

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VETERİNER) DOKTORA PROGRAMI
VBY-2020-0002

HİPOKSİK MCF 7 MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE GLUKOZ KATABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI

İREM BAYAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
ADÜ-VTF-17031 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
ÖZET	xix
ABSTRACT	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanserin Karakteristik Özellikleri.....	3
2.3. Meme Kanseri	5
2.3.1 MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı	6
2.4. Hücreşel Metabolizma.....	6
2.5. Glukoz Metabolizması.....	7
2.5.1. Glikolizis Akışı ve Regölasyonu	9
2.5.2. Allosterik Regölasyon ve Yüksek Glikolitik Akış	10
2.5.3. Dallı biyosentetik yollara Glikolitik Akışın Düzenlenmesi	11
2.6. Kanser Hücrelerinin Enerji Metabolizması	14
2.6.1. Crabtree Etkisi	16
2.6.2. Warburg Fenomeni	17
2.7. Hipoksi ve Kanser	23
2.7.1. Organizmadaki Oksijenin Fizyolojik Konsantrasyonları	23
2.7.2. Hipoksinin Tanımı.....	23
2.7.3. Kanser Gelişiminde Hipoksinin Rolü.....	24
2.8. HIF-1 Ailesi.....	25
2.9. Warburg Etkisinin Regölasyonu.....	29
2.9.1. Warburg Etkisinin Hipoksi ve HIF-1 α ile Regölasyonu	29
2.9.2. Warburg Etkisi'nin Onkogenler ile Regölasyonu	30

2.10. Kanser Teşhis ve Prognozunda Warburg Etkisinin Kullanılması	33
2.11. Glukoz Taşıyıcıları	34
2.12. Glikolizin Kontrolünde Rol Oynayan Bazı Metabolik Enzimler	36
2.12.1. Hekzokinaz-2 (HK2)	36
2.12.2. Fosfofruktokinaz-1 ve 6-fosfofrukto-2-kinaz /fruktoz-2,6 bifosfataz	39
2.12.3. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH).....	41
2.12.4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)	44
2.12.5. Piruvat kinaz (PK)	46
2.12.6. Laktat Dehidrogenaz (LDH).....	50
2.12.6.1. Hücresel metabolizmada LDHA'nın rolü.....	53
2.12.7. Laktat Metabolizması	55
3. GEREÇ ve YÖNTEM	60
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	60
3.2. Hücre Kültürü.....	61
3.2.1. MCF-7 Hücresinin Özellikleri.....	61
3.2.2. Hücre Kültürü Ortamı.....	62
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	62
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	63
3.2.5. Hücrelerin Çözülmesi	64
3.2.6. Hücre Sayımı	64
3.2.7. Hücrelere Farklı Konsantrasyonlarda Glukoz Uygulanması.....	65
3.2.8. Hipoksik Kültür Koşulları/ Hipoksi Modeli Oluşturulması	65
3.3. Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi)	66
3.4. Glikolitik Enzimlerin ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ile Tayini	67
3.5. Kolorimetrik Ölçümler	69
3.5.1. Laktat Tayini	69
3.5.2. Glukoz Tayini	70
3.6. Wound Healing Testi.....	72
3.7. İstatistiksel Analiz	73
4. BULGULAR	74
4.1. MCF-7 Hücrelerinin İnvert-Mikroskop Görüntüleri	74
4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	75
4.3. Enzim Miktarlarının Değerlendirilmesi.....	81
4.3.1. ELISA Yönteminden Elde Edilen PKM2 Sonuçları	81

4.3.1.1. PKM2 enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağılı değişimi	81
4.3.1.2. Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki PKM2 enzim miktarlarının karşılaştırılması	85
4.3.2. ELISA Yönteminden Elde Edilen LDHA Sonuçları	87
4.3.2.1. LDHA enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağılı değişimi	87
4.3.2.2. Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki LDHA enzim miktarlarının karşılaştırılması	91
4.3.3. ELISA Yönteminden Elde Edilen G6PD Sonuçları	94
4.3.3.1. G6PD enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağılı değişimi	94
4.3.3.2. Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki G6PD enzim miktarlarının karşılaştırılması	97
4.3.4. ELISA Yönteminden Elde Edilen HK2 Sonuçları	100
4.3.4.1. HK2 enzim miktarının zamana göre değişimi	100
4.3.4.2. Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki HK2 enzim miktarlarının karşılaştırılması	103
4.3.5. ELISA Yönteminden Elde Edilen PFKP Sonuçları	106
4.3.5.1. PFKP enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağılı değişimi	106
4.3.5.2. Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki PFKP enzim miktarlarının karşılaştırılması	110
4.4. Kolorimetrik Laktat Tayini	112
4.4.1. Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Zamana Bağılı Hücre Dışı Laktat Salınımı	112
4.4.2. Aynı Konsantrasyonlu Glukoz Uygulamalarında Normoksik ve Hipoksik Ortamdaki Ekstrasellüler Laktat Miktarlarının Karşılaştırılması	116
4.5. Glukoz Tüketim Miktarlarının Belirlenmesi	119
4.5.1. Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Glukoz Tüketim Miktarı	119
4.5.2. Normoksik ve Hipoksik Koşulların Glukoz Tüketim Miktarı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması	121
4.6. Wound Healing Test Sonuçları	123
5. TARTIşMA	128
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	146
KAYNAKLAR	149
ÖZGEÇMİş	185

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1,3BPG	: 1,3 Bifosfogliserat
2PG	: 2- Fosfogliserat
2-P-L	: 2- Fosfolaktat
3PG	: 3- Fosfogliserat
6PGDH	: 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
ACLY	: ATP sitrat liyaz
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive protein kinaz
ANT	: Adenin nükleotit translokator
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1
ATP	: Adenozin trifosfat
CA	: Karbonik anhidraz
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CBP	: CREB bağlı protein
CCND1	: Siklin D1
CMP	: Sitidin monofosfat
COX	: Sitokrom c oksidaz
CRE	: cAMP yanıt elemanı
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E(1,4)BP	: 1,4-Bisfosfoeritronat
E4P	: 4-Fosfoeritronat
ENO	: Enolaz
ENTPD5	: Ektonükleozid trifosfat difosfohidrolaz 5
EPO	: Eritropoietin
ER	: Endoplazmik retikulum
ER⁺	: Östrojen reseptörü pozitif
ER	: Östrojen reseptörü α
F1,6-BP	: Fruktoz 1,6 bisfosfat

F2,6-BP	: Fruktoz-2,6-bisfosfat
F6P	: Fruktoz-6-fosfat
FDG	: Floro-D-glukoz
FDG-PET	: 2-deoksi-2- [18F] Floro-D-Glukoz Pozitron Emisyon Tomografisi
FOXM1	: Forkhead box protein M1
FOXO	: Forkhead box subfamily O
G3P	: Gliseraldehid-3-fosfat
G6P	: Glukoz-6-fosfat
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
GLUT	: Glukoz transfercisi
GPI	: Glukoz fosfat izomeraz
GSH	: Aktif glutatyon
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HK	: Hekzokinaz
HRE	: Hipoksik cevap elementi
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-BP	: IGF-bağlı protein
IL-8	: İnterlökin-8
JMJD5	: Jumonji C domain içeren dioksijenaz
KLF4	: Kruppel-benzeri faktör 4
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LKB1	: Karaciğer kinaz B1; serin/treonin kinaz 11-STK11
LOX	: Lizil oksidaz
MCT1	: Protona bağlı karboksilat taşıyıcı-1
MMP-2	: Matriks metaloproteinaz 2
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
NHE1	: Na ⁺ /H ⁺ değiştirici
NO	: Nitrik oksit
NOX	: NADPH-oksidazlar
OCT1	: Oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1

OXPHOS	: Oksidatif fosforilasyon
PARP1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
PDH	: Piruvat dehidrogenaz
PEP	: Fosfoenolpiruvat
PFK-1	: Fosfofruktokinaz-1
PFKFB	: 6-fosfosfrukto-2 kinaz / fruktoz-2,6-bisfosfataz
PGAM	: Fosfogliserat mutaz
PGK-1	: Fosfogliserat kinaz 1
PHD	: Prolil hidroksilaz domain proteinleri
PHGDH	: 3-fosfogliserat dehidrogenaz
pHi	: Alkali hücre içi pH
PI3K	: Fosfoinositid-3-kinaz
PiC	: İnorganik fosfat taşıyıcı
PK	: Piruvat kinaz
PKB	: Serin/treonin kinaz Akt
PKM2	: Piruvat kinaz M2
PPP	: Pentoz fosfat yolu
PR⁺	: Progesteron reseptörü pozitif
pVHL	: Von Hippel-Lindau
R5P	: Riboz-5-fosfat
RNS	: Reaktif azot türleri
Ru5P	: Ribüloz 5-fosfat
SAICAR	: 2-[5-Amino-1-(5-fosfo-D-ribozil)imidazol-4-karboksamido] süksinat)
SCO2	: Sitokrom c oksidaz-2
SDH	: Süksinat dehidrogenaz
SIRT	: Sirtuin
TCA	: Trikarboksilik asit siklusu
TGF-α	: Transforme edici büyüme faktörü α
TKT	: Transketolaz
Ub	: Ubikitin
UDP	: Uridin 5' difosfat
UMP	: Uridin 5' monofosfat

VDAC : Voltaj bağlı anyon kanalları
VGEF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser belirteçleri.....	5
Şekil 2. Glikolizisin ve TCA döngüsünün metabolik adımları	9
Şekil 3. Glikolizis ile pozitif ve negatif feedback regülasyonlarının mekanizmalarına genel bakış	13
Şekil 4. Pasif ve çoğalan hücrelerde metabolik aktiviteye genel bakış.....	16
Şekil 5. Anaerobik glikolizis, aerobik glikolizis ve oksidatif fosforilasyon arasındaki farklılıklar.....	18
Şekil 6. Warburg etkisi ve hücrede yarattığı sonuçlar.....	22
Şekil 7. Hipoksi ve HIF'ler tarafından regüle edilen kanser belirteçleri	25
Şekil 8. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 α regülasyonu ve doğrudan HIF-1 α tarafından regüle edilen biyolojik fonksiyonlarına göre gruplandırılmış genler	28
Şekil 9. Onkogenik ve tümör baskılayıcı yolların Warburg Etkisi'ne katkısı	33
Şekil 10. Farklı sınıf (I, II ve III) GLUT'ların iki boyutlu modelleri	35
Şekil 11. Glikolitik akışın yüksek olduğu tümör hücresi içinde glukozun metabolik olarak izlediği yol.....	39
Şekil 12. Hipoksik ve normoksik koşullarda GAPDH aracılı glikolitik akı	43
Şekil 13. PPP ve glikolizin şematik gösterimi.....	46
Şekil 14. Piruvat kinaz (PKM2) aktivitesinin M2 izoformundaki değişikliklerin hücresel metabolik sonuçları.....	49
Şekil 15. PKM2'nin glikolitik olmayan nükleer fonksiyonlarının prolin hidroksilasyonu ile regülasyonu	50
Şekil 16. Laktat dehidrogenaz fonksiyonlarının ve gen ekspresyonunun gösterimi	52
Şekil 17. Tümör hücreleri ve normal hücreler arasındaki laktat mekiği.....	53
Şekil 18. Ekstrasellüler faktörler ve hipoksi aracılı LDHA gen regülasyonu ile LDH-5 aktivasyon yollarının şematik gösterimi	55
Şekil 19. Tümörlerde laktat metabolizması: Laktatın kanser hücrelerinde izlediği yol ve anjiyogenezi yönlendirmede bir sinyal molekülü olarak potansiyel rolü	57
Şekil 20. WST-1 redüksiyonunun şematik mekanizması	66
Şekil 21. Glukoz standard grafiği.....	71

Şekil 22. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	77
Şekil 23. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	78
Şekil 24. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	79
Şekil 25. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.....	80
Şekil 26. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PKM2 enzim miktarı düzeyleri.....	82
Şekil 27. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PKM2 enzim miktarı düzeyleri.....	83
Şekil 28. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PKM2 miktarlarının karşılaştırılması.....	84
Şekil 29. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PKM2 miktarlarının karşılaştırılması.....	84
Şekil 30. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması	85
Şekil 31. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5,5 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması	86
Şekil 32. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması	86

Şekil 33. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	87
Şekil 34. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen LDHA enzim miktarı düzeyleri.....	89
Şekil 35. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen LDHA enzim miktarı düzeyleri.....	89
Şekil 36. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında LDHA miktarlarının karşılaştırılması.....	90
Şekil 37. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında LDHA miktarlarının karşılaştırılması.....	91
Şekil 38. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	92
Şekil 39. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5,5 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	92
Şekil 40. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	93
Şekil 41. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	93
Şekil 42. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PD enzim miktarı düzeyleri.....	95
Şekil 43. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PD enzim miktarı düzeyleri.....	95

Şekil 44. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında G6PD miktarlarının karşılaştırılması.....	96
Şekil 45. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında G6PD miktarlarının karşılaştırılması.....	97
Şekil 46. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	98
Şekil 47. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5,5 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması	98
Şekil 48. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	99
Şekil 49. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	99
Şekil 50. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK2 enzim miktarı düzeyleri.....	101
Şekil 51. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK2 enzim miktarı düzeyleri.....	101
Şekil 52. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında HK2 miktarlarının karşılaştırılması.....	102
Şekil 53. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında HK2 miktarlarının karşılaştırılması.....	103
Şekil 54. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	104

Şekil 55. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5,5 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	104
Şekil 56. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması	105
Şekil 57. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması	105
Şekil 58. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFKP enzim miktarı düzeyleri.....	107
Şekil 59. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFKP enzim miktarı düzeyleri.....	108
Şekil 60. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PFKP miktarlarının karşılaştırılması.....	109
Şekil 61. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PFKP miktarlarının karşılaştırılması.....	109
Şekil 62. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması	110
Şekil 63. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması	111
Şekil 64. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması	111
Şekil 65. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması	112

Şekil 66. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6,12,24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.....	114
Şekil 67. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.....	114
Şekil 68. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.....	115
Şekil 69. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.....	116
Şekil 70. 0 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması.	117
Şekil 71. 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması.	117
Şekil 72. 15 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması.	118
Şekil 73. 55 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması.	118
Şekil 74. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6,12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları.....	120
Şekil 75. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6,12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları.....	121
Şekil 76. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında glukoz tüketim miktarlarının karşılaştırılması.	122
Şekil 77. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında glukoz tüketim miktarlarının karşılaştırılması.	122

Şekil 78. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında glukoz tüketim miktarlarının karşılaştırılması.	123
Şekil 79. Normoksik ortamdaki MCF7 hücrelerinin 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz muameleleri sonucu oluşan yara açıklığı yüzdeleri.	124
Şekil 80. Hipoksik ortamdaki MCF7 hücrelerinin 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz muameleleri sonucu oluşan yara açıklığı yüzdeleri.	125



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. MCF-7 hücrelerinin görüntüsü (4x büyütme).....	62
Resim 2. 75 cm ² 'lik flasklara ekilen MCF-7 hücreleri ve invert mikroskopta incelenmesi	63
Resim 3. Hemositometre	64
Resim 4. Modüler inkübatör chamber.....	65
Resim 5. Sandviç ELISA Yöntemi.	67
Resim 6. Stok solüsyonunun dilüsyonu	69
Resim 7. Wound healing testi için hipoksi ortamına alınacak 6'lı plakaların modüler inkübatör chamber içine yerleştirilmesi.....	72
Resim 8. MCF7 hücrelerinin normoksik (sol) ve hipoksik ortamda (sağ) 0 mM (a), 5.5 mM (b), 15 mM (c) ve 55 mM (d) glukoz uygulanan gruplarda 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri	75
Resim 9. Normoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz uygulanan MCF7 hücrelerinde 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreler sonunda görülen yara iyileşmesi test fotoğrafları.....	126
Resim 10. Hipoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz uygulanan MCF7 hücrelerinde 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreler sonunda görülen yara iyileşmesi test fotoğrafları.....	127

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan kimyasal maddeler	61
Tablo 2. Laktat ölçümü işlem adımları	70
Tablo 3. Glukoz standartlarının hazırlanması	71
Tablo 4. Normoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda glukoz uygulamasının 3.saat kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri	76
Tablo 5. Hipoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda glukoz uygulamasının 3.saat kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri	77
Tablo 6. Normoksik ortamda farklı inkübasyon sürelerindeki (3,6, 12, 24 ve 48.saat) glukoz uygulamasının 0 mM kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri	79
Tablo 7. Hipoksik ortamda farklı inkübasyon sürelerindeki (3, 6, 12, 24 ve 48 saat) glukoz uygulamasının 0 mM kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri.	80
Tablo 8. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PKM2 enzim miktarları ve standart hata değerleri.....	81
Tablo 9. Normoksik ve hipoksik ortamda MCF-7 hücrelerinin glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen LDHA enzim miktarları ve standart hata değerleri.	88
Tablo 10. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PD enzim miktarları ve standart hata değerleri.....	94
Tablo 11. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK2 enzim miktarları ve standart hata değerleri.....	100
Tablo 12. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFKP enzim miktarları ve standart hata değerleri.....	106
Tablo 13. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen ekstrasellüler laktat miktarları ve standart hata değerleri.....	113

Tablo 14. Normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları ve standart hata değerleri.....	119
Tablo 15. Hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları ve standart hata değerleri.....	120
Tablo 16. Normoksi ortamında glukoz muamelesinin MCF-7 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç potansiyeli üzerine etkisi	124
Tablo 17. Hipoksi ortamında glukoz muamelesinin MCF-7 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç potansiyeli üzerine etkisi	125



ÖZET

HIPOKSİK MCF 7 MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE GLUKOZ KATABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Bayar İ. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Bu çalışmada hipoksinin MCF-7 kanser hücrelerinin glukoz katabolizması üzerine olan etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Normoksi ve hipoksi ortamlarına yerleştirilen kanser hücreleri belirli inkübasyon süreleri (3, 6, 12, 24 ve 48 saat) boyunca farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukozu maruz bırakılmıştır. Oksijen gerilimi ve glukoz miktarının hücrelerin canlılığı üzerine etkisini belirleyebilmek adına tüm uygulama gruplarında WST-1 canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Normoksik ortamda konsantrasyona bağlı olarak 12. saatten sonra canlılık oranlarının arttığı tespit edilmiştir. Hipoksik ortamda hem zamana hem de konsantrasyona bağlı bir şekilde canlılık oranlarının kademeli olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Hücre lizatlarındaki glikolitik metabolizmayı yansıtan kilit enzimlerin (hekzokinaz-2 ,fosfofruktokinaz P, piruvat kinaz M2, laktat dehidrogenaz A, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) ELISA yöntemi ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ekstrasellüler laktat düzeyleri ve glukoz miktarları kolorimetrik yöntemle tayin edilmiştir. Glukoz ve oksijen düzeylerinin hücrelerin göç etme potansiyelleri üzerine etkisini görebilmek adına ise yara iyileşmesi testi yapılmıştır. Yüksek konsantrasyonda glukoz içeren grupların hipoksikde normoksiye kıyasla glukoz tüketiminin daha fazla olduğu (12. saat hariç) ($p<0,001$) ve bu sonucun hücre canlılığı sonuçları ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Hem normoksik hem de hipoksik ortamdaki hiperglisemik (55 mM glukoz) hücrelerde 6. saatten itibaren hücre migrasyonu hızlanmış, yara açıklığı yüzdeleri azalmıştır. Ayrıca glukozsuz ortamda hücrelerin morfolojik görüntüleri değişime uğramıştır. Hipoksik hücrelerde glukoz içermeyen uygulama gruplarına kıyasla artan glukoz konsantrasyonuna bağlı ekstrasellüler laktat seviyelerinin yükselmesi ($p<0,05$), Crabtree etkisinin baskın çalıştığını kanıtlar niteliktedir. Ortamda artan ürün miktarının enzim sentezini durdurmasına bağlı hipoksik ortamda LDHA düzeylerinin zamana bağlı anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). Hipoksi koşullarında tüm konsantrasyonlar için (PKM2 için glukozsuz ortam

haricinde) 6. saatteki PKM2 ve G6PD enzim miktarları en yüksek düzeyde tespit edilmiş ($p<0,001$) ve kısa süreli hipoksi maruziyetinin hem glikolitik yolağı hem de pentoz fosfat yolu (PPP)'nu çalıştırarak enzim sentezini başlattığı öngörülmüştür. G6PD enzim seviyelerinin normoksida hipoksiye göre tüm gruplar için (12. saat hariç) daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Bu veriler, normal oksijen koşulları altında glukozun PPP'na yönlendirildiğini göstermektedir. Uzun süreli hipoksi maruziyetinin hiperglisemik ortamda glikolitik akışı tetiklediği bilgisini doğrular nitelikte 15 ve 55 mM glukoz içeren hipoksi uygulama gruplarında 48 saatlik inkübasyon sonucunda PKM2 enzim miktarlarının artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Glikolizin iki kilit enzimi HK2 ve PFKP'nin normoksik ortamda birbiriyle denge halinde azalan ve artan grafikler sergilediği görülmüştür. PFKP enzimi için hiperglisemik ortamda normoksi ve hipoksi arasındaki farklılıklar daha belirgin olmakla beraber 15 mM glukoz ortamında 6. ve 24. saatlerde hipoksida normoksiye göre sırasıyla 14,91 ve 56,5 kat artış gözlenmiştir ($p<0,001$). Bu durum yukarıda belirtilen inkübasyon sürelerinde, hipoksi ile glikolitik akının indüklendiğini göstermektedir. Farklı düzeyde elde edilen glikolitik enzim miktarları, oksijen gerilimine uyumlanmada hücrelerin birbirinden ayrı potansiyel kapasitelere ve değişen mekanizmalara sahip olduğunu kanıtlamıştır. Bu çalışma genel itibariyle hipoksi ile glikolitik profil arasında önemli bir etkileşim olduğunu göstermiş ve hipoksi tarafından aktive edilen metabolik süreçlerin terapötik hedefleme potansiyeli sunarak literatüre önemli bir katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Enzim, glukoz, hipoksi, meme kanseri, oksijen.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF GLUCOSE CATABOLISM IN HYPOXIC MCF-7 BREAST CANCER CELL CULTURE

**Bayar I. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Biochemistry
(Veterinary) Program, Ph.D. Thesis, Aydin, 2020.**

In this study, it was aimed to show the effects of hypoxia on glucose catabolism of MCF-7 cancer cells. Cancer cells placed normoxia and hypoxia environments were exposed to glucose at different concentrations (0, 5.5, 15 and 55 mM) for certain incubation times (3, 6, 12, 24 and 48 hours). WST-1 viability analysis was performed in all application groups to determine the effect of oxygen tension and glucose amount on cell viability. In the normoxic environment, viability rates increased after 12th hour depending on the concentration. In the hypoxic environment, a gradual increase in viability rates depending both on time and concentration was determined. Quantification of key enzymes (hexokinase-2, phosphofructokinase P, pyruvate kinase M2, lactate dehydrogenase A, glucose-6-phosphate dehydrogenase) reflecting glycolytic metabolism in cell lysates was performed by ELISA method. Extracellular lactate levels and glucose levels were determined by colorimetric method. To see the effect of glucose and oxygen levels on the migration potential of cells, a wound healing test was performed. It was determined that the groups containing high concentrations of glucose had higher glucose consumption in hypoxia compared to normoxia (except 12th hour) ($p<0.001$) and this result was found to be in parallel with cell viability results. From the 6th hour, cell migration has accelerated and wound opening percentage has decreased in hyperglycemic (55 mM glucose) cells in both normoxic and hypoxic environment. In addition, morphological images of the cells undergo a change in glucose free medium. The increase in extracellular lactate levels ($p<0.05$) due to increased glucose concentration in hypoxic cells compared to glucose-free administration groups is evidence that the Crabtree effect is predominant. It was determined that LDHA levels decreased significantly depending on time in the hypoxic environment due to stopping enzyme synthesis by increasing amount of product in the environment ($p<0.001$).

