü amilaz ile sağlanmaktadır. Oligosakaritler ve disakaritler, bağırsaktaki hücrelerin apikal yüzlerindeki mikrovillusların (fırçamsı kenar) üzerinde yer alan spesifik enzimler tarafından sindirilmektedir. Fırçamsı kenar enzimleri endoplazmik retikulumda sentezlenir ve enterositin golgi aparatında glikosile edilir. Daha sonra bir transmembran segmentine bağlanarak apikal zara taşınır. Bağlanmış enzimler, hücre dışı N-terminal ucundaki küçük bir kalıntının ayrılmasından sonra aktif hale gelmektedir (10).

Karbonhidratlar sindirildikten sonra, ürünlerin emilimi sağlanmalı ve portal dolaşıma taşınmalıdır. Sindirim ürünlerinin hücre içine alınmasını sağlayan taşıyıcı proteinler hücre zarı üzerinde yer almaktadır. Taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücre içine alınan monosakkaritler sitoplazma içerisinde taşıyıcı proteinlere yakın yerleşim gösteren enzimler ile birleştirilerek enerji üretimi için kullanılır (10).

2.1.1. Glukoz Taşıyıcıları

Karbonhidratların alımı ve sindirilmesine bağlı olarak dolaşımdaki glukoz konsantrasyonu yükseldiğinde, pankreastaki beta hücrelerinden insülin hormonu salgılanmaktadır. Bu durum glukoz alımını kolaylaştırmak için hücre yüzeyi üzerindeki glukoz taşıyıcıların yoğunluğunu artırır (11). Glukoz birçok glukoz taşıyıcı ile bu mekanizma ile hücre içine alınır. Fruktoz glukozdan farklı olarak diğer şekerler için sınırlı afiniteye sahip olan insülin bağımsız, fruktoz spesifik taşıyıcı ile daha hızlı ve limitsiz bir şekilde hücre içine alınabilir (12, 13).

Glukozun plazma membranı boyunca taşınmasını kolaylaştıran glukoz taşıyıcıları (GLUT) çok sayıda üyeye sahip bir protein ailesidir. Glukoz tüm yaşam için hayati bir enerji kaynağı olduğundan, bu taşıyıcılar tüm filumlarda bulunur. GLUT bir tür uniporter taşıyıcı proteindir ve GLUT ailesi, GLUT 1-14 olarak adlandırılan 14 adet membrana bağlı proteinden oluşur (14). GLUT protein ailesi üç ana sınıfa ayrılır (15).

GLUT1, ailenin en yaygın üyesidir ve galaktoz, mannoz ve glukozamini belirli bir verimlilikle taşıyabilmesine rağmen, esas olarak glukozu taşır (16). GLUT2 fruktoz, galaktoz ve mannoz için afinite gösteren bir glukoz taşıyıcı proteindir (17).

GLUT3, galaktoz, mannoz, maltoz veya ksiloz da taşıdığı halde glukoz için çok yüksek afiniteye sahiptir (18). GLUT4, insüline cevaben intraselüler rezervuardan plazma membranına translokasyon yapan yüksek afiniteli bir glikoz taşıyıcıdır (13). GLUT5, glukoz veya galaktoz taşıma kabiliyetine sahip olmayan ancak fruktoz için yüksek affinitesi olan taşıyıcı proteindir ve en fazla karaciğerde eksprese edilmektedir (19).

GLUT6, düşük afiniteli bir glukoz taşıyıcıdır ve beyin, dalak, düz kas hücrelerinde ifade edilir (20). GLUT7, GLUT taşıyıcıları arasında en yüksek afiniteye sahip olan hem glikozu hem de fruktozu taşıyabilen ancak, galaktoz, ksiloz veya 2-deoksiglukoz affinitesi olmayan bir proteindir. İnce bağırsak, kolon ve testiste ifade edilir (21). GLUT8, glikozu yüksek afinite ile taşır ve bu taşıma aktivitesi fruktoz ve galaktoz tarafından inhibe edilir. Testis, nöronlar ve yağ hücrelerinde ifade edilir (22). GLUT9 böbrek, akciğer ve karaciğerde eksprese edilir ve hem fruktoz hem de ürik asit taşıyıcı olduğu düşünülmektedir (23-25). GLUT11 kalp, iskelet kası ve böbrekte ifade edilir (26) ve glukoz ile fruktozu taşır fakat galaktozu taşıyamaz (15). GLUT10 karaciğer, pankreas, plasenta ve böbrekte ifade edilir ve glukoz, galaktoz ve deoksiglukozu taşır (27)

Bir glikoz ve fruktoz taşıyıcısı olan GLUT12 kalp, iskelet kası ve prostatta ifade edilir (28). İlk olarak MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tanımlanmıştır (29). GLUT13 beyinde glial hücrelerde, GLUT14 ise testiste ifade edilir ve GLUT3'e %95 sekans özdeşliği gösteren ve glikozu taşıyabilen sınıf I izoformlarının en son keşfedilen üyesidir (30).

Tüm GLUT izoformları arasında, GLUT2 ve GLUT5 orijinal olarak insan hücrelerinde fruktoz taşınmasına aracılık edebilen proteinler olarak bildirilmiştir (31, 32), ancak GLUT-5 saf bir fruktoz taşıyıcıdır (33, 34). Bununla birlikte, daha yakın bir zamanda GLUT7, GLUT9, GLUT11 ve GLUT12'nin, GLUT5 (%36-40 özdeşlik) ile yüksek sekans homolojilerine dayanarak fruktoz taşıyıcıları olduğu öne sürülmüştür (21, 35,36) ve in vitro modeller kullanılarak fonksiyonel karakterizasyonları yapılmaya çalışılmıştır (28, 37).

Glukoz alımı, kanser hücrelerinde aerobik glikolizde hız sınırlayıcı bir adımdır. Prensip olarak, glukoz taşıyıcıları geri dönüşümlüdür, ancak dört ana glukoz taşıyıcıdan sadece

GLUT2 yüksek düzeyde geri dönüşümlüdür. Farklı izoformların nispi ekspresyon seviyeleri, farklı memeli dokularında değişiklik gösterir ve genellikle dokunun tüm vücut bağlamındaki işlevi için uygundur. Glukoz için yüksek afiniteye sahip olan GLUT1 birçok kanserde oldukça yüksek seviyelerde ifade edilmesine rağmen, kanser hücreleri ayrıca GLUT2 ve GLUT3'ü de ifade eder (38).

2.1.2. Glikolitik Enzimler

Karbonhidratlar sindirilerek hücre içine alındıktan sonra glikolitik yolda yer alan enzimler ile katalize edilerek enerji üretiminde kullanılırlar. Hekzokinazlar (HK), glukoz metabolizmasının ilk aşamasını katalize eden enzimlerdir. Plazma zarı üzerinde glukoz taşıyıcıları yoluyla taşınan glukoz, glukoz-6-fosfat (G6P) üretmek üzere hekzokinazlar tarafından fosforile edilir. Hekzokinazların aktivitesi, kendi tepkimesinin ürünü olan G6P ile allosterik olarak inhibe edilir (39-43). G6P, glikolizin yanı sıra pentoz fosfat yolu, glikojenez ve heksosamin biyosentetik yolu için bir öncü görevi görür (40-43). Bu nedenle hekzokinazlar, anabolik ve katabolik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Memeli dokularında farklı genler tarafından kodlanan dört hekzokinaz izoformu vardır (41,43-45). HK-I, HK-II, HK-III ve HK-IV'e kıyasla glukoz için daha yüksek afiniteye sahiptir (40,42,43,46).

HK-I beyindeki ana izoformdur, fakat aynı zamanda tüm dokularda ifade edilebilir (42,45). HK-II, adipoz, iskelet ve kalp kası gibi insüline duyarlı dokularda baskın izoformdur (47). HK-III her dokuda açık bir şekilde eksprese edilir ancak herhangi bir dokuda baskın değildir; HK-IV, ekspresyonu öncelikle karaciğer ve pankreas ile sınırlıdır (40-43).

Glikolizin ikinci aşamasında fruktoz-6-fosfat'ın (F6P), fruktoz1-6-bisfosfata (F1,6-BP) dönüşümünü katalize eden tetramerik fosfofruktokinaz1 (PFK1) çoklu pozitif ve negatif regülatörler tarafından kontrol edilir. PFK1 alt birimleri farklı dokularda örneğin kasta (PFKM), karaciğerde (PFKL) ve trombositlerde (PFKP) olacak şekilde farklı genler tarafından kodlanmaktadır (48).

Fruktoz hepatik heksokinaz olan glukokinaz için zayıf bir substrattır. Bunun yerine, ketoheksokinaz (KHK, ayrıca fruktokinaz olarak da bilinir), fruktoz-1-fosfat (F1P) oluşturmak için fruktozu hızlı bir şekilde fosforile eder. KHK'nın yüksek aktivitesi ve

hücresel enerji durumuna karşı duyarsızlığı, fruktozun karaciğere verimli şekilde alınmasını sağlar. F1P, glikolitik/glukoneojenik metabolit havuzlarına giren dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehit 3-fosfata (G3P) metabolize edilir (8).

Gerçekleşmiş glikoliz aşamalarını katalize eden enzimler hem pozitif hem de negatif olarak sıkı bir şekilde kontrol edilir ve allosterik olarak düzenlenir. Yukarıda belirtildiği gibi, birinci işlenmiş aşamayı katalize eden mitokondriyle ilişkili yüksek afiniteli HK-I ve HK-II enzimleri, mitokondriden ayrılmalarına neden olan kendi katalitik ürünleri olan G6P tarafından tamamen inhibe edilir. Bununla birlikte, bu geri bildirim inhibisyon mekanizmasının etkisinin kanser hücrelerinin hızla bölünmesinde minimal olması muhtemeldir, çünkü G6P aşağı akış yollarının artan hızı ile kısa sürede tüketilir (8).

2.1.3. Glukoz Metabolizması

Glukoz, pek çok organizmanın temel yakıtıdır ve metabolizmada merkezi bir konuma sahiptir. Glukoz altı karbonlu bir aldozdur. Metabolik olaylarda karbonhidratlar glukozla çevrilmek suretiyle kullanılır. Sadece mükemmel bir yakıt değil, aynı zamanda dikkat çekici derecede kolay yönelebilen biyosentetik tepkimeler için çok sayıda metabolik ara bileşikleri sağlayabilen bir öncüdür. Potansiyel enerji bakımından göreceli zengindir; glukozun karbondioksit ve suya tam oksidasyonu $-2,840 \text{ kJ/mol}$ 'luk bir standart serbest enerji değişimiyle yürür. Bir hücre glukozun nişasta ve glikojen gibi yüksek molekül ağırlıklı bir polimer olarak depolanmasıyla nispeten düşük bir sitozolik osmolariteyi korurken, çok fazla miktarda heksoz birimleri yığılabilir. Glukoz, enerji gereksinimi aniden arttığı zaman, çabucak bu hücre içi depo polimerlerden açığa çıkar ve aerobik ya da anaerobik olarak ATP üretiminde kullanır (8).

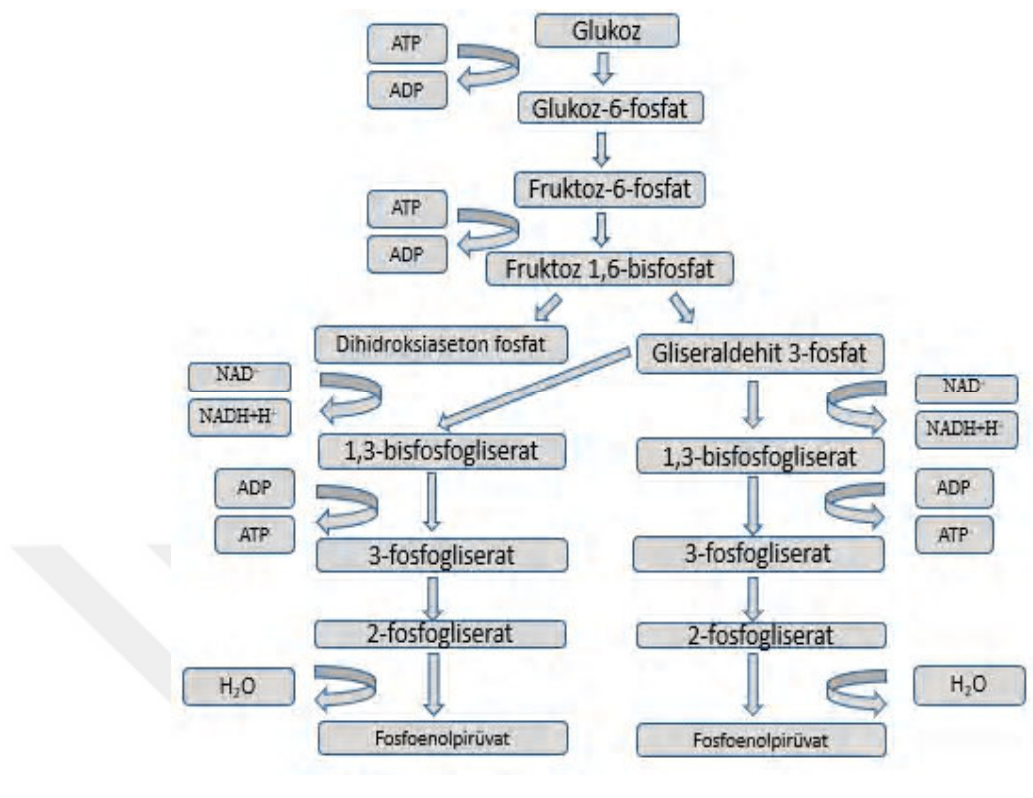
Bitki ve hayvanlarda glukoz üç temel sona sahiptir: depo edilebilir (polisakkarit veya sükroz olarak), glikoliz yoluyla üç karbonlu bileşiklere oksitlenebilir (pirüvat) veya pentoz fosfat yolu ile pentozlara oksitlenebilir (8).

2.1.4 Glikoliz

Glikoliz, bir molekül glukozun enzimlerle katalizlenen bir seri tepkimeyle iki molekül üç karbonlu bir bileşik olan pirüvik asite (pirüvat) kadar yıkılması olayıdır. Glikolizin birbirini izleyen tepkimeleri sırasında, glukozdan çıkan serbest enerjinin bir kısmı ATP

ve nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) şeklinde saklanır. Altı karbonlu glukozun iki molekül üç-karbonlu pirüvata parçalanması on basamakta olur. Bunlardan ilk beşi hazırlık fazını oluşturur. Bu tepkimelerde önce glukozun C-6'daki hidroksil grubu fosforlanır. Böylece oluşan glukoz 6-fosfat, fruktoz 6- fosfata çevrilir, fruktoz 1,6-bifosfatı oluşturmak üzere bu kez C-1'de tekrar fosforlanır. Her iki fosforillenme için fosforil grubu vericisi ATP'dir. Fruktoz 1,6-bifosfat sonraki basamakta iki üç karbonlu moleküle; dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfata ayrılır; bu basamak bu yola ismini veren lizis basamağıdır. Dihidroksiaseton fosfat, ikinci bir gliseraldehit 3-fosfata izomerleşerek glikolizin ilk fazı sonuçlandırılır. Özetle: glikolizin hazırlık fazında ATP enerjisi harcanır, ara bileşiklerin serbest enerjileri artırılır ve metabolize olan tüm heksozların karbon zincirleri genel bir ürün olan gliseraldehit 3- fosfata dönüştürülür (8).

Enerji kazancı glikolizin hizmet fazında gelir. Gliseraldehit 3- fosfatın her bir molekülü oksitlenir ve 1,3-bisfosfoglisarat oluşturmak üzere inorganik fosfatla (ATP'yle değil) fosforlanır. İki molekül 1,3-bisfosfoglisarat, iki molekül pirüvata çevrilirken enerji açığa çıkar. Bu enerjinin büyük kısmı dört molekül adenosin difosfatın (ADP) ATP'ye eşlenir fosforillenmesiyle saklanır. Bütün canlılarda glikoliz reaksiyonları aynı şekilde gerçekleşir çünkü olaylar için tüm canlılarda aynı enzimler görevlidir. Başlangıçta glukozu aktifleştirmek için 2 ATP harcanır. Reaksiyonlar sırasında 4 ATP oluşturulur. 2 NADH meydana gelir. Oluşan NADH'lar oksijenli solunumda elektron taşıma sistemine (ETS) aktarılır ve her birinden üçer ATP elde edilir. Oksijensiz solunumda ise NADH'lar son ürün evresinde tekrar yükseltgenerek bir sonraki glikoliz olayında kullanılır. Kısacası glikolizde substrat düzeyinde fosforilasyonla 4 ATP üretilir ve 2 ATP harcandığı için net kazanç 2 ATP'dir. Ancak oluşan 2 NADH iyonundan dolayı olarak 6 ATP ETS'den kazanılır (8). Glikoliz, aerobik organizmalar ve dokularda aerobik şartlar altında glukozun tam yıkımında sadece ilk aşamadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Glikolizin aşamaları

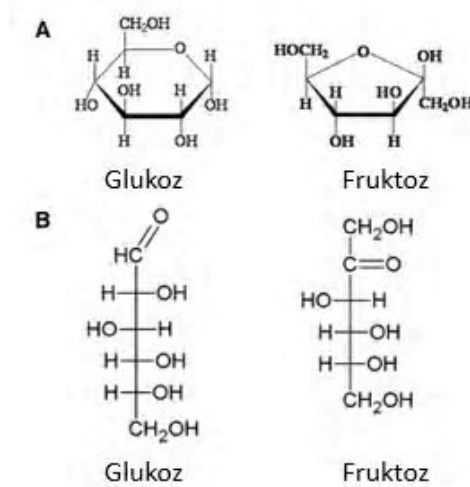
Glikolizin birbirini izleyen tepkimeleri içinde özellikle üç tip dönüşüm dikkate değerdir: glukozun karbon iskeletinin pirüvat oluşturmak üzere yıkılması, glikoliz sırasında oluşan yüksek enerjili fosfat bileşikleriyle ADP'nin ATP'ye fosforillenmesi ve bir hidrid iyonunun, elektronlarıyla birlikte nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) üzerine transferiyle NADH oluşumu gerçekleşmektedir. Pirüvatın yazgısı hücre tipine ve metabolik şartlara bağlıdır. Açığa çıkan pirüvat, karboksil grubunun CO₂ şeklinde kaybı ile oksitlenir, asetil-koenzim A'nın asetil grubunu oluşturur; asetil grubu daha sonra sitrik asit döngüsüyle CO₂'e tamamen oksitlenir. Bu oksidasyonlardan açığa çıkan elektronlar H₂O oluşturmak üzere mitokondrideki bir dizi taşıyıcı aracılığıyla O₂'e geçirilir. Elektron transfer tepkimelerinden açığa çıkan enerji mitokondrideki ATP sentezini sürdürür. Pirüvat için ikinci yol ise laktik asit fermentasyonu yoluyla laktata indirgenmesidir. Kuvvetle kasılabilen iskelet kasları düşük oksijenli hipoksi şartlarında işlev görmek zorunda oldukları zaman, NADH yeniden NAD⁺'ye oksitlenmez ve pirüvatın daha ileri oksidasyonu için birer elektron alıcısı olarak NAD⁺'ye gereksinilir. Bu şartlar altında pirüvat NADH'dan elektronları alarak glikolizin devamı için gerekli

olan NAD^{+} 'yi yenilerken laktata indirger. Glikoliz, sitrik asit döngüsü ve elektron transfer zinciri birlikte glikoz molekülü başına 36 ATP molekülü üretir (8).

2.1.5 Fruktoz Metabolizması

Fruktoz birçok besin maddesinde bulunan altı karbonlu bir monosakkarittir. Günümüzde her ikisi de hemen hemen eşit miktarda glikoz ve fruktozdan oluşan sükroz veya yüksek fruktozlu mısır şurubu formundaki şeker, üretilen birçok gıda ürününe eklenmektedir. Fruktoz tüketimi son 30 yılda çarpıcı bir şekilde artmıştır (49). Şekerle tatlandırılmış içecekler, dünya çapında, diyetlerde ilave bir şeker kaynağıdır. Gazlı içecekler, meyve aromalı içecekler ve spor içecekleri bunlara dahildir. Ortalama olarak, günlük kalori miktarının yaklaşık %7'sine (50) ve diyetle eklenen şekerlerin yaklaşık %50'sine (51) katkıda bulunur. Her ne kadar gazlı içecek tüketimindeki trendler son yıllarda azalmış olsa da, amerikalı gençlerin neredeyse %66'sı günde en az bir bardak şekerli içecek tüketmektedir (52). Şeker alımına katkıda bulunan diğer ana katkı maddeleri arasında, yaşa bağlı olarak günlük enerji alımının yaklaşık %4 ila %9'una katkıda bulunan şeker ve tatlılar bulunmaktadır (51, 53).

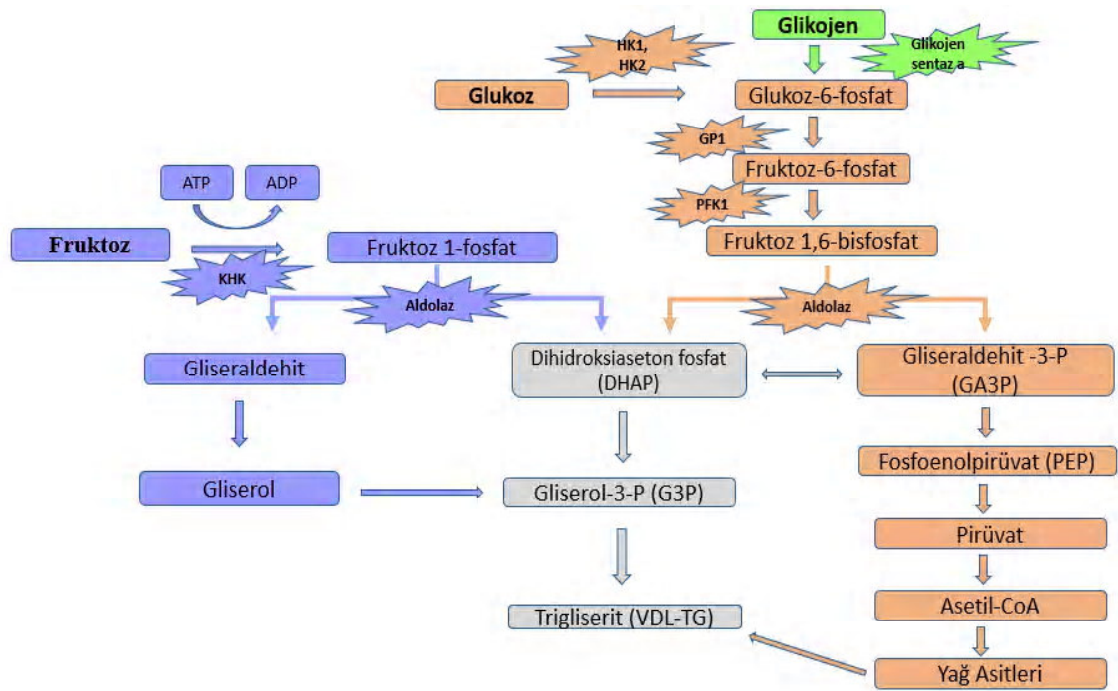
Glukoz ve fruktoz aynı kimyasal formüle sahiptir ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ancak glukozda asimetrik karbon atomu üzerinde aldehid grubu bulunurken fruktozda keton grubu bulunmaktadır (Şekil 2.2.) (10).