PKM2 and G6PD enzyme levels at the 6th hour for all concentrations (except glucose-free medium for PKM2) were determined at the highest level in hypoxia conditions ($p < 0.001$) and short-term exposure to hypoxia has been predicted to initiate enzyme synthesis by operating both the glycolytic pathway and pentose phosphate pathway (PPP). It has been determined that enzyme levels of G6PD in normoxia are higher for all groups (except 12th hour) than hypoxia ($p < 0.001$). These data show that glucose is directed to PPP under normal oxygen conditions. It was concluded that PKM2 enzyme amounts increased after 48 hours incubation in hypoxia application groups containing 15 and 55 mM glucose, which confirms the knowledge that long-term hypoxia exposure triggers glycolytic flow in hyperglycemic environment. Two key enzymes of glycolysis, HK2 and PFKP in balance with each other, were shown to exhibit decreasing and increasing graphs in a normoxic environment. Although the differences between normoxia and hypoxia in hyperglycemic environment for PFKP enzyme are more pronounced, at the 6th and 24th hours, at hypoxia increased 14.91 and 56.5 times compared to normoxia in the 15 mM glucose environment, respectively. ($p < 0.001$). This indicates that glycolytic flux is induced by hypoxia in during the incubation times mentioned above. The amounts of glycolytic enzymes obtained at different levels proved that the cells have different potential capacities and changing mechanisms in adapting to oxygen tension. This study showed that there was a significant interaction between hypoxia and glycolytic profile in general, and it was concluded that the metabolic processes activated by hypoxia would make a significant contribution to the literature by offering therapeutic targeting potential.

Keywords: Breast cancer, enzyme, glucose, hypoxia, oxygen.

1. GİRİŞ

Kanser, potansiyel olarak vücudun tüm bölgelerine istila eden ve ölümcül sonuçlar doğurabilen kontrolsüz büyüme gösteren hücrelerin oluşturduğu komplike bir hastalıktır. Dünya çapında oldukça yaygın görülen bu hastalık, bilim camiasının araştırmalarında önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Kanser hücrelerinin metabolizması normal hücrelerinkinden farklıdır, bu da yüksek bir proliferasyon oranını sürdürmelerine ve apoptoz sinyallerine direnmelerine izin verir (Liu ve ark, 2001). Kanser araştırmalarında tespit edilen ortak bir özellik, bu hücrelerin yüksek oranda aerobik glikolizi tercih etmeleridir (Semenza ve ark, 2001). Otto Warburg, kanserli hücrelerin glukozu farklı şekillerde metabolize ettiğini fark etmiş ve özellikle, hücrelerin glukoz alımında artış olduğunu ve daha yüksek bir laktat üretimi gerçekleştirdiklerini gözlemlemiştir. Sonuç olarak, kanser hücrelerinin geleneksel oksidatif fosforilasyon hücresel mekanizması yerine enerji üretimi için glikolizise yöneldiği ve bunu aerobik koşullarda dahi yaptığı sonucuna varmıştır (Warburg ve ark, 1927; Warburg, 1956). Aerobik glikolizis ile tümör mikroçevresinde laktik asit konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak asidik bir ortam oluşur, bunun da tümör invazyonunu kolaylaştırdığı, immun efektör mekanizmaları baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca tümör hücreleri tarafından üretilen laktik asit, bu hücrelerin etrafındaki normal hücreler tarafından piruvata dönüştürülür ve tümör enerji metabolizmasında tekrar kullanılır (Kroemer ve Pouyssegur 2008). Glikoliz, birçok metabolik yolla bağlantı halindedir. Bunlardan biri de pentoz fosfat yolağı (PPP)'dır. Kanser hücresi, glukozun aerobik glikoliz dışında PPP ile de metabolize edilmesini sağlayarak, çoğalmaları ve gelişimleri adına elzem olan nükleotidler, lipidler ve aminoasitlerin biyosentezi için gerekli öncül metabolitlerin oluşumunu sağlar. PPP ile aynı zamanda kemoterapotiklere ve serbest radikallerin oksidatif etkilerine karşı koruyucu bir antioksidan olan NADPH'nin sentezi de sağlanır (Patra ve Hay, 2014).

Oksijen yetersizliği olarak bilinen hipoksi, birçok solid kanserin bir başka ortak özelliğidir ve tümör mikroçevresinin anahtar karakteristiklerinden birisidir. Hipoksi, proteom ve genomda çok yönlü değişikliklere neden olur. Solid tümörlerde hipoksik bölgelerin gelişimi; malign fenotip, metastaz, kemo-, immüno- radyoterapi direnci, yüksek genetik instabilite ve apoptoz toleransı ile ilişkilendirilmiştir (Graeber ve ark, 1996; Bristow ve Hill, 2008). Hipoksik koşullarda glukoz metabolizması değişime uğrar. Hipoksik hücreler, glukoz alımını büyük ölçüde artırarak glikolitik metabolizmanın verimsizliğini telafi ederler, böylece

hücrelerin hayatta kalmasını sağlayıcı glikolitik akışı arttırırlar (Semenza, 2007). Glikolitik akışın kontrolü glikolizde yer alan kilit enzimler vesilesiyle gerçekleştirilir. Dolayısıyla bu reaksiyon dizisinde görev alan enzimlerin izlenmesi metabolik profili görebilmek adına önem taşımaktadır. Çoğu tümör hücresinde glikolitik akış, bazı onkogenler ve hipoksi indüklenebilir faktör-1 α 'nın (HIF1 α) transkripsiyonel aktivasyonu ile indüklenen tüm glikolitik enzimlerin ve taşıyıcıların aşırı ekspresyonundan dolayı normal hücrelerden 2-17 kat daha yüksek bulunmuştur (Marín-Hernández ve ark, 2014). Birçok araştırma tümör glikolizi üzerine hipoksinin etkilerine yoğunlaşmakla beraber kanser hücresi ortamında glukoz sınırlandırılması veya artışı ile hipoksinin sinerjik faaliyetlerinin incelendiği daha az sayıda çalışma mevcuttur.

Yapılan araştırma, hipoksi ve glukoz metabolizması ilişkisine yönelik bir takım sorulara cevap bulmayı amaçlamıştır. Bu sorular şunlardır: Kanser hücreleri, oksijen konsantrasyonundaki değişikliklere metabolik düzeyde nasıl tepkiler verir? Warburg etkisi hücreleri ne düzeyde etkiler ve kanser hücrelerinin hipoksik koşullarda sağ kalım ve glikolitik yetenekleri hakkında daha fazla bilgi edinebilir miyiz? Eğer oksijen düzeylerine duyarlılık var ise bu durum enzim miktarlarına nasıl yansır? Soruların cevabını almak amacıyla hipoksinin ve normoksinin enzim düzeyinde kanser hücre hatları üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu etkiyi karakterize etmek adına belli konsantrasyonlarda glukoz ilave edilmiş MCF-7 hücre hattındaki glukoz tüketimleri ve laktat üretimleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca glukozun her iki ortamda da yara iyileşmesi yöntemi ile kanser hücrelerinin göç potansiyeli üzerine olan etkisi ve hücre canlılıkları ile olan ilişkisi incelenmiştir. Bu çalışma ile oksijen seviyeleri (normoksi/hipoksi) ve glukoz düzeylerinin glikolitik metabolizmaya olan etkilerinin önemli kanser türlerinden biri olan meme kanserine yönelik yapılan araştırmalarda etkili bir terapötik yaklaşım yolu sunabilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Yaşam, normal şartlar altında doğma, büyüme, olgunlaşma ve ölümle son bulan bir olaylar bütünü olarak tanımlanmaktadır. Yaşam sürecinde ölüme neden olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden birisi kanser olarak tanımlanan yüksek mortaliteye sahip hastalıktır. Kanser, hücrenin çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin bozulmasına neden olan, dokuları istila eden ve uzak bölgelere metastaz yapabilen gen ekspresyonunda çoklu değişikliklerin neden olduğu anormal hücre büyümesinin bir sonucudur (Ruddon, 2007). Hücredeki bu anormal gelişme; boyalar, kimyasallar, radyasyon, ultraviyole ışık, kromozom replikasyon hataları gibi faktörlerden kaynaklanan mutasyonlar sonucu meydana gelebilmektedir. Bu mutajenler nükleotid bazları ve hatta DNA'nın şeklini değiştirerek etki edebilirler. Değişen DNA, protein sentezinde ve replikasyonda hatalar üreterek hücre çoğalması ve büyümesini etkiler (Fadaka ve ark, 2017).

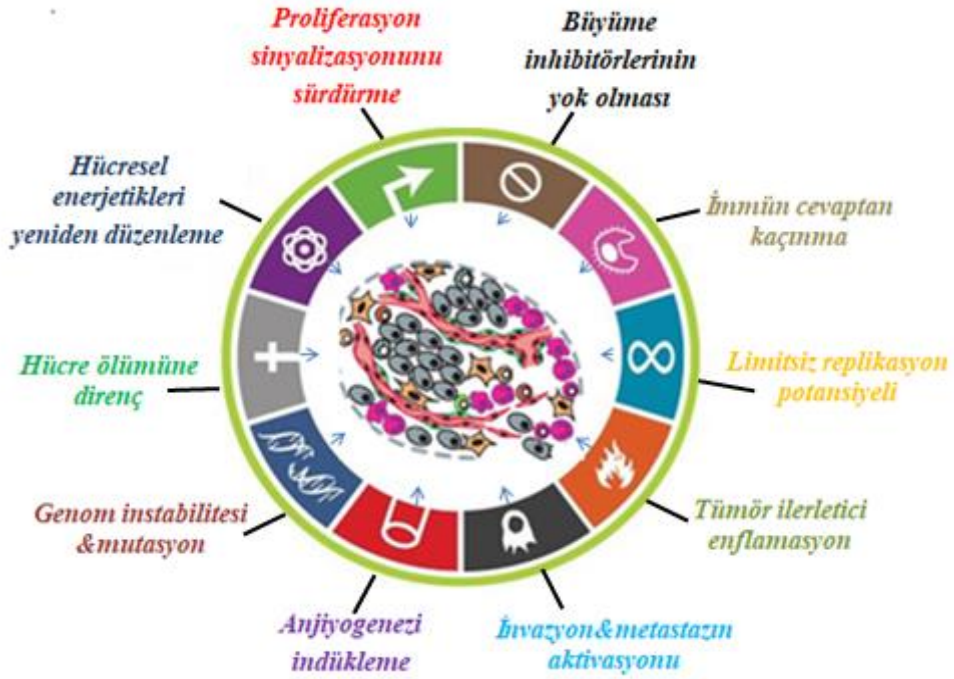
2.2. Kanserin Karakteristik Özellikleri

Kanser gelişimi tümör hücrelerinin birçok genel mutasyonla varlığını sürdürdüğü çok aşamalı bir süreçtir. Mutasyonlar; büyüme sinyalizasyonunda kendi kendine yetebilme, anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık, apoptozdan kaçma, sınırsız replikatif potansiyel, anjiyogenez ve komşu dokulara istilanın sağlanması gibi durumları oluşturur. Bu anahtar değişiklikler tümör fizyolojisinde kanserin özellikleri olarak bilinir ve ilk olarak Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2000) (Şekil 1).

Kanser hücrelerinin özelliklerden biri büyüme faktörü reseptörlerinin ileri ekspresyonu veya büyüme faktörü sinyalizasyon kaskadlarındaki mutasyonlardan dolayı dış- proliferatif sinyallerden bağımsız olmasıdır. Kanserli hücreler normalde proliferasyon ve hücre büyümesini durduracak olan inhibitör sinyallere direnirler ve bunun yanında apoptoz indüksiyonuna neden olan uyarılardan kaçma yeteneğine de sahiptirler. Kanserin bir diğer belirleyici özelliği normal hücrelerin kısıtladığı sınırlı sayıda replikasyon siklusunun üstesinden gelebilme durumudur; bu durum kanser hücrelerine sınırsız replikatif potansiyel kazandırır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanserin bir başka önemli özelliği metastaz oluşumunun ön şartı olan hücre göçü ve hücre istilasının aktivasyonudur. Kanser hücreleri belirli hücre/hücre ve hücre/matriks adezyon moleküllerinin ekspresyonunu kaybederek ve lokal kan veya lenf damarlarını istila edip uzak dokulara yayılabilir hale gelebilirler (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücrelerinin çoğalabilme ve büyüyebilme yeteneği genellikle metabolik süreçlerin yeniden programlanması ile ilişkilidir. Bu metabolik yeniden programlanma kanser hücrelerinin tümör potansiyeline katkıda bulunan besin ve oksijen açlığı gibi stres koşulları altında sadece hayatta kalmalarını değil aynı zamanda büyümelerini de sağlar. Bunun yanında oksijen yetersizliği tümör mikroçevresinin yaygın bir özelliğidir ki "tümör anjiyogenezi" olarak isimlendirilen yeni kan damarlarının indüksiyonuna yol açar. Tümör anjiyogenezi büyümekte olan tümöre besin ve oksijen tedarikini sağlar; böylece istila ve metastazı kolaylaştırır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Çoğu kanser hücresinin normal hücreler için öldürücü olan koşullar altında hayatta kalmasını sağlayıcı metabolik adaptasyon süreci "metabolik transformasyon" olarak adlandırılır. Farklı hücre tiplerinde meydana gelen sellüler transformasyon çok farklı yollardan meydana gelmesine rağmen oluşan tümör hücrelerinin metabolik gereksinimleri genellikle benzerdir. Kanser hücreleri 1) ATP şeklinde enerji üretmeli, 2) hücre büyümesini desteklemek amacıyla makromolekül biyosentezi için prekürsörler sağlamalı ve 3) reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisini azaltmak için yıkıcı metabolizmalarının oksitleyici etkilerini yönetmelidir. Bu büyüme gereksinimleri tüm habis tümörlerde yaygın olduğundan, metabolik transformasyonun etkisi ve bu mekanizmaların incelenmesi şimdilerde büyük bir araştırma konusudur (Cairns ve ark, 2011). Verilen bilgiler ışığında, bu adaptasyonları engelleyici terapötiklerin dizayn edilebilmesi ve bunların yaygın bir şekilde kanser büyüme ve metastaz adımlarında etkin olabileceği de umulmaktadır (Tennant ve ark, 2010).



Şekil 1. Kanser belirteçleri (Hanahan ve Weinberg, 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

2.3. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme bezi epitel dokusundan gelişen kadın malign neoplazmidir ve dünya çapında kadınlar arasında yüksek oranda ölümlere sebebiyet verici en yaygın görülen ikinci kanser türüdür (Li ve Han, 2018; Liu ve Hu, 2018). 2008'den bu yana, meme kanseri insidansında (>% 20) ve ölümlerde (<500.000) küresel bir artış gözlenmiştir (Tao ve ark, 2017). Meme, süt bezleri ve üretilen bu sütü meme başına taşıyan kanallardan meydana gelir. Meme kanseri, lobülleri ya da bu süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrol dışı çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle gelişmektedir. Erken evre meme kanserleri yaşamı tehdit edici olmamasına rağmen, metastatik evre meme kanseri ölümlere yol açmakta ve tedavi aşamalarında güçlükler yaşanmaktadır (Noh ve ark, 2016). Meme kanseri metastazlarının akciğer, kemik, lenf nodu ve beyine transfer olmaları tedavide başarıyı güçleştirir (Sun ve ark, 2017). Bununla birlikte hastalığın erken teşhisi iyi prognoz ve yüksek sağkalım oranını sağlayabilir (Desantis ve ark, 2016). Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıksız yaşam tarzı gibi çok sayıda risk faktörü meme kanseri gelişme olasılığını artırabilir (Sun ve ark, 2017).

2.3.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

Hücre hatları, kanserin moleküler tanısında anahtar bir unsur olarak görülür ve MCF-7, yıllardır birçok grup tarafından çoğaltılan ve yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır (Comşa ve ark, 2015). MCF-7 ilk defa 1970 yılında 69 yaşındaki invaziv duktal karsinomalı beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule ve ark, 1973). MCF-7 hücre hattının meme kanseri araştırmalarına en önemli katkılarından biri, östrojen reseptörü α (ER α) çalışması için uygun olmasıdır. MCF-7 hücre hattı; östrojen reseptörü pozitif (ER+) ve progesteron reseptörü pozitif (PR+) olup, lüminal A moleküler alt tipine aittir ve düşük metastatik potansiyele sahip, zayıf agresif ve invazif olmayan bir hücre hattıdır (Comşa ve ark, 2015). MCF-7, kolaylıkla kültüre edilebilmesi ve yüksek seviyelerde ER eksprese edebilmesi gibi özelliklerinden ötürü hedeflenen tedavi açısından yüksek oranda tercih edilir (Lee ve ark, 2015).

2.4. Hücresel Metabolizma

Metabolik yolları oluşturan bir seri enzim katalizli tepkime vasıtasıyla hücre ya da organizmada meydana gelen kimyasal dönüşümlerin tamamına metabolizma denir (Nelson ve Cox, 2005). Organizmalar enzim katalizli metabolizmanın bir sonucu olarak büyür, çoğalırlar, çevrelerine cevap verirler ve yapılarını korurlar. Hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonlar bir hücrenin günlük işlemlerinin gerçekleştirilmesini sağlar. Bu reaksiyonlar hücrenin ihtiyaçlarına ve işlevlerine bağlı olarak düzenlenir (Gill ve ark, 2016).

Bir hücrenin metabolizması anabolizma ve katabolizma olmak üzere 2 kısımdan meydana gelir. Anabolizmada küçük, öncül bileşiklerden (aminoasit, glukoz, yağ asidi, nükleotid gibi) büyük kompleks yapılar (lipitler, proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler gibi) sentezlenir (Nelson ve Cox, 2005). Anabolik bu reaksiyonlar esnasında ATP formundaki Gibbs serbest enerjisi, hücre çoğalması veya bölünmeye katkıda bulunan birçok hücresel proseste kullanılır. Bu hücresel proseslere deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu da dahildir (DeBerardinis ve ark, 2008). Metabolizmanın organik büyük besin moleküllerini küçük, basit son ürünlere dönüştüren yıkıcı fazına ise katabolizma denir (Nelson ve Cox, 2005). Katabolik reaksiyonlarda organik ürünlerin parçalanmasından elde edilen Gibbs serbest enerjisi, adenosin difosfat (ADP)'ı fosforile ederek ATP üretme amacıyla kullanılır.

ATP; biyolojik moleküllerin sentezi, taşınması, parçalanması gibi birçok biyolojik işlem için önem taşımaktadır ve hücre döngüsü ile hücre büyümesini tetikler (Roy ve ark, 2017). Ayrıca ATP'nin metabolik yolların düzenlenmesinde de önemli bir rolü vardır. Ökaryotik hücrelerin çoğunda glikoliz ile 2 ATP molekülü, 1 glukoz molekülünden aerobik solunum yoluyla ise 36 ATP molekülü üretilir. Glikolizden 2 molekül, sitrik asit döngüsü substrat düzeyinde fosforilasyonundan 2 molekül ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile elektron taşınmasından 32 molekül ATP üretimi gerçekleştirilir (Roy ve ark, 2017). Dolayısıyla normal hücre metabolizması enerjisinin yaklaşık %70'ini Krebs siklusundan ve sadece %20'sini glikolizden (Embden Meyerhof yolu) üretir. Bu hücrelerde enerji üretiminin çoğu OXPHOS yolu ile olur (Gill ve ark, 2016).