Şekil 2.2. Glukoz ve fruktozun kimyasal yapısı (10).

Alınan fruktoz, esas olarak, fruktoz için yüksek afiniteye sahip olan ($K_m = 6 \text{ mM}$) GLUT5 olarak da bilinen heksoz taşıyıcı SLC2A5 yoluyla bağırsak lümeninden pasif olarak emilir. GLUT5, enterositlerin lümen membranında yüksek oranlarda ifade edildiği gibi ve bazolateral yüzeyde de ifade edilmektedir (54). Periferik plazmadaki fruktoz konsantrasyonları tipik olarak yaklaşık $0.04 \text{ milimolardır (mM)}$, fruktoz tüketiminden sonra akut olarak 10 kat artabilir ve 2 saat içinde açlık seviyelerine geri dönebilir (55-57). Bu hızlı değişim, büyük ölçüde karaciğer tarafından fruktozun verimli bir şekilde özütlenmesine aracılık eder. Karaciğer oral glukoz yükünün sadece %15 ila %30'unu, oral fruktoz yükünün %70'ini metabolize edebilir (58, 59). Karaciğer yutulan fruktozun çoğunu metabolize etmesine rağmen, bağırsak kendisi oral fruktoz yükünün %30'una kadar metabolize edebilir (60, 61). Tüm fruktolitik enzimler ince bağırsakta ve özellikle de en yüksek GLUT5 seviyelerinin gözlemlendiği jejunumda yüksek oranda eksprese edilir (62). Fruktoz alımının ardından, plazma fruktozu, portal damarda, yaklaşık 0.2 mM 'lik periferik dolaşım seviyeleri eşliğinde düşük konsantrasyonlarına ulaşabilir, bu da periferik fruktoz konsantrasyonlarının nadiren yüksek mikromolar aralığını aştığını gösterir (63).

Glikoz metabolizması, hücresel metabolik durum ve enerji durumuna göre, karaciğerdeki glikolizde glikolitik akışı sınırlayan fosfofruktokinaz (PFK) basamağıyla sıkı bir şekilde düzenlenir (64). Fruktoz ise ketohekzokinaz (KHK) ile F1P'a fosforile edilir ve daha sonra gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfat oluşturmak üzere aldolaz B ile ayrılır. Hem gliseraldehit hem de dihidroksiaseton fosfat daha sonra gliserol-3-fosfata (G3P) veya gliseraldehit-3-fosfata (GA3P) dönüştürülebilir. Bu triosfosfatlar, fosfolipitler ve triasilgliserol sentezinde omurga oluşturmak için ayrıca metabolize edilebilirler (65). Gliserol-3-fosfat, asıl gliserol moleküllerini üretir ve bunlar daha sonra çok düşük yoğunluklu lipoprotein sentezi için kullanılır (66). Ayrıca, sitozolik asetil-CoA, de novo lipogenez için karbon ve trigliseritlere esterlenen uzun zincirli yağ asitleri için karbon sağlayabilir (67,68). Belirgin bir şekilde, GA3P glikoliz içine girdiğinde, glikokinaz ve G6P'ın iki hız sınırlayıcı aşamasını atlar (Şekil 2.3.) (69).



Şekil 2.3. Fruktoz Metabolizması

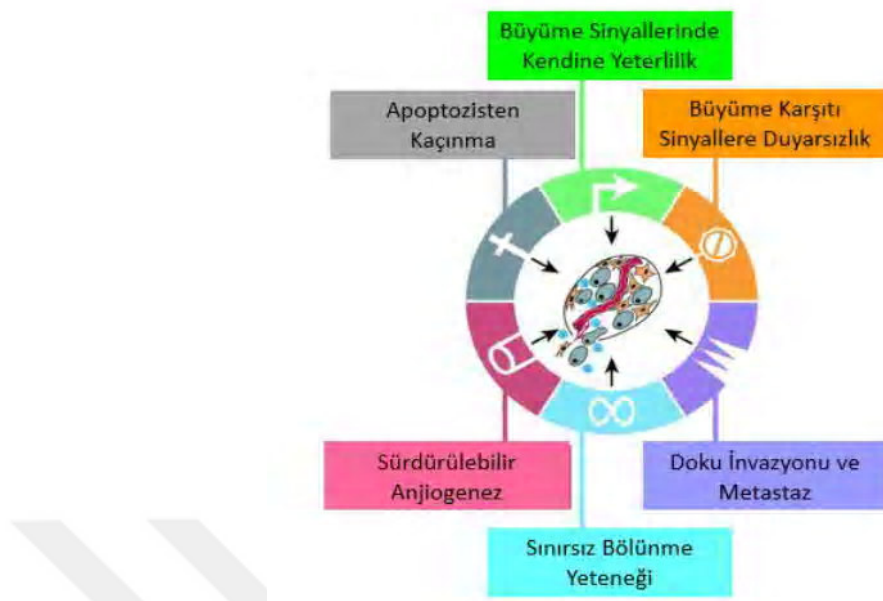
Fruktoz metabolizmasında, KHK, PFK'in aksine insülin ve sitrattan bağımsızdır ve ATP tarafından inhibe edilmez. Bu fruktokinazın sürekli aktivasyonuna izin verir ve herhangi bir negatif geri besleme döngüsüne duyarız kılar. Dahası, KHK iki izoformda bulunur, KHK A ve C, C ana hepatik izoformdur ve glukokinazdan 10 kat daha büyük bir K_m 'ye sahiptir (70). KHK, ATP kullanır ve yüksek fruktoz metabolizması nedeniyle hücre içi ATP ve fosfat seviyelerini hızla tüketir ve ADP ve adenosin monofosfat (AMP) havuzunu artırır. Hepatik fruktoliz sınırsız olduğundan, fruktoz yükleri heksoz ve trioz fosfat havuzlarında glikoliz, glikojenez, glikoneojenez, lipogenez ve oksidatif fosforilasyon dahil olmak üzere tüm merkezi karbon metabolik yolları için potansiyel olarak arttırılmış substrat sağlayan büyük, hızlı gelişimlere neden olabilir (64).

Fruktoz beslenmesi ayrıca ürik asit üretimine katkıda bulunan pürin sentezini uyarabilir (71). Artan dolaşımdaki ürik asit seviyeleri, eklemlerde ürik asit kristallerinin birikmesi nedeniyle ağrılı inflamasyonla karakterize bir durum olan gut riskini artırır (72). Ayrıca, artmış serum ürik asit seviyeleri ve gut, farklı popülasyonlarda diğer kardiyometabolik

risk faktörleriyle ilişkilidir (73-75). Artan ürik asit seviyelerinin bağımsız olarak metabolizmanın önemli yönlerini düzenleyebileceği ve kardiyometabolik riske katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (76-80). Metabolize fruktozun büyük çoğunluğu diyet şeker kaynaklarından elde edilirken, insanlar ve hayvanlar fruktozu endojen olarak sentezleyebilmektedir. Çok çeşitli dokularda aktif olan sorbitol (polyol) yolu, glukozdan endojen fruktoz oluşumundan sorumludur (81,82). Bu yolda, glukoz ilk önce aldoz redüktaz (83) ile sorbitol'e indirgenir. Sorbitol daha sonra sorbitol dehidrojenaz (84) tarafından fruktoza okside edilir. Fizyolojik olarak endojen olarak sentezlenen fruktoz, sperm için birincil enerji kaynağıdır ve doğurganlık için önemli olabilir (85-86). Plasenta ayrıca, gelişmekte olan fetüsün, fruktoz sentezlemek için kullanabileceği sorbitol sentezleyerek, üreme ve gelişim biyolojisinde endojen fruktoz için daha geniş bir rol olduğunu düşündürür (88).

2.2.KANSER

Kanser vücudumuzdaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması ile ortaya çıkan ölümcül bir hastalıktır. Kanser gelişimine yönelik temel görüş; kanser hücrelerinde, genetik faktörler, çevresel etmenler ve yaşam biçimine bağlı olarak normal hücre proliferasyonu ve homeostazı düzenleyen mekanizmalarda bozulmalar meydana geldiği yönündedir. 100'den fazla farklı kanser türü vardır ve spesifik organlarda tümör alt tipleri bulunur. Bu kanser tiplerinin çoğunda hücreler çeşitli faktörlerden etkilense de gelişimleri sırasında benzer fonksiyonel yetenekleri kazanmaktadır (Şekil 2.4.). Bu fonksiyonel değişiklikler aşağıda kısaca açıklanmıştır (1).



Şekil 2.4. Kanser hücrelerinin kazanılmış yetenekleri

2.2.1. Büyüme Sinyallerinde Kendine Yeterlilik

Normal hücreler, pasif durumdan aktif proliferatif duruma geçmeden önce mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duyar. Bu sinyaller; büyüme faktörleri, hücre dışı matris bileşenleri, hücreler arası bağlanma ve etkileşim molekülleri gibi sinyallerdir ve transmembran proteinleri tarafından hücrelere aktarılmaktadır. Bu tür uyarıcı sinyallerin yokluğunda normal hücreler çoğalmaz. Kanser oluşumunda etkin onkogenlerin çoğu, normal büyüme sinyallerini bir şekilde veya benzer şekilde taklit ederek hareket ederler. Sonuç olarak tümör hücreleri kendi büyüme sinyallerinin çoğunu üretebilmekte ve böylece normal doku mikro çevresinden uyarılmaya olan bağımlılıkları azalmaktadır. Ekzojen olarak türetilen sinyallere bağımlılıktan kurtulma, normal olarak, bir doku içindeki çeşitli hücre tiplerinin uygun davranmalarını sağlamak için çalışan, kritik olarak önemli homeostatik mekanizmayı bozar (1,89).

2.2.2. Büyüme Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık

Normal bir doku içinde, çoklu antiproliferatif sinyaller, hücrenin sessizliğini ve doku homeostazını korumak için çalışır. Bu sinyaller hem ekstraselüler matrikse hem de yakın hücrelerin yüzeylerine gömülmüş, hareket edebilen büyüme inhibitör proteinlerini ve sabitlenmiş inhibitör proteinlerini içerir. Büyüme teşvik eden sinyaller gibi bu

büyümeyi durduran sinyaller de hücre içi haberleşme yollarına bağlı transmembran proteinleri tarafından hücrelere alınır (1).

Büyümeyi engelleyici sinyaller iki farklı mekanizma ile proliferasyonu engelleyebilir. Hücreler, aktif proliferatif döngüden, ekstraselüler sinyallerin izin verdiği durumlarda, mitozun sessiz (G0) durumuna geçişe zorlanabilir. Bu duruma alternatif olarak, hücreler, genellikle özelleşmiş farklılaşma ile bağlantılı özelliklerin edinilmesiyle postmitotik durumlara girmeye zorlanarak proliferatif potansiyellerini kalıcı olarak bırakmaya teşvik edilebilir (89).

Kanser hücreleri ise proliferatif sinyalleme bir dizi alternatif yolla sürdürme kabiliyetini kazanabilirler: Otokrin proliferatif stimülasyon ile sonuçlanan, konik reseptörlerin ekspresyonu yoluyla cevap verebilecekleri büyüme faktörü ligandlarını üretebilirler. Alternatif olarak, kanser hücreleri, kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak karşılık veren, destekleyici tümörle ilişkili stroma içindeki normal hücreleri uyarmak için sinyaller gönderebilir (1).

Ayrıca büyüme faktörü bağımsızlığı, bu reseptörlerin aşağısında çalışan sinyal yollarının bileşenlerinin yapısal aktivasyonundan kaynaklanabilir ve bu yolların ligand aracılı reseptör aktivasyonu ile uyarılma ihtiyacını ortadan kaldırır. Bir dizi farklı aşağı akış sinyal yolunun, bir ligand tarafından uyarılan bir reseptörden yayıldığı göz önüne alındığında, bu aşağı akış yollarından birinin veya diğerinin aktivasyonu sadece iletilen düzenleme talimatlarının bir alt kümesini, aktive edilmiş bir reseptör ile yeniden düzenleyebilir (1).

2.2.3.Apoptozisten Kaçınma

Tümör hücre popülasyonlarının sayıca genişleme yeteneği, sadece hücre çoğalması hızıyla değil, aynı zamanda hücre yıpranma hızı ile de belirlenir. Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis hücre için bu yıpranmaya karşı temel korumadır. Fare modellerinde ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların yanı sıra, insan karsinogenezinde biyopsi yapılan evrelerin betimleyici analizleri, apoptozise karşı kazanılan direncin, çoğu ve belki de tüm kanser türlerinin ayırt edici bir özelliği olduğunu göstermektedir (1).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, apoptotik programın vücuttaki hemen hemen tüm hücre tiplerinde, belirti göstermeyen formda da olsa bulunduğunu göstermektedir. Çeşitli fizyolojik sinyaller tarafından tetiklendiğinde, bir dizi aşama ile ortaya çıkmaktadır. Hücresel membranlar bozulur, sitoplazmik ve nükleer iskeletler parçalanır, sitosol membran dışına çıkar, kromozomlar bozulur, nükleus parçalanır ve hepsi 30-120 dk. sonunda yakındaki hücreler tarafından yutulur (90).

2.2.4.Sınırsız Bölünme Yeteneği

Büyüme sinyali otonomisi, büyümeyi durdurma sinyallerine karşı duyarsızlık ve apoptosis'e karşı direnç, hepsi bir hücrenin büyüme programının kendi mikroçevresindeki sinyallerden uzaklaşmasına yol açar. Temelde ortaya çıkan düzensiz proliferasyon programı makroskobik tümörleri meydana getiren geniş hücre popülasyonlarının oluşturulmasını sağlamak için yeterli görünmektedir. Bununla birlikte, son 30 yılda yapılan araştırmalar, hücre-hücre etkileşiminin, tümör büyümesini ilerlettiğine işaret etmektedir. Pek çok ve belki de her tür memeli hücresi, çoğalmasını sınırlayan içsel, özerk bir programa sahiptir. Bu programın, yukarıda tarif edilen hücre-hücre sinyal yollarından bağımsız olarak çalıştığı görülmektedir. Bir klon hücresinin makroskopik, hayatı tehdit eden bir tümör oluşturan bir boyuta yayılması için bu etkileşim bozulmalıdır (1).

Kültürdeki normal hücreler sonlu bir replikatif potansiyele sahiptir. Katlanarak ilerlediklerinde ve belirli sayıda büyümeyi durdurur ve yaşlanma sürecine girerler. Kültüre edilmiş insan fibroblastları yaşlansa da pRb ve p53 gibi tümör baskılayıcı proteinleri devre dışı bırakarak, sonraki kuşaklar için çoğalmaya devam edebilirler. Kültürde çoğaltılan tümör hücrelerinin çoğunun ölümsüzleştirildiği görülmektedir, bu da sınırsız çoğalma potansiyelinin, tümör ilerlemesi sırasında *in vivo* edinilen ve malign büyüme durumunun gelişimi için gerekli olan bir fenotip olduğunu göstermektedir (96). Bu sonuç, çok aşamalı tümör ilerlemesi sırasında bir noktada, premalign hücre popülasyonlarının, mortalite bariyerini ihlali ile sınırsız replikatif potansiyel elde ederek tümörojenik süreçlerini tamamlayabileceğini göstermektedir (1).

2.2.5. Sürdürülebilir Anjiyogenez

Damarlar tarafından sağlanan oksijen ve besinler hücre fonksiyonu ve hayatta kalma için çok önemlidir. Bir dokudaki hemen hemen tüm hücrelerin kapiler kan damarının 100 µm yakınında kalması zorunludur. Organogenez sırasında bu yakınlık, damarların ve parankimin koordineli büyümesi ile sağlanır. Bir doku oluşturulduğunda, yeni kan damarlarının oluşma süreci dikkatle düzenlenir. Yakındaki kılcal damarlara olan bu bağımlılık nedeniyle, bir doku içindeki çoğalan hücrelerin kan damarı büyümesini teşvik etmek için içsel bir kabiliyete sahiptir. Anormal proliferatif lezyonların içindeki hücreler başlangıçta anjiyojenik yeteneklerden yoksundur ve bu durum genişleme kabiliyetlerini kısıtlar. Daha büyük bir boyuta ilerlemek için, yeni başlayan neoplazi anjiyojenik yetenek geliştirmelidir (92-94). Tümörler anjiyogenez indükleyicileri ve karşı inhibitörlerin dengesini değiştirerek anjiyojenik molekülleri aktive ederler (95). Tümörlerde angiogenesisin indüklenmesi ve sürdürülmesinin önemine dair oldukça fazla deneysel kanıt mevcuttur (92-94). Yaklaşık 30 yıl önce Folkman ve arkadaşları, tümör eksplantlarının hızla büyümesi için angiogenesis gerekliliğini göstermek üzere in vivo biyoanalizler kullanmıştır (93). Bunlar vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antikorumun (95) ve VEGF reseptörü 2'nin (96) neovaskularizasyonu ve farelerde subkutanöz tümörlerin büyümesini bozduğunu moleküler olarak kanıtlayan çalışmalardır. Her iki sonuç da şimdi geç aşama klinik çalışmalarda olan spesifik VEGF/VEGF-R inhibitörlerinin gelişimini motive etmiştir.

2.2.6.Doku İnvazyonu ve Metastaz

Er ya da geç insan kanserlerinin çoğunun gelişmesi sırasında, birincil tümör kütleleri, etrafındaki dokuları istila eden ve yeni koloniler kurmayı başarabilecekleri uzak yerlere giden öncü hücreler ortaya çıkarır. Tümör hücrelerinin bu uzak yerleşimleri - metastazlar- insan kanser ölümlerinin %90'ının sebebidir (97). İnvazyon ve metastaz yeteneği, kanser hücrelerinin primer tümör kütesinden kaçmasına ve en azından başlangıçta besin ve alanın sınırlayıcı olmadığı vücutta yeni yerlerde kolonize olmasına imkan sağlar. Yeni oluşan metastazlar, kanser hücrelerinin ve konakçı dokudan alınan normal destekleyici hücrelerin amalgamları olarak ortaya çıkar. Primer tümör kütesinin oluşumu gibi, invazyon ve metastazın başarılması, diğer beş özelliği edinme yeteneğine bağlıdır (1).

Tümörlerin proliferasyon gösteren kanser hücresi kitlesinden oluştuğu ve bu hücre kitlesinin belli başlı özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Artık tümör dokularının birbirleriyle heterotipik etkileşimlere katılan çok sayıda farklı hücre tipinden oluşan karmaşık dokular olduğu ve tümörle ilişkili stromal hücrelerin, bazı ayrıcalık özelliklerinin geliştirilmesi ve ifadesine katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. Takip eden yıllar boyunca çalışmalar tümörlerin biyolojisinin kanser hücrelerinin özelliklerini sıralamakla artık anlaşılamayacağını, bunun yerine “tümör mikroçevresinin” tümör oluşumuna katkılarını kapsaması gerektiğini ortaya konmuştur (98).

Normal dokular, hücre sayısını, normal doku mimarisini ve fonksiyonunu korumak için hücrenin büyüme ve bölünme döngüsünü başlatan, büyümeyi teşvik eden sinyallerin üretimini ve salımını dikkatli bir şekilde kontrol eder. Kanser hücreleri, bu sinyalleri deregüle ederek, kendi kaderlerinin efendisi olurlar. Etkinleştirme sinyalleri, büyük ölçüde, hücre içi reseptörleri bağlayan, tipik olarak hücre içi tirozin kinaz alanlarını içeren büyüme faktörleri tarafından iletilir. İkincisi, hücre döngüsü yanı sıra hücre büyümesi (hücre boyutunda artış) sırasında ilerlemeyi düzenleyen hücre içi sinyal yolları aracılığıyla sinyaller yaymaya devam eder. Bu sinyaller genellikle hücre sağ kalımı ve glikoliz metabolizması gibi diğer hücrenin biyolojik özelliklerini etkiler (98).

2.3. KANSER METABOLİZMASI

Yirmi yıl öncesine kadar, hücresel glukoz metabolizması ve genel olarak kanser metabolizması, kanser biyolojisinin ana dalları olarak görülmezken, günümüzde kanser biyolojisinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Kansere karşı geliştirilmeye çalışılan tedavi yöntemleri metabolizmalarında meydana gelen değişikliklerin tespiti ve üzerinden yoğun bir şekilde ortaya konmaya çalışılmaktadır.

2.3.1. Kanserde Glukoz Metabolizması

Tüm kanser hücrelerinin glikoz metabolizmasını yeniden programlamak için kullandığı bilinen hiçbir evrensel mekanizma yoktur, ancak kanser hücrelerinin glikolizde işlenen aşamaları, glikoz alımının yanı sıra anabolitleri üretmek üzere modüle edip kullanmak için izledikleri ortak bir yol vardır. Metabolik anormallikler kanserin ayırt edici özelliğidir. Warburg'un hipotezine göre, kanser hücreleri daha verimli oksidatif fosforilasyon yerine ana glukoz metabolizması modu olarak aerobik glikolizi seçer (5).

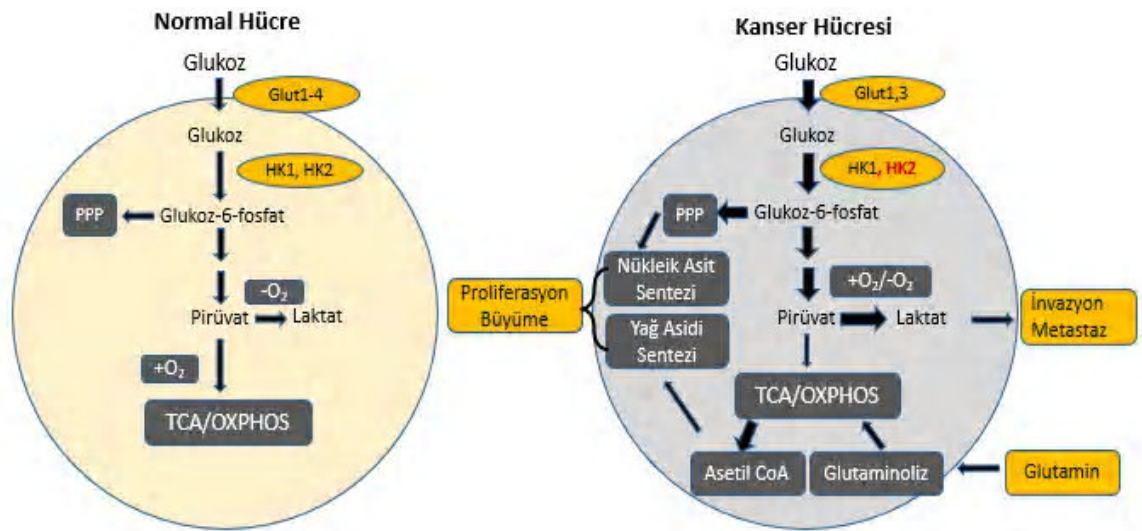
Bu durumda normal hücrelerin aksine, hızlı proliferen olan kanser hücreleri bir molekül glukozdan elde edilen ATP miktarı çok az olmasına rağmen glukozu aerobik ortamda laktata dönüştürür (4). Aslında bu davranışları, proliferen olan hücrelerin hipoksik şartlara duyarsız olmalarını sağlar ve hücre göçünü, yeni damar oluşumunu, immun sistemden kaçışı ve radyoaktif direnci geliştirerek tümör invazyonunu arttırmak üzere kanser dokusuna avantaj sağlar (7,98,99). Ayrıca kanser dokularında meydana gelen artmış glukoz alımı sayesinde nükleozidlerin ve aminoasitlerin üretimine katkıda bulunmakta ve enerji üretimi için çok hızlı bir yol oluşturmaktadır (6,7). İnsan kanserlerinin %70'inden fazlasında, glikolitik genler her yerde aşırı eksprese edilmektedir (100,101).