2.5. Glukoz Metabolizması

Hücre solunumun glikolizis yolu, karbonhidrat metabolizmasının ilk aşamasını oluşturan bir dizi reaksiyondan meydana gelir. Glikolizis oksijenden bağımsız bir metabolik yoldur, yani herhangi bir reaksiyonunda moleküler oksijen kullanılmaz ve tüm organizmaların hücre sitozolünde gerçekleşir (Gill ve ark, 2016). Bu proses bir molekül glukozu iki molekül pirüvik asit haline getirir ve salınan enerji ATP ve indirgenmiş NADH formunda korunur. Glikolizisin temel işlevi ve amacı diğer metabolik yollar için enerji ve ara maddeler sağlamaktır. Glikolizis için temel glukoz kaynakları diyet karbonhidratları ve sellüler glikojendir. 10 sitozolik reaksiyon serisiyle glukoz, glikolize girer ve bu reaksiyon basamaklarından yedi tanesi geri dönüşümlü olmakla birlikte üç tanesi geri dönüşümsüzdür. İlk 5 reaksiyon ATP kullanıldığı için "yatırım" aşamasını oluştururken, son 5 reaksiyon sonuç aşamasını oluşturur ve ATP üretimini sağlar (Fadaka ve ark, 2017).

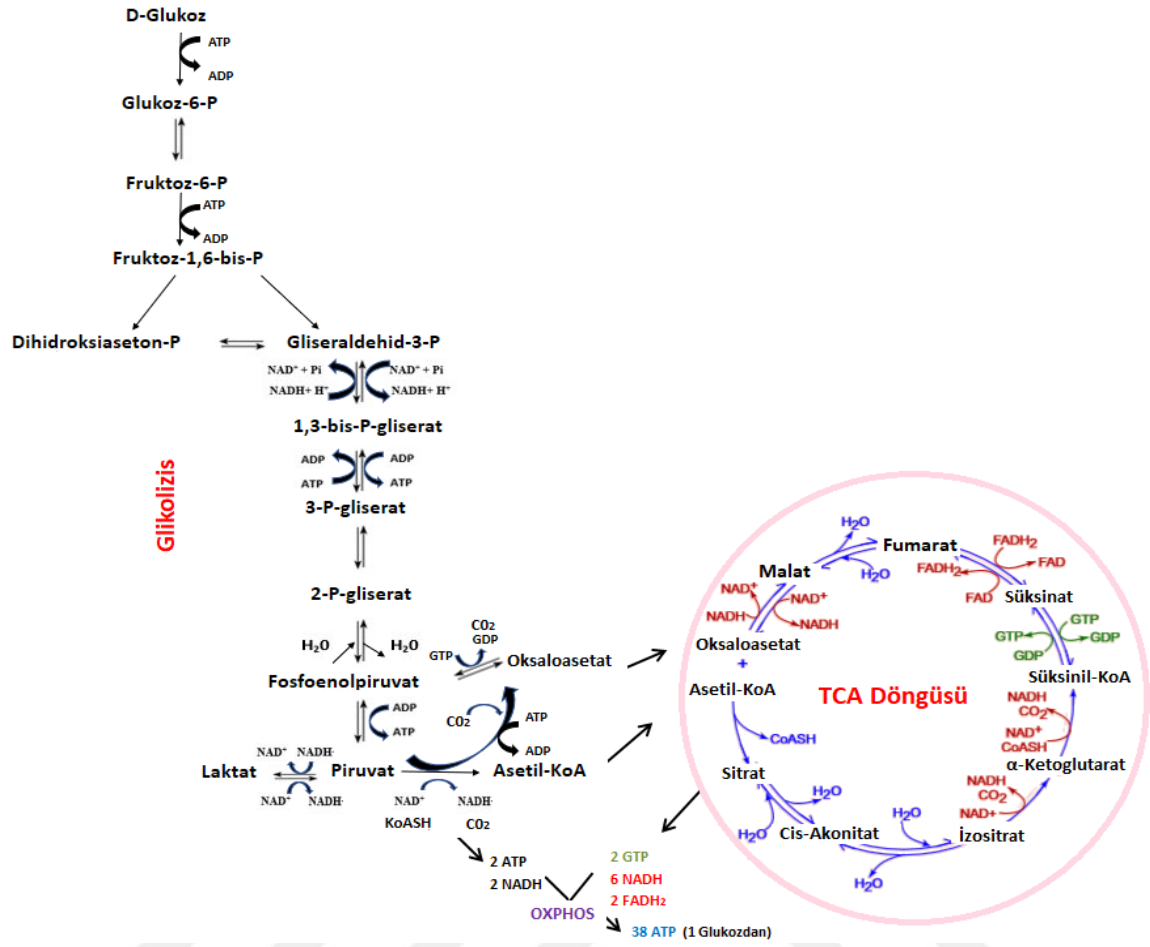
Glikolizisin ilk aşamasında glukoz, ATP kullanılarak hekzokinaz (HK) enzimi ile C-6'dan fosforlanarak, glukoz-6-fosfat (G6P) molekülüne dönüştürülür ve aktifleştirilir. Bu, geri dönüşümsüz bir reaksiyondur ve bu yüzden glikolizisin hız sınırlayıcı reaksiyonlarından biri olarak kabul edilir. G6P daha sonra glukoz fosfat izomeraz (GPI) (fosfoheksozizomeraz) enzimi vasıtasıyla fruktoz-6-fosfat (F6P) molekülüne dönüştürülür. Bir diğer aşamada substrat olarak ATP kullanılarak fosfofruktokinaz 1 (PFK-1) enzimi ile F6P'tan fruktoz-1,6-bisfosfat (F1,6-BP) elde edilir. Bu reaksiyon glikolitik yolağın diğer bir hız sınırlayıcı basamağıdır. PFK-1 karmaşık olduğu bilinen düzenleyici enzimlerden biridir ve fizyolojik koşullarda

inaktiftir. Bu enzim aktive olmak için fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP) molekülünü gerektirir ((Nelson ve Cox, 2005; Rajendran, 2011).

F1,6-BP, aldolaz enzimi ile iki farklı trioz fosfata ayrılır. Bu trioz fosfatlar; bir aldoz olan gliseraldehid-3-fosfat ve bir ketoz olan dihidroksiaseton fosfattır (DHAP). DHAP, glikolitik dizinin beşinci enzimi olan trioz fosfat izomeraz ile gliseraldehid-3-fosfata (G3P) ve G3P ise hizmet fazının ilk aşamasında yer alan NAD bağımlı enzim gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ile 1,3-bisfosfogliserata (1,3BPG) dönüştürülür. Diğer bir basamakta fosfogliserat kinaz enzimi 1,3-bisfosfogliseratın karboksil grubundaki yüksek enerjili fosforil grubunu ADP'ye transfer ederek ATP ve 3-fosfogliserat (3PG) moleküllerini oluşturur. 3PG fosfogliseratmutaz (PGAM) enzimi ile, gliseratın C-2 ve C-3'ü arasında fosforil grubunun yer değişimi vasıtasıyla 2-fosfogliserata (2PG) dönüştürülür. Enolaz enzimi, 2PG'tan bir su molekülünü tersinir olarak uzaklaştırarak fosfoenolpiruvat (PEP) molekülünün oluşumunu katalizler ve son olarak da piruvat kinaz (PK) enzimi ile PEP'tan bir fosfat grubu ADP'ye aktararak ATP ve piruvat molekülü oluşumu sağlar (Nelson ve Cox, 2005; Rajendran, 2011).

Sitoplazmada meydana gelen glikoliziste (normal hücreler), bir glukoz molekülünden 2 ATP, 2 NADH ve 2 piruvat molekülü üretimi gerçekleşir. Normal hücrelerde aerobik koşullarda piruvat mitokondri içine alınır ve piruvat dehidrogenaz (PDH) enzim kompleksi yardımıyla Asetil-KoA molekülüne dönüştürülür. Her Asetil-KoA molekülü sitrik asit döngüsüne girer ve sitrik asit döngüsünde yer alan enzimler vasıtasıyla CO₂'e okside olur. Glikoliziste üretilen 2 molekül NADH, piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu ile üretilen 2 molekül NADH ve sitrik asit döngüsünde üretilen 6 NADH +2 FADH₂ molekülleri iç mitokondriyal membran boyunca meydana gelen bir proton graidenti ile "elektron transport sistemine" (ETS) girer. ADP'nin fosforilasyonunu sağlamak üzere kemiozmatik gradient kullanılarak ATP sentaz enzimi ile ATP sentezlenir. Son olarak elektronlar moleküler oksijen tarafından alınır ve su üretilir. Böylece hücreler tarafından tüketilen glukozun her bir molekülünden net 38 ATP sentezlenmiş olur (Rajendran, 2011).

Anaerobik glikolizis ise glukozun düşük oksijen seviyelerinde mitokondriyal oksidasyon yerine glikolizis yoluyla metabolize edildiği bir durumdur (Gill ve ark, 2016). Anaerobik koşullar altında sitoplazmada glikolizis ile üretilen piruvattan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi vasıtasıyla laktat molekülü oluşturulur. Glikolizisin önemli basamakları sistematik olarak Şekil 2'de sunulmuştur (Alam ve ark, 2016).



Şekil 2. Glikolizisin ve TCA döngüsünün metabolik adımları (Alam ve ark, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.5.1. Glikolizis Akışı ve Regülasyonu

Hücresel düzeyde, glikolizisin önemli iki çıkış noktası vardır. Bunlar laktat atılımı (bazen de alımı) veya glikolizis ile oluşan piruvatın mitokondriye girişidir. Hücreler tarafından alınan glukoz karbonları ayrıca pentoz fosfat yoluna (PPP) ve serin, alanin, gliserol fosfat, vb. moleküllerin sentezine de yönlendirilir. Ancak, bu akışlar laktat ve piruvat akıbetinden daha az oranda gerçekleşir. Sonuç olarak, glukozun hücreye alımı ve hücreden çıkışı dengeli olmalıdır. Glikolizis yoluyla akış glikolizisteki enzimler tarafından sürdürülür ve değişkenlik gösterir. Kanser hücreleri, kök hücreler ve diğer hızlı gelişen hücreler yüksek glikolizis oranına sahipken, pasif hücreler genellikle düşük glikolizis oranına sahiptir. Taşıyıcılar ve birçok glikolizis enzimi çoklu izoformlar içerir. Bu izoformların bileşimi ile

ekspresyon seviyeleri, farklı dokulardaki hücreler arasında ve hücreler onkojenik transformasyona uğradığında değişiklikler göstermektedir (Mulukutla ve ark, 2016).

2.5.2. Allosterik Regülasyon ve Yüksek Glikolitik Akış

Glikolitik akış oranı, substrat mevcudiyeti, enzim konsantrasyonları, allosterik efektörler ve düzenleyici enzimlerde kovalent modifikasyonlar gibi farklı seviyelerde ve farklı mekanizmalarla kontrol edilir. Glikoliziste HK, PFK, 6-fosfosofrukto-2 kinaz / fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) ve PK gibi bazı enzimler çeşitli metabolitlerin allosterik düzenlemelerine tabi tutulur. Bu enzimlerin her biri, aynı reaksiyonu katalizleyen ancak kinetik özellikleri farklı olan çoklu izoformlara sahiptir. Ayrıca, bu izoformlar, allosterik efektörlere farklı tepkiler verir. Hücre kültürü biyoişlemlerinde kullanılan yüksek proliferativiteye sahip hücrelerde dominant izoformlar olan HK1 ve/veya HK2, PFKFB3, kas ve / veya karaciğer PFK izoformları (PFKM/L) ve PKM2 enzimlerinin overeksprese olduğu görülür. Bu hücrelerdeki glikolizis akışı, allosterik düzenlemeden yüksek ölçüde etkilenir (Mulukutla ve ark, 2016).

HK1/II, son ürünü olan G6P tarafından inhibe edilir. PFKM/L aktivitesi F6P; F2,6BP, F1,6BP ve AMP ile pozitif olarak; sitrat, ATP ve laktat ile ise negatif olarak düzenlenir (Şekil 3). PK'ın memeli sistemlerinde M1, M2, L ve R olmak üzere dört izoformu eksprese edilir. PKM2, çoğalan hücrelerde eksprese edilen baskın bir izoformdur ve PPP, serin ve nükleotitlerin biyosentezinin de dahil olduğu biyosentetik yollara glukoz akışının düzenlenmesinde kilit rol oynar. F1,6BP, PKM1 hariç tüm PK izoformlarını, allosterik olarak aktive eder (Mulukutla ve ark, 2016) (Şekil 3).

GAPDH, G3P'ı 1,3BPG'ye dönüştüren glikolizisteki beşinci adımı katalizler (Locasale, 2018). Metabolik kontrol analizleri, belirli koşullar altında GAPDH'in glikolitik yol akışı üzerinde kontrol edici etkisini göstermiştir. Yapılan bazı hesaplamalar da GAPDH'in PFK ve PK gibi standart hız belirleyici adımlardaki enzimler kadar Warburg etkisi esnasında glikoliz kontrolü sağladığını ispatlamıştır (Shestov ve ark, 2014; Van Heerden ve ark, 2014; Liberti ve ark, 2017). GAPDH basamağında da sayısız başka negatif düzenleme unsurunun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. 1,3BPG'nin GAPDH'nin aktif bölgesi yakınında bir lizini kovalent olarak modifiye ettiği gösterilmiştir (Moollering ve Cravatt, 2013). Bu nedenle, eğer bu asilasyon reaksiyonu hücrelerde kayda değer kinetiklerle oluşabilirse, negatif bir geri besleme döngüsü oluşturur (Şekil 3). Mitokondriyal metabolizmadan türetilen açıl-koenzim A türleri gibi

glikolizisin aşağı basamaklarında yer alan diğer metabolizma ürünleri de GAPDH ile reaksiyona girerek aktivitesini kovalent olarak değiştirir ve inhibe eder (Wagner ve Hirschey, 2014; Nishida ve ark, 2015; Wagner ve ark, 2017). Bunun yanında hidrojen peroksit (H_2O_2) aracılı oksidasyon ve katalitik sistemin etkisiz hale getirilmesi yoluyla üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) de GAPDH aktivitesini negatif yönde regüle eder (Yun ve ark, 2015) (Şekil 3).

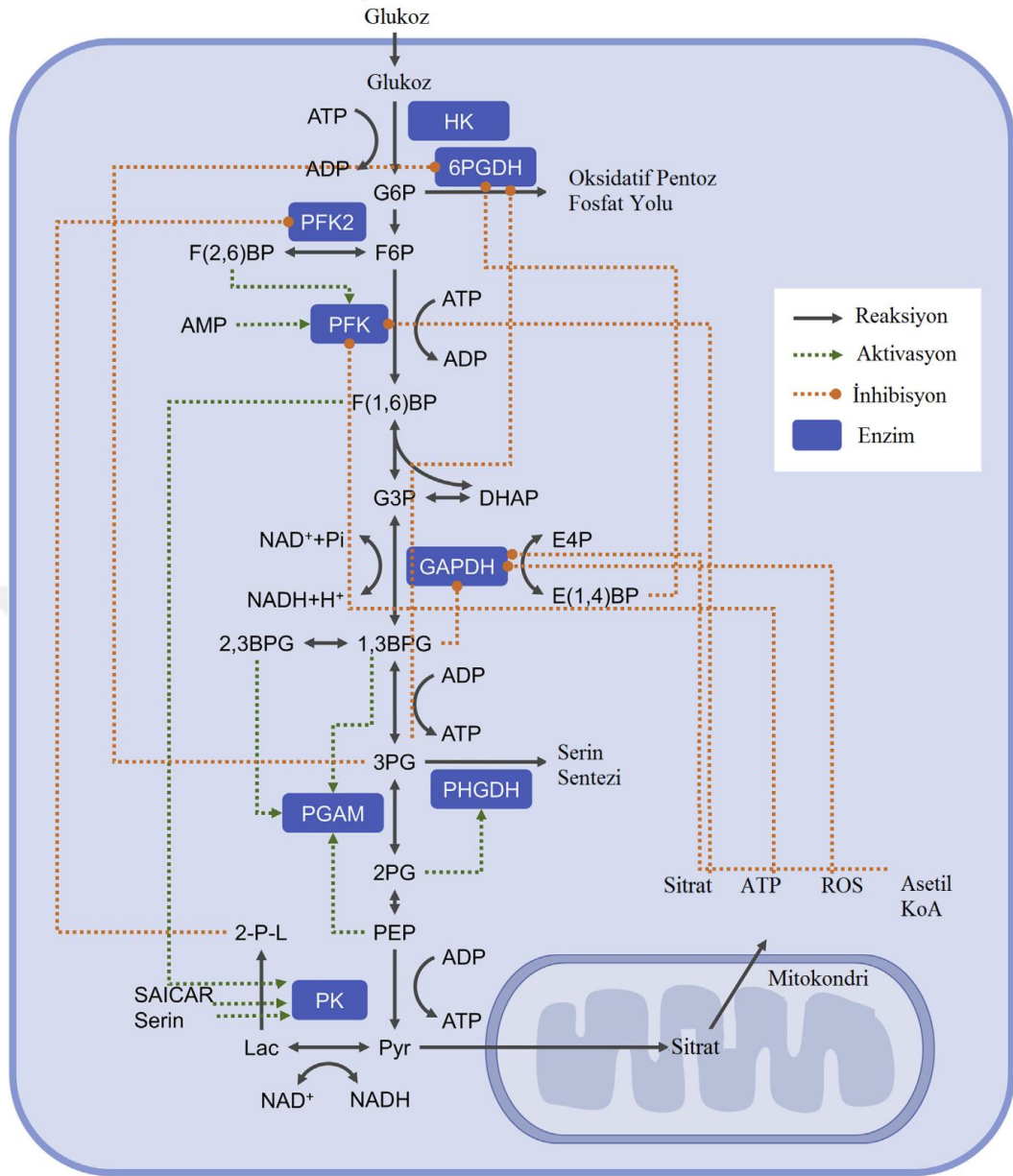
2.5.3. Dallı biyosentetik yollara Glikolitik Akışın Düzenlenmesi

Glikolitik piruvat, laktat üretimine ve Krebs döngüsüne doğru kanalize edilmesinin yanı sıra PPP, nükleotit sentezi, gliserol-fosfat ve serin/glisin/treonin biyosentezine de yönlendirilir. Bu yollardan geçen akış hücrel enerjiyi ve biyosentetik ihtiyaçları karşılamak amacıyla farklı büyüme koşulları altında değişkenlik gösterir. Hücreler bu akışları kısmen glikolizdeki anahtar enzimler üzerinde uygulanan allosterik düzenleme yoluyla kontrol ederler. Örneğin, PFK aktivitesi aynı zamanda F2,6BP'nin bağlanma yeri olan Ser529 kalıntısında post-translasyonel o-glikoNAsetilasyon yolu ile akut olarak inhibe edilir. o-glikoNAsetilasyon, F2,6BP'nin bağlanmasını böylece PFK aktivasyonunu azaltır (Yi ve ark, 2012). o-glikoNAsetilasyon yoluyla azalan PFK aktivitesi glikoliz yolu akışını düşürür ve hücrelerin biyosentetik ihtiyaçları için ara madde ve NADPH sağlamak amacıyla glukozu PPP'ye doğru yönlendirir. o-glikoNAsetilasyon; glutamin, glukoz, UTP, asetil KoA ve ATP dahil olmak üzere biyosentetik öncüllerin mevcudiyetinin kolektif göstergesi olduğu düşünülen üridin-difosfat N-Asetilglukozamin (UDP-GlcNAc)'nin hücre içi konsantrasyonuna dinamik olarak yanıt verir. PFKL ve PFKP o-glikoNAsetilasyon'a oldukça hassastır (Mulukutla ve ark, 2016).

Pürin biyosentezinin bir aracı olan fosforibozilaminoimidazolesüksinokarboksamid (SAICAR), özellikle PK'nin M2 izoformunun aktivitesini uyarır (Keller ve ark, 2012). SAICAR, akut glukoz açlığı altındaki hücrelerde birikir ve bu da PKM2'ye bağlanmasında bir artışa neden olur. PKM2'nin intrinsik aktivitesi düşüktür ve PEP için K_M 'si PKM1'inkinden daha yüksektir (Yamada ve Noguchi, 1999). SAICAR'ın bağlanışındaki artış, PEP için K_M 'yi azaltır ve ATP sentezi için mitokondriye daha fazla glukoz akışının kanalize edilmesiyle sonuçlanan PKM2 aktivitesini artırır (Şekil 3). Böyle bir mekanizmanın, glukoz-sınırlı koşullar altında kanser hücrelerinin sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir (Mulukutla ve ark, 2016).

PKM2'nin aktivitesi; serin, fenilalanin ve diğer amino asitler tarafından allosterik olarak düzenlenir (Morgan ve ark, 2013). PKM2 monomerik haliyle sadece bazal aktiviteye sahiptir ve tamamen işlevsel hale gelmesi için oligomerizasyonu gerekir. Aktivatör F1,6BP'nin bağlanması PKM2'yi aktif tetramerik bir durumda kilitler, buna karşın fenilalanin bağlanması ise onu inaktif tetramerik bir yapıya dönüştürür (Morgan ve ark, 2013). Yüksek fenilalanin konsantrasyonları veya triiyodotirozin (T3) hormonu stimülasyonu ile PKM2 aktivitesi kısıtlanabilir. PKM2 ayrıca PKM2'nin doğal bir ligandı ve aktivatörü olarak tanımlanmış olan serinin hücresel seviyelerine cevap verir (Chaneton ve ark, 2012). Yüksek seviyelerde serin, PKM2 üzerinde bir bölgeye bağlanır, böylece PEP'e karşı K_M 'sini düşürür ve aktivitesini artırır. PKM2 aktivitesini inhibe eden diğer faktörler arasında PKM2 Cys358 kalıntısının oksidasyonu, bir fosfotirozin peptidin bağlanması veya PKM2'nin tirozin kinaz sinyalizasyonu ile fosforilasyonu bulunur (Christofk ve ark, 2008; Hitosugi ve ark, 2009; Anastasiou ve ark, 2011).

Son zamanlarda, PGAM'ın, glikoliz, PPP ve serin biyosentezi gibi dallanma yolları vasıtasıyla karbon akışı üzerinde bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Yüksek PGAM seviyelerine sahip kanserlerde daha yüksek seyreden glikolitik akış, sırasıyla PGAM'ın substratı ve reaksiyon ürünü olan 3PG'ın düşük seviyelerine ve 2PG'ın daha yüksek seviyelerine yol açar (Hitosugi ve ark, 2012). 3PG, PPP'deki ilk enzim olan 6-fosfoglukonat dehidrogenazı (6PGDH) inhibe ederken; 2PG, serin biyosentez yolundaki ilk enzim 3-fosfogliserat dehidrogenaz (PHGDH)'ı aktive eder (Şekil 3). Buna göre, 6PGDH ve PHGDH, yüksek PGAM'li tümör hücrelerinde uyarılır, bu da glikolitik akışın PPP'ye ve serin biyosentezine kanalize edilmesine yol açar (Mulukutla ve ark, 2016).



Şekil 3. Glikolizis ile pozitif ve negatif feedback regülasyonlarının mekanizmalarına genel bakış (Locasale, 2018'den değiştirilerek alınmıştır).

Kısaltmalar: G6P: Glukoz-6-fosfat, F6P: Fruktoz-6-fosfat, F(1,6)BP: Fruktoz (1,6)bisfosfat, DHAP:Dihidroksiaseton fosfat, G3P:Gliseraldehid-3-fosfat, 1,3BPG: 1,3-bisfosfoglisarat, 2,3BPG: 2,3-bisfosfoglisarat, 3PG:3-fosfoglisarat, 2PG: 2-fosfoglisarat, PEP: fosfoenolpiruvat, Pyr: piruvat, Lac: laktat, SAICAR: 2-[5-Amino-1-(5-fosfo-d-ribozil)imidazol-4-karboksamido] süksinat), NAD⁺: Nikotinamid adenin dinükleotid (okside), NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte), ATP: Adenozin trifosfat, ADP: Adenozin difosfat, AMP: Adenozin monofosfat, ROS: Reaktif oksijen türleri, 2-P-L: 2-fosfolaktat, E4P: 4-fosfoeritronat, E(1,4)BP: 1,4-bisfosfoeritronat, HK: Hekzokinaz, PFK: Fosfofruktokinaz, PFK2: fosfofruktokinaz-2, 6PGDH: 6-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, GAPDH: gliseraldehid fosfat dehidrogenaz, PHGDH: fosfoglisarat dehidrogenaz, PGAM: fosfoglisarat mutaz, PK: piruvat kinaz.

2.6. Kanser Hücrelerinin Enerji Metabolizması

Kanser metabolizması alanı, metabolik aktivitelerin kanser hücrelerinde normal hücrelere göre değiştiği ilkesine dayanmaktadır ve bu değişiklikler habis özelliklerin kazanımı ve onarımını destekler. Bazı değişmiş metabolik özellikler genelde birçok kanser hücresi türünde gözlemlendiğinden yeniden programlanmış metabolizma kanserin bir özelliği olarak kabul edilir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücrelerinin fonksiyonları ve malignant özelliklerinin nasıl yeniden programlandığı ve terapötik fayda için metabolik değişikliklerin nasıl kullanılacağı kanser alanında araştırılan en anahtar konulardandır (DeBerardinis ve Chandel, 2016). 1930'da yeniden programlanan kanser hücresi metabolizmasına dayalı keşfin ardından birçok çalışma enerji metabolizmasını hedefleyerek tümör hücrelerini etkili bir şekilde ortadan kaldırmanın yeni yollarını bulmak için kanser metabolizmasının çeşitli yönlerini aydınlatmaya yönelmiştir (Fadaka ve ark, 2017).

Normal hücreler popülasyonlarını sürdürmek için çoğalırlar ve bu süreç belli sayıda tekrarlama siklusu ile sınırlıdır. Kanser hücreleri ise kesintisiz çoğalabilirler çünkü replikasyonu kontrol eden kontrol noktalarını atlatırlar (Hanahan ve Weinberg, 2000). Zor koşullar altında bile yüksek oranda kanser hücresinin çoğalmasını sağlamak adına karmaşık bir düzenleme ağı geliştirilir (besleyici ve oksijen kısıtlaması, bağışıklık saldırısı gibi) (Danhier ve ark, 2017).

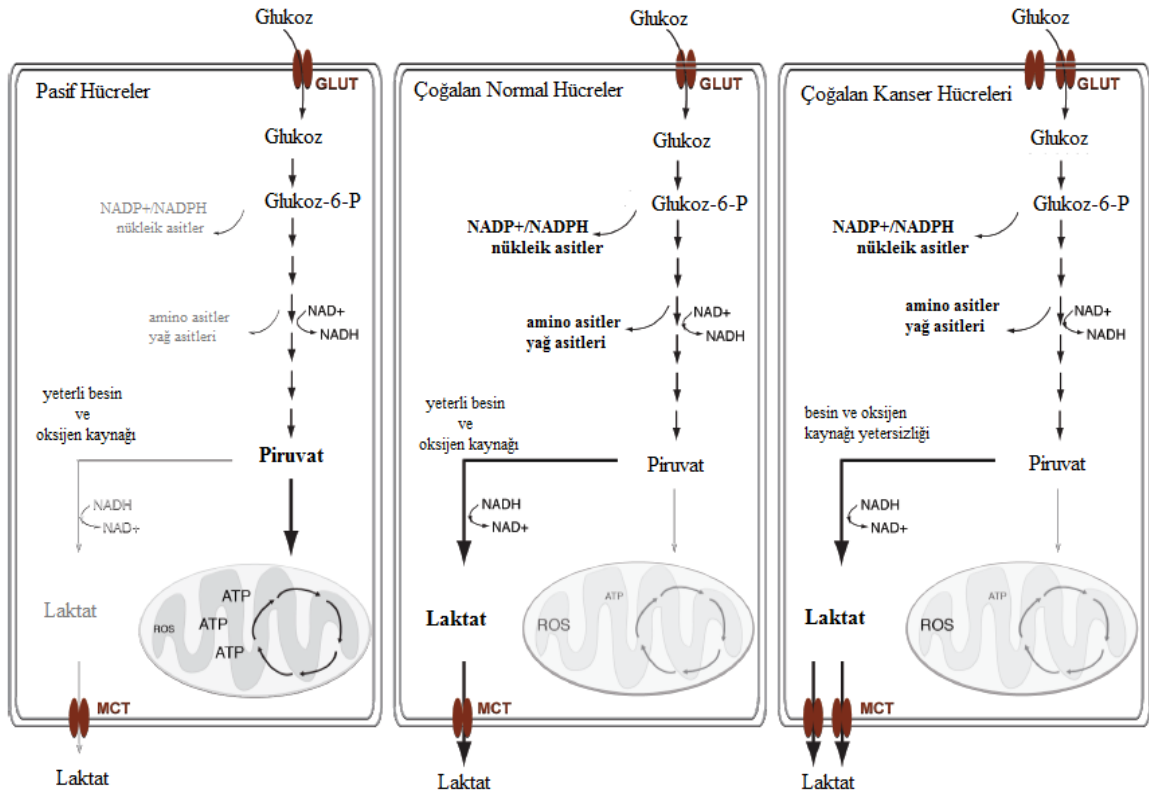
Pasif hücreler fizyolojik işlevlerini yerine getirmek, redoks ve enerji dengesinin yanı sıra yapısal bütünlüğünü korumak için metabolik olarak aktive olurlar. Pasif hücrelerde ATP üretimi esas olarak mitokondriyal solunumla sağlanır (Baenka, 2012). Çoğu pasif hücre ETS ile ve OXPHOS için gerekli NADH'ı oluşturan mitokondriyal metabolizma vasıtasıyla ATP üretirken, çoğalan hücrelerin ATP talebinin önemli bir kısmı glikolizis ile karşılanır (Vander Heiden ve ark, 2009). Pasif hücrelerdeki mitokondriyal solunum enerji üretimini kofaktör kaynağı ile birleştirerek NADH'ı NAD⁺'ye dönüştürür. Ancak, proliferatif normal hücrelerde, NAD⁺'nin yeniden oluşumu hem mitokondriyal solunum hem de laktat üretimi vasıtasıyla başarılabilir (Baenka, 2012) (Şekil 4).

Malign olmayan hücreler, normal hücre işlevi için yeterli besin ve oksijen sağlayan ortama yerleşmişlerdir. Aksine kanser hücreleri, tümörjenezin aynı evrelerinde besin ve oksijen tüketişine maruz kalabilir (Baenka, 2012). Tümör hücreleri düzensiz hücresel çoğalmayı ve hayatta kalmayı sürdürmek için metabolizmalarını değiştirirler ama bu dönüşüm onları sürekli besin maddesi ve enerji kaynağına bağımlı kılar (Fadaka ve ark, 2017). Bir kanser hücresi çoğalabilmek amacıyla bölünme sırasında ürettiği ikiz hücrelerden her ikisinin

de yoluna devam etmesi için yeterli bir biyokütle üretebilmelidir. Bu nedenle çoğalan hücrelerin yüksek düzeyde lipid, nükleotid ve amino asit kazanması gereklidir (Danhier ve ark, 2017). Kanser hücrelerinin metabolik programlarında artan glukoz alımı, yağ asidi sentezi ve artan glutaminolizis hızı gibi metabolik değişikliklerin tümör hücrelerinin büyümesini; hayatta kalmalarını destekleyen karakteristik değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Fadaka ve ark, 2017).

Kanser hücreleri ayrıca tümör çevresinin metabolit oluşumunu da etkiler. Kanser hücrelerine besin maddesi akışındaki artış ve hücrelerin yükselen metabolik hızı çevredeki dokulara salınan metabolik yan ürünlerde de artışa neden olur. Tümör hücrelerinin hem hücre içi hem de hücre dışı ortamlarını bu toksik metabolik yan ürünlerden korumaya yönelik metabolizmalarında bir değişim sağlamaları gerekir (Baenke, 2012).

Kanser hücrelerinin ilk tanımlanan ve en yaygın biyokimyasal özelliklerinden biri anormal glukoz metabolizmasıdır (Lu ve ark, 2015). Glukoz, memeli hücreleri için ana enerji ve karbon kaynağıdır ki sadece ATP değil aynı zamanda çeşitli anabolik yollar için birçok metaboliti de sağlar (Vander Heiden ve ark, 2009). Kanser hücreleri normal hücrelerin aksine glukoz metabolizmasında belirgin değişiklikler gösterir. Normal hücrelere kıyasla kanser hücreleri artan glukoz alımı ve glikolitik oranlar sergiler. Glukoz tüketimi artışı daha fazla glikolitik ara metabolit ve glikolizisten gelen önemli bir miktar ATP üretimi sağlar (Lu ve ark, 2015). Dahası glukoz karbonunun önemli bir kısmı piruvat meydana getirmek yerine glikolitik ara ürünler şeklinde birden fazla biyosentetik yola saptırılır. Son olarak, glikolizisten sonra oluşan çoğu piruvat molekülü mitokondriyal metabolizma yoluyla oksitlenmek yerine sitoplazmada LDH enzimi vasıtasıyla laktata dönüştürülür. Bu durum mitokondriyal solunumu desteklemek amacıyla yeterli oksijenin bulunduğu ortamlarda dahi meydana gelir (Lu ve ark, 2015) (Şekil 4).



Şekil 4. Pasif ve çoğalan hücrelerde metabolik aktiviteye genel bakış (Baenka, 2012'den değiştirilerek alınmıştır).

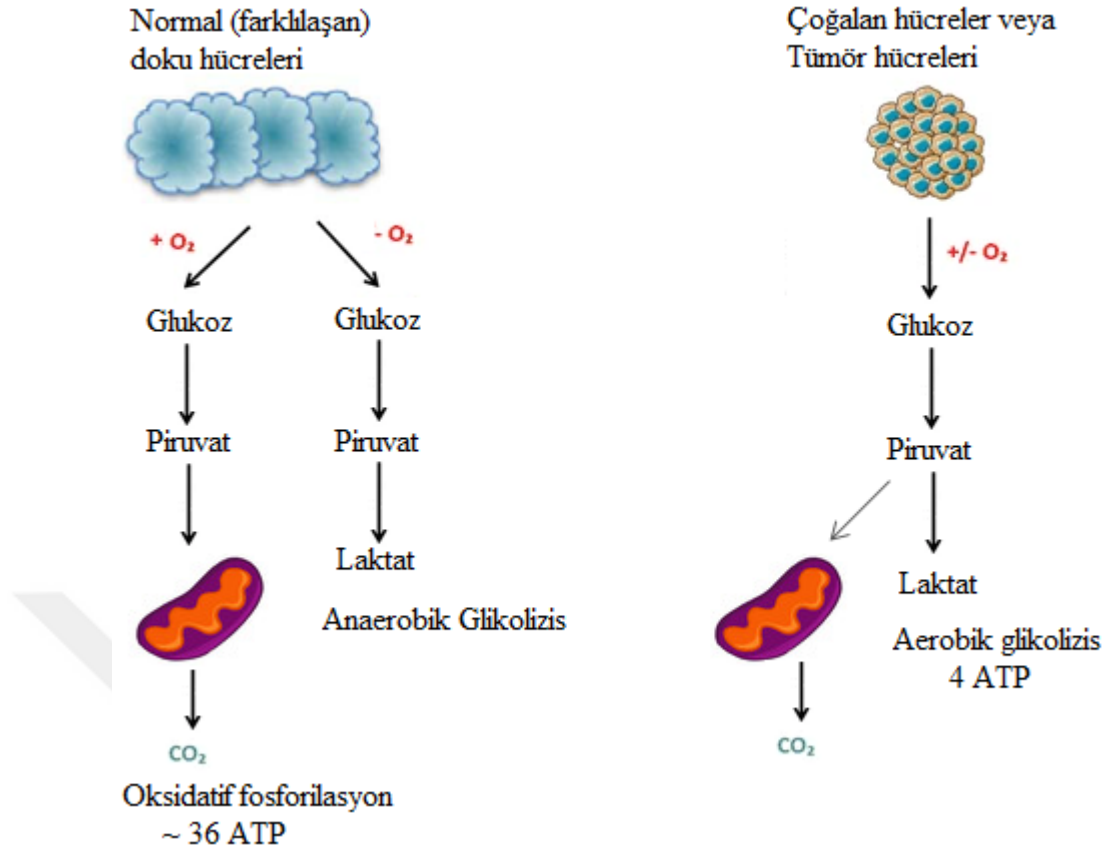
2.6.1. Crabtree Etkisi

Herbert G. Crabtree 1926 yılında karbonhidratların tümörler tarafından kullanımı üzerine yaptığı bir gözlemde normal hücreler için, glukoz varlığının solunumu az miktar arttırdığını veya oksijen tüketimini etkilemediğini, aksine glukozun, tümör hücrelerinde oksijen alımını azalttığını belirlemiştir (Crabtree, 1929). Glukoz tarafından kanser hücrelerinde solunum yolunun inhibisyonuna Crabtree etkisi denir. Kanser hücrelerinin bu metabolik dönüşümü, karsinogeneziste spesifik bir özellik değildir ancak hızla bölünen hücrelerin bir gereksinimi olarak görülebilir. Bu fenomen ayrıca bakteri ve mayada da rapor edilmiştir. Hızlı çoğalmanın yanı sıra tüm bu hücreler tarafından paylaşılan ortak karakteristik özellik, solunumdaki bozulmadan beklenildiği üzere yüksek oranda glikolizistir. Crabtree etkisinin bir başka gözlemi ise glukozun sağlanması ardından solunumda ilk artışın gözlenmesidir. Aslında, diğer heksozların da kanser hücrelerinde bu etkiyi tetikleyebileceği görülmektedir (Dakubo, 2010). Crabtree etkisine dayanılarak çeşitli mekanizmalar

açıklanmıştır ancak moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Bu mekanizmalar: (1) OXPHOS ve glikolizis arasındaki mevcut ADP+Pi yarışının, artan glukoz mevcudiyeti ile solunum anormalliklerine neden olabilirliliği (2) azalan sitozolik pH ve oksidatif enzimlerin inhibisyonu ile laktat üretiminde artış (3) glukoz ile artan mitokondriyal kalsiyum seviyelerinin F_1F_0 inhibitör alt birimlerinin ATP sentaz ile birleşmesine neden olarak respirasyonu inhibe etmesi (4) glukoz metabolizmasının mitokondriyal membranlara zarar veren ve solunumu baskılayan ROS üretimini arttırması olarak sıralanabilir (Wojtczak, 1996; Yang ve ark, 1997; Sussman ve ark, 1980). Ayrıca Crabtree etkisi, kanser hücrelerinde ATP/ADP oranı, Pi, G6P, sitozolik pH değerlerinde değişiklikler içeren çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenebilir (Rodríguez-Enríquez ve ark, 2001). Mekanizmadan bağımsız olarak, kanser hücreleri glikolitikdir ve bu kısmi mitokondriyal bozulma ile ilişkilidir (yani, bastırılmış solunum, daha az oksijen tüketimi ve düşük ATP üretimi) (Dakubo, 2010).

2.6.2. Warburg Fenomeni

Kanser hücrelerinin gereksinimleri hızla çoğalan diğer hücrelerinkine benzer. Yani nispeten büyük miktarda Gibbs serbest enerjisi ve biyomolekül kaynağı gerektirirler (Tatum, 2006; Vazquez ve ark, 2010). Kanser hücreleri bu ihtiyaçlarını karşılamak için önemli miktarda glukoz ve hızlandırılmış glukoz metabolizmasına ihtiyaç duyarlar. 1920'li yıllarda Alman Biyokimyager Otto Warburg ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda tümörlerin çevrelerindeki dokulara kıyasla glukoz tüketimlerinin ve laktat üretimlerinin oldukça fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Tümör hücrelerinin glukozu laktik aside oksijen varlığında dahi metabolize edebilmelerinden dolayı bu metabolik fenomen "aerobik glikolizis" veya "Warburg Etkisi" olarak adlandırılmıştır (Warburg ve ark, 1927; Warburg, 1956). Bu normal olmayan enerji metabolizması, kanser hücrelerinin potansiyel bir özelliğini oluşturmaktadır ve tümör oluşumunun ve büyümesinin kökeni olduğu düşünülmektedir (Garber, 2006). Warburg hipotezine göre tümör hücrelerinde artan glikolize geri dönüşümsüz mitokondriyal solunum hasarı da katkı sağlamaktadır (Warburg, 1956) (Şekil 5).



Şekil 5. Anaerobik glikolizis, aerobik glikolizis ve oksidatif fosforilasyon arasındaki farklılıklar (Kanser hücrelerinde Warburg etkisi)

Hızla büyümekte olan kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla enerjiye ihtiyaç duyacakları düşünülürken, enerji üretmek için verimsiz bir reaksiyon olan aerobik glikolizisi tercih ederler. Bu biyoenerjetik değişimin olası bir nedeni, düşük oksijen gerilimi altında hızlı büyüme ve çoğalmalarını desteklemek için metabolik son ürünlerini üretmek ve toksik ortamlar veya sitotoksik ajanların neden olacağı ölümden kaçışı sağlamaktır. Glikolizisin biyoenerjetik açıdan daha verimsiz doğası kanser hücrelerinin enerji taleplerini karşılamak için artan glukoz alımı modelini benimsemeleri gerektiğini vurgular (Fadaka ve ark, 2017). Kanser hücrelerindeki glikolitik hız yaklaşık 100 misline kadar arttırılır ve bu durum, bu hücrelerin gelişimi ve büyümesi için gerekli olan yüksek ATP üretimini sağlar (Pfeiffer ve ark, 2001; Locasale ve Cantley, 2010). Hücre içine girdikten sonra glukoz glikojene dönüştürülür. Bu nedenle, artan bir glukoz alımı, güçlü bir glikojen sentezi de sağlayabilir. Yapılan çalışmalar tümörlerde belirgin bir glikojen içeriği olduğunu göstermiştir (Xu ve ark, 2015).

Tümör hücre proliferasyonu için ATP üretiminin yanında makromoleküllerin biyosentezi de esastır (Deberardinis ve ark, 2008). Kanser hücrelerinde anabolik reaksiyonlar için glikolitik yol ara maddeleri (örneğin glikojen ve riboz-5-fosfat sentezi için G6P, triaçilgliserid için DHAP ve fosfolipid sentezi ve alanin ile malat sentezi için piruvat gibi) dallanma yollarına gönderilirler ve nükleotidlerin, proteinlerin ve lipidlerin üretilmesi için kullanılırlar (Kroemer ve Pouyssegur, 2008; Liberti ve Locasale, 2016).

Warburg etkisi, hücre metabolizması ve kanser hücrelerinin çoğalması için gerekli olan iki önemli nikotinamid kofaktörü NADPH, H^+ ve NAD^+ havuzunu etkiler (Icard ve ark, 2018). Artan glikolitik ara ürün G6P'ın PPP'na girmesi ile riboz-5-fosfat ve NADPH (nükleik asit ve lipid sentezi için gerekli) molekülleri üretilir. PPP, glukoz metabolizmasında glikolize paralel olarak önemli bir rol oynar. NADPH ve riboz 5-fosfat, çok önemli glikoliz ara ürünleridir (Xu ve ark, 2015). NADPH, H^+ ; PPP'nin oksidatif kısmı, malik enzim ve IDH gibi dehidrogenazlar tarafından rejenere edilir. Transmembran proteinleri NADPH-oksidazlar (NOX), nükleotidler ve de nova lipid biyosentezi, NADPH, H^+ 'yı yoğun olarak tüketir. NADPH varlığında üretilen antioksidan glutatyon (GSH), redoks seviyelerini dengeler ve kemoterapötik ajanlara karşı koyarak kanser hücrelerini korur. NADPH, H^+ eksikliği ise genomik lezyonları ve apoptoza karşı direnci desteklemektedir (Icard ve ark, 2018).