Geliştirilmiş aerobik glikoliz, aerobik oksidasyon anlamına gelmez, başta mitokondri disfonksiyonunun, tümör baskılayıcıların kaybının, hipoksik mikro-ortam ve onkojene bağlı metabolik yeniden programlamanın kanser hücrelerinin anormal enerji metabolizması olaylarını başlattığı düşünülmektedir (102). Ancak yapılan son araştırmalarda, çoğu kanserde mitokondri fonksiyonunun sağlam olduğunu bildirmiştir (103, 104). Warburg etkisi esas olarak maksimum glikoliz oranları ve piruvat oksidasyonu arasındaki dengesizliğin bir sonucudur (105).

Aerobik glikolizde piruvat, laktik asit dehidrojenaz-A (LDHA) ile laktik aside dönüştürülür. Laktik asitlerin kanser hücrelerinde birikmesi, proton bağlı monokarboksilat taşıyıcı (MCT), özellikle MCT1 (106) ve MCT4 tarafından laktik asit taşınmasını teşvik eder (107,108). MCT'lerin sitoplazmadan hücre dışı sıvıya laktik asit salgılanmasını hızlandırmak için yüksek miktarlarda eksprese edildiği bulunmuştur ve bu durum tümör mikro ortamında pH'ı 6,6'ya kadar düşürür (109). Mikro-ortamın asitleşmesine esas olarak kanser hücrelerinden salgılanan laktik asit neden olur (110). Laktik asit, normoksik oksidatif tümör hücrelerinde bile VEGF (111, 112), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) (113), interlökin-1 (IL-1) ve mTOR sinyal yolağına bağlı hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α)'i aktive eder (114).

HIF-1, glikoz metabolizması değişimi sırasında önemli bir düzenleyicidir. Bu yüzden daha yüksek laktik asit, kanser hücrelerinde glikolizi arttırmak için kısır bir döngüye neden olabilir. Daha yüksek VEGF ayrıca endotelial hücre göçünü ve dolaşımdaki vasküler progenitor hücrelerin ve vasküler morfogenezin oluşumunu uyarak tümör anjiyogenezini indükler (98).

Tümör, farklı hücrelerin alt popülasyonlarından oluşur. Hipoksik ortamdaki kanser hücreleri, değiştirilmiş enerji metabolizması yolu olarak aerobik glikolizi kullanarak yüksek seviyelerde glikoz tüketir, sitoplazmadan yüksek seviyelerde laktik asit salgılar. Çok sayıda oksijen desteği içeren kan damarlarının yakınındaki kanser hücresi, tercihen ana enerji kaynağı olarak laktik asidi kullanır. Bu yüzden, laktik asit bir atık değildir, enerji olarak yeniden kullanılır, farklı kanser alt popülasyonları arasında enerji aktarımı yapar (Şekil 2.5.) (98).



Şekil 2.5. Normal hücreler ve kanser hücreleri arasındaki metabolik farklılıklar gösterilmiştir.

Normal hücrelerde, glukoz, sitrik asit döngüsü ve mitokondride oksidatif fosforilasyon işlemi yoluyla tamamen CO₂'e okside olan piruvata metabolize edilir. Sadece O₂ sınırlı ise piruvat laktata metabolize olur. Kanser hücreleri, O₂'nin varlığına bakılmaksızın (Warburg etkisi) çoğu glukozu laktata çevirir. Laktatın salgılanması, tümörün ilerlemesini kolaylaştırır. Glikolitik yol boyunca artan glukoz kullanımı, nükleik asitlerin pentoz fosfat yolu boyunca sentezi için kullanılan glukoz-6-fosfat gibi metabolik ara maddeler üretir. Glutaminoliz sırasında üretilen glutamat, sitrik asit döngüsüne yakıt ikmali yapmak için ana substrat görevi görür. Sitrat türevli asetil CoA, lipid üretimi için kullanılır. Nükleik asit ve lipidlerin artan sentezi, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini teşvik eder (Şekil 2.5).

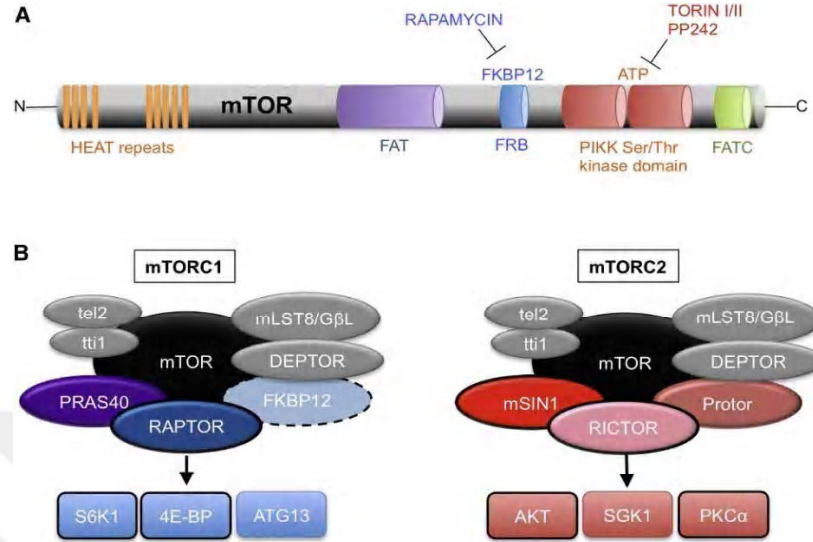
Kansere karşı immün yanıtta, mikro-ortamdaki yardımcı hücelere ve sitokinlere bağılı efektör T-hücelerinin aracılık ettiğı bilinmektedir. Tümör immünitesi, çevresel pH'dan da etkilenir, mikro-ortamdaki asidik pH, immün hücelerin tepkisini belirgin bir şekilde zayıflatabilir (115). Mikro-ortam asitliğinin fizyolojik değrlere doğru modülasyonu, tümör içine sızan T lenfositlerinin enerjisini tersine çevirir (116).

2.4. mTOR SİNYAL YOLAĞI

İzole edilmiş Güney Pasifik adası olan Rapa Nui'ye (Paskalya Adası olarak da bilinir) 1964 yılında Kanadalı bir kaşifin yaptığı keşif gezisinde, yeni antimikrobiyal ajanları belirlemek amacıyla bir dizi toprak örneğı toplandı. Bu örneklerden izole edilen bakterilerde, Sehgal ve arkadaşları, dikkate değer bir antifungal, immünosüpresif ve antitümör özelliklerine sahip bir bileşik keşfetti (116-118). Bulunduğı bölgeden sonra rapamisin olarak adlandırılan bu bileşiğın daha ileri analizleri yapıldığında (klinik olarak sirolimus olarak adlandırılmaktadır), kısmen hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli olan sinyal iletim yollarını inhibe etmek için FK506 bağlayıcı protein 12 (FKBP12) peptidil prolizomeraz ile kompleks oluşturarak hareket ettiğı ortaya çıkarıldı (119). Bu öngörülere rağmen, rapamisinin tam etki mekanizması, mTOR'un ‘‘memelilerde rapamisin FKBP12 kompleksinin’’ doğrudan hedefi olarak tanımladığı 1994 yılına kadar belirsiz kaldı (120). Bu keşiflerden bu yana geçen otuz yıldan uzun bir süre içinde, dünya genelinde yapılan çalışmalar, mTOR protein kinazının, hücre büyümesini çevresel koşullarla koordine eden ve hücre ve organizmal fizyolojisinde temel bir rol oynayan büyük bir ökaryotik sinyal ağı oluşturduğunu ortaya koydu (121).

mTOR sinyal yolağının, ribozom biyojenezi ve protein, nükleotit, yağ asidi ve lipid sentezi gibi anabolik süreçleri teşvik ettiğı ve otofaji gibi katabolik süreçleri inhibe ettiğı gösterilmiştir (121). mTOR, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ile ilişkili kinaz (PIKK) familyasındaki mTOR Kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR Kompleksi 2 (mTORC2) olarak bilinen iki ayrı protein kompleksinin katalitik alt ünitesini oluşturan serin/treonin protein kinazdır. mTORC1 rapamisin duyarlıdır ve üç ana bileşeni ile tanımlanır: mTOR, Raptor (mTOR ile bağlantılı düzenleyici protein) ve mLST8 (Secl proteini 8, GBL olarak da bilinir) (122). Rapamisin-FKBP12 kompleksi doğrudan mTORC1'i inhibe ederken, mTORC2, akut rapamisin tedavisine duyarsızlığı ile karakterize edilir. mTORC1 gibi, mTORC2 de ayrıca mTOR ve mLST8 içerir. Bununla birlikte, Raptor

yerine, mTORC2, muhtemelen benzer bir fonksiyona hizmet eden bir protein olan Rictor (mTOR'un rapamisine duyarsız bölümü) içerir (Şekil 2.6.) (123, 124).



Şekil 2.6. mTOR kinazının domain yapısı ve protein komplekslerinin bileşenleri (132).

mTORC1'in aktivasyonu besinlere ve büyüme faktörlerine bağlıdır. Besin maddelerine cevap olarak, mTORC1 sitoplazmadan lizozomal yüzeye geçer, burada PI3K sinyal yolağı yoluyla büyüme faktörleriyle aktive edilir. Büyüme ve bölünme için hücrelerin protein, lipid ve nükleotit üretimini arttırması ve aynı zamanda otofaji gibi katabolik yolları bastırması gerekir. mTORC1, tüm bu işlemlerin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar ve bu nedenle çevresel koşullara cevap olarak anabolizm ve katabolizma arasındaki dengeyi kontrol eder (123). mTORC1, büyük ölçüde iki anahtar efektör olan p70S6 Kinaz 1 (S6K1) ve eIF4E Bağlayıcı Protein (4EBP) fosforilasyonu yoluyla protein sentezini destekler. mTORC1, S6K1'i hidrofobik motif bölgesi Thr389 üzerinde doğrudan fosforile eder, daha sonra fosfoinositide bağımlı kinaz-1 (PDK1) ile fosforilasyon ve aktivasyonunu sağlar (125). S6K1, 50 başlık bağlama eIF4F kompleksinin pozitif bir regülatörü olan eIF4B (126) dahil olmak üzere, mRNA çevirisi başlatmasını destekleyen birkaç substratı fosforiller ve aktive eder. S6K1 ayrıca, eIF4B'nin bir inhibitörü olan Programlanmış hücre ölümü 4'ün (PDCD4) bozulmasını fosforile eder ve ekson birleşme komplekslerinin bir bileşeni olan SKAR ile etkileşimi yoluyla eklenmiş mRNA'ların çeviri etkinliğini arttırır (127). Büyüyen hücreler, yeni membran oluşumu ve genişlemesi için yeterli lipid ihtiyacı duyar. mTORC1, sterol yanıt veren element bağlayıcı protein (SREBP) transkripsiyon faktörleri yoluyla de novo lipid sentezini teşvik eder; bu, yağ asidi ve kolesterol biyosentezine katılan metabolik

genlerin ekspresyonunu kontrol eder (128). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, mTORC1'in ayrıca, DNA replikasyonu için gerekli nükleotidlerin ve büyüyen ve çoğalan hücrelerde ribozom biyogenezinin sentezini desteklediğini ortaya koymuştur. Ayrıca mTORC1, purin sentezi için bir karbon birimi sağlayan mitokondriyal tetrahidrofolat döngüsünün bir anahtar bileşeni olan MTHFD2'nin ATF4'e bağlı ekspresyonunu artırır (129). Ek olarak, S6K1, de novo pirimidin sentez yolunun kritik bir bileşeni olan karbamoil-fosfat sentetaz (CAD) 'ı fosforiller ve aktive eder (130).

mTORC1 glikoz metabolizmasında oksidatif fosforilasyondan glikolize geçişi teşvik ederek büyümeyi kolaylaştırır; bu, muhtemelen besinlerin yeni biyokütle içine dahil edilmesini kolaylaştırır. mTORC1, KHK gibi birkaç glikolitik enzimin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörü HIF1α'nın ekspresyonunu artırır (131). Dahası, SREBP'nin mTORC1'e bağlı aktivasyonu, NADPH ve proliferasyon ve büyüme için gerekli diğer ara metabolitleri üretmek için glikozdan karbonları kullanan oksidatif pentoz fosfat yolu (PPP) boyunca artan akı sağlar (123).

mTORC1'e bağlı artan anabolizmaya doğru kayma, sadece büyüme sonrası endokrin sinyallerinin yanı sıra makromoleküler sentez için yeterli enerji ve kimyasal yapı bloklarının varlığında meydana gelmelidir. Memelilerde, bu girdiler büyük ölçüde diyetle bağlıdır, öyle ki mTORC1, karaciğer ve kas gibi dokularda büyüme ve enerji depolanmasını teşvik etmek için beslenmeyi takiben aktive edilir, ancak açlık durumu sırasında inhibe edilir, sınırlı kaynakları korur (123). mTORC1 ayrıca düşük ATP seviyeleri, hipoksi veya DNA hasarı gibi büyümeyle uyumlu olmayan hücre içi ve çevresel streslere de cevap verir (132).

Glikoza bağımlı insülin salımına ek olarak, beslenme aynı zamanda diyet proteinlerinin sindirimi nedeniyle serum amino asit seviyelerinde bir artışa yol açar. Amino asitler sadece proteinlerin temel yapıtaşları değil aynı zamanda birçok diğer metabolik yol için enerji ve karbon kaynakları olduğu için mTORC1 aktivasyonu, amino asit konsantrasyonlarındaki diyetle bağlı değişikliklere sıkı sıkıya bağlıdır (133).

2.5. KANSER HÜCRE HATLARI

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore'da 1951 yılında serviks kanseri nedeniyle takip edilen Afro-Amerikan bir hastanın kanser dokusundan elde edilen hücreler laboratuvarında ilk defa çoğaltılarak kültürü yapılmıştır. Henrietta Lack adındaki hasta kanserin ilerlemesi sonucu 4 Ekim 1951'de ölmüş ancak ölümsüz hücrelerinin kültürü adına ithafen "HeLa" adı ile dünya genelindeki laboratuvarlara deneysel amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilibilmeleri çalışmalarda hücre kültürü gerektiren araştırmalara hız kazandırmıştır. Ancak, ilerleyen süre içerisinde Stanley Gartler 1966'da Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection=ATCC) kurumunda saklanan 20 insan hücresinin 18'inin kromozomal ve biyokimyasal olarak HeLa hücreleri ile tıpatıp aynı olduğunu bildirmiş ve 1968 yılında bu durumu Nature dergisinde yayınlamıştır. ATCC kayıtlarına göre beyaz ırktaki bireylerden elde edilmiş olmalarına rağmen, sıklıkla Afro-Amerikanlarda bulunan A tipi G6P enzim aktivitesi göstermeleri, bu hücrelerin HeLa hücreleri ile kontamine olduğunu göstermiştir (134-137). Çalışmalarda kullanılan hücre hatları geçmişe yönelik endişeleri taşımakla beraber günümüz teknolojisinin getirdiği olumlu koşullar ile daha kontrollü üretilmekte ve çok sayıda çalışmada aktif olarak kullanılmaktadır. Kullanılan bu hücre hatları insan, fare, rat, maymun, balık, hamster gibi farklı canlılardan elde edilebildiği gibi farklı hastalıklara yönelik deney modelleri oluşturacak şekilde tasarlanabilmektedir. Bu çalışmada Mus musculus farenin meme bezinden elde edilen 4. evrede epitelyal ve yapışkan özellikteki 4T1 (ATCC® CRL-2539™) kanser hücre hattı, insan (kadın) meme kanseri dokusundan elde edilen epitelyal ve yapışkan özellikteki MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) kanser hücre hattı ve insan (erkek) karaciğer dokusundan elde edilen epitelyal ve yapışkan özellikteki HEPG2 (ATCC® HB-8065™) kanser hücre hattı kullanılmıştır.

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler Aletler

- Laminer airflow (BioTech 20)
- Flouresan Mikroskop (Olympus DP71)
- Konfokal Mikroskop (Zeiss Primo Vert)
- Buzdolabı (Vestel +4 °C)
- Derin Dondurucu (Vestel -20°C)
- Derin Dondurucu (New Brunswick -80°C)
- Otomatik Mikropipetler (Thermo Scientific)
- Otomatik Makropipet (Thermo Scientific)
- Soğutmalı Santrifüj (Thermo Scientific)
- Benmari Küveti (GFL 1052)
- Sonikatör (Bandelin Sonopuls)
- Mikro santrifüj (Thermo Scientific, Micro CL17R)
- İnkübatör (Panasonic)
- Multimod Mikroplate Okuyucu (Thermo Scientific, Varioscan LUX)

3.1.2 Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

- Besiyeri (Gibco DMEM 1X, Capricorn RPMI 1640, Sigma DMEM High Glucose, Sigma DMEM No Glucose)
- D-Fruktoz (Biomass Ultra Pure %99)
- Fetal Sığır Serum (Gibco 10270)

- Tripsin Edta (Capricon)
- Penisilin Streptomisin (Sigma, Penisilin:10000 units/mL+streptomisin 10mg/mL)
- Fosfat Buffer Salin (Thermo Scientific, pH;7,4)
- L-Glutamin (Gibco, 200mM, 20 mL)
- Kültür Flaskları ve Petri Kapları (Corning 25cm², 75 cm², 125 cm²)
- Primer Antikorlar (Hexokinase I, Hexokinase II, Ketoheksokinaz (fruktokinaz), S6 Ribozomal Protein, pS6 Ribozomal Protein, Glut I, Glut II)
- Paraformaldehid
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Sekonder antikor (Anti-Rabbit IgG, F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate))
- Normal Donkey Serum
- Falkon tüpler (15 ml, 50ml)
- Pipet uçları (0.5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)
- Serolojik Pipetler (5ml, 15ml, 25ml)
- Cryo Tüpler
- DAPI içeren kapatma solüsyonu
- Polilizinli lam ve lamel
- Triton™ X-100

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücre Hatları

Bu çalışmada farklı kanser hücre hatlarının glukoz ve fruktoz kullanım kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bunun için Erciyes Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda kullanılan aşağıda özellikleri belirtilen kanser hücre hatları kullanılmıştır.

- 4T1 hücre hattı (ATCC® CRL-2539™): Musculus farenin meme bezinden elde edilen 4. evrede epitelyal ve yapışkan özellikteki kanser hücre hattıdır.
- MDA-MB-231 hücre hattı (ATCC® HTB-26™): İnsan (kadın) meme kanseri dokusundan elde edilen epitelyal ve yapışkan özellikteki kanser hücre hattıdır.

- HEPG2 hücre hattı (ATCC® HB-8065™): İnsan (erkek) karaciğer dokusundan elde edilen epitelyal ve yapışkan özellikteki kanser hücre hattıdır.

3.2.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması

Laboratuvar ve çalışma ortamı çalışmaya başlamadan önce ve günlük çalışma tamamlandıktan sonra %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Bütün malzemeler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda ısıtıldıktan sonra %70'lik alkol ile temizlenerek steril kabin içine alındı ve deney gruplarına göre besiyerleri hazırlandı. Protokollerde hücre hatlarına özgü belirtilen besiyerleri kontrol ve deney grupları arasında farklılık ortaya çıkmaması için DMEM/F12 olarak standart tutuldu.

Yüksek glukoz (HG) gruplarının besiyeri; DMEM/F12, yüksek glukoz (4500 mg/L glukoz) içeren besiyerine %10 fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, 50 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı.

Yüksek fruktoz (HF) gruplarının besiyeri; DMEM/F12, glukozsuz, fruktozsuz media içerisine 4500 mg/L fruktoz (%99 ultra saf D-fruktoz Bioss), %10 fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, 50 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı.

Kontrol gruplarının besiyeri; standart DMEM/F12 %10 fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, 50 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı.

Hazırlanan besiyerleri 0,22 µm filtreden geçirildi ve +4°C'de saklandı ve her kullanımdan önce 37°C sıcaklığındaki su banyosunda ısıtıldı.

Tablo 3.1. Deney grupları ve besiyeri içerikleri.

HücreHattı	Deney Grupları ve Besiyeri İçerikleri		
4T1	Yüksek Glukoz 24 saat	Yüksek Fruktoz 24 saat	DMEM/F12 24 saat
	Yüksek Glukoz 48 saat	Yüksek Fruktoz 48 saat	DMEM/F12 48 saat
	Yüksek Glukoz 72 saat	Yüksek Fruktoz 72 saat	DMEM/F12 72 saat
MDA-MB-231	Yüksek Glukoz 24 saat	Yüksek Fruktoz 24 saat	DMEM/F12 24 saat
	Yüksek Glukoz 48 saat	Yüksek Fruktoz 48 saat	DMEM/F12 48 saat
	Yüksek Glukoz 72 saat	Yüksek Fruktoz 72 saat	DMEM/F12 72 saat
HEPG2	Yüksek Glukoz 24 saat	Yüksek Fruktoz 24 saat	DMEM/F12 24 saat
	Yüksek Glukoz 48 saat	Yüksek Fruktoz 48 saat	DMEM/F12 48 saat
	Yüksek Glukoz 72 saat	Yüksek Fruktoz 72 saat	DMEM/F12 72 saat

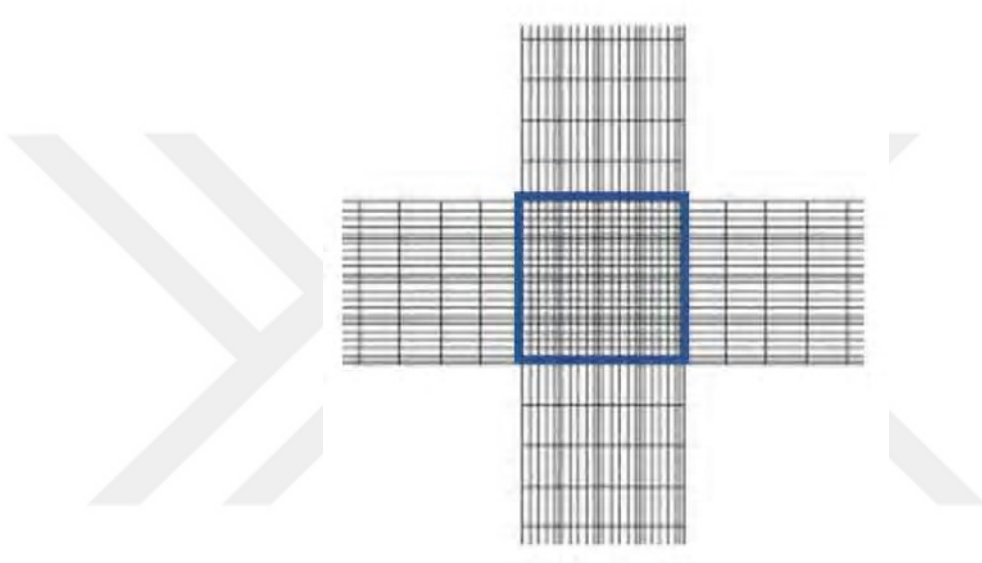
3.2.1.3. Hücrelerin Çözdürülmesi

Falkon tüplerin içine deney gruplarına göre 5 ml ilgili besiyeri eklendi ve -80 °C'deki cryo tüp içerisinde bulunan hücreler 37°C'de hızla çözdürülerek bu besiyeri içine alındı. Hücreler 1800 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atılarak 15 ml taze besiyeri eklendi. Yavaşça pipetleme yapılarak T-25 flaska alındı 37°C'de %5 CO₂ ve nemlendirilmiş inkübatör içine yerleştirildi. Ertesi gün besiyeri değiştirilerek %70-80 oranında çoğalana kadar günlük olarak besiyerleri değiştirildi.