Warburg etkisi; PDH, süksinat dehidrogenaz (SDH) ve Sirtuin-3 (SIRT-3) ile Sirtuin-5 (SIRT-5) fonksiyonlarını inaktive eden mitokondriyal NAD^+ 'ı azaltır. Aynı zamanda, malat dehidrogenaz ve LDH-5 gibi NAD^+ yenileyici sitozolik dehidrogenazların aktivitelerini artırır. NAD^+ , glikolizin oksidatif olmayan kısmı, pirimidin sentezi, histon deasetilasyonu gibi çeşitli işlemlerde ve siklik ADP riboz hidrolaz olarak görev yapan yüzey proteini CD38 tarafından, Poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) ile desteklenen DNA onarımı işeminde ve kaspazların Sirtuin-1 (SIRT-1) ile inaktivasyonunda tüketilir. NAD^+ 'nin bu çeşitli üretim ve tüketim sistemleri, farklı hücre fenotiplerinin oluşumunu teşvik eder. NAD^+ eksikliği (aşırı tüketim veya yetersiz geri dönüşüm nedeniyle) özellikle sirkadiyen kontrolün kaybı ve PARP1'in DNA hasarını teşvik eden ve / veya NAD^+ -bağımlı deasetilaz olan SIRT1'in (mitokondri downregülasyonunu teşvik eden) etkisiz hale getirilmesi gibi birçok işlemle karsinojenezi destekleyebilir (Icard ve ark, 2018).

Mitokondri yoluyla sitrat ve ATP'nin aşırı üretimi hücresele proliferasyona zararlıdır. Bu nedenle Warburg etkisi, çeşitli seviyelerde glikolizi (PFK1 ve PK enzimlerini) durdurduğu bilinen iki molekül olan ATP ve sitratın mitokondriyal aşırı üretimini engelleyen düzenleyici bir mekanizma olarak görülebilir (Icard ve ark, 2018). ATP sitrat liyazın (ACLY) upregülasyonu, ATP ve sitratın düşük konsantrasyonlarının sürdürülmesine katkı sağlayarak

tümör agresifliğini, apoptoza ve dediferansiyasyona karşı direnci artırır. Buna göre mitokondriyal ATP üretimi, kötü diferansiye kanser hücrelerinde %50'ye kadar azalmıştır. Kanser hücrelerinde ATP'nin üretimindeki azalma esas olarak ATPazda (kompleks V) meydana gelen solunum zinciri hasarı ile de ilişkili olabilir (Icard ve ark, 2018).

Azalan oksidatif metabolizma ayrıca CO₂ üretimini de azaltır. İki temel kaynak olan ATP ve CO₂'in azalması kanser hücrelerinde (7.12 ve 7.65 aralığında), normal hücrelerinkinden (6.99-7.20) daha yüksek bir alkali hücre içi pH (pHi) oluşturulmasını destekler. pH'nın logaritmik bir değer olduğu ve hafif bir varyasyonunun H⁺ konsantrasyonunda potansiyel olarak büyük bir düşüşe işaret ettiği unutulmamalıdır. Hücre dışı çevreye H⁺ yayan tümör hücrelerindeki bazı membran değiştiriciler (özellikle Na⁺/H⁺ değiştirici (NHE1)) upregüle edilir. Karbonik anhidraz (CA) ile kolaylaştırılan CO₂'in hidrasyonu ile alkali pH korunmuş olur bu denge, H⁺ atılırken bir sodyum bikarbonat ko-transporter tarafından bikarbonatın (HCO₃⁻) yeniden yakalanması ile sağlanır (Icard ve ark, 2018) (Şekil 6).

Sitrata Asetil KoA'ya dönüştürmekten sorumlu enzim ACLY'nin etkinliği histon asetilasyon seviyelerini etkileyebilir. Glukozun uzaklaştırılması veya ACLY'nin redüksiyonu çeşitli histonlarda asetilasyonun kaybına neden olur ve glukoz metabolizmasında yer alan genlerin transkripsiyonunun azalmasına sebebiyet verir. Bu durum glukoz metabolizması ile histon asetilasyonu arasında bir miktar etkileşim olduğunu gösterir (Liberti ve Locasale, 2016). Bu fıkirden destekle glikolitik metabolizmanın kromatin yapısını etkilediği belirlenmiştir (Liu ve ark, 2015).

Histonların deasetilasyonu alkali pH'sının korunmasına da yardımcı olur. Çünkü pHi yaklaşık 7'nin altına düştüğünde asetat kromatini terk eder ve aşırı yüksek H⁺ konsantrasyonlarını nötralize eder. Alkali pHi, PFK1 aktivitesini 100 kat arttırdığı, piruvat oksidasyonunu azalttığından hücre proliferasyonu için temel bir koşuldur. Dahası, hücre döngüsü kontrol noktalarının atlatılmasını sağlar ve sentrozom etrafında mitoz ve mikrotübül polimerizasyonunun başlatılmasına yardımcı olur. Alkali pHi apoptozisi sınırladığı için tümör agresifliğinin de bir faktörüdür ve normalde glikolitik aktivatör F2,6BP'ı düşük bir seviyede tutan bir faktör olan apoptoz düzenleyicisinin (TIGAR) ve TP53 indüklenebilir glikoliz inhibisyonuna yol açan p53 benzeri proteinleri inaktive eder (Icard ve ark, 2018).

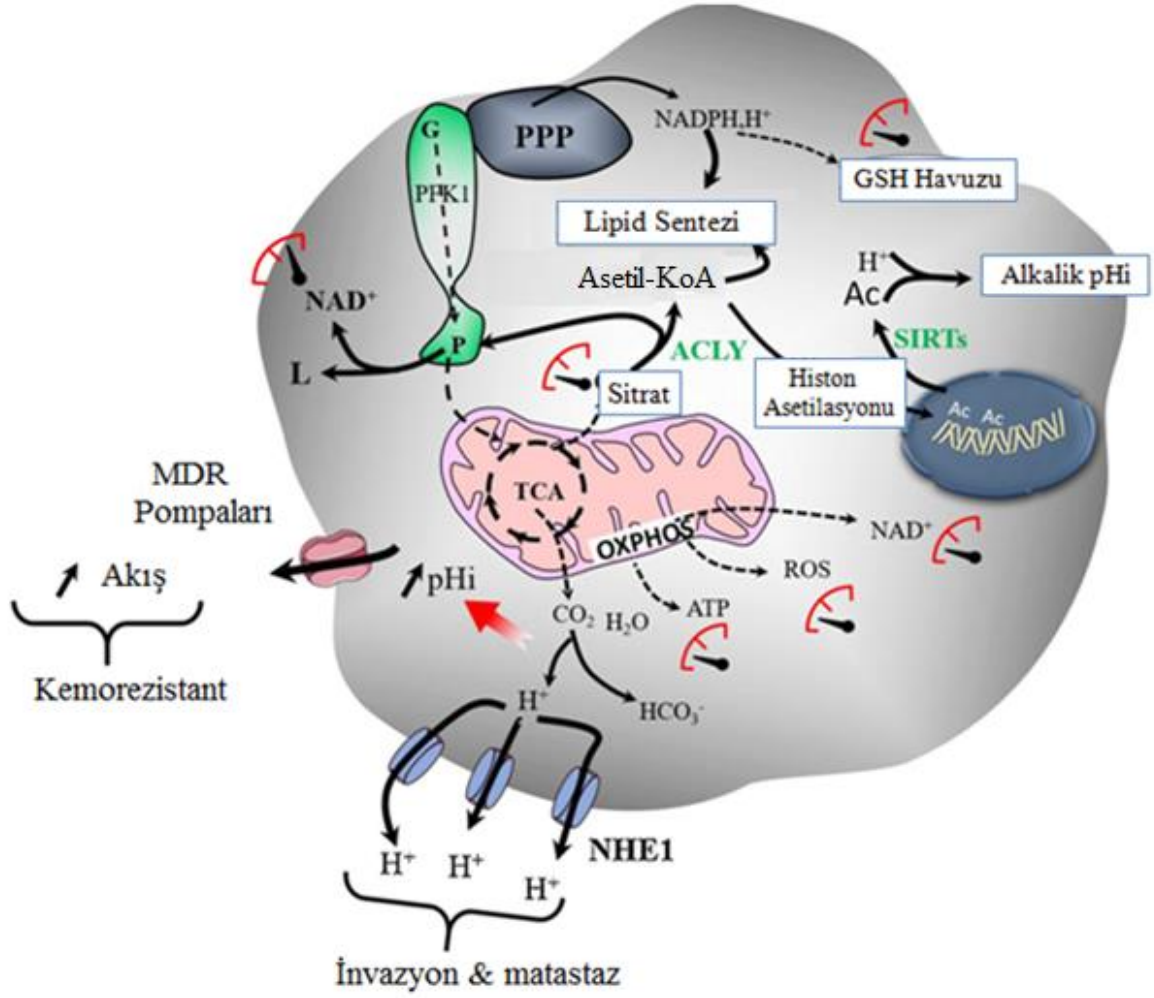
Kanser hücrelerinde hücre zarının her bir tarafında oluşan ters akıştaki pH gradyanı, zayıf bazik anti-kanser ilaçlarının hücrelere difüzyonunu azaltır. Ayrıca ekstrasellüler asidite kemoterapötik ilaçları hücre dışına iten taşıma pompalarının fonksiyonunu güçlendirebilir (Icard ve ark, 2018).

Hücrel OXPHOS, mitokondride önemli bir metabolik yoldur, ancak hücrelere zarar verebilen serbest radikaller olan ROS'ları da üretebilir (Xu ve ark, 2015). Tümörlerin kısıtlı substrat kaynağı ile ya da glikolitik enzim laktat dehidrogenaz A (LDHA)'nın inhibisyonuyla yüksek bir OXPHOS hızı göstermesi daha yüksek bir ROS üretimine ve tümör büyümesinde önemli bir azalmaya neden olur (Herling ve ark, 2011). Hücrelerde aşırı ROS hücre membranlarına ve nükleik asitlere zarar verir. Uygun ROS dengesini korumak esastır (Liberti ve Locasale, 2016). Warburg etkisi, kanser hücreleri için toksik veya ölümcül olmayan bir konsantrasyon aralığında ROS seviyelerini koruyucu bir proses olan mitokondri aktivitesini downregüle eder. Mitokondrinin bu azalan aktivitesi ayrıca sitozolde H_2O 'un üretimini de sınırlar: hafif bir ozmotik artış hücre proliferasyonunu ve göçünü arttırırken, aşırı artışı yıkıcı olabilir. Özetle Warburg etkisi hücrel sağkalım ve hücrel proliferasyon ile uyumlu bir konsantrasyon aralığında ATP, CO_2 , ROS, sitrat ve H_2O üretimini sınırlar. Ayrıca büyümeyi, invazivliği ve gelişmeyi destekleyen bir pH ortamı sağlar (Icard ve ark, 2018) (Şekil 6).

Aerobik glikolizisin baskın bir şekilde kullanılması yoğun laktat oluşumuna neden olur ve tümör mikroçevresinde laktat birikimi hem komşu normal hücre popülasyonlarının tahribatını hem de ekstrasellüler matriksin asit kaynaklı degradasyonunu ve anjiyogenez oluşumu ile tümör invazyonunu kolaylaştırır (Bonuccelli ve ark, 2010). Yoğun miktarda oluşan laktik asit ve bikarbonik asitler ortamı, tümör istilası için koşullandırmanın yanı sıra antikanser immün efektörlerini baskırlar (Koukourakis ve ark, 2006; Fischer ve ark, 2007; Swietach ve ark, 2007). Kanser odağı çevresindeki sitotoksik T lenfositlerin birikiminden kaynaklanan hücre dışı laktatın artışı ise bağışıklıktan kaçışa neden olacak şekilde T hücrelerinin işlevini ve metabolizmasını bozar (Xu ve ark, 2015).

Artan aerobik glikolizis ile laktat konsantrasyonunun artışı piruvat konsantrasyonundaki artış ile de paraleldir çünkü her iki metabolit doğrudan LDH tarafından katalizlenen bir denge reaksiyonu ile birleşir. Piruvat ve diğer ketoasitlerin ayrıca enzimatik olmayan bir kimyasal reaksiyon ile H_2O_2 'i suya dönüştürerek etkili antioksidanlar olarak görev yaptıkları gösterilmiştir. Böylece artan piruvat seviyeleri tümörlerin ROS'a karşı yüksek hassasiyetinin azaltılmasına katkıda bulunabilir (Herling ve ark, 2011).

Bunun yanında metabolizmanın mitokondriden sitoplazmaya doğru yönlendirilmesi malign hücrelerin apoptoza direnç göstermesini sağlar. Glikolitik enzimler, mitokondriye bağlı apoptozun çeşitli bileşenlerini inhibe ederek anti-apoptotik faktörler olarak görev yaparlar (Li ve ark, 2011).



Şekil 6. Warburg etkisi ve hücrede yarattığı sonuçlar (Icard ve ark, 2018'den değiştirilerek alınmıştır).

Kısaltmalar: Ac: Asetil; ACLY: ATP Sitrat Liyaz; G: glukoz; GSH: Glutatyon; H⁺: proton; L: laktat; MDR: Multi İlaç Direnci; NAD⁺: Nikotinamid Adenin Dinükleotid; OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon; P: Piruvat; PFK1: Fosfofruktokinaz 1; PPP: Pentoz Fosfat Yolu; ROS: Reaktif Oksijen Türleri; SIRT6: Sirtuinler; TCA: Trikarboksilik Asit Siklusu

2.7. Hipoksi ve Kanser

2.7.1. Organizmadaki Oksijenin Fizyolojik Konsantrasyonları

Oksijen, solunum sırasında kullanılmasından ötürü biyokimyasal reaksiyonlarda merkezi bir öneme sahiptir. Yetişkinlerde fizyolojik oksijen konsantrasyonu dokuya ve hatta aynı organın bölgelerine göre bile değişir. İnsan vücudundaki normal O₂ seviyeleri üst solunum yolunda %21'den [deniz seviyesinde ~150mmHg kısmi basınca (pO₂) karşılık gelir] böbrekte kortikomedüller bileşimde ~1'e kadar değişir (Semenza, 2010). İnsan vücudundaki birçok hücre daha düşük O₂ seviyelerine maruz kalmasına rağmen *in vitro* kültür hücreleri genellikle %20 O₂ (%95 hava ve %5 CO₂) içinde tutulur ve bu konsantrasyon "normoksi" olarak tanımlanır (Semenza, 2010).

O₂'nin her hücrede basit moleküler difüzyonuna izin veren ilkel çok hücreli organizmaların aksine, karmaşık çok hücreli organizmalar, O₂'ni (solunum sistemi) etkili bir şekilde yakalamak ve dokulara dağıtmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Ayrıca, esasen eritropoietin (EPO) ile temsil edilen bir nöroendokrin sistemi, O₂ konsantrasyonunun etkin bir şekilde düzenlenmesini ve organizmanın bütün hücrelerine verilmesini sağlar (Brahimi-Horn ve Pouyssegur, 2007; Hsia ve ark, 2013). Bu güçlü sistemlere rağmen, insan vücudundaki oksijen dağılımı oldukça heterojendir (Van Den Brenk ve Jamieson, 1962; Brahimi-Horn ve Pouyssegur, 2007). Pulmoner, kardiyak ve vasküler sistemlerde art arda dirençler nedeniyle bir O₂ kaskadı oluşur. Bu kaskad deniz seviyesindeki atmosferik bir O₂ konsantrasyonundan (%21.1; 160 mmHg), akciğerlerin alveollerine (%14.5; 110 mmHg), arter kanına (%13.2; 100 mmHg) ve venöz kana doğru azalan bir gradient oluşturur (%5.3; 40 mmHg) (Leach ve Treacher, 1998; Le ve ark, 2006). Oksijen seviyesi dokuların interstisyel boşluklarında (% 1.5-5; 12-38mmHg) ve mitokondride (%1; 7.5mmHg) daha da düşer (Gnaiger ve ark, 1995; Gnaiger ve ark, 1998). Bu kaskadın çok düşük seviyelerde lokal O₂ konsantrasyonunu koruyarak, “enerji üretici fabrikası” olan mitokondriyi oksidatif strese karşı koruduğuna inanılmaktadır (Halliwell, 1999; Hsia ve ark, 2013).

2.7.2. Hipoksinin Tanımı

Hipoksi, oksijen seviyelerinin normalin (normoksi) altına (örneğin %5'in altına) düşmesi olarak tanımlanır. Şiddetli hipoksi genellikle <%1 O₂ (7.5 mmHg) veya <%0.1 O₂

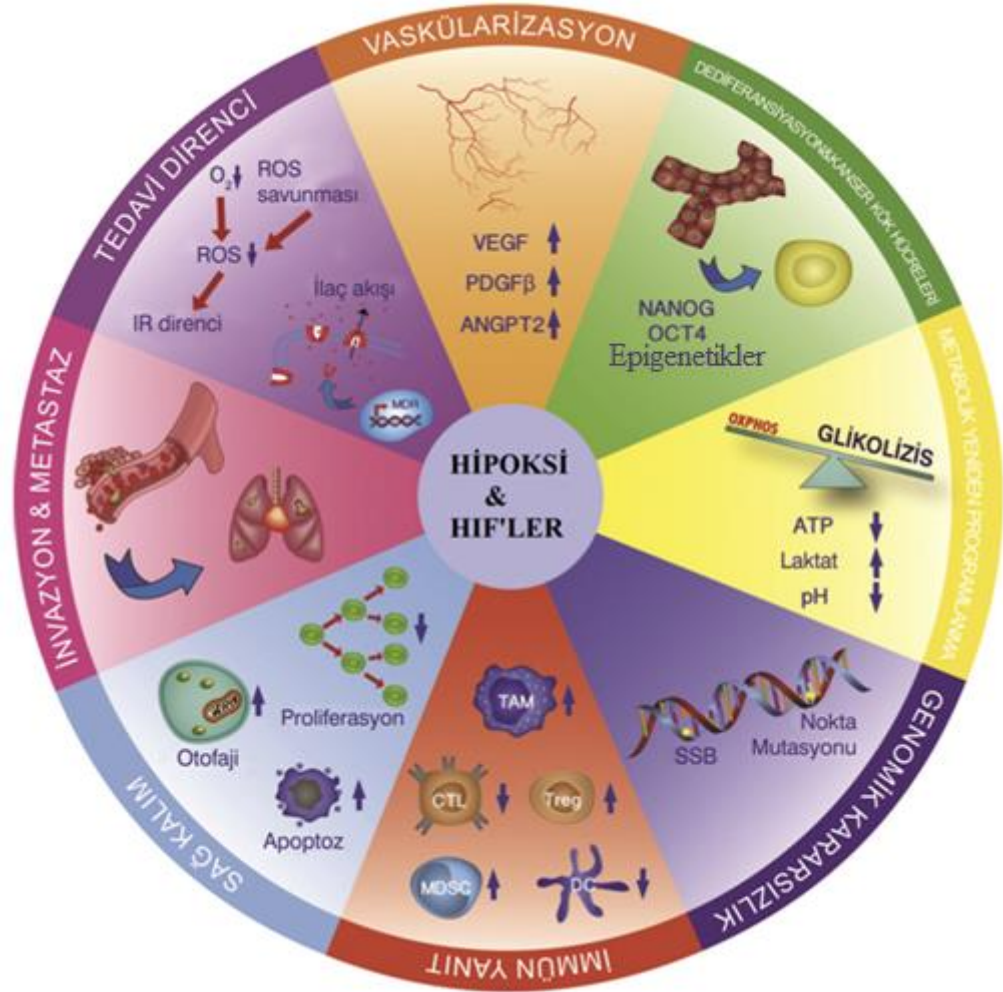
(0.75 mmHg) koşullarında oluşur. Bununla birlikte, normal fizyolojik koşullar altında, birçok doku düşük ve değişken O₂ seviyeleri sergiler (%3-7; 22.6-39.6 mmHg), bu da hipoksik eşik değerinin dokular arasında farklılık gösterebileceğini kanıtlar (Jiang ve ark, 1996). Hipoksi; anemi, böbrek, koroner arter, pulmoner ve hematolojik hastalıklar, yara iyileşmesi, inflamasyon ve kanser patofizyolojisinde önemli rol oynar (Adamaki ve ark, 2012). Bununla birlikte hipoksi, memelilerin embriyogenezi esnasında anjiyogenezin düzenlenmesinde, kök hücre farklılaşmasının ve hücre kaderinin kontrolünü sağlamada önemli bir etkiye sahiptir. Kanser progresyonu ve kanser hücresi sağ kalımı üzerine önemli etkilerin çoğu; örneğin anjiyogenez, metastatik potansiyelde artış, hücre döngüsü progresyonunun devamı ve apoptozise karşı direnç, hipoksi ile sürdürülür (Bertout ve ark, 2008).

2.7.3. Kanser Gelişiminde Hipoksinin Rolü

Hipoksi, hem malign transformasyon sürecinin tetiklenmesinde hem de tümör mikroçevresi içinde adaptif hücre yanıtlarının sağlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Adamaki ve ark, 2012). Kanser hücrelerinin hızlı çoğalması nedeniyle tümör, normal damar sistemindeki besin ve oksijen ihtiyacını hızla tüketir ve hipoksik hale gelir (Eales ve ark, 2016). Bu durum, tümörün vaskülarizasyonunu tetikleyen hipoksik tümör bölgelerinde anjiyogenik faktörlerin upregülasyonunu sağlar. Çoğu solid tümörler oldukça düşük oksijen konsantrasyonlu bölgeler içerir, bu da kanserin ilerlemesi için ön şarttır. Tümör mikroçevresindeki hipoksi, kan damarlarından uzak hücrelerin, genellikle onlardan 100-200 µm uzakta hızlı hücre proliferasyonu sonucunda meydana gelir (Adamaki ve ark, 2012). Tümör kan damarları düzensiz kan akışı ve oksijen dağıtımı ile sonuçlanan ciddi yapısal ve fonksiyonel anormalliklere sahiptir (Vaupel ve ark, 1989; Brown ve Giaccia, 1998). Çoğalan kanser hücrelerinde yeni oluşan bu damarlar artan beslenme gereksinimlerini karşılayamaz veya tümör büyümesi ile baskılanabilir ve tıkanabilir (Harris, 2002). Bu durum, tümör hücrelerini hipoksik koşullar altında sağ kalmaya ve proliferasyona teşvik edecek yanıtlar geliştirmeye zorlar (Adamaki ve ark, 2012).