3.2.1.4. Hücrelerin Sayılması ve Pasajlanması

Hücreler konfokal mikroskop altında incelenerek %70-80 oranında çoğaldıktan sonra flask içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kez steril PBS ile yıkandı. Flaska 2,5 ml Tripsin-EDTA (%0.25) eklenerek 3 dk boyunca 37°C'de %5 CO₂ ve nemlendirilmiş inkübatör içinde bekletildi. Sonrasında kontrol edilerek eğer hücreler yüzmüyorsa 1dk daha bekletilerek tüm hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Hücrelerin zarar görmesini engellemek için hızlıca eklenen tripsinin 2 katı kadar (5 ml) besiyeri eklendi ve içerik 15 ml'lik falcon tüp içine alındı. 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 10 ml taze besiyeri eklendi. Hücre sayımı için hücreler 1:1 oranında tripan mavisini muamele edilerek Thoma lamında sayıldı. 1ml içindeki hücre sayısı= Thoma lamında sayılan ortalama hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10⁴ formülü kullanılarak hesaplandı.

Ortalama hücre sayısı 3 defa 1 mm² 'lik alandaki 16 kare sayıldıktan sonra, toplam hücre sayısının 3'e bölünmesiyle elde edildi. Her 1 mm² alan hacim olarak 0.1 mm³ 'e, bu da 10⁴mL'ye eşit olduğu için, mL'deki hücre sayısını bulmak için 10⁴ ile çarpıldı. Alınan örnek hacmine eşit miktarda tripan mavisi konulduğu için 2 kat seyreltme yapıldı, bu yüzden 2 ile çarpıldı. Hücrelerin homojen dağılması için pipetleme yapılarak flasklara ekim yapıldı (4x10⁵-1x10⁶) ve flasklar inkübatöre yerleştirildi. Deneylerin üç kere tekrar edilerek yapıldı.



Şekil 3.1. Thoma Lamı

3.2.1.5. Hücrelerinin Dondurulması

Flask içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kez steril PBS ile yıkandı. Flaska 2,5 ml Trypsin-EDTA (%0.25) eklenerek 3 dk boyunca 37°C'de %5 CO₂ ve nemlendirilmiş inkübatör içinde bekletildi. Sonrasında kontrol edilerek eğer hücreler yüzmüyorsa 1dk daha bekletilerek tüm hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Hücrelerin zarar görmesini engellemek için hızlıca eklenen tripsinin 2 katı kadar (5 ml) besiyeri eklendi ve içerik 15 ml'lik falcon tüp içine alındı. 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 1900 µl besiyeri ile dikkatlice dağıtıldı ve içerik cryo tüp içine alınarak 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve tarihi ile pasaj sayısı yazılarak -80°C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2. İmmünflouresan Boyamalar

Hücreler lamların üzerine ekildi ve deney gruplarına göre besiyeri kullanılarak, 37°C'de %5 CO₂ nemlendirilmiş inkübatör içinde deney gruplarına göre belirlenen sürelerde immünflouresan boyamalar için kültüre edildi. Lamlar PBS ile yıkanarak %4'lük paraformaldehid içine alındı. Hücreler 15 dk boyunca tespit oluktan sonra 3 kez PBS ile yıkandı. Bloklama tamponu (1X PBS %5 normal serum %0,3 Triton TM X-100) ile 60 dk boyunca muamele edildi. Primer antikor olarak GLUT1, GLUT2, HK1 ve pS6 kullanıldı. Antikorlar üretici firmaların talimatları doğrultusunda antikor dilüsyon tamponu (1X PBS %1 BSA %03 Triton TM X-100) ile dilüe edilerek hazırlandı. Bloklama tamponu uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan primer antikorlar uygulanarak lamların yüzeyi coverslip ile kapatıldı ve +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 3 kere 5 dk boyunca PBS ile yıkama yapıldı. Örnekler antikor dilüsyon tamponu ile seyreltilen sekonder antikorda oda sıcaklığında 1-2 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Karanlık ortamda 3 kere 5 dk boyunca PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 4 ', 6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroklorür (DAPI) içeren kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Olympus (DP71) flouresan mikroskopta görüntülenerek DP Maneger programında her bir gruptan 10 adet fotoğraf çekildi. Çekilen her bir fotoğraftan 100 hücrenin yoğunluğu Image J programı ile ölçülerek ‘‘Yoğunluk = Entegre Yoğunluk-(Seçilen hücrenin alanı X Arka plan okumalarının ortalama floresanı)’’ formülüne göre hesaplandı.

3.2.3 Western Blot

Western Blot analizi yapmak için hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılıp steril PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler flasklardan kazıyıcı ile kaldırılarak 2 ml ependorf tüplere alındı 1500 rpmde santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve kalan pellet üzerine 500 ml ripa lizis tamponu eklendi. Hücrelerin parçalanması için her 3 dk da bir vortekslenerek 15 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Sonrasında sonikatör yardımıyla pelletin parçalanması sağlandı. Ardından 10000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatantlar yeni ependorflara alınarak proteinlerin konsantrasyonu Bradford tekniğiyle belirlendi. Kullanılincaya kadar stok proteinler olarak etiketlendi -20°C' de saklandı.

Protein konsantrasyonlarının ölçümü için öncelikle 2mg/ml konsantrasyonda olan stok albümin seri şekilde dilüe edilerek standartlar hazırlandı. “Blank” olarak distile su kullanıldı. Standartlar, blank ve örnekler sırayla 96 kuyucuklu plate’e 5 µl olacak şekilde yüklendi. Sonra üzerlerine 200 µl Bradford Reagent (Biorad) eklenerek Varioscan cihazında 37°C’de 20 dk boyunca inkübe edildi ve 595 nm dalga boyunda protein ölçümleri yapıldı. Standart solüsyonların eğrisi %99 çıktığında ölçümler doğru kabul edildi. Her bir örneğin konsantrasyonuna göre hesaplamalar yapılarak protein değerleri eşit olacak şekilde jele yüklenecek proteinler ayarlandı. %10’luk ayırma jeli hazırlanarak (Resolver A 2ml + Resolver B 2 ml + %10 APS + TEMED, Biorad, TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions) cam kasete döküldü ve jelin polimerize olması için 20 dk beklendi. Bu sırada %4’lük yükleme jeli (Stacking A 0.5 ml + Stacking B 0.5 ml + %10 APS + TEMED, Biorad, TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions) hazırlanarak 20 dk sonra polimerize olan ayırma jelinin üzerine döküldü. Yükleme jeli polimerize olduktan sonra kaset western tankındaki yürütme tamponu içine alındı. Hazırlanan örnekler ve marker jele yüklenerek 120 Volt’da yaklaşık 40 dk yürütüldü. Daha sonra proteinler PVDF membrana transfer edildi. Membran kullanılmadan önce 1 dk soğuk metanol ile aktive edildi. Transfer işlemi Biorad Mini Protean Elektforez sisteminde membran transfer tamponu ile ıslatılarak ve membran büyüklüğüne uygun program kullanılarak gerçekleştirildi. Transferden sonra membran Ponceau S boya ile muamele edilerek protein membranda varlığı tayin edildi. TBS-T ile yıkama yapılarak %5’lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında bloke edildi. Antikorlar üretici firmaların talimatları doğrultusunda antikor dilüsyon tamponu (1X TBS-T + %5 BSA) ile dilüe edilerek hazırlandı. Membranlar primer antikorlarla bir gece boyunca +4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 15’er dk 3 kez tampon solüsyonu (1X TBS-T + %0,02’lik Tween 20) ile yıkandı. Sekonder antikorlar (Goat Anti-Mouse IG HRP, Goat Anti-Rabbit IG HRP) üretici firmaların talimatları doğrultusunda antikor dilüsyon tamponu (1X TBS-T + %5 BSA) 1:1000 oranında ile dilüe edilerek hazırlandı. Membranlar sekonder antikorlar ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında aynı şekilde yıkama yapıldı ve membranlara 5 dk boyunca HRP substratı (ECL) uygulandı ve biorad görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.2.4 İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. Küresellik varsayımı Sphericity testi ile değerlendirildi. Uygulama, grup ve zaman faktörlerinin pS6, GLUT1, Glut2 ve HK1'e etkisinin incelenmesinde tekrarlı ölçümlerde üç yönlü varyans analizi (3-way RM ANOVA) kullanıldı. Her bir uygulama ve her bir grupta 24, 48 ve 72. saat ölçümleri için tekrarlayan ölçümlerde tek yönlü varyans analizi uygulandı. Üç farklı uygulama ve üç farklı grup için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Bonferroni ve Tukey testi kullanıldı. Verilerin analizi Turcosa Cloud (Turcosa Ltd Co) istatistik yazılımında gerçekleştirildi. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

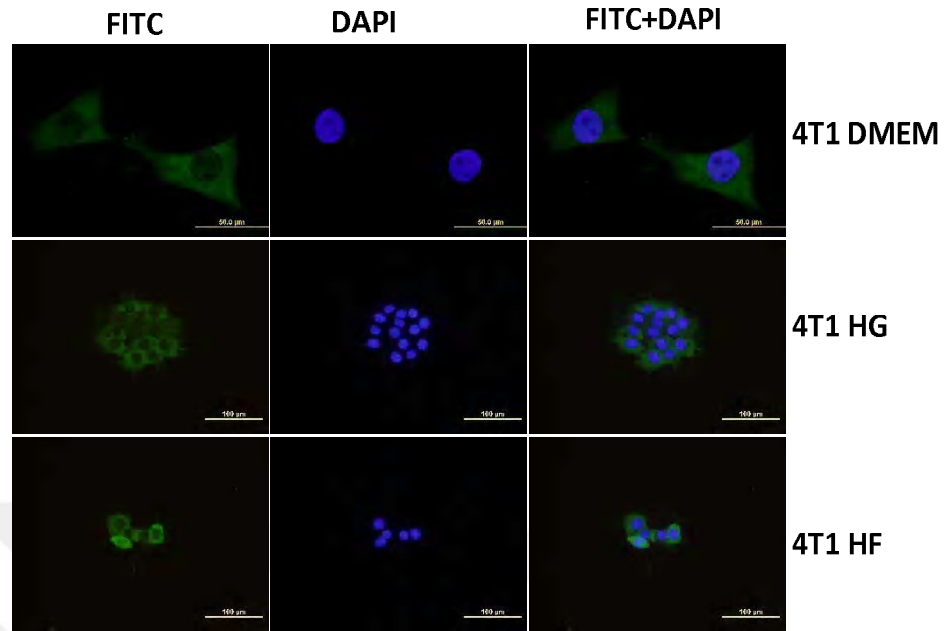
4. BULGULAR

4.1. İmmünflouresan Bulgular

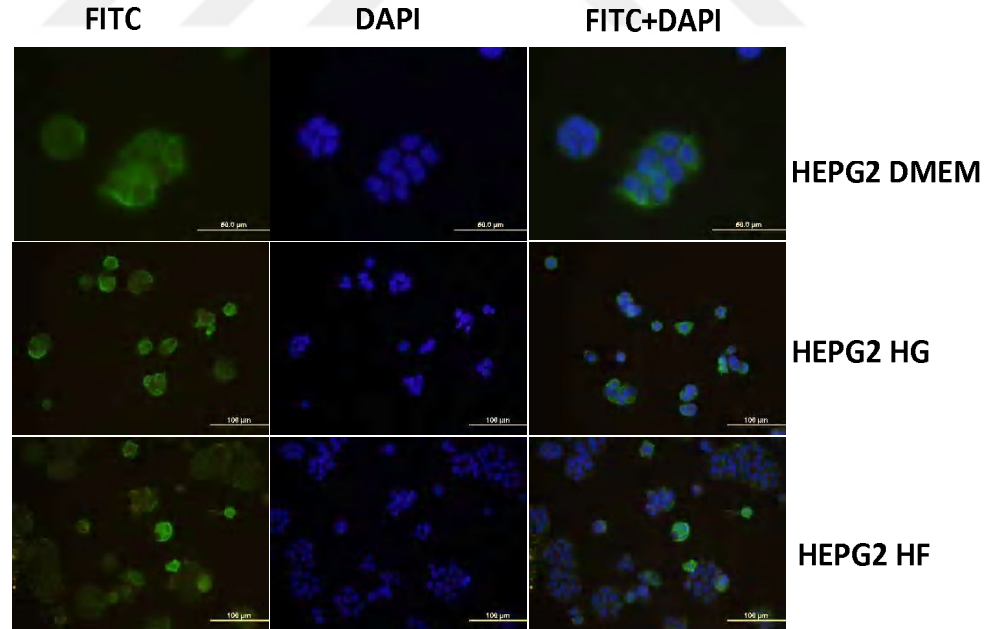
Bütün deney gruplarına ait hücreler pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 proteinleri ile immünoflouresan boyandı ve her gruptan 10 adet fotoğraf çekilerek toplamda rastgele seçilen 100 hücrenin flouresan yoğunluğu Image J programında hesaplandı. İmmünflouresan boyamalar 3 tekrarlı yapıldı. Çekirdek boyamaları DAPI ile yapıldı.

Bütün deney gruplarında pS6 antikoru için yapılan boyamalarda hücrelerin sitoplazmalarında yaygın bir şekilde her alanda protein ekspresyonu gözlemlendi. Aynı gruplar içerisinde hücreler arası ekspresyon düzeylerinin farklılık gösterdiği belirlendi (Şekil 4.1), (Şekil 4.2), (Şekil 4.3). GLUT1 antikoru için yapılan boyamalarda 4T1 DMEM, 4T1 HG, 4T1 HF gruplarında hemen hemen bütün hücrelerde sitoplazmada yaygın protein ekspresyonu vardı (Şekil 4.4). HEPG2 DMEM, HEPG2 HG, HEPG2 HF gruplarında ise GLUT1 protein ekspresyonu hücrelerin çoğunda hücre membranını çevreleyecek şekilde ince yoğun bir hat şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.5). MDA-MB-231 DMEM, MDA-MB-231 HG, MDA-MB-231 HF gruplarında ise protein ekspresyonları sitoplazmada yaygın alanlar şeklinde görüldü. MDA-MB-231 HF gruplarında ise yoğun protein ekspresyonu vardı (Şekil 4.6).

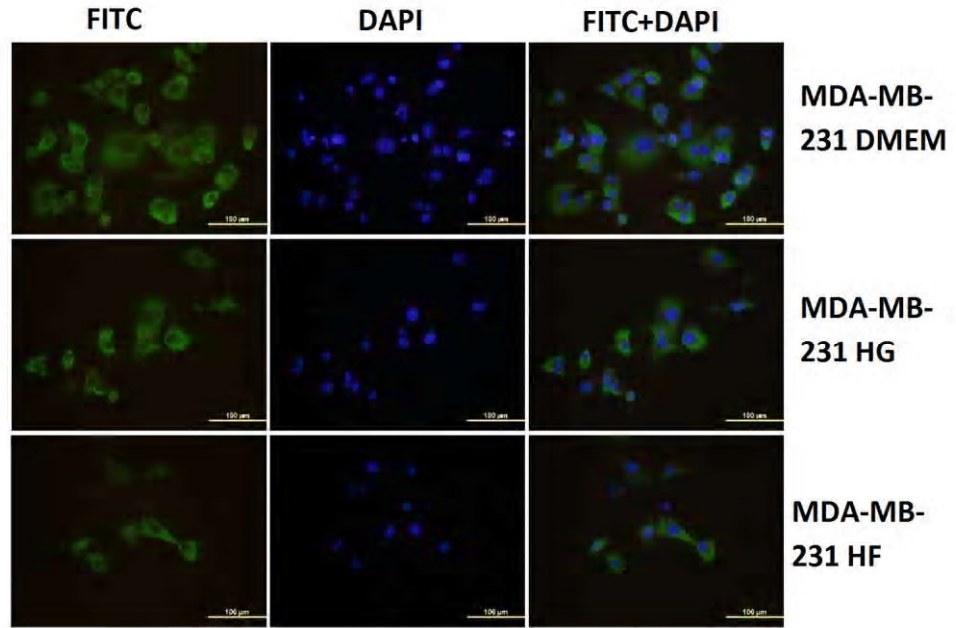
GLUT2 antikoru için yapılan boyamalarda protein ekspresyonları HEPG2 HG, HEPG2 HF gruplarında hücre membranına yakın yoğun alanlar şeklinde gözlemlenirken (Şekil 4.8.) diğer gruplar arasında belirgin bir farklılık yoktu (Şekil 4.7.), (Şekil 4.8.). Bütün deney gruplarında HK1 antikoru için yapılan boyamalarda protein ekspresyonu sitoplazma içerisinde yaygın yoğun alanlar şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.10.), (Şekil 4.11.) (Şekil 4.12.).



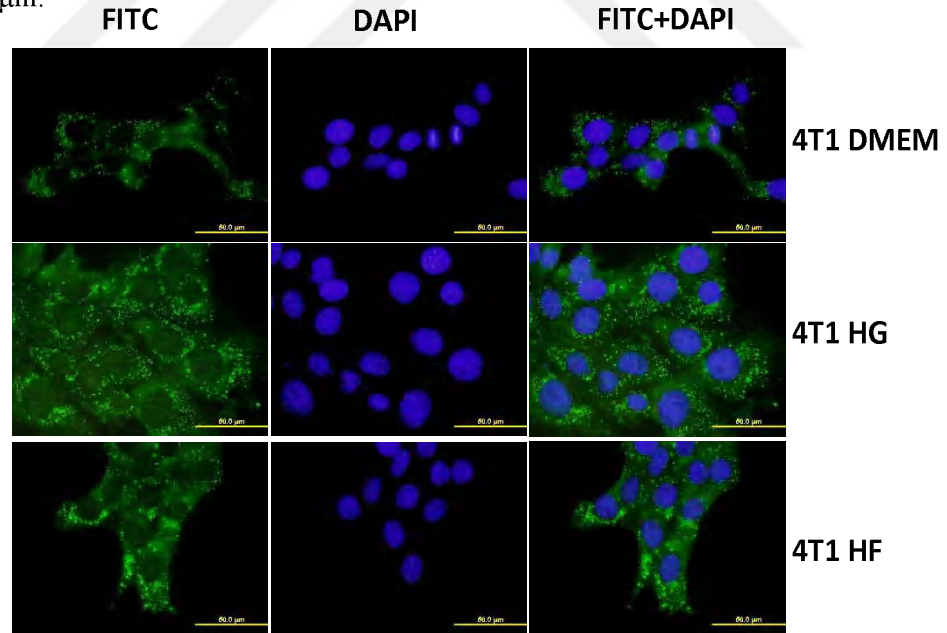
Şekil 4.1. 4T1 deney gruplarına ait pS6 immünofluoresan boyama. pS6 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, pS6 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



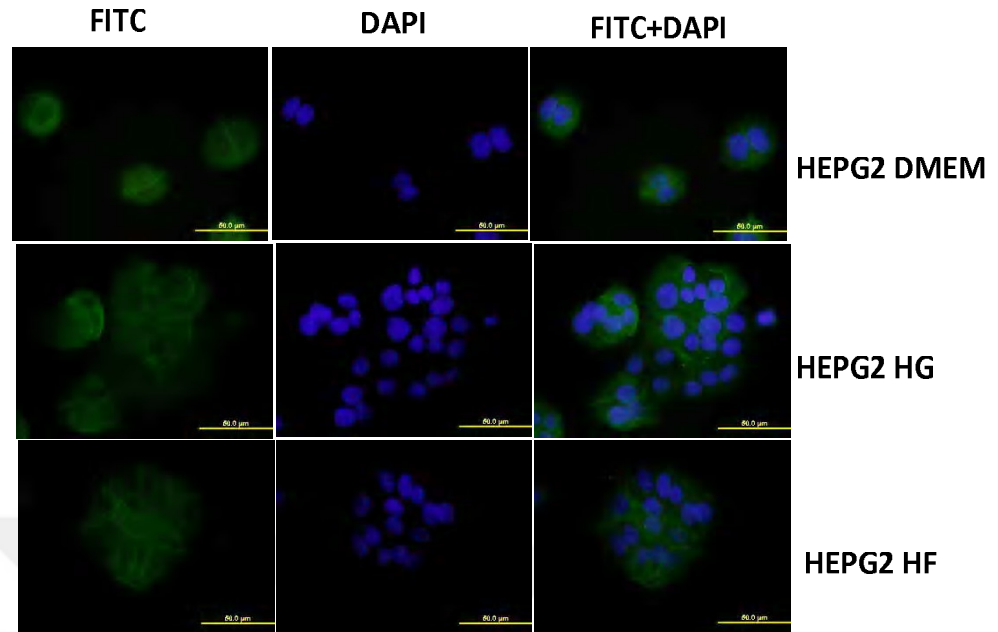
Şekil 4.2. HEPG2 deney gruplarına ait pS6 immünofluoresan boyama. pS6 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, pS6 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



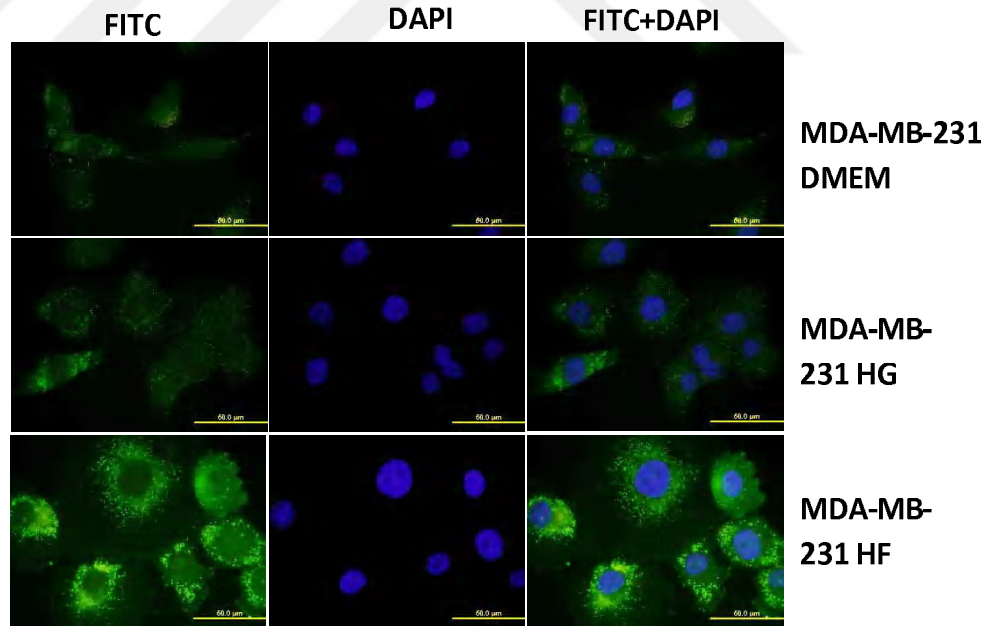
Şekil 4.3. MDA-MB-231 deney gruplarına ait pS6 immünofluoresan boyama. pS6 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, pS6 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



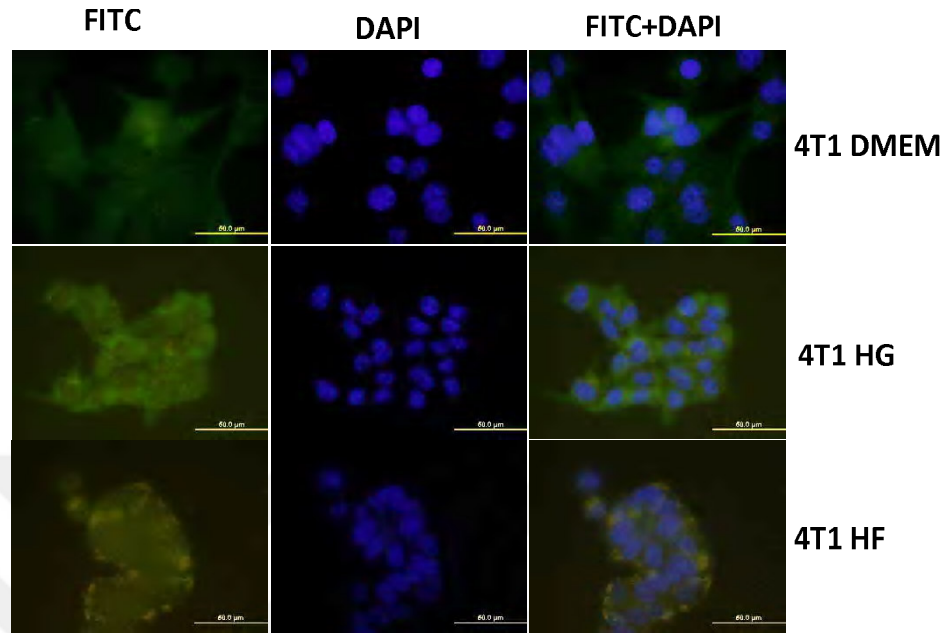
Şekil 4.4. 4T1 deney gruplarına ait GLUT1 antikorlu immünofluoresan boyama. GLUT1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



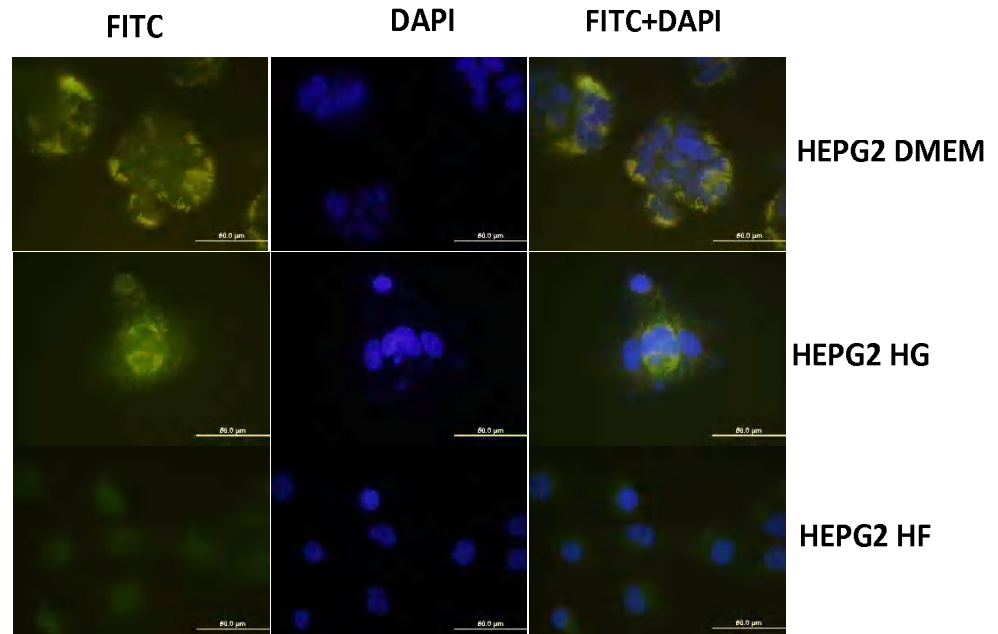
Şekil 4.5. HEPG2 Deney gruplarına ait GLUT1 antikoru immünofluoresan boyama. GLUT1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



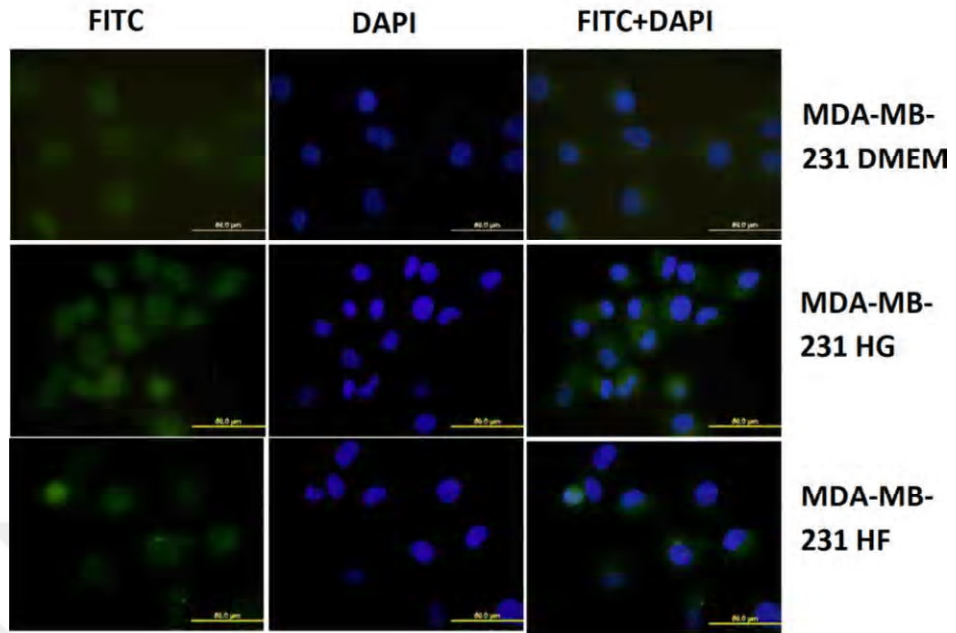
Şekil 4.6. MDA-MB-231 deney gruplarına ait GLUT1 antikoru immünofluoresan boyama. GLUT1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



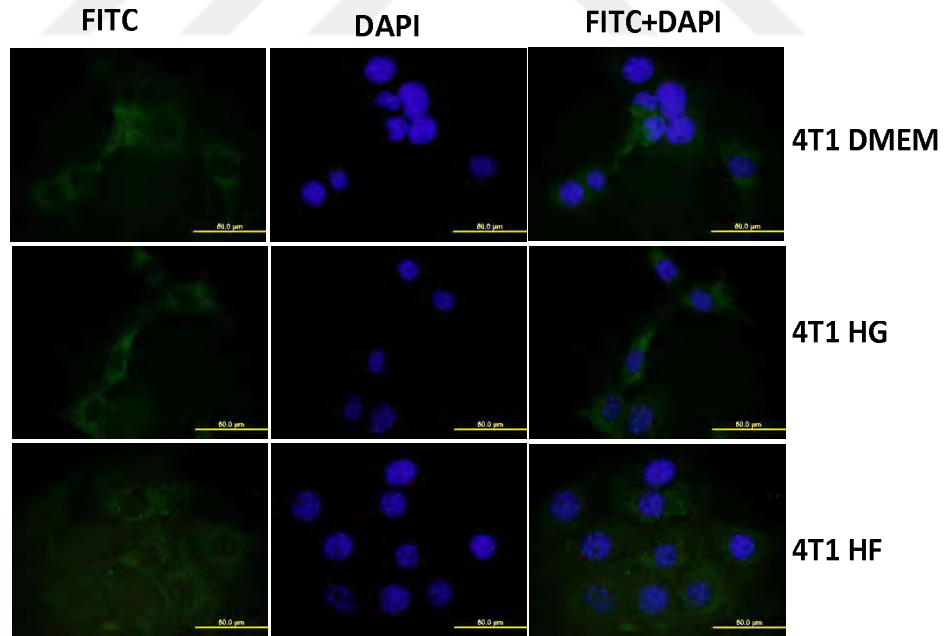
Şekil 4.7. 4T1 deney gruplarına ait GLUT2 antikorü immünoflouresan boyama. GLUT2 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT2 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



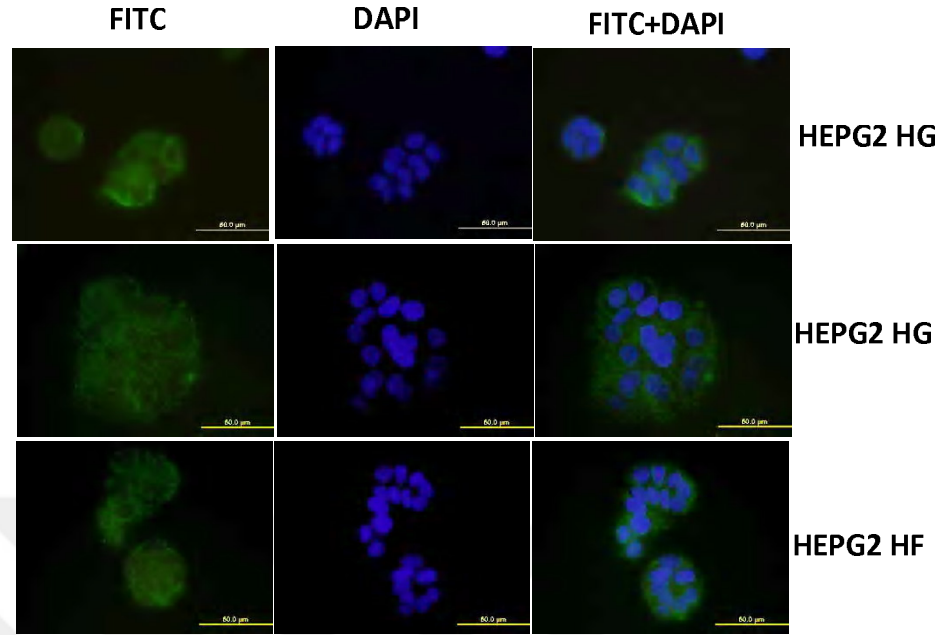
Şekil 4.8. HEPG2 deney gruplarına ait GLUT2 antikorü immünoflouresan boyama. GLUT2 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT2 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



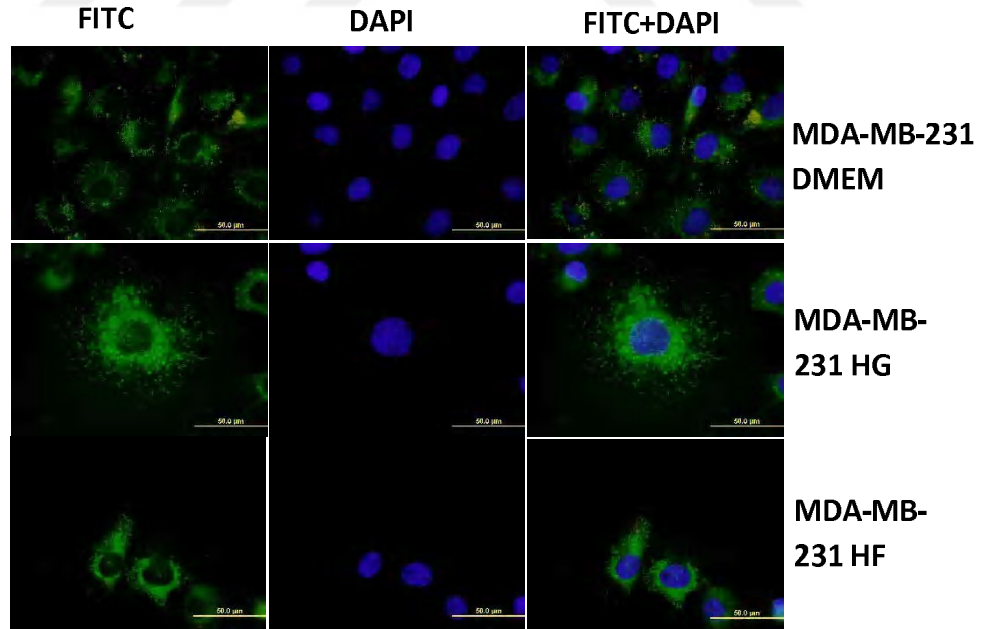
Şekil 4.9. MDA-MB-231 deney gruplarına ait GLUT2 antikorlu immünofluoresan boyama. GLUT2 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, GLUT2 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



Şekil 4.10. 4T1 deney gruplarına ait HK1 antikorlu immünofluoresan boyama. HK1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, HK1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



Şekil 4.11. HEPG2 deney gruplarına ait HK1 antikorlu immünofluoresan boyama. HK1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, HK1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.



Şekil 4.12. MDA-MB-231 deney gruplarına ait HK1 antikorlu immünofluoresan boyama. HK1 ekspresyon yoğunluğu FITC, hücre çekirdeği DAPI, HK1 ekspresyon yoğunluğu+nukleus (eşleştirilmiş olarak) FITC+DAPI verilmektedir. Ölçek çubuğu=50 µm.

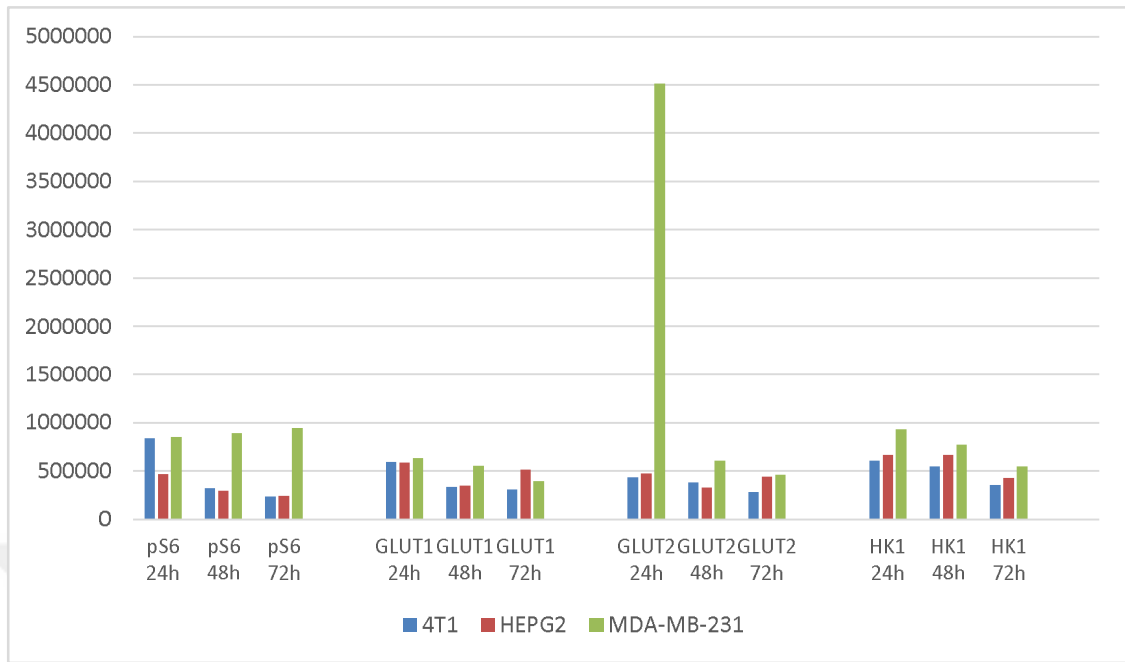
Tablo 4.1. Zaman hücre hattı ve uygulama değişkenlerinin üç yönlü anova kullanılarak karşılaştırılması.

Değişim Kaynağı pS6	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p*
Zaman	2,966E+13	1,948	1,522E+13	115,271	<0.001
Hücre Hattı	1,420E+14	2	7,101E+13	507,554	<0.001
Uygulama	3,106E+12	2	10553E+12	11,101	<0.001
Zaman x Hücre hattı	3,759E+13	3,897	9,646E+12	73,045	<0.001
Zaman x Uygulama	2,145E+13	3,897	5,504E+12	41,679	<0.001
Zaman x uygulama x Hücre hattı	7,052E+12	7,793	9,048E+11	6,852	<0.001
Değişim Kaynağı GLUT1					
Zaman	2,093E+13	1,813	1,154E+13	199,991	<0.001
Hücre Hattı	5,430E+12	2	2,715E+12	51,747	<0.001
Uygulama	4,143E+12	2	2,072E+12	39,489	<0.001
Zaman x Hücre hattı	9,179E+12	3,626	2,532E+12	43,862	<0.001
Zaman x Uygulama	5,469E+12	3,626	1,508E+12	26,135	<0.001
Zaman x uygulama x Hücre hattı	1,327E+13	7,252	1,831E+12	31,716	<0.001
Değişim Kaynağı GLUT2*					
Zaman	7,934E+14	1,000	7,933E+14	1,116	0,291
Hücre Hattı	8,247E+14	2	4,124E+14	1,158	0,315
Uygulama	6,639E+14	2	3,319E+14	0,932	0,315
Zaman x Hücre hattı	1,279E+15	2,000	6,392E+14	0,900	0,407
Zaman x Uygulama	1,366E+15	2,000	6,830E+14	0,961	0,383
Zaman x uygulama x Hücre hattı	2,564E+15	4,000	6,409E+14	0,902	0,462
Değişim kaynağı HK1					
Zaman	3,755E+13	1,830	2,052E+13	261,348	<0.001
Hücre Hattı	2,607E+13	2	1,304E+13	175,451	<0.001
Uygulama	2,619E+12	2	1,310E+12	17,625	<0.001
Zaman x Hücre hattı	2,583E+12	3,661	7,055E+11	8,987	<0.001
Zaman x Uygulama	3,714E+12	3,661	1,014E+12	12,924	<0.001
Zaman x uygulama x Hücre hattı	6,657E+12	7,332	9,092E+11	11,582	<0.001

Yapılan istatistiksel analizlere göre Tablo 4.1’de zaman, hücre hattı ve uygulama değişkenlerinin üç yönlü Anova kullanılarak karşılaştırılması verilmiştir. pS6, GLUT1 ve HK1 antikorlarında hücre hattı, uygulama ve zaman etkileşimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($P<001$) GLUT2 antikorunda anlamlı bir etkileşim bulunmamıştır ($P>005$)

Tablo 4.2. pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının floüresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değışiminin hücre hatlarına göre dağılımı

Antikorlar ve Uygulama Süresi	Hücre Hattı		p*
	4T1	HEPG2	
pS6 24h	841156,4±389346,4 ^a	469135,4±301804,2 ^b	<0.001
pS6 48h	324482,7±199022,4 ^a	295114,7±162370,6 ^a	<0.001
pS6 72h	234220,3±169125,8 ^a	243063,6±125389,1 ^a	<0.001
GLUT1 24h	595166,6±282282,5 ^a	587061,2±315541,7 ^a	0,163
GLUT1 48h	334631,7±189041,6 ^a	347429,9±164171,9 ^a	<0.001
GLUT1 72h	310537,0±172767,7 ^a	516039,6±299651,6 ^b	<0.001
GLUT2 24h	435449,0±228990,0 ^a	475017,9±231177,4 ^a	0,276
GLUT2 48h	380951,5±172174,3 ^a	326198,8±143190,7 ^b	<0.001
GLUT2 72h	280558,5±117202,8 ^a	438809,2±249638,2 ^b	<0.001
HK1 24h	607980,1±314665,7 ^a	667202,4±227595,6 ^a	<0.001
HK1 48h	546777,9±245284,8 ^a	668622,5±247508,2 ^b	<0.001
HK1 72h	358678,4±191382,4 ^a	428720,0±240774,8 ^b	<0.001
Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.			



Şekil 4.13. pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin hücre hatlarına göre dağılım grafiği

Yapılan istatistiksel analizlere göre Tablo 4.2’de pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin hücre hatlarına göre dağılımı gösterilmiştir.

pS6 antikorunun 24., 48. ve 72. saatlerdeki değişiminin 4T1, HEPG2 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Bu farklılığın pS6 antikoru için 24. saatte HEPG2 grubundan, 48. ve 72. saatler için ise MDA-MB-231 grubundan kaynaklandığı bulunmuştur.