Hipoksi, mTOR ve PERK sinyalizasyonları gibi bazı önemli hücre sağ kalım yollarını aktive eder (Bertout ve ark, 2008). Bununla birlikte, hipoksi ile aktive edilen işlemlerin çoğu, hipoksi ile indüklenebilir faktörlerin (HIF'ler) bir ailesi ile ve özellikle hipoksik yanıtların en iyi tanımlanan mekanizmalarına aracılık eden HIF-1 izoformu ile düzenlenir (Wigerup ve ark, 2016) (Şekil 7). Tümör hipoksisi ve HIF'ler; kanser proliferasyonu, apoptoz, metabolizma, immün yanıtlar, genomik instabilite, vaskülarizasyon, istila ve metastazın içinde olduğu

kanser “belirteçleri” nin birçoğunu etkiler. HIF’lerin ayrıca çoklu mekanizmalar yoluyla kemo- ve radyoterapi direncine katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Klinik tümör örneklerinde HIF ekspresyonu, kötü prognozlarla ve tedavide nüksetme ile ilişkilidir. HIF’ler, mevcut metastatik ve tedaviye dirençli kanserlerin üstesinden gelebilmek için kullanılabilecek önemli moleküler hedefler gibi görünmektedir (Wigerup ve ark, 2016) (Şekil 7).



Şekil 7. Hipoksi ve HIF’ler tarafından regüle edilen kanser belirteçleri (Wigerup ve ark, 2016’dan değiştirilerek alınmıştır).

2.8. HIF-1 Ailesi

HIF-1, ilk olarak 1991 yılında Semenza ve arkadaşları tarafından, kırmızı kan hücrelerinin üretimi için eritropoietin hormonunun kodlanmasından sorumlu bir gen olan EPO

geni üzerinde yapılan bir çalışma sırasında keşfedilmiştir (Semenza ve ark, 1991). EPO geninin belli bir bölgesinde cis-etkili DNA sekansları (5'-RCGTG-3') tanımlanmıştır. Bu DNA sekanslarının, EPO geninin hipoksiye cevap olarak transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle hipoksi cevap elemanları (HRE) olarak adlandırılmıştır (Beck ve ark, 1991; Pugh ve ark, 1991; Semenza ve ark, 1991; Rajendran, 2011). İlerleyen çalışmalarla, birçok düzenleyici genin transkripsiyonel aktivasyonunun, hipoksi koşulları altında indüklenen spesifik bir proteinin HRE'ye bağlanması yoluyla başlatıldığı keşfedilmiştir. Bu spesifik protein HIF-1 olarak tanımlanmıştır (Masoud ve Li, 2015).

HIF'ler O₂ homeostazının ana düzenleyicisidirler; metabolizma, apoptozis ve anjiyogenez gibi çeşitli proseslerde yer alan çok sayıda geni düzenleyerek hem O₂ dağıtımını hem de O₂ yoksunluğuna uyum sağlayabilmeyi kolaylaştırırlar (Semenza, 2012). HIF-1, HIF-1 α (veya analogları HIF-2 α ve HIF-3 α) ve HIF-1 β adlı iki alt birimden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür (Xie ve Simon, 2017). HIF-1 α , oksijene duyarlı bir alt birimdir ve ekspresyonu hipoksik koşullar altında indüklenir. Aksine, HIF-1 β yapısal olarak eksprese edilir (Masoud ve Li, 2015). HIF-2 α , HIF-1 α ile belirgin bir derece amino asit dizisi benzerliği gösterir (% 48 dizi benzerliği). Bu kimlik benzerliği, HIF-1 β ile heterodimerizasyonu ve HRE'lerle bağlanma yeteneklerini açıklayabilir (Masoud ve Li, 2015). Bunun yanında birçok dokuda her yerde eksprese edilen HIF-1 α 'nın aksine HIF-2 α 'nın dağılımı çeşitli vasküler yapılar ve beyin, kalp, akciğer, böbrek ve karaciğer dokuları ile sınırlıdır (Wiesener ve ark, 2003).

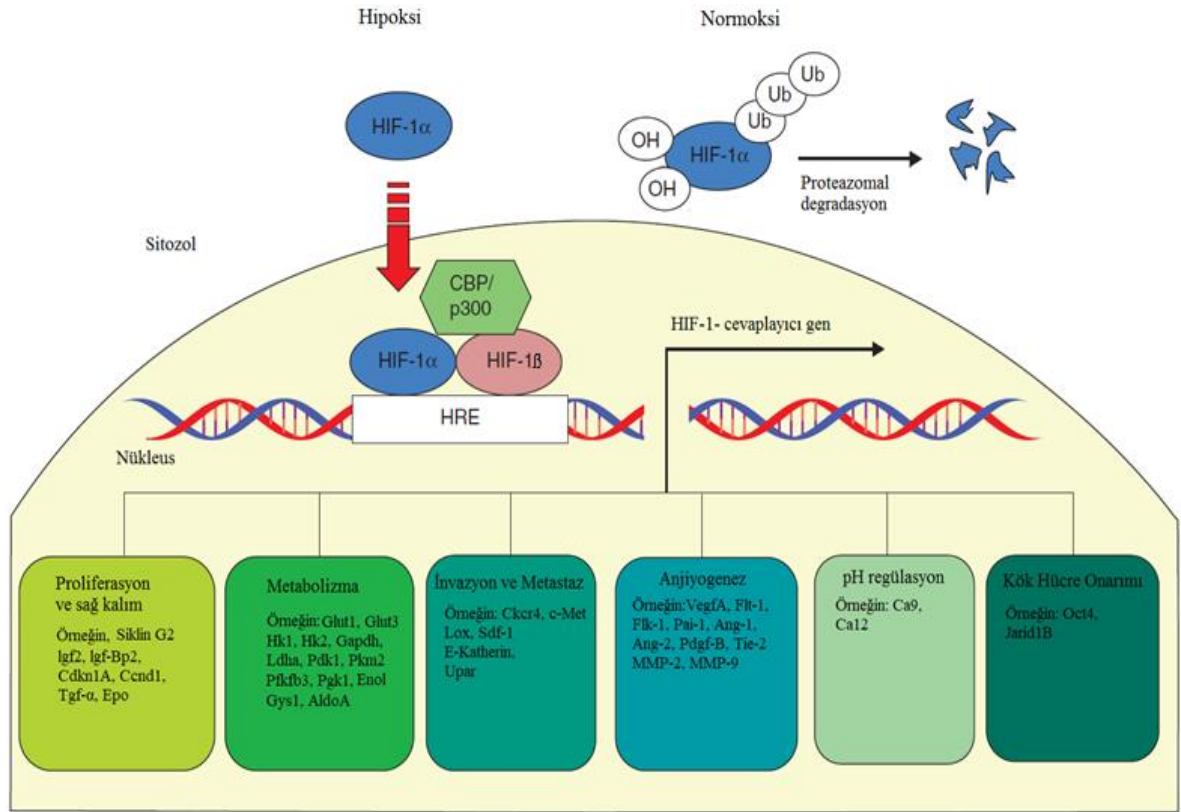
HIF-1 α proteininin aktivitesi ve birikiminin, hücrelerdeki yaşam döngüsü boyunca farklı şekillerde regüle olduğu tespit edilmiştir. O₂ seviyelerinden bağımsız olarak HIF-1 α , çeşitli büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerinin içinde bulunduğu bir dizi sinyalizasyon olayı vasıtasıyla yapısal olarak kopyalanır ve sentezlenir (Kallio ve ark, 1997) (Şekil 8).

HIF-1 α normoksik koşullar altında hızlı bir degradasyona uğrar ve çok kısa bir yarı ömre sahiptir (yaklaşık 5 dakika). Hem HIF-1 α hem de HIF-1 β subunitleri normoksik ve hipoksik koşullarda yapısal olarak eksprese edilse de, hipoksik koşullarda sadece HIF-1 α protein stabilizasyonu ve artan DNA bağlama aktivitesi mevcuttur. Bu durum HIF-1 α alt biriminin düşük oksijen konsantrasyonlarına duyarlı olduğunu gösterir (Kallio ve ark, 1997). HIF-1 α 'nın stabilitesinin ve sonraki etkilerinin sıkı bir şekilde regülasyonu başlıca hidroksilasyon, ubiquitasyon ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar ile kontrol edilir (Kallio ve ark, 1997; Brahimi-Horn ve Pouyssegur, 2007).

Normoksik koşullar altında ($\geq 5\%$ O₂) spesifik prolil hidroksilaz domain proteinleri (PHD) adı verilen özel sensörler HIF-1 α 'daki ODD domaininin hidroksilasyonunu katalizler ve von Hippel-Lindau (pVHL) tümör baskılayıcı protein tarafından HIF-1 α bir sinyal olarak hareket eder (Adamaki ve ark, 2012). pVHL; Elongin C, Elongin B, cullin-2 ve RBX1'i içeren bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinin tanıma bileşenidir. HIF-1 α 'nın bir multiprotein E3 kompleksinin tanıma bileşeni olan bağlanması poliubikitasyonuna neden olur ve sonuç olarak 26S proteazomu tarafından parçalanmasına yol açar (Kallio ve ark, 1999; Sutter ve ark, 2000) (Şekil 8).

Ancak hipokside, PHD'lerin enzimatik aktivitesi inhibe edilir ve bu durumda HIF-1 α proteini VHL yakalama ve proteazomal degradasyondan kaçır. Oksijene-bağlı hidroksilasyonun engellendiği akut olarak hipoksik bir ortamda HIF- 1 α , HIF1 β (ARNT) ile dimerize edildiği çekirdeğe transloke olur ve böylece degradasyonu önler (Jiang ve ark, 1996). Sonuç olarak, HIF- 1 α /ARNT kompleksi histon asetilasyonu yoluyla kromatin yapısını değiştirmek için gerekli p300/CBP koaktivatörlerini görevlendirir ve tanıma dizisi 5'-(A/G)CGTG-3' vasıtasıyla hedef genlere bağlanabilir ve böylelikle hedef sekansların transkripsiyonunu arttırabilir (Adamaki ve ark, 2012) (Şekil 8).

Yüzlerce gen, HIF bağlanması ve transaktivasyonunun direkt hedefleri olarak kabul edilmiştir. Eritropoez, anjiyogenez, glikoliz, vasküler gelişme, mitokondriyal fonksiyon, enerji metabolizması, hücre proliferasyon, hücre göçü gibi önemli proseslerde yer alan 90'ın üzerinde hedef gen mevcuttur. EPO, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), glukoz taşıyıcı-1 (GLUT1), GAPDH, LDHA bunlara örnektir (Adamaki ve ark, 2012) (Şekil 8).



Şekil 8. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1α regülasyonu ve doğrudan HIF-1α tarafından regüle edilen biyolojik fonksiyonlarına göre gruplandırılmış genler (Favaro ve ark, 2011’den değiştirilerek alınmıştır).

(Kısaltmalar: ANG-1: Anjiyopietin-1; CA9: Karbonik anhidraz 9; CBP: CREB bağlı protein; CCND1: Siklin D1; CCR4: C-X-C kemokin reseptör tipi 4; c-MET: Mezenkimal-epitel geçiş faktörü; ENOI: Enolaz I; EPO: Eritropoietin; FLK-1: Fetal karaciğer kinaz-1; FLT-1: FMS-benzeri tirozin kinaz-1; GAPDH: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz; GYS1: Glikojen sentaz 1; HK1: Hekzokinaz 1; HRE: hipoksik cevap elementi; IGF2: İnsülin benzeri büyüme faktörü 2; IGF-BP2: IGF-bağlı protein 2; JARID1B: Jumonji AT-zengin etkileşimli domain 1B; LOX: Lizil oksidaz; MMP-2: Matriks metaloproteinaz 2; OCT4: Oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4; PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1; PDGF-B: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-B; PDK1: Piruvat dehidrogenaz kinaz-1; PFKFB3: 6-fosfruktokinaz-2-kinaz/fruktoz-2, 6-bifosfataz 3; PGK1: Fosfogliseratkinaz 1; PKM2: Piruvat kinaz M2; SDF-1: Stromal-türevi faktör 1; TGF-α: Transforme edici büyüme faktörü α; TIE-2: Tie-benzeri reseptör kinaz 2; Ub: Ubikitin; UPAR: Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü)

2.9. Warburg Etkisinin Regülasyonu

2.9.1. Warburg Etkisinin Hipoksi ve HIF-1 α ile Regülasyonu

Birçok insan tümörü verimsiz/bozuk veya yaygın olarak yetersiz vasküler sistemlerden dolayı şiddetli derecede hipoksiktir. Hipoksik koşullarda, normal hücreler, enerji üretmek için OXPHOS'tan glikolize geçiş yaparlar ve oksijen tekrar mevcut olduğunda, OXPHOS'a geri dönerler. Bu durum, oksijen varlığında bile glikolize uyum sağlayan kanser hücreleri için geçerli değildir (Warburg, 1956). HIF-1 α bu metabolik yeniden programlanmada kritik rol oynamaktadır çünkü glukoz taşıyıcıları ve glukozu piruvata ve ardından da laktata dönüştüren glikolitik enzimleri kodlayıcı genlerin ekspresyonunu aktive eder (Seagroves ve ark, 2001).

Hipoksik ortamda, HIF1 α stabilize edilir ve HIF1'in düşük moleküler oksijen seviyelerine metabolik adaptasyonu modüle etmesine izin verilir. Bu koşullar altında, HIF1 α hücrel glikolizi artırırken, aynı zamanda TCA döngüsüne piruvat akışını, OXPHOS hızını ve oksijen tüketimini azaltır. HIF-1'in sıklıkla insan kanserlerinde yüksek oranda eksprese olduğu bulunmuştur (Bartrons ve Caro, 2007).

HIF-1, glukoz taşıyıcılarının ve glikolitik enzimlerin çoğunun ekspresyonunu artırır. Kanser hücrelerinde HIF-1 α 'nın hipoksik koşullar altında yeterli glukoz alımını sağlayan GLUT1 ve GLUT3'ün ekspresyonunu aktive ettiği kanıtlanmıştır (Huang ve ark, 2014). HIF-1, hücreler tarafından glukoz alımını teşvik eden glukoz taşıyıcıları GLUT1 ve GLUT3'ü kodlayan genler olan SLC2A1 ve SLC2A3 gen ekspresyonlarını uyarır (Iyer ve ark, 1998) Ayrıca, glukozun hücreler tarafından hızlı bir şekilde kullanılması; HK, PFK1, aldolaz, trioz fosfat izomeras, GAPDH, fosfo gliserat kinaz, enolaz ve LDH gibi glikolitik enzimlerin HIF-1 aracılı indüksiyonu ile desteklenir (Semenza ve ark, 1994; Dang ve Semenza, 1999; Minchenko ve ark, 2003; Gess ve ark, 2004; Marín-Hernández ve ark, 2006; Rajendran, 2011).

HIF-1 aracılı metabolik yeniden programlanma ile özellikle GLUT1 ve HK2 gibi glikolitik enzimlerin ekspresyonunun artırılması, hücre içi seviyelerde glukoz ve G6P artışına neden olur. G6P, NADPH ve glutatyon antioksidanlarının biyolojik oluşumundan sorumlu olan PPP için bir substrat görevi görür. HIF-1 aracılı Warburg etkisi, antioksidan kapasitenin indüklenmesi ve kanser hücrelerinin nihayetinde radyorezistans özellikleri ile de ilişkilendirilmiştir (Harada, 2016).

Kilit enzimlerden biri olan PKM2'nin doğrudan HIF1 α ile etkileşime girdiği ve hedef genlerin transaktivasyonunu teşvik etmek amacıyla HRE'lerine HIF1 bağlanışını arttırdığı

gösterilmiştir (Huang ve ark, 2014). PKM2'nin prolil hidroksilaz 3 ile hidroksilasyonu, HIF1'e bağlanmasını sağlar. Ayrıca, PKM2'nin kendisi bir HIF1 hedef genidir. Bu nedenle, bir glikolitik enzim rolüne ek olarak PKM2, HIF1 aktivitesini artıran ve kanser hücrelerinde metabolizmanın yeniden programlanmasını sağlayan pozitif geri besleme döngüsüne katılarak Warburg etkisini güçlendirmektedir (Luo ve ark, 2011; Bensinger ve Christofk, 2012).

Bunun yanında HIF-1, PDH aktivitesini inhibe eden PDK1'i indükleyerek hem TCA döngüsünü hem de solunumu baskılar (Şekil 2.12, Şekil 2.13). Böylece LDH enzimi ile piruvattan laktat oluşumu artar ve laktat hücre dışı boşluğa salınır. Bu reaksiyonla O₂ yoksunluğu olan hücreler tarafından devam eden glikoliz için NAD⁺ üretilir. Mitokondriyal O₂ tüketimine karşı bu HIF-1'e bağımlı blok, özellikle O₂ yoksunluğu şiddetli ve uzun süreli olduğunda hücrenin hayatta kalmasını teşvik eder (Bartrons ve Caro, 2007).

Hipoksi, besinsel ya da çevresel stres durumunda memeli hücreleri ve tüm ökaryotik hücrelerde bulunan yüksek oranda korunmuş bir hücresel enerji durumu sensörü olan AMP ile aktive protein kinazı (AMPK) algılar (Hardie, 2004). AMPK, hücresel AMP / ATP oranını artıran uyarılarla aktive edilir ve mTOR'un güçlü bir inhibitörü olarak işlev görür. Aktive edilmiş AMPK, hücresel enerji metabolizmasında ve p53 aktivasyonu ile hücre döngüsünü durdurmayı kontrol etmede doğrudan yer alan çeşitli hedef molekülleri fosforile eder (Jones ve ark, 2005). AMPK'nın hipoksi ile aktive edilmesi F2,6BP miktarı ve glikolizde artışa neden olan PFK-2'nin fosforilasyonunu sağlar (Marsin ve ark, 2002). Bir tümör baskılayıcı olarak bilinen serin/treonin kinaz LKB1 (Karaciğer kinaz B1; serin/treonin kinaz 11-STK11) hücre metabolizmasını, büyümenin kontrolü ve hücre polaritesi ile ilişkilendiren bir sinyal yoludur. LKB1, AMPK'yi doğrudan aktive eden bir serin/treonin kinazı kodlar (Shackelford ve Shaw, 2009). AMPK'nın hipoksik veya iskemik mikro ortamlarda aktivasyonu, hücrenin hayatta kalması için kritik öneme sahip olabilir ve bu nedenle metabolik olarak baskılanmış veya ATP eksikliği olan hücreler için koruyucu bir mekanizmayı temsil eder. Bu bulgular, HIF-1 ve AMPK'nın, düşük oksijenli veya iskemik doku mikro ortamlarında enerji homeostazını korumak için uyumlu bir hücresel cevabın bileşenleri olduğu anlamına gelmektedir (Bartrons ve Caro, 2007) (Şekil 9).

2.9.2. Warburg Etkisi'nin Onkogenler ile Regülasyonu

Yüksek oranda glikolitik olan bir tümörün tüm bölgelerinin mutlaka hipoksik olmadığı açıktır. Bu nedenle, glikolitik fenotipi indükleyen başka düzenleyici mekanizmalar

bulunmalıdır (Bartrons ve Caro, 2007). Normal oksijen koşulları altında büyüyen birçok tümör hücresi, glikolitik enzimlerin ve glukoz taşıyıcılarının ekspresyonunun artması ile ilişkili olan yüksek glikolitik oranlar sergilerler (Dang ve Semenza, 1999). Bunun nedeni, HIF-1 α 'nın hipoksi dışındaki faktörlerle stabilizasyonu, örneğin VHL'nin inaktivasyonu veya HIF1'in büyüme faktörleri veya farklı onkogenler tarafından aktivasyonu olabilir. Onkogenlerin kendi başına da glikolizi aktive edebileceği gösterilmiştir. HIF-1'in RAS ve onun bozunmasına aracılık eden VHL kaybı ile artış gösterdiği belirlenmiştir (Kim ve Dang, 2006). RAS onkogenleri bu sayede transforme hücrelerde glukoz taşınımı ve glikolizi artırabilir. Hedeflerden birinin PFK-1 olduğu gösterilmiştir (Bartrons ve Caro, 2007).

Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) sinyalizasyon yolu hem büyüme kontrolü hem de glukoz metabolizması ile bağlantılıdır. Mevcut aminoasitleri mTOR yoluyla protein sentezine yönlendirmedeki iyi tanımlanmış rolüne ek olarak PI3K yolu glukoz alımını ve kullanımını da düzenler. İnsüline bağımlı olmayan dokularda bile AKT ile PI3K sinyalizasyonu glukoz taşıyıcı ekspresyonunu düzenleyebilen HK ile glukoz tutulumunu artırabilir ve PFK aktivitesini uyarabilir. PI3K yolu aktivasyonu, hücreleri yüksek glikolitik akış seviyelerine bağımlı hale getirebilir (Kim ve Dang, 2006; Vander Heiden ve ark, 2009) (Şekil 9).