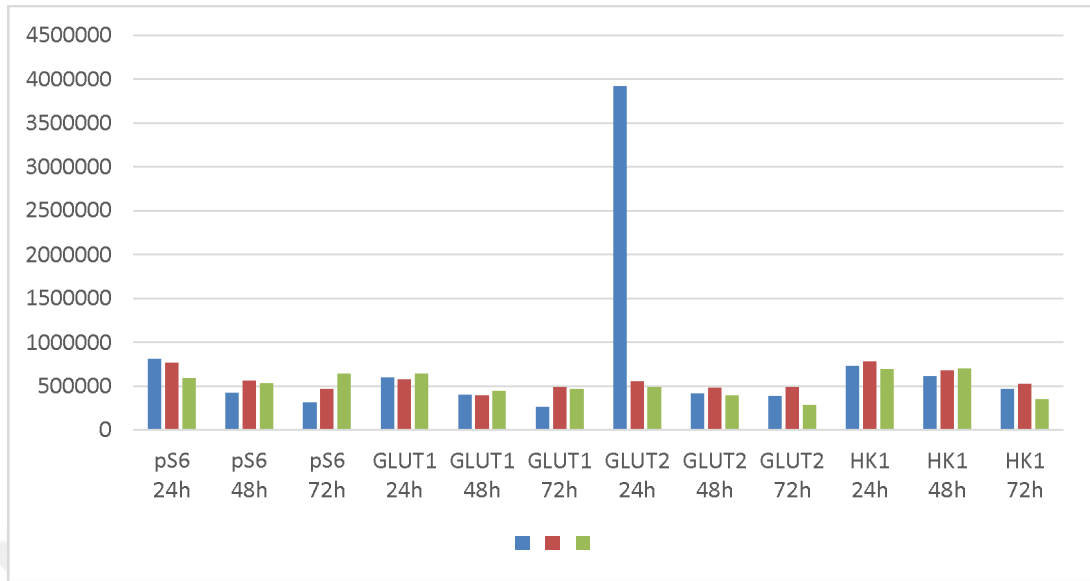
GLUT1 ve GLUT2 antikorlarının 48. ve 72. saatlerdeki değişiminin 4T1, HEPG2 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

HK1 antikorunun 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin 4T1, HEPG2 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.3. pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının floüresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değışiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı

Antikorlar ve Uygulama Süresi	Uygulama			p*
	DMEM	HG	HF	
pS6 24h	808844,4±405407,2 ^a	764873,3±498671,0 ^a	590075,5±390207,9 ^b	<0.001
pS6 48h	425023,3±314736,3 ^a	559958,8±450506,9 ^b	531789,4±531048,4 ^b	<0.001
pS6 72h	317374,8±309434,0 ^a	464750,2±464473,3 ^b	642005,7±681389,3 ^c	<0.001
GLUT1 24h	598214,5±314712,2 ^{ab}	574835,3±233214,0 ^a	643089,1±358863,1 ^b	0,031
GLUT1 48h	399331,0±194736,9 ^a	393701,1±234813,3 ^a	445271,9±239079,4 ^b	0,013
GLUT1 72h	262522,1±124312,6 ^a	489555,2270005,2 ^b	467718,7±250365,1 ^b	<0.001
GLUT2 24h	3922114,1±5548920,8 ^a	552870,7±310133,9 ^a	489323,0±245935,1 ^a	0,382
GLUT2 48h	413144,9±222140,4 ^a	482707,5±243844,2 ^b	391881,4±204617,4 ^a	<0.001
GLUT2 72h	387221,6±250972,5 ^a	490797,0±255775,3 ^b	286106,7±145269,7 ^c	<0.001
HK1 24h	730461,9±312217,6 ^{ab}	784501,2±349550,9 ^a	695063,7±441850,3 ^b	0,019
HK1 48h	614077,6±238186,2 ^a	675405,3±291486,0 ^{ab}	699796,0±411769,1 ^b	0,006
HK1 72h	464243,7±175908,7 ^a	523647,1±312453,8 ^b	348207,7±212008,8 ^c	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.14. pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.

Yapılan istatistiksel analizlere göre Tablo 4.3’de pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı verilmiştir.

ps6 antikorunun 24, 48 ve 72.saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). pS6 ekspresyon yoğunluğu HF gruplarında zamana bağlı olarak artmış ve 72. saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır. DMEM ve HG gruplarında ise zamana bağlı olarak düşüş gözlenmiştir. pS6 antikorunun ekspresyonunun artması diğer gruplara kıyasla HF gruplarda proliferasyonun aktif olarak devam ettiğini göstermektedir.

GLUT1 antikorunun flouresan yoğunluğunun 24., 48. ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bütün gruplarda GLUT1 ekspresyon yoğunluğunda 48 ve 72. saatlerde azalma gözlenmiştir.

GLUT2 antikorunun 48. ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Yüksek fruktoz gruplarında zamana bağlı olarak GLUT2 ekspresyon yoğunluğunda düşüş gözlenmiştir.

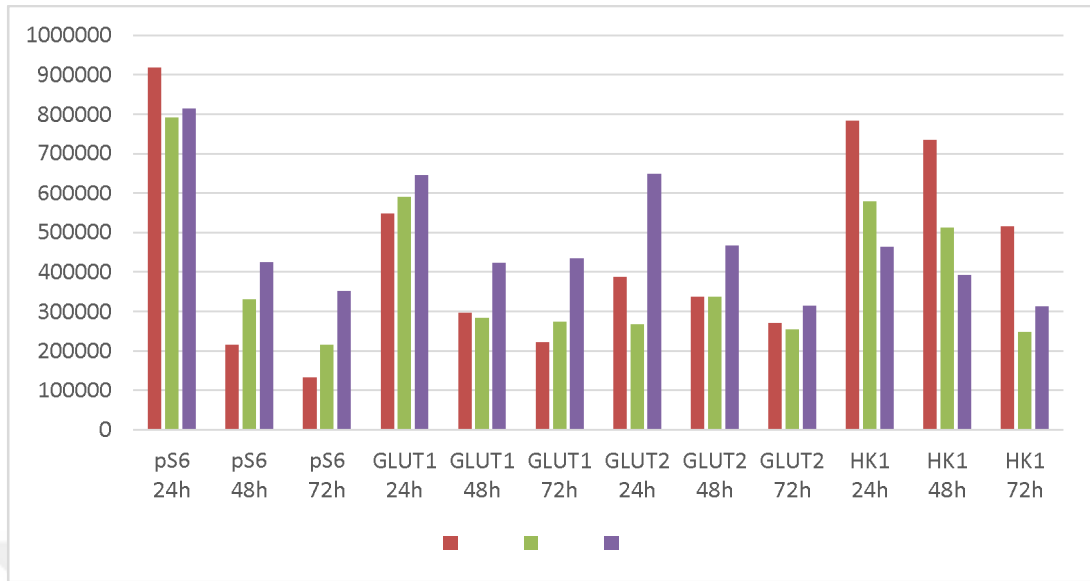
HK1 antikorunun flouresan yoğunluğunun 24., 48. ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bütün gruplarda HK1 ekspresyon yoğunluğu 72. saatte en alt seviyededir.

GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouseran yoğunluklarında ortaya çıkan bu değişiklikler zamana bağlı olarak hücrelerin şekeri kullanma kapasitelerinde düşüş olduğunu göstermektedir.



Tablo 4.4. 4T1 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı

4T1			
Antikorlar ve Uygulama Süresi	DMEM	HG	HF
pS6 24h	918504,4±484199,6 ^a	790994,5±298252,9 ^a	814266,2±354585,2 ^a
pS6 48h	216267,1±138374,7 ^b	331278,8±187190,2 ^b	424787,5±208121,5 ^b
pS6 72h	133439,9±91704,0 ^c	216447,7±127730,6 ^c	351470,5±192321,9 ^c
p*	<0.001	<0.001	<0.001
GLUT1 24h	548341,6±283534,8 ^a	590318,0±226390,1 ^a	646272,3±322508,3 ^a
GLUT1 48h	296780,8±157091,1 ^b	283351,9±145902,3 ^b	422783,1±223241,0 ^b
GLUT1 72h	221895,6±85095,5 ^c	273923,0±141620,7 ^b	434415,8±194518,1 ^b
p*	<0.001	<0.001	<0.001
GLUT2 24h	387747,9±148298,6 ^a	268066,8±121240,2 ^a	648168,8±212086,4 ^a
GLUT2 48h	337267,9±158865,6 ^a	337734,5±154447,4 ^b	466897,3±170705,7 ^b
GLUT2 72h	271639,2±105933,8 ^a	254901,0±103183,7 ^a	314755,5±132903,6 ^c
p*	<0.001	<0.001	<0.001
HK1 24h	782798,2±371071,4 ^a	578716,9±209134,5 ^a	464024,7±255454,9 ^a
HK1 48h	735540,4±233529,5 ^a	513370,8±238054,1 ^a	393129,6±99530,7 ^b
HK1 72h	515573,0±167868,8 ^b	248126,6±182670,2 ^b	312844,8±100277,5 ^c
p*	<0.001	<0.001	<0.001
Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.			



Şekil 4.15. 4T1 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.

Yapılan istatistiksel analizlere göre tablo Tablo 4.4'te 4T1 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı gösterilmiştir.

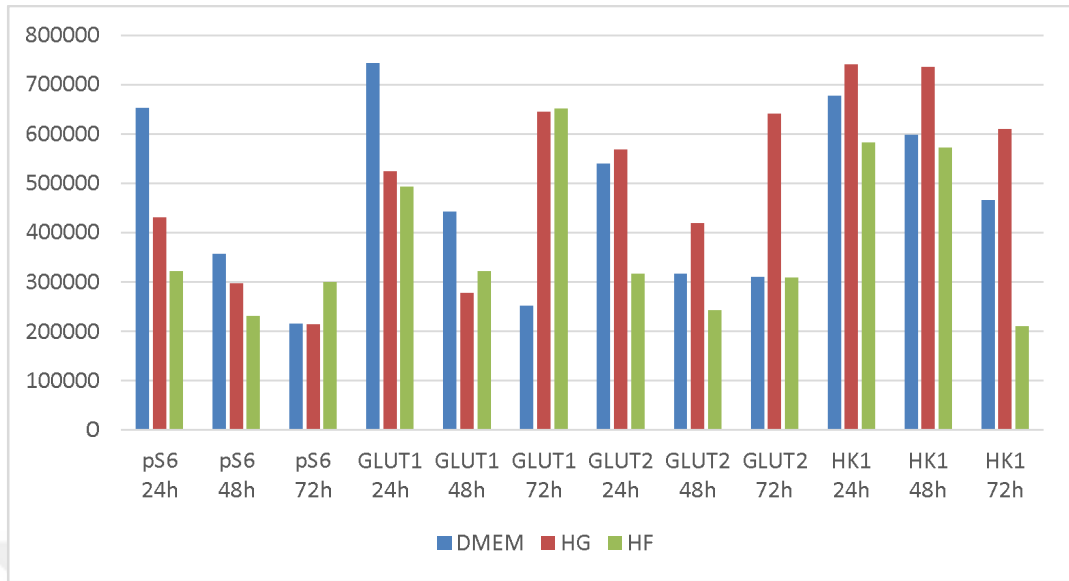
4T1 hücre hattında DMEM, HG ve HF uygulamasında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının ekspresyonunun zamanla azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$).

4T1 hücreleri glukozu fruktoza göre daha etkin kullanılarak pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarını daha yoğun eksprese etmiştir.

Tablo 4.5. HEPG2 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı

HEPG2			
Antikorlar ve Uygulama Süresi	DMEM	HG	HF
pS6 24h	653443,2±344139,6 ^a	431527,9±255907,4 ^a	322435,0±183912,8 ^a
pS6 48h	356845,7±187714,5 ^b	297784,9±154754,6 ^b	230713,4±111529,7 ^b
pS6 72h	215809,6±119841,0 ^c	213928,6±100574,1 ^c	299452,7±134963,9 ^a
p*	<0.001	<0.001	<0.001
GLUT1 24h	743789,6±347690,2 ^a	523862,6±218340,8 ^a	493531,5±307621,3 ^a
GLUT1 48h	442716,0±195028,2 ^b	278134,3±137993,4 ^b	321439,4±98282,4 ^b
GLUT1 72h	251163,0±140437,2 ^c	644915,5±300731,0 ^c	652040,4±234035,3 ^c
p*	<0.001	<0.001	<0.001
GLUT2 24h	540486,3±232131,3 ^a	567948,9±196337,6 ^a	316618,7±175066,3 ^a
GLUT2 48h	316689,6±137320,0 ^b	419060,8±144256,4 ^b	242846,1±80400,2 ^b
GLUT2 72h	310409,5±216416,3 ^b	640687,2±220549,9 ^a	308330,9±171138,5 ^a
p*	<0.001	<0.001	<0.001
HK1 24h	676982,6±209341,7 ^a	741700,2±203677,3 ^a	582924,2±241561,5 ^a
HK1 48h	597928,1±204810,0 ^b	735780,2±315113,9 ^a	572159,3±185127,4 ^b
HK1 72h	465352,9±166075,0 ^c	610447,8±247814,1 ^b	210359,3±57035,9 ^c
p*	<0.001	<0.001	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.16. HEPG2 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.

Yapılan istatistiksel analizlere göre Tablo 4.5. HEPG2 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı gösterilmiştir.

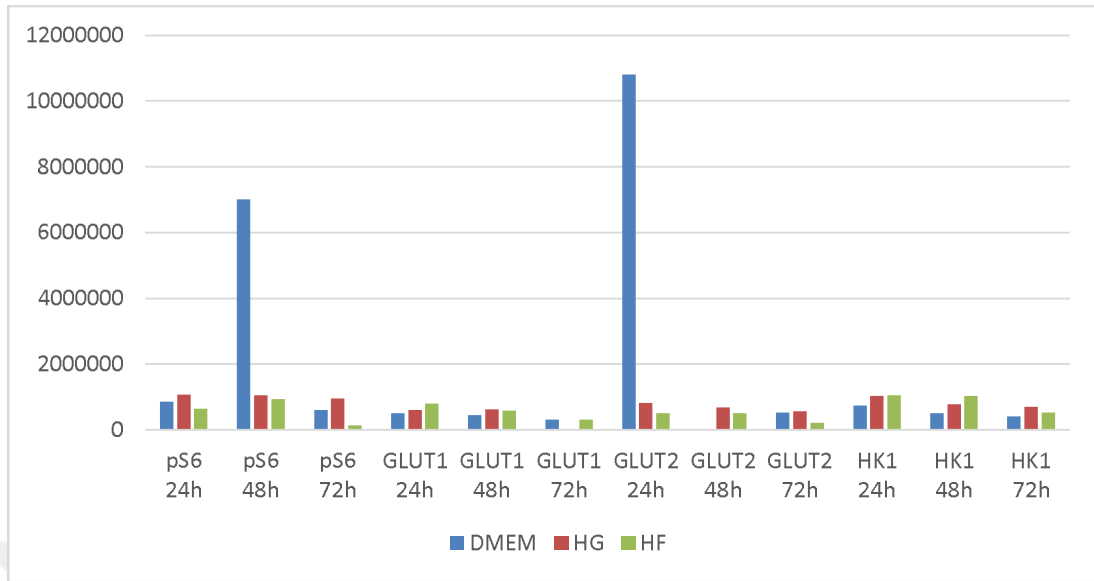
HEPG2 hücre hattında DMEM, HG ve HF uygulamasında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorları ekspresyonunun zamanla değiştiği ve bu değişimin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$).

HEPG2 hücre hattında HF uygulamasında pS6, GLUT1 ve GLUT2 antikorlarının flouresan yoğunluğunun 72. saatte birbirine paralel şekilde arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile HEPG2 hücrelerinin diğer hücrelerin aksine fruktozu kullanarak 72. saatte proliferasyona devam ettiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. MDA-MB-231 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının floüresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı

MDA-MB-231			
Antikorlar ve Uygulama Süresi	DMEM	HG	HF
pS6 24h	855787,8±325488,8 ^a	1072384±621833 ^a	633525,3±418878,8 ^a
pS6 48h	6999663,0±345777,2 ^b	1048299±435436 ^a	939867,2±724529,2 ^b
pS6 72h	600853,6±374324,5 ^b	961145,8±498942,1 ^a	127093,9±859499,9 ^c
p*	<0.001	0,331	<0.001
GLUT1 24h	501964,3±254091,8 ^a	610495,6±247512,2 ^a	789463,5±382462,7 ^a
GLUT1 48h	457369,1±189535,8 ^a	618404,4±221805,8 ^a	591593,3±274930,9 ^b
GLUT1 72h	314061,3±123217,1 ^b	547457,6±186958,9 ^a	316700,0±195698,0 ^c
p*	<0.001	0,062	<0.001
GLUT2 24h	10799268±95895674 ^a	819466,7±288664,6 ^a	510698,2±214647,8 ^a
GLUT2 48h	584643,5±244683,2 ^a	689734,3±257279,0 ^b	506046,8±247108,9 ^a
GLUT2 72h	521346,1±315883,9 ^a	574210,7±228954,9 ^c	207641,8±78372,1 ^b
p*	0,311	<0.001	<0.001
HK1 24h	732179,9±328482,4 ^a	1030825±421462 ^a	1045954±529019 ^a
HK1 48h	510099,1±221365,3 ^b	775284,2±245910,5 ^b	1041611±508756 ^a
HK1 72h	412369,2±179919,2 ^c	709339,1±284891,5 ^b	525311,3±267640,5 ^b
p*	<0.001	<0.001	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılım grafiği.

Yapılan istatistiksel analizlere göre Tablo 4.6’da MDA-MB-231 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikollarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına göre dağılımı gösterilmektedir.

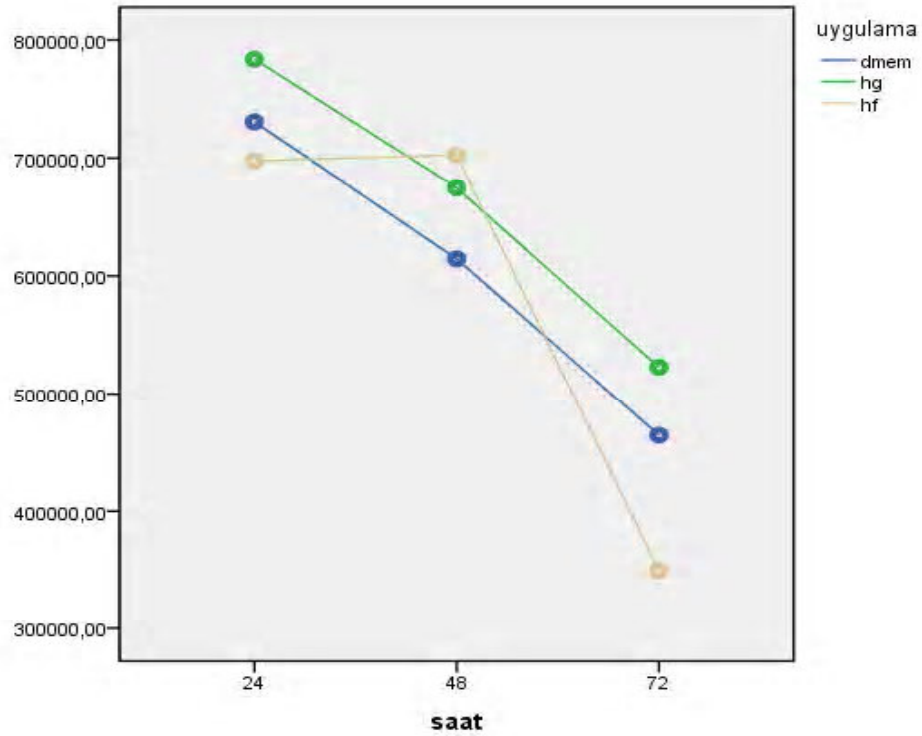
MDA-MB-231 hücre hattında DMEM, HG ve HF uygulamasında ps6 antikoru ekspresyonunun DMEM ve HF uygulamalarında zamanla değiştiği ve bu değişimin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.001$).

MDA-MB-231 hücre hattında DMEM, HG ve HF uygulamasında GLUT1, antikoru ekspresyonunun DMEM ve HF uygulamalarında zamanla değiştiği ve bu değişimin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p<0.001$).

MDA-MB-231 hücre hattında DMEM, HG ve HF uygulamasında GLUT2, antikoru ekspresyonunun HG ve HF uygulamalarında zamanla değiştiği ve bu değişimin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.001$).

MDA-MB-231 hücre hattında DMEM, HG ve HF uygulamasında HK1 antikoru ekspresyonunun zamanla değiştiği ve bu değişimin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.001$).

MDA-MB-231 hücre hattında pS6, GLUT1, GLUT2 ve HK1 antikorlarının flouresan yoğunluklarının 24., 48., ve 72. saatlerdeki değişiminin DMEM, HG ve HF uygulamalarına bağlı olarak zamanla değişerek azaldığı ve buna bağlı olarak şekeri kullanma kapasitesinin zamanla düştüğü gösterilmiştir.

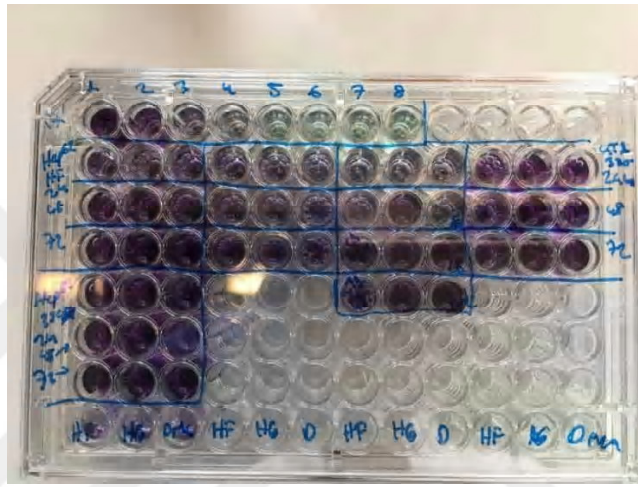


Şekil 4.18. Zamana bağlı olarak DMEM, HG ve HF deney gruplarındaki ortalama yoğunluklar gösterilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizlere göre Şekil 4.18’de zamana bağlı olarak DMEM, HG ve HF deney gruplarındaki ortalama yoğunluklar gösterilmiştir. HG grupları DMEM gruplarına göre 24., 48., ve 72. saatlerde daha yoğun ekspresyon göstermektedir. Zaman bağlı olarak düşüş gösteren ekspresyon düzeyleri 72. saatte her iki grupta da en alt seviyededir. HF grubunda ise 24. saatte diğer gruplara göre daha az ekspresyon yoğunluğu gözlenmektedir. 48 saatte ise diğer gruplarda gözlenen düşüşün aksine HF grubunda ekspresyon yoğunluğu artmaktadır. 72. saatte ise HF grubunda ekspresyon yoğunluğu en alt seviyededir.

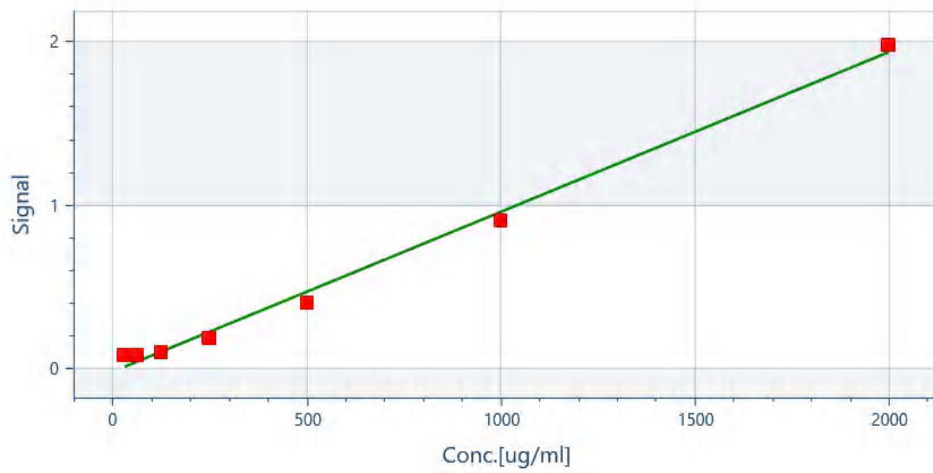
4.2. Western Blot Bulgular

HEPG2 hücre hattında DMEM, HG ve HF besiyerlerinde 24., 48. ve 72. saatlerdeki GLUT5 protein ekspresyon miktarı western blot analiz ile gösterilmiştir. “Housekeeping” gen olarak β 6 proteini kullanılmıştır. Deney gruplarından elde edilen hücreler ripa buffer ile lizat haline getirilmiş ve albümin standartları hazırlanarak BCA analizi ile protein miktar tayini yapılmıştır (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. BCA analizinde okuma için hazırlanan 96 kuyucuklu plate görüntüsü

BCA analizi için yapılan okuma sonucu standart eğri R^2 grafiğinde 0.9 ile 1 arasında olması gereken R^2 değeri 0,994 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.20.). Elde edilen sonuçlara göre stok proteinlerden yükleme örnekleri hazırlanmıştır.