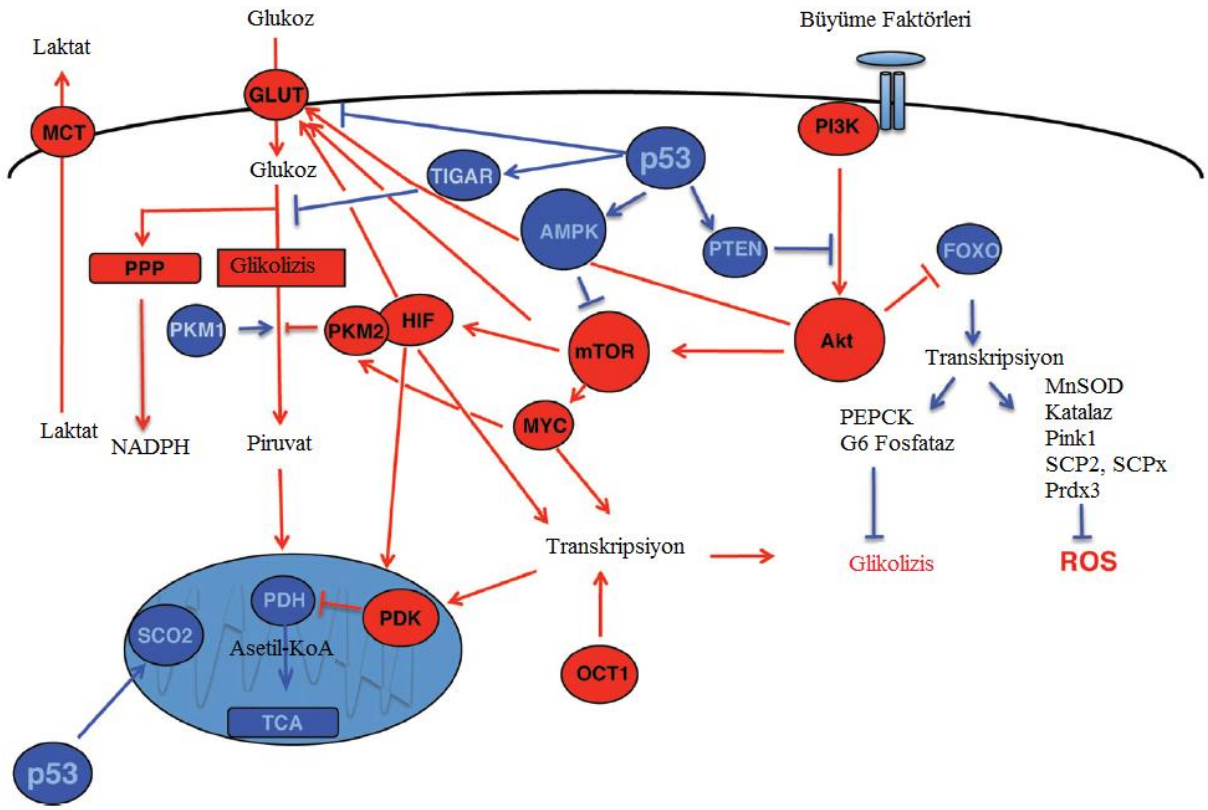
En iyi karakterize edilmiş onkogenler ve tümör baskılayıcılarının çoğu PI3K-AKT-mTOR yolağında bulunur ve bu sinyal yolağının anormal aktivasyonu çeşitli kanser türlerinde en sık görülen değişiklikler arasındadır (DeBerardinis ve Chandel, 2016) (Şekil 9). AKT kanser hücrelerinde glukoz alımını ve glukoz metabolizmasını uyarmasıyla hücre metabolizmasını kontrol eden en önemli sinyal moleküllerinden biridir. Bu nedenle AKT'nin habis hücrelerde genellikle yapısal olarak aktif olması şaşırtıcı değildir (Danhier ve ark, 2017). Normal ve kanser hücrelerinde makromoleküllerin biyosentezine yol açan birçok metabolik aktivitenin güçlendirilmesinden PI3K/AKT/mTOR yolağının sorumlu olduğu düşünülmektedir (DeBerardinis ve ark, 2008). Özellikle AKT, glikolitik laktat üretimini arttırarak kanserli hücrelerdeki Warburg Etkisini indükleyebilmektedir (Danhier ve ark, 2017). Onkoprotein AKT'nin GLUT4'ü aktive ederek, glukoz alımını arttırdığı ve glikolizisi desteklemek için HK2'yi indüklediği gösterilmiştir (Elstrom ve ark, 2004; Kim ve Dang, 2006) (Şekil 9).

Sürekli AKT1 upegülasyonu, HIF moleküllerinin ekspresyonunun yanı sıra FOXO (forkhead box subfamily O) transkripsiyonel faktörlerinin translokasyon, ubikitinasyon ve degradasyonu ile sonuçlanır (Khatri ve ark, 2010) (Şekil 9). FOXO'lar; apoptozis, hücre döngüsü süreçleri ve antioksidan yanıtlarını içeren çok çeşitli hücresel prosesler için önem taşıyan genlerin ekspresyonunu kontrol ederler (Cairns ve ark, 2011). Aktive AKT1 ayrıca

ektonükleozid trifosfat difosfohidrolaz 5 (ENTPD5)'in ekspresyonunu artırır. ENTPD5, uridin 5' difosfatın (UDP) endoplazmik retikulumda (ER) proteinlerin N-glikolizasyonunu stimüle eden uridin 5' monofosfata (UMP) dönüşümünü katalizler. ENTPD5 bir inhibitör enerji seviyesine ulaşarak intrasellüler enerji üretimini engelleyen ATP hidroliz döngüsü oluşturmak için adenilaz kinaz-1 ve sitidin monofosfat (CMP) ile uyum içinde çalışır (Fang ve ark, 2010). İlginç bir şekilde, ENTPD5'in artan ekspresyonu, PFK aktivasyonunu koruyarak AMP/ATP oranını artırır ve bu sayede Warburg etkisine hizmet eder. PFK sırayla glikolizisi çalıştırır ve özellikle upregüle olan reseptörlerin glikolizasyonunu düzenler. Aynı zamanda, glukoz alımının artması sonucu alınan bu glukoz, büyüme faktör reseptörlerinin posttranslasyonel modifikasyonu için kullanılan heksozamin şekerler ve UDP-glukozun üretimi gibi diğer glukoz kullanım yollarına kanallanır (Cairns ve ark, 2011).

MYC onkogenleri, kanserlerde metabolik fenotipin önemli bir transkripsiyonel regülatörüdür. Yapılan bir çalışmada, MYC aşırı ekspresyonunun, insan meme kanserinde yüksek Floro-D-Glukoz (FDG) alımı ile en fazla ilişkili moleküler değişiklik olduğu bulunmuştur. MYC; HK2, ENO 1, LDH-A, PFK-M, GAPDH ve TPI gibi birçok anahtar glikolitik enzimin gen ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücrelerinde Warburg etkisine katkıda bulunur (Kim ve ark, 2004). İnsan B hücre modelinde MYC aktivasyonunun, mitokondriyal biyogenez ile de ilişkili olduğu ve mitokondriyal DNA'da mutasyonlara neden olabilecek hücre içi ROS seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Li ve ark, 2005; Kim ve Dang, 2006).

En iyi DNA hasar cevabı ve apoptozdaki rolü ile bilinen tümör baskılayıcı p53, metabolizmayı düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. p53, bir fruktoz-2,6-bisfosfataz olan TP53 kaynaklı glikoliz ve apoptoz düzenleyicisinin (TIGAR) ekspresyonunu yükselterek glikolizi baskılar. Ek olarak, p53, elektron taşıma zinciri sitokrom c oksidaz (COX) kompleksinin kurulması için gerekli olan bir bakır taşıyıcısı sitokrom c oksidaz-2 (SCO2) sentezinin ekspresyonunu artırarak OXPHOS'u destekler (Şekil 9). Bu nedenle, tümör hücrelerinde p53 ekspresyonunun kaybı, eş zamanlı olarak glikoliz yoluyla akışı artırarak ve OXPHOS'u azaltarak Warburg etkisini kolaylaştırabilir (Bensinger ve Christofk, 2012). Oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1 (OCT1) (POU2F1 olarak da bilinir) de, ekspresyonu bazı insan kanserlerinde artış gösteren bir transkripsiyon faktörüdür ve oksidatif ve glikolitik metabolizma arasındaki dengeyi düzenleyen p53 ile işbirliği yapabilir. Nakavt farelerinin ve insan kanser hücre hatlarının çalışmalarından elde edilen veriler, OCT1'in glukoz metabolizmasını arttıran ve mitokondriyal solunumu azaltan bir genler grubunu düzenlediğini göstermiştir (Cairns ve ark, 2011) (Şekil 9).



Şekil 9. Onkogenik ve tümör baskılayıcı yolların Warburg Etkisi'ne katkısı (Cairns ve ark, 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

2.10. Kanser Teşhis ve Prognozunda Warburg Etkisinin Kullanılması

FDG-PET (2-deoksi-2- [18F] Floro-D-Glukoz Pozitron Emisyon Tomografisi), kanser hücrelerinin yüksek glukoz kullanımından yararlanan bir moleküler görüntüleme tekniğidir. FDG, glukozu benzer şekilde glukoz taşıyıcıları GLUT1 ve GLUT3 yoluyla kanser hücrelerine girer ve daha sonra HK ile FDG-6-fosfata fosforile edilir. G6P, pentoz fosfat yolunda 6-fosfoglukonolaktone oksidasyon veya glikolitik yoldaki F6P'a izomerizasyona tabi tutulurken, FDG-6-fosfat, C-2 konumunda bir oksijen atomunun bulunmamasından dolayı daha fazla katabolize edilemez. FDG-6-fosfat hücrelerden difüze edilememektedir ve defosforilasyon hızı yavaşça gerçekleşmektedir; bu nedenle, tuzağa düşürülür ve glukoz kullanımına orantılı bir oranda birikim gösterir. FDG alımı hem glukoz taşıyıcısı ekspresyonu hem de HK aktivitesine bağlıdır ve hücrelerde glukoz alım oranlarını değerlendirmek için

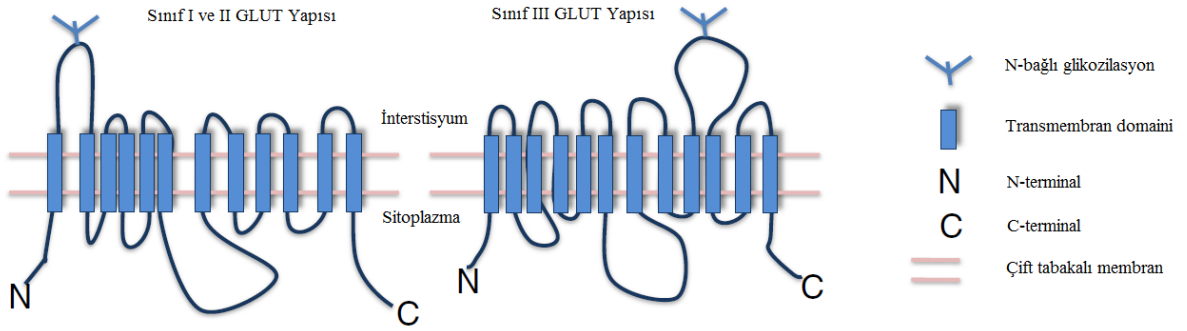
olanak sağlar. Çevre dokulardan daha fazla glukoz alan tümörler FDG- kanser hastalarında PET ile non-invazif bir şekilde görüntülenebilir (Bensinger ve Christofk, 2012).

FDG-PET, 1980'lerden beri kanser hastalarında kullanılmaktadır ve şu anda onkoloji alanında kullanımı oldukça yaygındır. Çok sayıda tümör tipinde FDG-PET'in kullanımı; Warburg etkisine, bunun regülasyonu ve tümör biyolojisindeki rolüne ilgi gösterilmesine yol açmıştır (Bensinger ve Christofk, 2012).

2.11. Glukoz Taşıyıcıları

Glukoz geniş bir metabolik ara ürün yelpazesi için bir öncü olarak hizmet eder ve çeşitli hücresel yollarda bir sinyal molekülü olarak işlev görür. Glukozun çok yönlü biyolojik işlevini yerine getirmesi için hücreye girmesi ön koşuldur. Yüksek derecede suda çözünebilir bu heksoz, hidrofobik lipid çift tabakasını geçmenin yollarını bulmak zorundadır (Yan, 2017). Plazma membranından glukoz alımı glukoz metabolizması için hız sınırlayıcı olarak kabul edilir (Barron ve ark, 2016). Glukozun hücreye taşınmasına aracılık eden membran ilişkili taşıyıcıların iki ailesi bulunur. Bunlar; kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcı proteinler ve sodyum bağlı glukoz ko-transporter (SGLT) proteinleridir (Karim ve ark, 2012; Barron ve ark, 2016). Glukoz taşımak için enerji gerektiren SGLT proteinlerinden farklı olarak GLUT'lar şekerleri bir konsantrasyon gradientine göre taşırlar (Barron ve ark, 2016).

GLUT'lar yaklaşık 500 aminoasitlik proteinlerdir ve 12 transmembran yayılımlı α -helikslere ve tek bir N-bağlı oligosakkarite sahip oldukları bilinir (Szablewski, 2013). GLUT'lar uzun ekstrasellüler loop pozisyonunda farklılık gösteren 3 gruba ayrılabilirler. Sınıf I ve II proteinlerinde N-bağlı bir glikozilasyon bölgesi içeren bu loop, transmembran alanları 1 ve 2 arasında bulunurken sınıf III proteinlerinde 9 ve 10 alanları arasındadır (Joost ve ark, 2001; Barron ve ark, 2016) (Şekil 10). Sınıf I'de GLUT 1/2/3/4/14, sınıf II'de GLUT5/7/9/11 ve sınıf III'de GLUT6/8/10/12/13 olmak üzere insanlarda farklı substrat spesifiklikleri ve doku ekspresyonları gösteren 14 tane GLUT proteini tanımlanmıştır. Bu proteinler glukozun yanı sıra fruktoz, galaktoz, mannoz, glukozamin, ksiloz, dihidroksiaskorbik asit, ürat ve değişken afinitelere sahip miyoinositol gibi molekülleri de taşırlar (Barron ve ark, 2016).



Şekil 10. Farklı sınıf (I, II ve III) GLUT'ların iki boyutlu modelleri (Barron ve ark, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

GLUT1 (insan SLC2A1:1p34.2) balık, tavuk, inek, sıçan, fare arasında %74-98 sekans özdeşliği gösteren yüksek oranda korunmuş bir izoformdur (Zhao ve Keating, 2007). Bu taşıyıcı, glukozu karşı yüksek bir afiniteye sahiptir (K_m :3 mmol/L) ve ayrıca galaktoz, mannoz, glukozamin, DHA'yı da taşıyabilir (Barron ve ark, 2016). GLUT1 bazal glukoz alımından sorumludur ve normal koşullarda tüm dokularda eksprese edilir. Total membran proteininin %3-5'ini oluşturan eritrositlerdeki yüksek ekspresyonundan dolayı "eritrosit tipi Glukoz Taşıyıcı" olarak adlandırılır (Zhao ve Keating, 2007). Beyin, göz, periferik sinir, plesanta ve emziren meme bezindeki kan doku bariyerlerindeki endotel ve epitelyal hücrelerde de GLUT1'in yüksek seviyeleri bulunabilir (Takata ve ark, 1990; Joost ve ark, 2001; Zhao ve Keating, 2007).

GLUT1 ve GLUT3 farklı tipteki solid tümörlerde Warburg etkisine bağlı olarak önemli ölçüde arttırılan glukoz talebi sonucu aşırı eksprese edilir (Yan, 2017). Özellikle GLUT1 insanlarda en yaygın glukoz taşıyıcısıdır ve hepatik, pankreas, göğüs, yemek borusu, beyin, böbrek, akciğer, deri, kolorektal, endometriyal, yumurtalık ve servikal kanserler dahil olmak üzere birçok tümörde aşırı eksprese olduğu gözlenmiştir (Medina ve Owen, 2002). Artan GLUT mRNA'sı ve GLUT miktarı seviyeleri çeşitli orijinli insan kanser hücrelerinin ekstraktlarında bulunmuştur ve GLUT1 ekspresyon seviyesinin hipoksi ile glukoz metabolizmasının uygun bir belirteci olabileceği tespit edilmiştir (Yamamoto ve ark, 1990; Brown ve Wahl, 1993).

GLUT1 geni transkripsiyonunun HIF-1, c-MYC, ve serin/treonin kinaz Akt (PKB) ile kontrol altında olduğu gösterilmiştir (Herling ve ark, 2011). HIF-1'in glukoz taşıyıcılarını kodlayan bir dizi genin ve glikolitik enzimlerin transkripsiyonunu aktive ederek Warburg

etkisine katkıda bulunduğu ve kanser metabolizmasının yeniden programlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Chen ve Russo, 2012). Bazı çalışmalar hipoksinin HIF-1 α yoluyla yüksek bir GLUT-1 ekspresyon seviyesini indüklediğini göstermiştir (Hayashi ve ark, 2004; Mobasher ve ark, 2005; Baumann ve ark, 2007; Ren ve ark, 2008). Ren ve arkadaşları, hipoksinin kondrositlerde HIF-1 α yoluyla GLUT-1 ve GLUT-3 ekspresyon düzeylerini arttırdığını belirlemiştir (Ren ve ark, 2008). Benzer şekilde BeWo korikarsinoma hücrelerinde ve trofoblast kaynaklı hücrelerde GLUT-1 ekspresyonunun indüksiyonunun HIF-1 α yoluyla olduğu bulunmuştur (Hayashi ve ark, 2004; Baumann ve ark, 2007). Son zamanlarda, GLUT1 ve HIF-1'in artan ekspresyonunun akut miyeloid lösemide kemoterapiye dirençle ilişkili olduğu ve her iki genin downregülasyonunun iyileşme yanıtıyla korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Song ve ark, 2014).

2.12. Glikolizin Kontrolünde Rol Oynayan Bazı Metabolik Enzimler

2.12.1. Hekzokinaz-2 (HK2)

Hekzokinaz, glukozun ATP'den fosfat transferi yoluyla G6P'a fosforile edildiği glikolitik yolun esas olarak geri döndürülemez ilk adımını katalizleyen bir enzimdir (Mathupala ve ark, 2009). Oluşan ürün G6P, şekerin glikolitik yola, PPP'a veya glikojen sentezine girişi için bir başlangıç noktasıdır (Gill ve ark, 2016). HKII (HK2), glukoz alımı ve hücrel metabolizma içindeki bu ilk kararlı adımı katalizleyerek glukozun metabolik akışını, nihayetinde hücrel metabolizma ile büyümeyi başlatır ve kontrol eder (Ho ve Choomber, 2016). HKI, HKII, HKIII ve HKIV veya A, B,C ve D olarak adlandırılan 4 önemli memeli HK izoenzimi vardır. Subsellüler lokasyonlarda ve kinetiklerde farklı substratlar ve koşullara, fizyolojik fonksiyonlara göre değişiklik gösterirler (Chen ve Russo, 2012; Gill ve ark, 2016). HKI, hemen hemen tüm memeli dokularında bulunur ve çoğu fizyolojik, hormonal ve metabolik değişikliklerden etkilenmeyen "temizlik enzimi" olarak kabul edilir (Chen ve Russo, 2012; Wang ve ark, 2014). HKII adipoz, iskelet ve kalp kasları gibi insüline duyarlı dokularda eksprese edilirken, HKIII bu dokularda genellikle daha düşük seviyede eksprese edilir ve HKIV ekspresyonu ise pankreas ve karaciğer ile sınırlıdır (Wang ve ark, 2014). Memeli HKIV (ayrıca glukokinaz olarak da bilinir), kinetik ve fonksiyonel olarak diğer HK'lardan farklıdır. HKIV, eğer bir substratın konsantrasyonu yeterince yüksek ise glukozu

öncelikle fosforile edebilir çünkü glukoz için Km değeri diğer üç HK'dan 100 kat daha fazladır (Chen ve Russo, 2012).

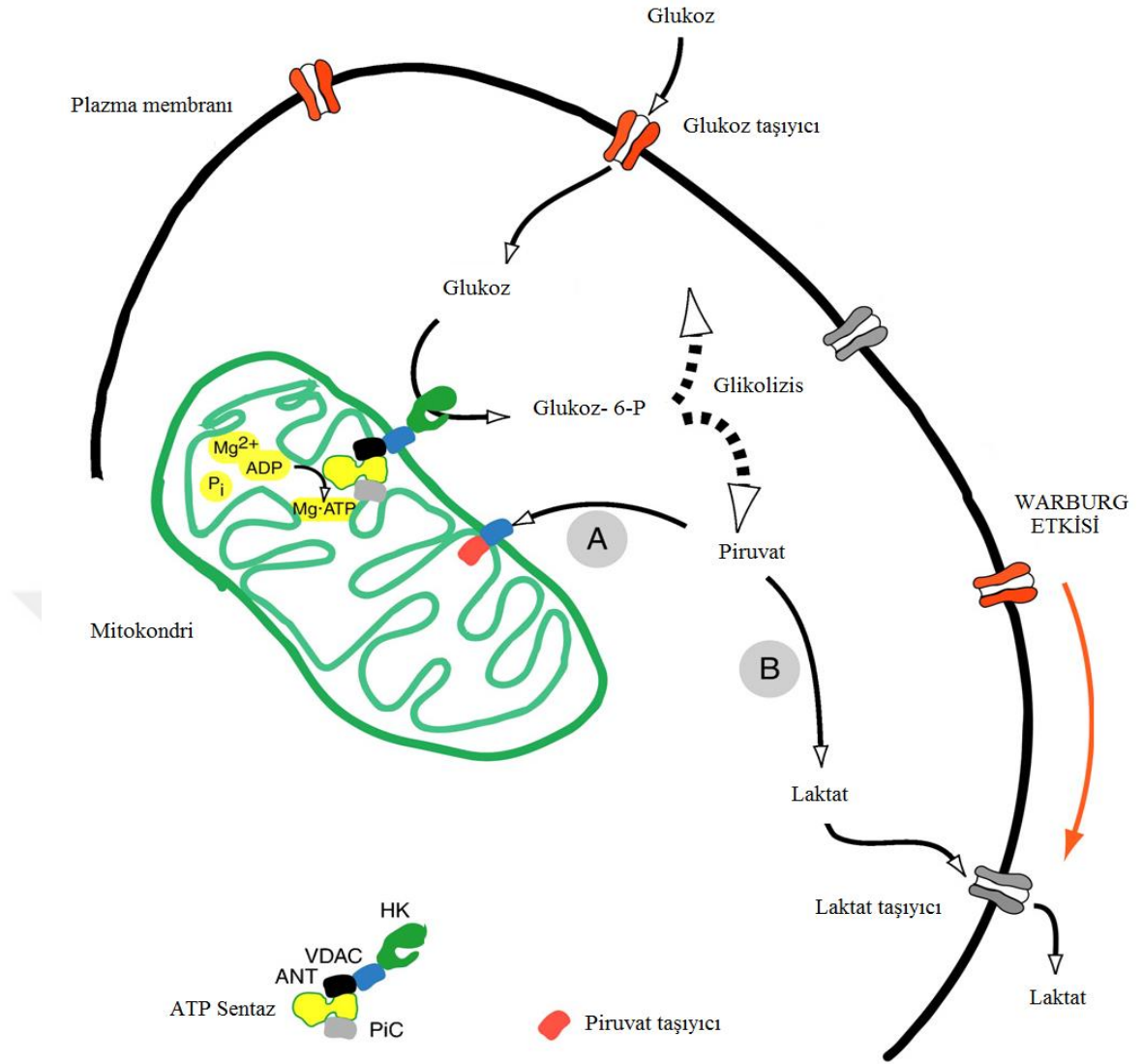
HK'lar arasında HKII, tümör hücrelerinde mitokondriyal dış zara bağlı bulunan en baskın izoformdur (Mathupula ve ark, 2009; Chen ve Russo, 2012). Bu enzimin konumu, onun glukozu fosforile etmek için yeni sentezlenmiş ATP'ye erişimini ve ürün inhibisyonuna direnç göstermesini sağlar (Mathupula ve ark, 2009). Ayrıca onun enzimatik ürünü G6P, sadece glikolizise bir prekürsör olarak hizmet etmekle kalmaz aynı zamanda ATP üretimi, nükleik asit, yağ asidi biyosentezi ve NADPH üretimine yol açan diğer önemli biyolojik yolları da besler (Ho ve Choomber, 2016).