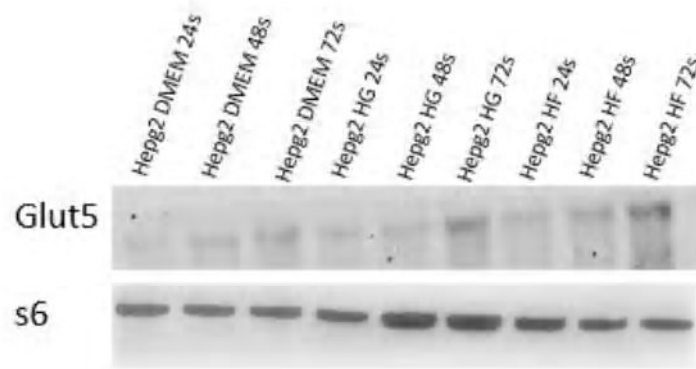
Şekil 4.20. Proteinlerin miktar tayini için yapılan BCA'da standart eğri R^2 grafiği
($y = 0,000976353x - 0,0120412$ $R^2: 0,994$).

Marker ile birlikte örnekler jele yüklenerek koşturulmuş ve membrana transfer edilmiştir. Membranda protein varlığının kontrolü için Ponceau S boya ile membran boyanmıştır. Bantlar halinde protein varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.21.).

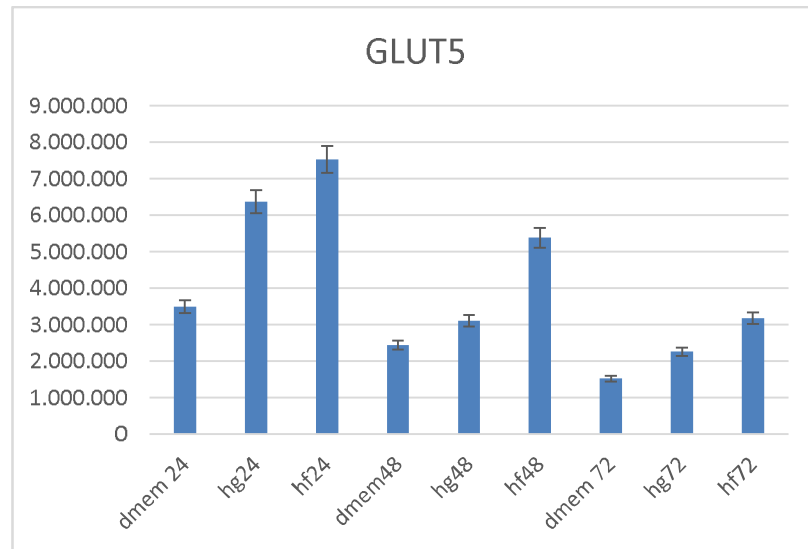


Şekil 4.21. Western blot analizi için proteinlerin membrana transferinden sonra yapılan Ponceau S boyama ile membranda protein bantlarının görünümü.

Membranlar antikorlar ile muamele edildikten sonra membran görüntüleri alınarak (Şekil 4.22.), ekspresyon yoğunlukları image j programında hesaplanmıştır. HEPG2 kanser hücre hattında GLUT5 ekspresyonu gruplar arasında karşılaştırıldığında 24., 48., ve 72. saatlerde HF gruplarda protein ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23.).



Şekil 4.22. HEPG2 hücre hattında GLUT5 protein ekspresyonunun western blot analizi ile gösterilmesi. Kontrol S6 protein ekspresyonu ile gösterilmiştir.



Şekil 4.23. HEPG2 hücre hattında DMEM, HG ve HF gruplarında 24., 48., ve 72. saatlerde GLUT5 proteininin ekspresyon grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde birçok kanser türünde genetik yatkınlığın önemi (138, 139) iyi belirlenmiş olsa da genetik risk faktörleri büyük oranda değiştirilemez (140, 141). Buna karşılık, sigara ve alkol tüketimi, uyku düzeni, beslenme ve kanser riskini değiştirdiği kanıtlanan fiziksel egzersiz gibi yaşam tarzı seçimleri değiştirilebilir. Obezitenin rolünü kabul etmeden enerji tüketimi ile kanser riski arasındaki bağlantıları tartışmak mümkün değildir. Vücut kitle indeksi (BKİ) 30kg/m^2 üstü olarak tanımlanan obezite, artık sanayileşmiş ülkelerde 185 milyondan fazla yetişkin, gelişmekte olan dünyada ise 115 milyon ve 5 yaş altı 18 milyondan fazla çocuğu etkilemektedir (142). ABD'de, nüfusun %24'üne eşdeğer 72 milyon yetişkin obez ve nüfusun %50'sinden fazlası ise kilolu olarak tanımlanmaktadır (143). “Fast-food” un küreselleşmesi, doymuş yağ asitleri, trans yağlar, yüksek rafine şeker içeriğine sahip “alkolsüz içecekler” ve yüksek yağlı diyetler bu salgına katkıda bulunmada özellikle etkili olabilir (144). ABD'de her yıl 250.000 ile 350.000 arasında obezite ile ilgili ölüm meydana gelmektedir ve bu durum akciğer (154.000), kolon (48.000), meme (40.000) ve prostat (30.200) kanserinden kaynaklanan ölüm oranlarını aşmaktadır. Aslında, son analizler aşırı kilo ve obezitenin erkeklerde tüm kanser ölümlerinin %14'ünü, kadınlarda ise kanser ölümlerinin %20'sini oluşturabileceğini öngörmüştür (145). Obezitenin kansere nasıl katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılmamakla birlikte önerilen mekanizmalar arasında, dislipidemi ve artan kanser riskine bağlı olan insülin direnci gibi kronik metabolik anormallikler bulunmaktadır (146,147). Genetik, çevresel ve psikolojik faktörlerin tümü obezite gelişiminde rol oynamaktadır, ancak bireysel obezite riski kalori alımı ve fiziksel aktivitenin azalması ile yakından ilgilidir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı'nın ABD'deki gıda tüketimiyle ilgili yıllık yayınlanmış geçmiş verilerine dayanarak, 1910 ve 1985 yılları arasında kalori alımı oldukça sabit kalmasına rağmen,

1985-2000 yılları arasında ~%12 (300 kalori/gün), 1999-2000 arasında erkekler için %7,3 (179 kalori/gün) ve kadınlar için %23,3 (355 kalori/gün) arttığı tespit edilmiştir. Karbonhidratlar alınan kalori miktarımızı arttırmaktadır (144). Örneğin, 1976-1980 yıllarında, yetişkin erkek ve 20-74 yaşları arasındaki kadınların günlük 1039 ve 700 kilokalori karbonhidrat tükettiği belirlenmiştir. 1999-2000 arasında bu, sırasıyla 1283 ve 969 kilokalori karbonhidratlara kadar yükselmiştir. Bu artışın %80'i şekerli içeceklerden kaynaklanmaktadır. Bunların içeriğinde şeker olarak sükroz (%50 glukoz, %50 fruktoz) ve yüksek fruktozlu mısır şurubu (%55 fruktoz, %45 glukoz) bulunmaktadır (144, 148). Bu bulgular bazı yazarların ABD'de artan rafine karbonhidrat ve özellikle fruktoz tüketiminin şişmanlıktaki hızlı artışla, hiperlipidemi ve bozulmuş insülin etkisiyle ilişkili problemlerle ilişkili olduğunu önermesini sağlamıştır. Örneğin, insanlarda ve hayvanlarda yüksek fruktoz tüketimi, obezite, hipertansiyon ve hiperlipidemi dahil olmak üzere birçok metabolik anormallik ile ilişkilendirilmiştir (146).

İnsanlarda, fruktoz beslenmesi, özellikle hiperinsülinemik bireylerde hiperlipidemiye neden olmuştur. Ayrıca tip 2 diyabetli hastalarda yüksek lifli, yüksek karbonhidratlı, düşük yağlı diyetlere fruktoz eklenmesi kan şekeri kontrolünü iyileştirmesine rağmen önemli kilo alımına neden olmuştur. Yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca fruktoz ile beslenmenin sıçanlarda hiperinsülinemi, insülin direnci, bozulmuş glukoz toleransı, yüksek sistolik kan basıncı, artan kalp ağırlığı ve kontrollere kıyasla azalmış adiponektin düzeylerine neden olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, fruktoza maruz bırakılan sıçanlardan türetilen aort, endotel ve kardiyak dokusunda artmış timidin katılımı ve azalmış epitelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesi görülmüştür (149, 150). Yüksek fruktoz diyetleriyle beslenen sıçanlarda hepatik lipogenezisin 3-15 kat arttığı ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı olan hastalarda fruktoz tüketiminin kontrollerden 2-3 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (151).

Yüksek oranda sindirilen ve emilen ve yüksek kan şekeri ve insülin seviyelerine neden olan besinlerdeki diyetler, tümör büyümesini destekleyen metabolik bir ortama katkıda bulunabilir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, sadece yüksek oranda karbonhidrat tüketimi olan bireylerde değil, özellikle yüksek fruktoz alımında da kanser riskinin arttığını göstermiştir. Ortalama 7.9 yıl boyunca 38.451 kadını takip eden prospektif

hemşire sağlığı çalışmasında toplam 174 kolorektal kanser tespit edildi. Diyet alımının ayrıntılı analizi yapılarak glisemik yük, toplam karbonhidrat, fiber olmayan karbonhidrat ve fruktoz alımının sırasıyla 2.85-, 2.41-, 2.6- ve 2.1 kat artan kolorektal kanser riski ile ilişkili olduğu tespit edildi (152). Buna karşılık, Sağlık Çalışanlarının İzleme Çalışması 47.781 erkek ile yapılan prospektif bir çalışmada, meyve veya meyve olmayan kaynaklardan gelen yüksek fruktoz tüketimi, prostat kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (153).

Fruktozun, hali hazırda iyi anlaşılmayan dokuya özgü bir şekilde, farklı düzeylerde kanser riskini taşıyabileceği muhtemeldir. Düzensiz hücrel metabolizma kanserin temel bir faktörüdür ve özellikle de yüksek oranda karbonhidrat metabolizması hızla bölünen hücrelerin bir işaretidir (154). Tartışıldığı gibi, bazı epidemiyolojik çalışmalar fruktoz, obezite, insülin direnci ve kanser arasında olası bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Fruktozun doğrudan kanser gelişimini sağladığına dair ikna edici kanıt bulunmamakla birlikte, mevcut kanıtlar fruktozun tümörogenezi teşvik etmek için izin verilen şekilde hareket ettiğini göstermektedir. Örneğin, kanserojen, N-nitrosomorfolin (NNM) uygulanan sıçanların içme sularına fruktoz eklenmesi, hepatik tümör oranlarında iki katlık bir artışa neden olmuş ve sadece su içen hayvanlarla karşılaştırıldığında atipik pankreas asiner hücre nodüllerinin görülme sıklığını arttırmıştır (155). Daha yakın tarihli bir çalışma, insan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin fruktoz ile muamele edilmesinin, hücre yüzeyi glikan yapısını değiştirdiğini ve hücrel göçün ve istilaların hızlandırılmasını sağladığını göstermiştir (156). Başka bir çalışmada kanser hücrelerinin, glukoz bulunmamasına rağmen fruktoz içeren ortamlarda eşdeğer oranda büyüebildiği ve bu durumun bazı kanserlerde fruktozun, kanser büyümesi için alternatif bir karbonhidrat substratı olarak hizmet edebileceğini ortaya koymuştur (157). Bir çalışmada pankreas kanserli hastalarda dolaşımdaki fruktoz konsantrasyonlarını ölçmek için spesifik bir enzim bazlı fruktoz analizi ve gaz kromatografisi kütle spektroskopisi kullanılmış ve bunları sağlıklı insan deneklerdeki seviyelerle karşılaştırıldığında pankreas kanseri hastalarında ortalama dolaşımdaki açlık fruktoz seviyeleri, 0,5-1 mM aralığında olan sağlıklı bireylere kıyasla 2,5 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (158). Bunlara ek olarak, fruktoz kan trigliseritlerini (159, 160) toplam plazma kolesterolünü, düşük yoğunluklu ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolünü ve serbest yağ asidi seviyelerini artırarak lipid

metabolizmasında büyük değişiklikler yapmaktadır (161). Fruktoz ayrıca androjen bağımsız prostat kanserinde SREBP-1gen ekspresyonunu arttırmaktadır (162, 163).

Glikoz ve fruktoz 6-karbonlu şekerlerdir ve galaktoz ile birlikte insan hücrel metabolizması için en önemli üç şekeridir. Kanser karbonhidrat metabolizmasının çoğu araştırması, tartışmasız kanser büyümesi için en önemli karbonhidrat olan glukozu odaklanır. Fizyolojik glukoz konsantrasyonu, insülin ve glukagon içeren hormonlar tarafından 5 ila 7 mM arasında sıkı bir şekilde kontrol edilir, ancak insan dolaşımdaki serum fruktoz seviyeleri hakkında çok az şey bilinmektedir.

Kanser metabolizmasında glukozun yeri birçok araştırmada gösterilmiş ancak herhangi bir geri besleme mekanizması ile kontrol edilmeyen, diğer bir deyişle “sınırsız kullanılabilme kapasitesine sahip” fruktoz metabolizmasıyla ilgili çalışmalar ancak son zamanlarda gündeme gelmiştir. Kanser hücreleri büyümek, proliferasyon olmak ve başka organlara metastaz yapabilmek için glukozu çok iyi metabolize eder. Kanserde glukoz metabolizmasının anlaşılması kanseri durdurabilmek için kullanılacak en iyi yollardan biri olarak kabul edilmektedir. Glukoz ve fruktoz metabolizmasına ait yollar hücre içinde birbiri ile sıkı bir etkileşim halindedir. Bu bağlamda aslında fruktoz metabolizmasının anlaşılması da kanser tedavisi için glukoz metabolizması kadar önemlidir. Biz bu çalışmada farklı kanser hücre hatlarında, yüksek glukoz ve yüksek fruktoz içeren besiyeri ortamlarında hücrelerin hangi karbonhidrat kaynağını daha iyi metabolize ettiğini ve proliferasyonun zamana bağlı değişimini gösterdik. Bu bağlamda dokuya özgü farklı etkileri olduğu düşünölen fruktozun glukozla kıyasla karaciğer kanseri ve farklı canlılardaki meme kanserleri üzerine etkisini değerlendirdik.

Bu çalışmada yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda MDA-MB-231 hücre hattında GLUT1, GLUT2 ve HK1 protein yoğunluklarındaki değişim miktarının birbirleri ile uyumlu olduğu göröldü. Yüksek glukoz gruplarında proteinlerin ekspresyon yoğunlukları DMEM ve yüksek fruktoz gruplarına göre daha yüksekti. MDA-MB-231 hücre hattında glukozun fruktoza kıyasla proliferasyon için daha iyi bir ortam oluşturduğu gözlemlendi. Gupta ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada MDA-MB-231 hücre hattında yüksek glukoz uygulamasının siklin D1 ifadesinin, p38 ve ERK fosforilasyonunun artmasına neden olduğu ve insülin uygulaması ile birlikte GSK-3 β , NF- κ B, ve ER α gibi proliferasyonu doğrudan veya dolaylı etkileyen genlerde

ortaya çıkan değişiklikler sonucunda hücre proliferasyonunu desteklediği öne sürülmüştür (164).

Bu çalışmada 4T1 ve HEPG2 hücre hatlarında şekerin hücre içine alınmasını sağlayan GLUT1 ve GLUT2 ekspresyon düzeyleri DMEM ve yüksek glukoz gruplarında HK1 ile korele şekilde değişiklik gösterdi. Yüksek fruktoz gruplarında ise daha düşük HK1 ekspresyonu vardı. Bunun sebebinin HK1 yerine fruktozun metabolize edilmesinde etkin KHK aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Fan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada fruktozun, özellikle glukoz eksikliğinde meme kanseri hücreleri tarafından seçici bir şekilde kullanılabileceğini ve yüksek fruktoz uygulamasının, meme kanserinin ilerlemesini in vivo hızlandırabileceğini göstermiştir. Aynı zamanda hücre içi fruktoz katabolizmasının hücre proliferasyonu için gerekli olup olmadığını belirlemek adına, GLUT5 ve KHK için gen susturucu shRNA kullanılarak bu proteinlerin ekspresyonları baskılanmış ve fruktozun hücre çoğalması üzerindeki etkilerini belirlenmiştir. Sonuçlara göre, KHK veya GLUT5'in yokluğunun fruktoz içeren ortamda 4T1 ve MCF-7 hücrelerinde büyümeyi önemli ölçüde inhibe ettiği ancak glukoz içeren ortamda hücre büyümesini etkilemediği gösterilmiştir. Ek olarak fruktozun, işlevsel GLUT5'in varlığına bağlı olarak HeLa ve A549 hücrelerinde sağkalımı anlamlı düzeyde artırdığı gösterilmiştir (165).

4T1 hücre hattında proliferatif marker olan pS6 ekspresyonunda DMEM ve yüksek glukoz gruplarında 24., 48., ve 72. saatlerde kademeli düşüş görülürken 48 ve 72. saatlerde yüksek glukoz ve DMEM besiyerine kıyasla yüksek fruktoz grubunda daha yoğun bir şekilde ekspresyon görülmüştür. Sonuçlara göre hücre kültürü ortamında ilerleyen zamanlarda dahi 4T1 hücrelerinde glukozla kıyasla fruktozun hücrelerin proliferasyonu üzerinde etkin olmaya devam ettiği görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda triple-negatif meme kanseri fenotiplerinin, normal meme hücreleri için ölçülen minimum fruktoz alım değerlerine göre diğer fenotiplerden 8-10 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (166-168). Bu sebeple normal meme hücreleri ile kıyaslandığında meme kanseri hücrelerinde bulunan fruktoza özgü taşıyıcı GLUT5'in ekspresyonunun daha fazla olduğu veya meme kanseri fenotipleri arasında farklı düzeylerde eksprese edildiği düşünülmektedir. Fruktoz karaciğerde metabolize edildiği için karaciğer hücrelerinde GLUT5 ekspresyonu yüksektir. Çalışmamızın sonuçlarına

göre karaciğer kanser hücre hattı olan HEPG2’de GLUT5’in DMEM ve yüksek glukoz gruplarına kıyasla beklenen şekilde hem gruplar arasında hemde 24., 48., ve özellikle 72. saatlerde en fazla yüksek fruktoz gruplarında eksprese olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda HEPG2 hücre hattı için 72. saatte diğer gruplara göre yüksek fruktoz grubunda pS6 daha yoğun eksprese edilmiştir. Bu farklılık çok yüksek olmasa bile kültür ortamında 72. saatte proliferasyonun daha aktif durumda olması fruktozun avantaj sağladığını düşündürmektedir. DMEM, yüksek glukoz ve yüksek fruktoz deney gruplarında zamana bağlı olarak ortalama ekspresyon yoğunluklarına bakıldığında yüksek glukoz gruplarında, DMEM gruplarına göre ekspresyon yoğunlukları daha yüksekti ve yoğunluklar her iki grupta da 24., 48., ve 72. saatlerde kademeli olarak düşüş gösterdi. Yüksek fruktoz gruplarında ise 48. saatte diğer grupların aksine ekspresyon yoğunluklarında artış gözlenmesi yüksek fruktozun kanserin ilerlemesinde proliferasyonu teşvik edebileceğini göstermektedir.

Özetle, rafine fruktoz alımı, nispeten çok az miktarlarda bile olsa değişmiş hücre metabolizması, artmış enflamatuar yanıt, insülin direnci, hiperlipidemi ve hiperglisemi dahil olmak üzere çok sayıda metabolik etkiye yol açmaktadır. Son zamanlarda yapılan büyük epidemiyolojik çalışmalar, bu bileşenlerin (insülin direnci, adipokin üretimi, anjiyogenez, glukoz kullanımı ve oksidatif stres / deoksiribo dükleik asit (DNA) hasarı) kümelenmesinin bazı kanserlerin riskini artırmak için nasıl bir araya gelebileceğini göstermektedir (169). Kanser hücre metabolizmasının daha iyi anlaşılması, çeşitli ortamlarda gelişen mekanizmaların çözülmesinin anahtarı olabilir. Fruktoz, fruktoz metabolizması ve kanser arasındaki ilişkinin daha fazla karakterizasyonu, yalnızca kanser etiyolojisine bir bakış açısı sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda kanserin teşhis ve tedavisi için yeni stratejiler sağlayabilir. Glukoz ve fruktoz metabolizmasındaki benzer adaptasyonlar potansiyel olarak yeni tedavi seçeneklerini artırabilir. Bu genel araştırma alanının nihai amacı, şekerlerin farklı metabolik yolları ve substrat oluşumunu taklit edebilen ve kanser için görüntüleme ve terapötikler için taşıyıcı olarak işlev gören veya kanseri teşvik etmek için şeker substratlarının zararlı etkilerini bloke etmeye yarayan bileşikler tasarlayabilmektir. Kanserde fruktoz aracılı eylemleri seçici olarak hedeflemenin olası faydaları şu anda bilinmemektedir ve fruktoz aracılı eylemleri spesifik olarak hedef alan farmakolojik ajanlar mevcut değildir. Fruktoz gibi diğer şekerlerin kanser hücresi çoğalması ve gelişimindeki rolünü anlamaya yönelik

alışmalar, başlangıç aşamasındadır ancak kanser hücrelerinin bu şekerleri çeşitli metabolik işlemler için kullanma şeklindeki temel farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Glukoz ve fruktozdaki bu metabolik farklılıkların daha fazla sayıda kanser türünde değerlendirilmesi ve bu bulguların tam olarak öneminin ortaya çıkabilmesi için ek in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Fruktoz gibi monosakaritlerin metabolizma, oksidatif stres, DNA hasarı, insülin direnci ve enflamasyon gibi hücreyel olayları düzenlediği kesin moleküler mekanizmalar, kanser hücresi biyolojisi ve farmakolojik müdahale stratejilerinde heyecan verici yeni yollar sağlayacaktır. Bu, muhtemelen artmaya devam edecek olan obezite ile ilişkili kanserlerin halk sağlığı etkileri göz önüne alındığında, özellikle önemli olacaktır. Kanserdeki fruktoz aracılı etkilerin engellenmesi için farmakolojik yöntemler arama çabalarına paralel olarak, yaşam tarzı alışkanlıklarını değiştirme eylemleri artırılmalı ve fruktoz tüketimi de dahil olmak üzere sağlıklı bir vücut ağırlığını koruma ve rafine şeker alımını azaltma yönünde çalışmalar yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery*. 2012;2(10):881-98.
3. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(2):85.
4. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*. 2009;324(5930):1029-33.
5. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
6. Granchi C, Fancelli D, Minutolo F. An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2014;24(21):4915-25.
7. Salamon S, Podbregar E, Kubatka P, Büsselberg D, Caprnda M, Opatrilova R, et al. Glucose metabolism in cancer and ischemia: possible therapeutic consequences of the Warburg effect. *Nutrition and cancer*. 2017;69(2):177-83.
8. Boyle J. *Lehninger principles of biochemistry*: Nelson, D., and Cox, M. Wiley Online Library; 2005.
9. Theytaz F, de Giorgi S, Hodson L, Stefanoni N, Rey V, Schneider P, et al. Metabolic fate of fructose ingested with and without glucose in a mixed meal. *Nutrients*. 2014;6(7):2632-49.
10. Ross MH, Pawlina W. *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
11. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*. 1988;333(6169):183.

12. Bray GA. Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. Oxford University Press; 2013.
13. Hundal HS, Darakhshan F, Kristiansen S, Blakemore SJ, Richter EA. GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Skeletal Muscle Metabolism in Exercise and Diabetes*: Springer; 1998. p. 35-45.
14. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*. 2016;65(2):124-39.
15. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985;229(4717):941-5.
16. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):121-38.
17. Garcia MdA, Millán C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, et al. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(3):709-24.
18. Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *International journal of endocrinology*. 2010;2010.
19. Hundal HS, Darakhshan F, Kristiansen S, Blakemore SJ, Richter EA. GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Skeletal Muscle Metabolism in Exercise and Diabetes*: Springer; 1998. p. 35-45.
20. Phay JE, Hussain HB, Moley JF. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*. 2000;66(2):217-20.
21. Li Q, Manolescu A, Ritzel M, Yao S, Slugoski M, Young JD, et al. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004;287(1):G236-G42.

22. Ibberson M, Uldry M, Thorens B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(7):4607-12.
23. Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH. Identification and Characterization of Human Glucose Transporter-like Protein-9 (GLUT9) ALTERNATIVE SPLICING ALTERS TRAFFICKING. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(16):16229-36.
24. Bibert S, Hess SK, Firsov D, Thorens B, Geering Kt, Horisberger J-D, et al. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2009;297(3):F612-F9.
25. Witkowska K, Smith KM, Yao SY, Ng AM, O'Neill D, Karpinski E, et al. Human SLC2A9a and SLC2A9b isoforms mediate electrogenic transport of urate with different characteristics in the presence of hexoses. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2012;303(4):F527-F39.
26. Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, Cheeseman C. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology*. 2007;22(4):234-40.
27. Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12–13.1. *Molecular genetics and metabolism*. 2001;74(1-2):186-99.
28. Pujol-Giménez J, Pérez A, Reyes AM, Loo DD, Lostao MP. Functional characterization of the human facilitative glucose transporter 12 (GLUT12) by electrophysiological methods. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2015;308(12):C1008-C22.
29. Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, et al. Identification of a novel glucose transporter-like protein—GLUT-12. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2002;282(3):E733-E8.
30. Wu X, Freeze HH. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*. 2002;80(6):553-7.

31. Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, et al. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(15):5434-8.
32. Watanabe T, Nagamatsu S, Matsushima S, Kondo K, Motobu H, Hirosawa K, et al. Developmental expression of GLUT2 in the rat retina. *Cell and tissue research*. 1999;298(2):217-23.
33. Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan Y-S, Eddy RL, et al. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(22):13276-82.
34. Concha II, Velásquez FV, Martínez JM, Angulo C, Droppelmann A, Reyes AM, et al. Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood*. 1997;89(11):4190-5.
35. Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH. Identification and Characterization of Human Glucose Transporter-like Protein-9 (GLUT9) ALTERNATIVE SPLICING ALTERS TRAFFICKING. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(16):16229-36.
36. Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, Cheeseman CI, Bell A, Zahn C, et al. Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Molecular membrane biology*. 2005;22(4):339-51.
37. Nualart F, Garcia MdlA, Medina RA, Owen GI. Glucose transporters in sex steroid hormone related cancer. *Current vascular pharmacology*. 2009;7(4):534-48.
38. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(4):248-57.

39. Ardehali H, Printz RL, Whitesell RR, May JM, Granner DK. Functional interaction between the N-and C-terminal halves of human hexokinase II. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(23):15986-9.
40. Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", ie, elevated glycolysis in the presence of oxygen. Springer; 2007.
41. Robey Ra, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*. 2006;25(34):4683.
42. Wilson J. Hexokinases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Volume 126: Springer; 1995. p. 65-198.
43. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*. 2003;206(12):2049-57.
44. Sui D, Wilson JE. Structural determinants for the intracellular localization of the isozymes of mammalian hexokinase: intracellular localization of fusion constructs incorporating structural elements from the hexokinase isozymes and the green fluorescent protein. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997;345(1):111-25.
45. Katzen HM, Schimke RT. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1965;54(4):1218.
46. Tsai HJ, Wilson JE. Functional organization of mammalian hexokinases: both N-and C-terminal halves of the rat type II isozyme possess catalytic sites. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;329(1):17-23.
47. Heikkinen S, Suppola S, Malkki M, Deeb SS, Jänne J, Laakso M. Mouse hexokinase II gene: structure, cDNA, promoter analysis, and expression pattern. *Mammalian Genome*. 2000;11(2):91-6.
48. Dunaway GA, Kasten TP, Sebo T, Trapp R. Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochemical Journal*. 1988;251(3):677-83.
49. World Health Organization Fact Sheet. Obesity and overweight. 2014; No. 311.

50. Kit BK, Fakhouri TH, Park S, Nielsen SJ, Ogden CL. Trends in sugar-sweetened beverage consumption among youth and adults in the United States: 1999–2010. *The American journal of clinical nutrition*. 2013;98(1):180-8.
51. <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/> Erişim tarihi: 12.12.2017.
52. Rosinger A, Herrick KA, Gahche JJ, Park S. Sugar-sweetened beverage consumption among US youth, 2011-2014. 2017.
53. Vos MB, Kaar JL, Welsh JA, Van Horn LV, Feig DI, Anderson CA, et al. Added sugars and cardiovascular disease risk in children: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(19):e1017-e34.
54. Patel C, Douard V, Yu S, Gao N, Ferraris RP. Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *The FASEB Journal*. 2015;29(9):4046-58.
55. Sugimoto K, Kawasaki T, Tomoda M, Nakagawa K, Hayashi S, Inui H, et al. Lowering of postprandial hyperfructosemia in humans by eucalyptus leaf extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Food science and technology research*. 2010;16(5):509-12.
56. Wahjudi PN, Patterson ME, Lim S, Yee JK, Mao CS, Lee W-NP. Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clinical biochemistry*. 2010;43(1-2):198-207.
57. Preston GM, Calle RA. Elevated serum sorbitol and not fructose in type 2 diabetic patients. *Biomarker insights*. 2010;5:BMI. S4530.
58. Lam P. Effects of consuming dietary fructose versus glucose on de novo lipogenesis in overweight and obese human subjects. *Berkeley Scientific Journal*. 2011;15(2).
59. Tappy L, Lê K-A. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2012;36(6):554-60.
60. Mavrias DA, Mayer RJ. Metabolism of fructose in the small intestine I. The effect of fructose feeding on fructose transport and metabolism in rat small intestine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1973;291(2):531-7.

61. Ginsburg V, Hers H. On the conversion of fructose to glucose by guinea pig intestine. *Biochimica et biophysica acta*. 1960;38:427-34.
62. Rand E, Depaoli A, Davidson N, Bell G, Burant C. Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1993;264(6):G1169-G76.
63. Sugimoto K, Hosotani T, Kawasaki T, Nakagawa K, Hayashi S, Nakano Y, et al. Eucalyptus leaf extract suppresses the postprandial elevation of portal, cardiac and peripheral fructose concentrations after sucrose ingestion in rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2010;46(3):205-11.
64. Boscá L, Corredor C. Is phosphofructokinase the rate-limiting step of glycolysis? *Trends in Biochemical Sciences*. 1984;9(9):372-3.
65. Bray GA. Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. Oxford University Press; 2013.
66. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(5):911-22.
67. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(4):537-43.
68. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition reviews*. 2005;63(5):133-57.
69. Cantley LC. Cancer, metabolism, fructose, artificial sweeteners, and going cold turkey on sugar. *BMC biology*. 2014;12(1):8.
70. Vos MB, Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;57(6):2525-31.
71. Raivio KO, Becker MA, Meyer LJ, Greene ML, Nuki G, Seegmiller JE. Stimulation of human purine synthesis de novo by fructose infusion. *Metabolism*. 1975;24(7):861-9.

72. Jamnik J, Rehman S, Mejia SB, de Souza RJ, Khan TA, Leiter LA, et al. Fructose intake and risk of gout and hyperuricemia: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ open*. 2016;6(10):e013191.
73. Chang CH, Chen YM, Chuang YW, Liao SC, Lin CS, Tang YJ, et al. Relationship between hyperuricemia (HUC) and metabolic syndrome (MS) in institutionalized elderly men. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2009;49:S46-S9.
74. Liu M, He Y, Jiang B, Wu L, Yang S, Wang Y, et al. Association between serum uric acid level and metabolic syndrome and its sex difference in a Chinese community elderly population. *International journal of endocrinology*. 2014;2014.
75. Puig JG, Martinez MA. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Current opinion in rheumatology*. 2008;20(2):187-91.
76. Lanaspá MA, Sanchez-Lozada LG, Choi Y-J, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jimenez CA, et al. Uric Acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress potential role in fructose-dependent and-independent fatty liver. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(48):40732-44.
77. Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007;293(2):C584-C96.
78. Tapia E, Cristóbal M, García-Arroyo FE, Soto V, Monroy-Sánchez F, Pacheco U, et al. Synergistic effect of uricase blockade plus physiological amounts of fructose-glucose on glomerular hypertension and oxidative stress in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2012;304(6):F727-F36.
79. Choi Y-J, Yoon Y, Lee K-Y, Hien TT, Kang KW, Kim K-C, et al. Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis. *The FASEB Journal*. 2014;28(7):3197-204.
80. Lanaspá MA, Sanchez-Lozada LG, Choi Y-J, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jimenez CA, et al. Uric Acid induces hepatic steatosis by generation of

- mitochondrial oxidative stress potential role in fructose-dependent and-independent fatty liver. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(48):40732-44.
81. Oates PJ. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *International review of neurobiology*. 2002;50:325-92.
 82. Hwang JJ, Jiang L, Hamza M, Dai F, Belfort-DeAguiar R, Cline G, et al. The human brain produces fructose from glucose. *JCI insight*. 2017;2(4).
 83. Cheng HM, González RG. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism*. 1986;35(4):10-4.
 84. Jedziniak JA, Chylack L, Cheng H-M, Gillis MK, Kalustian AA, Tung WH. The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1981;20(3):314-26.
 85. Frenette G, Thabet M, Sullivan R. Polyol pathway in human epididymis and semen. *Journal of andrology*. 2006;27(2):233-9.
 86. Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, et al. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertility and sterility*. 2010;94(5):1739-43.
 87. Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat H, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(9):1195-204.
 88. Hwang JJ, Johnson A, Cline G, Belfort-DeAguiar R, Snegovskikh D, Khokhar B, et al. Fructose levels are markedly elevated in cerebrospinal fluid compared to plasma in pregnant women. *PloS one*. 2015;10(6):e0128582.
 89. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *cell*. 1995;81(3):323-30.
 90. Wyllie AH, Kerr JR, Currie A. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*. 68: Elsevier; 1980. p. 251-306.
 91. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry-New York-English Translation of Biokhimiya*. 1997;62(11):1180-90.

92. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Advances in cancer research*. 69: Elsevier; 1996. p. 135-74.
93. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(26):1757-63.
94. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*. 1996;86(3):353-64.
95. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362(6423):841.
96. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*. 1994;367(6463):576.
97. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* (London, England). 1996;347(9012):1377-81.
98. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
99. Draoui N, Schicke O, Fernandes A, Drozak X, Nahra F, Dumont A, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of carboxycoumarins as a new antitumor treatment targeting lactate transport in cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2013;21(22):7107-17.
100. Altenberg Ba, Greulich K. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004;84(6):1014-20.
101. Martins SF, Amorim R, Viana-Pereira M, Pinheiro C, Costa RFA, Silva P, et al. Significance of glycolytic metabolism-related protein expression in colorectal cancer, lymph node and hepatic metastasis. *BMC cancer*. 2016;16(1):535.
102. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*. 2008;13(6):472-82.
103. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ze'ev AR, et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines beyond the warburg effect. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(49):42626-34.
104. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.

105. DeBerardinis RJ. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genetics in Medicine*. 2008;10(11):767.
106. Miranda-Gonçalves V, Granja S, Martinho O, Honavar M, Pojo M, Costa BM, et al. Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. *Oncotarget*. 2016;7(29):46335.
107. Andersen AP, Flinck M, Oernbo EK, Pedersen NB, Viuff BM, Pedersen SF. Roles of acid-extruding ion transporters in regulation of breast cancer cell growth in a 3-dimensional microenvironment. *Molecular cancer*. 2016;15(1):45.
108. Miranda-Goncalves V, Honavar M, Pinheiro C, Martinho O, Pires MM, Pinheiro C, et al. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-oncology*. 2012;15(2):172-88.
109. Barar J, Omid Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy. *BioImpacts: BI*. 2013;3(4):149.
110. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreessen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*. 2006;107(5):2013-21.
111. Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Turley H, Harris AL, Koukourakis MI. Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2 (KDR) pathway and prognosis. *Gynecologic oncology*. 2006;103(3):912-8.
112. Kumar VS, Viji R, Kiran M, Sudhakaran P. Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF. *Journal of cellular physiology*. 2007;211(2):477-85.
113. Yalamanchi N, Klein MB, Pham HM, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon wound healing in vitro: lactate up-regulation of TGF- β expression and functional activity. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;113(2):625-32.
114. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(49):29083-9.
115. Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(4):522-30.

116. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, De Milito A, Ricupito A, et al. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer research*. 2012;72(11):2746-56.
117. Eng C, Sehgal S, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22, 989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics*. 1984;37(10):1231-7.
118. Martel R, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1977;55(1):48-51.
119. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*. 1992;69(7):1227-36.
120. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43.
121. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
122. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-75.
123. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology*. 2004;6(11):1122.
124. Lipton JO, Sahin M. The neurology of mTOR. *Neuron*. 2014;84(2):275-91.
125. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005;123(4):569-80.
126. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1-and βTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*. 2006;314(5798):467-71.
127. Ma XM, Yoon S-O, Richardson CJ, Jülich K, Blenis J. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*. 2008;133(2):303-13.

128. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism*. 2008;8(3):224-36.
129. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJ, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 2016;351(6274):728-33.
130. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*. 2013;339(6125):1323-8.
131. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell*. 2010;39(2):171-83.
132. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2008;30(2):214-26.
133. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology*. 2008;10(8):935.
134. Lacroix M. Persistent use of “false” cell lines. *International journal of cancer*. 2008;122(1):1-4.
135. Gartler SM. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature*. 1968;217(5130):750.
136. Chatterjee R. Cases of mistaken identity. *American Association for the Advancement of Science*; 2007.
137. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell biology and toxicology*. 2007;23(6):367-72.
138. Van den Brink GR, Offerhaus GJ. The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer cell*. 2007;11(2):109-17.
139. Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British journal of cancer*. 2007;96(1):11.
140. Gourin CG, Podolsky RH. Racial disparities in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2006;116(7):1093-106.

141. Yanke BV, Salzhauer EW, Colon I. Is race a positive predictor of cancer on repeat prostate biopsy? *The Journal of urology*. 2006;176(3):1114-7.
142. Chou S-Y, Grossman M, Saffer H. An economic analysis of adult obesity: results from the Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Journal of health economics*. 2004;23(3):565-87.
143. Health NIo. National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases. "Statistics related to overweight and obesity: the economic costs.". 2008.
144. Putnam JJ, Allshouse JE. Food consumption, prices, and expenditures, 1970-97. 1999.
145. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(17):1625-38.
146. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & metabolism*. 2005;2(1):5.
147. Gallagher EJ, LeRoith D. Insulin, insulin resistance, obesity, and cancer. *Current diabetes reports*. 2010;10(2):93-100.
148. Pitt HA. Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB*. 2007;9(2):92-7.
149. Miatello R, Risler N, Castro C, González S, Rüttler M, Cruzado M. Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats. *American journal of hypertension*. 2001;14(11):1135-41.
150. Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, et al. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Autonomic Neuroscience*. 2006;130(1-2):41-50.
151. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2008;48(6):993-9.
152. Higginbotham S, Zhang Z-F, Lee I-M, Cook NR, Giovannucci E, Buring JE, et al. Dietary glycemic load and risk of colorectal cancer in the Women's Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(3):229-33.

153. Giovannucci E, Rimm EB, Wolk A, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium and fructose intake in relation to risk of prostate cancer. *Cancer Research*. 1998;58(3):442-7.
154. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):54-61.
155. Enzmann H, Ohlhauser D, Dettler T, Bannasch P. Enhancement of hepatocarcinogenesis in rats by dietary fructose. *Carcinogenesis*. 1989;10(7):1247-52.
156. Monzavi-Karbassi B, Hine RJ, Stanley JS, Ramani VP, Carcel-Trullols J, Whitehead TL, et al. Fructose as a carbon source induces an aggressive phenotype in MDA-MB-468 breast tumor cells. *International journal of oncology*. 2010;37(3):615-22.
157. Liu H, Huang D, McArthur DL, Boros LG, Nissen N, Heaney AP. Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer research*. 2010;70(15):6368-76.
158. Hui H, Huang D, McArthur D, Nissen N, Boros LG, Heaney AP. Direct spectrophotometric determination of serum fructose in pancreatic cancer patients. *Pancreas*. 2009;38(6):706-12.
159. Kok N, Roberfroid M, Delzenne N. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism*. 1996;45(12):1547-50.
160. Kazumi T, Odaka H, Hozumi T, Ishida Y, Amano N, Yoshino G. Effects of dietary fructose or glucose on triglyceride production and lipogenic enzyme activities in the liver of Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM. *Endocrine journal*. 1997;44(2):239-45.
161. Yadav H, Jain S, Sinha P. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*. 2007;23(1):62-8.
162. Miyazaki M, Dobrzyn A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim H-J, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding

- protein-1c-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(24):25164-71.
163. Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, et al. Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer research*. 2004;64(6):2212-21.
 164. Gupta C, Tikoo K. High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *J Mol Endocrinol*. 2013;29;51(1):119-29.
 165. Fan X, Liu H, Liu M, Wang Y, Qiu L, Cui Y. Increased utilization of fructose has a positive effect on the development of breast cancer. *PeerJ*. 2017;27;5:e3804.
 166. Gowrishankar G., Zitzmann-Kolbe S., Junutula A., Reeves R., Levi E., Srinivasan A., Bruus-Jensen K., Cyr J., Dinkelborg L., Gambhir S.S. Glut 5 is not over-expressed in breast cancer cells and patient breast cancer tissues. *PLoS ONE*. 2011;11:e26902.
 167. Trayner B.J., Grant T.N., West F.G., Cheeseman C.I. Synthesis and characterization of 6-deoxy-6-fluoro-d-fructose as a potential compound for imaging breast cancer with pet. *Bioorg. Med. Chem*. 2009;17:5488–5495.
 168. Zamora-Leon S.P., Golde D.W., Concha I.I., Rivas C.I., DelgadoLopez F., Baselga J., Nualart F., Vera J.C. Expression of the fructose transporter glut5 in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996;93:1847–1852.
 169. Cowey S, Hardy RW. The metabolic syndrome: a high-risk state for cancer? *The American journal of pathology*. 2006;169(5):1505-22.

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA GLUKOZ VE FRUKTOZ TRANSPORT MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**5**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**6**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	www.tr.hukol.net İnternet Kaynağı	%1
3	KISAÇAM, Mehmet Ali and TEMİZER OZAN, Penbe Sema. "Kanser Hücrelerinin Metabolik İhtiyaçları ve Bağımlılıkları", Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri, 2017. Yayın	%1
4	onkder.org İnternet Kaynağı	%1
5	content.lms.sabis.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Ayca Lekesizcan

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Melikgazi 38039, Kayseri / TÜRKİYE
Telefon: +90 555 330 65 38

E-posta: aycakaraa@gmail.com, aycakara@erciyes.edu.tr

EĞİTİM

Doktora aday1, Erciyes Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

M.S, Erciyes Üniversitesi Tıp Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE 2009-2012

B.S, Fen Bilimleri Enstitüsü Erciyes Üniversitesi Kayseri, TÜRKİYE 2005-2009

İŞ DENEYİMİ

Araştırma Görevlisi, Tıp Anabilim Dalı Erciyes Üniversitesi Kayseri, TÜRKİYE (2011-2018)

Araştırma Görevlisi, Massachusetts Institute of Technology Whitehead Institute Nine Cambridge Center Cambridge MA, USA (2013 – 2014)

YABANCI DİL: İngilizce

ARAŞTIRMA ALANI: Bağırsak Kök Hücre, Kanser Metabolizması, Obezite, Fruktöz-Glukoz Metabolizması, Embriyonik Gelişim, PI3K / AKT / mTOR yolu

KONFERANSLAR VE BELGELER

- Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kursuna Katılım Sertifikası. Kayseri, Türkiye 2010-2011

- I. Ulusal Genetik ve Biyoteknoloji Çalıştay1. Kayseri, Türkiye 12-13 Şubat 2010

- X. Histoloji ve Embriyoloji Ulusal Kongresi. İzmir, Türkiye. 17-20 Mayıs 2010

- I. Kök Hücre Sempozyumu. Ankara Türkiye. 25-26 Haziran 2010

- 2. St Embriyonik Kök Hücreler Semineri Semineri. Kayseri, Türkiye 1-3 Aralık 2010

- Eğitim Kursu I-III Kök Hücre Teknolojileri Yönetimi ve İşletmeciliği ve Memeli Hücre Kültürü Temelleri dersi. Kayseri, Türkiye 1-3 Aralık 2010

- II. Temel Hücre Kültürü Dersi. Kayseri, Türkiye 15-16 Şubat 2011

Kök Hücre Araştırma ve Uygulamaları 1. Uluslararası Konferansı. Kayseri, Türkiye 7-9 Ekim 2011

-11. Histoloji ve Embriyoloji Ulusal Kongresi. Denizli Türkiye 16-19 Mayıs 2012

-Embryo Farelerde Manipülasyonlar ve Transgenik Fare Üretiminde Kullanılan Yöntemler, Tubitak / MAM, 2014

-Hematojenik Kursu, Erciyes Üniversitesi / GENKÖK, 2014

-Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi, Erciyes Üniversitesi / GENKÖK, 2014

Moleküler Biyoloji ve Hücre Kültürü Kursu, Erciyes Üniversitesi / Histoloji Anabilim Dalı,
Embriyoloji, 2017

BİLGİSAYAR BİLGİSİ: MS Office Uygulamaları; Power Point, Excel, Microsoft Word, Açık
Ofis Uygulamaları, İnternet Araçları, ImageJ, DP denetleyicisi, Analytics SIS LS Research