HK II, birçok kanser türünün sergilediği Warburg fenotipinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Gill ve ark, 2016). Bazı tümör dokularında HK II'nin aşırı ekspresyonu görülmekte ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Wang ve ark, 2014, Gill ve ark, 2016). HKII'nin yumurtalık, karaciğer, kolon gibi birçok kanser hücresinde ileri ekspresyonu bildirilmiştir (Thamrongwarangoon ve ark, 2018). HKII; meme kanseri, akciğer karsinoması, hepatoselüler karsinom, mide kanseri gibi çeşitli kanserlerde yüksek oranda eksprese edilir ve hızla büyüyen tümörlerin yüksek glikoliz oranlarını koruyarak tümör büyümesini desteklemeye yardımcı olur (Liu ve ark, 2018). Yapılan çalışmalar, hekzokinazların sadece glikolize değil aynı zamanda kanser hücrelerinin çoğalmasına ve metastazına da katkıda bulunduğunu göstermiştir (Zhang ve ark, 2016).

Kanser hücrelerinde veya solid tümörlerde oksijene sınırlı erişimin olduğu koşullar altında, HKII mRNA ve protein seviyesi önemli ölçüde artar (Nowak ve ark, 2018). Bazı durumlarda, HKII ekspresyonu 10 kat artış gösterir. Bu, daha sonra glikolitik yol kullanımının artışına ve ardından GLUT1 tarafından artan glukoz alımına neden olur (Yasuda ve ark, 2004; Natsuzaka ve ark, 2007). Oksijen yoksunluğunun, HKII'yi transaktive etmek amacıyla c-Myc'ye bağlanan HIF-1'in aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Nowak ve ark, 2018). Glikolitik ve PPP yollarıyla hücrel büyüme ve çoğalmayı desteklemesinin yanı sıra artan HK-mitokondriyal etkileşimlerinin, apoptozis ile ilgili sinyal olaylarının modülasyonu yoluyla kanser sağkalımını arttırmada da çok önemli olduğu bilinmektedir (Mathupula ve ark, 2009). HK II'ler fosforile glukozun yeni sentezlenen ATP'ye ulaşımını kolaylaştırmak adına dış mitokondriyal membranda bulunan voltaj bağlı anyon kanallarına (VDAC) bağlanabilmektedir (Lincet ve Icard, 2015). Plazma zarına glukoz taşıyıcıları tarafından getirilen glukoz, dış mitokondriyal zar üzerinde bulunan VDAC'a bağlı HKII ile hızla fosforile edilir. VDAC, ATP'nin VDAC'ye bağlı HKII'ye doğrudan erişimini kolaylaştırarak, iç mitokondri zarında ATP Sentazom kompleksi (ATP sentaz; adenin nükleotit translokator,

ANT; inorganik fosfat taşıyıcı, PiC) tarafından oluşturulan ATP kanallarına bağlanır (Mathupala ve ark, 2009). Bu VDAC-HK etkileşimi ile tümör hücrelerinin yeterli glukoza saptamasını sağlamak adına G6P'nın negatif feedback inhibisyonu önlenir (Gill ve ark, 2016) (Şekil 11). Akt, mitokondriyal HKII ilişkisini uyarırken reaksiyon ürünü G6P'nın yüksek hücresel konsantrasyonları enzimin VDAC'tan ayrılmasıyla sonuçlanan konformasyonel bir değişikliğe neden olur (Herling ve ark, 2011). Dahası, HKII'nin VDAC'ye bağlanmasının pro-apoptotik protein BAX'ın dış mitokondriyal membrana taşınmasını engelleyerek anti-apoptotik bir durum sergilediği düşünülmektedir. Bu durum, mitokondriyal geçirgen gözeneklerin oluşumunu ve dolayısıyla hücre yıkımına yol açan proteolitik kaskadın aktivasyonunda bir başlangıç olayı olan sitokrom c ve apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1 (APAF-1)'in mitokondriyal salınımını önler (Herling ve ark, 2011, Ho ve Choomber, 2016).

Kanser hücrelerinde artan HKII ekspresyonu, HKI'den HKII'ye spesifik bir kaymaya neden olur, bu da apoptozdan koruma sağlayarak büyük bir metabolik avantaj sağlar (Porporato ve ark, 2011). Kanser hücrelerinde dış mitokondriyal membrana bağlanan HKII miktarı önemli ölçüde artar (Nowak ve ark, 2018). HKII'nin VDAC ile ilişkisi glukoz alımına da bağlıdır (Lincet ve Icard, 2015). Glukoz yoksunluğu, apoptojenik moleküllerin salınması yoluyla apoptozise yön veren mitokondriyal membran potansiyelini değiştirici dış mitokondriyal membrandaki VDAC-HKII etkileşimini önleyebilmektedir (Lincet ve Icard, 2015).



Şekil 11. Glikolitik akışın yüksek olduğu tümör hücresi içinde glukozun metabolik olarak izlediği yol (Mathupula ve ark, 2009'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.12.2. Fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) ve 6-fosfofrukto-2-kinaz (PFK-2) /fruktoz-2,6 bifosfataz

6-fosfofrukto-1-kinaz (PFK1), bir fosforil donorü olarak MgATP kullanarak F6P'ın F1,6BP'a fosforilasyonunu katalizler (Chen ve Russo, 2012). Bu glikolitik yolakta ikinci tersinmez reaksiyondur ve önemli bir glikolizis kontrol noktasıdır (Lincet ve Icard, 2015). PFK'ın glikolizdeki geri dönüşümsüz niteliği ve aktivitesi, pH'nın küçük değişimlerine karşı

aşırı duyarlılığı ve pH düştükçe aktivitesinin düşüyor olması glikolizis için düzenleyici anahtar bir enzim olduğunu düşündürmüştür (Gill ve ark, 2011).

Bu enzimin aktivitesi glikolizis hızını önemli ölçüde değiştiren çok sayıda allosterik regülatöre tabidir (Herling ve ark, 2011). PFK'ların aktivitesi ATP seviyeleri hücrede yüksek seyrettiğinde ATP'nin kendisi tarafından allosterik olarak inhibe edilir. ACLY enzimi sitozolde sitratı asetil-KoA'ya dönüştürür. Hücre sitrik asit döngüsünden yeterli enerjiyi alabilir ve bu döngüye karbon sağlamak için glikolizise bağlı değildir, bu nedenle de sitratın yüksek intrasellüler seviyeleri ile de PFK aktivitesi inhibe edilir (Gill ve ark, 2011). Anaerobik glikolizis ile piruvatın indirgenmesi sonucu meydana gelen laktat birikimi de doğrudan PFK inhibisyonunu sağlar (Costa ve ark, 2007; Hasawi ve ark, 2014). Hem sitrat hem de laktat ATP'nin PFK üzerindeki inhibitör etkisini artırır (Costa ve ark, 2007; Marinho-Carvalho ve ark, 2009).

Allosterik aktivasyon esas olarak F2,6BP ile uygulanır (Clem ve ark, 2008). F2,6BP; F6P'yi F1,6BP'ye dönüştüren PFK'ın stimülasyonu ile glikolizisteki karbon akışını kontrol eden güçlü bir allosterik regülatördür (Chen ve Russo, 2012). F2,6BP; ATP varlığında bile PFK-1 aktivitesini indükler, bu durum pek çok tümörde F2,6BP'nin PFK-1'in upregülasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Lincet ve Icard, 2015). Deneysel olarak F2,6BP; F1,6BP substratının Km değerinde bir azalma ile PFK'yı aktive eder (Coelho ve ark, 2007; Costa ve ark, 2007). F2,6BP'nin sentezi ve degradasyonu, hem kinaz hem de fosfataz aktivitesi gösteren 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bifosfataz (PFK-2/F-2,6-BPaz) (PFKFB)'a bağlıdır. Bu iki işlevli enzim, hücre içi cAMP düzeylerine bağlı olan fosforilasyon ve defosforilasyon ile düzenlenir. Dahası, PFKFB sentezi çoklu fizyolojik ve patolojik koşullar altında glikolitik oranı ayarlamadaki rolü ile ilişkili olarak mitojenler, büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenebilir (Chen ve Russo, 2012). 4 memeli PFKFB izoenzimi (PFKFB 1-4) vardır (Lincet ve Icard, 2015). PFKFB3 izoenzimi en yüksek kinaz/ fosfataz aktivite oranına (740/1) sahiptir ve böylece yüksek glikolitik oranları devam ettiren artan F2,6BP seviyelerine yol açar. F2,6BPaz overekspresyonu glikolizisi bloke ederek F2,6BP'nin hızında bir azalmayı indükler (Lincet ve Icard, 2015).

F2,6BP ekspresyonu bir dizi agresif kanserde yüksektir (örneğin meme, kolon ve yumurtalık) ve hücre kültürü çalışılan insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde hipoksi ile indüklendiği görülmüştür (Lincet ve Icard, 2015). Mitojenik, inflamatuvar ve hipoksik uyarılarla aktive edilebilen PFKFB3 izoenzimi, çoğalan normal dokularda (örneğin timüs) ve birçok kanser hücresinde yüksek oranda eksprese edilir ve artan PFK-2: FBPaz aktivite oranı nedeniyle glikolizisi destekler (Okar ve ark, 2001; Rider ve ark, 2004; Houddane ve ark,

2017). Çoğalan hücrelerde F2,6BP konsantrasyonları, PFK-1'i uyarmak için gerekenden 50-100 kat daha yüksek seviyelere ulaşabilir. HeLa hücrelerinde PFKFB3 susuturulmasının glikolizisi azalttığı ve hücre döngüsü durdurulmasını indüklediği ve endotelial hücrelerin damar dallanmasını inhibe ettiği bulunmuştur; bu da F2,6BP /glikoliz ve hücre proliferasyonu arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Houddane ve ark, 2017).

PFK1 enzimi, kinetik özellikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilen çeşitli homo- ve heterotetramerik izoenzimleri üretmek adına rastgele tetramerizasyona maruz kalan üç izoformdan meydana gelir ve bunlar ana ekspresyon bölgesine göre adlandırılırlar: PFKM (başlıca iskelet kasında eksprese edilir), PFKL (akciğerde), ve PFKP (trombositlerde). (Wang ve ark, 2013; Ausina ve ark, 2018). Aminoasit sekanslarında yüksek homoloji göstermelerine rağmen (>%65), bu enzimler farklı kromozomlardaki ayrı ayrı genler tarafından kodlanır ve her bir izoform için allosterik düzenleyici bölgelerinde farklılıklar mevcuttur. (Sola-Penna ve ark, 2010; Ausina ve ark, 2018).

PFK1 izoformlarının farklı ekspresyonu hücre fizyolojisini ve fonksiyonunu doğrudan etkiler. Örneğin glikolitik verim, yani tüketilen glukoz başına üretilen laktat arasındaki oran mevcut PFK1 izoformlarının bulunma olasılığına göre değişir. (Zancan ve ark, 2010; Ausina ve ark, 2018). Zancan ve arkadaşları, PFK-1 izoenzim modellerinde, tümörjenik ve tümörjenik olmayan meme hücrelerinin mRNA seviyeleri arasındaki farkları bildirmişlerdir. Örneğin PFK-L ekspresyonunun, bu hücre hatlarında agresiflik ve glikolitik verimlilik ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Zancan ve ark, 2010; Wang ve ark, 2013). İnsan meme kanseri dokusunda PFK-1 aktivitesinin değişen hücresel dağılımı, glikolitik akıdaki bir artışla ilişkili olabilir ki, bu da karsinogenez ve tümör ilerlemesi süreci ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır. (El-Bacha ve ark, 2003; Wang ve ark, 2013).

2.12.3. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)

Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), aynı zamanda oksidoredüktazlar olarak da bilinen dehidrogenaz enzim ailesinin bir üyesidir. Bir "housekeeping" proteini olarak GAPDH, hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunur; ayrıca yapısında duyarlı sistein kalıntıları vardır, bu nedenle bu enzim, ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) ilk hedeflerinden biridir ve çok sayıda oksidatif modifikasyona tabidir (Hildebrandt ve ark, 2015; Gerszon ve Rodacka, 2018). Hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde toplam hücresel içeriğin % 10-20'sini oluşturan çok yüksek konsantrasyonlarda meydana gelir. En yüksek

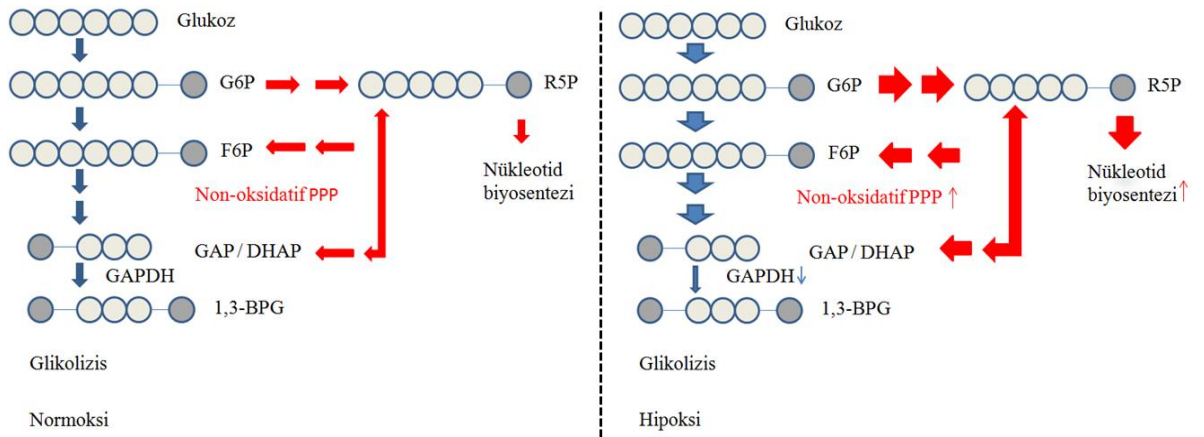
enzim ekspresyonu seviyesi, kas ve beyin gibi aşırı glikoliz oranına sahip dokulardadır (Gerszon ve Rodacka, 2018).

Sitoplazmada GAPDH, her biri tek bir katalitik tiyol grubuna sahip olan dört özdeş 37 kDa alt biriminden oluşan bir tetramerik izoform olarak bulunur. GAPDH, NAD^+ ve inorganik fosfat varlığında gliseraldehid-3-fosfat D-gliseratı 1,3 BP'a dönüştürür ve NADH ile ATP oluşumuna aracılık eder (Gerszon ve Rodacka, 2018). İnsan monositlerinde GAPDH, anaerobik solunumdan PPP'a metabolik bir geçişi kolaylaştırır. GAPDH, membran füzyonundan sitoskeletal bileşenlerle etkileşime girmeye, redoks algılama, hücre ölümü, otofaji, demir homeostazisi, DNA replikasyonu ve onarımı, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve viral enfeksiyon gibi birçok diğer hücresel süreçte de kilit rol oynar ve buna paralel olarak sitoplazma, mitokondri, plazma zarı ve nükleus da dahil olmak üzere çoklu hücresel kompartmanlarda lokalizedir (Garcin, 2019). Çeşitli fonksiyonları GAPDH'in spesifik hücre içi lokalizasyonları ile de ilişkilidir (Tristan ve ark, 2011; Cerella ve ark, 2014). Bu çoklu görev potansiyeli etkinlik alanlarının fazlalığı ve konformasyonel değişikliklerin varlığına dayanır. Ayrıca GAPDH üzerindeki post-translasyonel modifikasyonlar, subsellüler dağılımının ve çeşitli nükleik asitlerin yanı sıra sitoskeletal ve transkripsiyon komplekslerinin bileşenleri gibi heterojen hücresel partnerlerle etkileşimlerinin dinamiklerini belirler (Cerella ve ark, 2014, Tristan ve ark, 2011). Aktivitesi, özellikle katalitik bölgesinde lokalize olan kritik bir sistein kalıntısının varlığına bağlı olarak hücresel redoks durumu değişikliklerinden etkilenir (Cerella ve ark, 2014).

Hipoksik ortam, GAPDH ekspresyon seviyelerinde değişikliklere neden olur. Endotel hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, hipoksi stresinde GAPDH gen ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Graven ve ark, 1994). Yapılan çalışmalarda, hipoksik durumda GAPDH mRNA seviyesinin yaklaşık olarak %75 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir; GAPDH aşırı ekspresyonu, HIF-1 α protein seviyelerinin de upregülasyonu ile ilişkilidir (Zhong ve Simons, 1999; Zhang ve ark, 2015).

GAPDH akışı $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ redoks dengesi ile düzenlenebilir çünkü NAD^+ GAPDH'nin glikolitik reaksiyonu için bir substrattır. Yapılan bir çalışmada dört kanser hücre hattında $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ oranı ölçülmüş ve hipoksi altında bu oranın azaldığı tespit edilmiştir (Ahn ve ark, 2018). Bu gözlem, oksijenin sınırlı olduğu koşullar altında, yetersiz oksidatif fosforilasyon sonucu ortamda NADH birikimi izlenen önceki raporlarla uyumlu bulunmuştur (Santidrian ve ark, 2013). Bu nedenle, hipoksik ortamda değişen redoks durumunun, GAPDH'nin enzimatik aktivitesini, HIF'ler tarafından aktive edilen diğer glikolitik enzimlere nispeten düşürdüğü ve DNA ile RNA'nın biyosentezi için oksidatif olmayan PPP'yi arttıran

üst glikolitik metabolitlerin daha yüksek konsantrasyonlarını koruduğu belirlenmiştir. Hipokside oksidatif PPP'un azalış gösterdiği (glikolitik akışa göre), öte yandan oksidatif olmayan PPP ile daha fazla riboz-5-fosfat (R5P) sağlanarak kanser hücrelerine alternatif enerji kaynağı oluşturulduğu tespit edilmiştir (Ahn ve ark, 2018). GAPDH, PPP aracılı nükleotid biyosentezini ve TCA siklusu ile enerji üretimini dengelemede kritik rol oynamaktadır (Dong ve ark, 2017) (Şekil 12).



Şekil 12. Hipoksik ve normoksik koşullarda GAPDH aracılı glikolitik akı (Dong ve ark, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

GAPDH çeşitli insan kanser hücresi modellerinde ve özellikle meme, prostat, pankreatik ve akciğer kanser hastalarında aşırı eksprese edilir (Cerella ve ark, 2014). Enzimin aşırı ekspresyonu ile zayıf prognoz arasında bir ilişki vardır çünkü en agresif ve/veya geç evre formları çoğu zaman GAPDH dahil olmak üzere glikolitik enzimlerin önemli ölçüde artan seviyelerini gösterir (Puzone ve ark, 2013). GAPDH artan enerji ihtiyacını karşılamaya yanı sıra, kararlı bir sağ kalım faktörü olarak da ortaya çıkmaktadır (Colell ve ark, 2009). GAPDH'in aşırı ekspresyonu hücre ATP seviyesini arttırmak, glikolizi uyarmak ve otofajiyi arttırmak suretiyle kaspaz bağlı hücre ölümünü önler (Roy ve ark, 2017).

Yapılan çalışmalarla GAPDH'in tümör ilerlemesine katkı sağladığını ve yeni bir terapötik hedef olarak görüldüğünü gösterilmekle birlikte sayısız hücresel fonksiyonunun ve düzensiz ekspresyon seviyelerinin ilgili regülasyon mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. GAPDH, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenir. İnsülin, HIF-1, p53, nitrik oksit (NO) ve asetillenmiş histon gibi kansere bağlı

çeşitli faktörler, yalnızca GAPDH gen ekspresyonunu modüle etmekle kalmaz, aynı zamanda ortak yollar aracılığıyla protein fonksiyonlarını etkiler. Ayrıca, kanser hücrelerinde GAPDH'de meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar, GAPDH'nin orijinal glikolitik fonksiyonu ile ilgili olmayan yeni faaliyetlerle de sonuçlanır (Zhang ve ark, 2015).

2.12.4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)

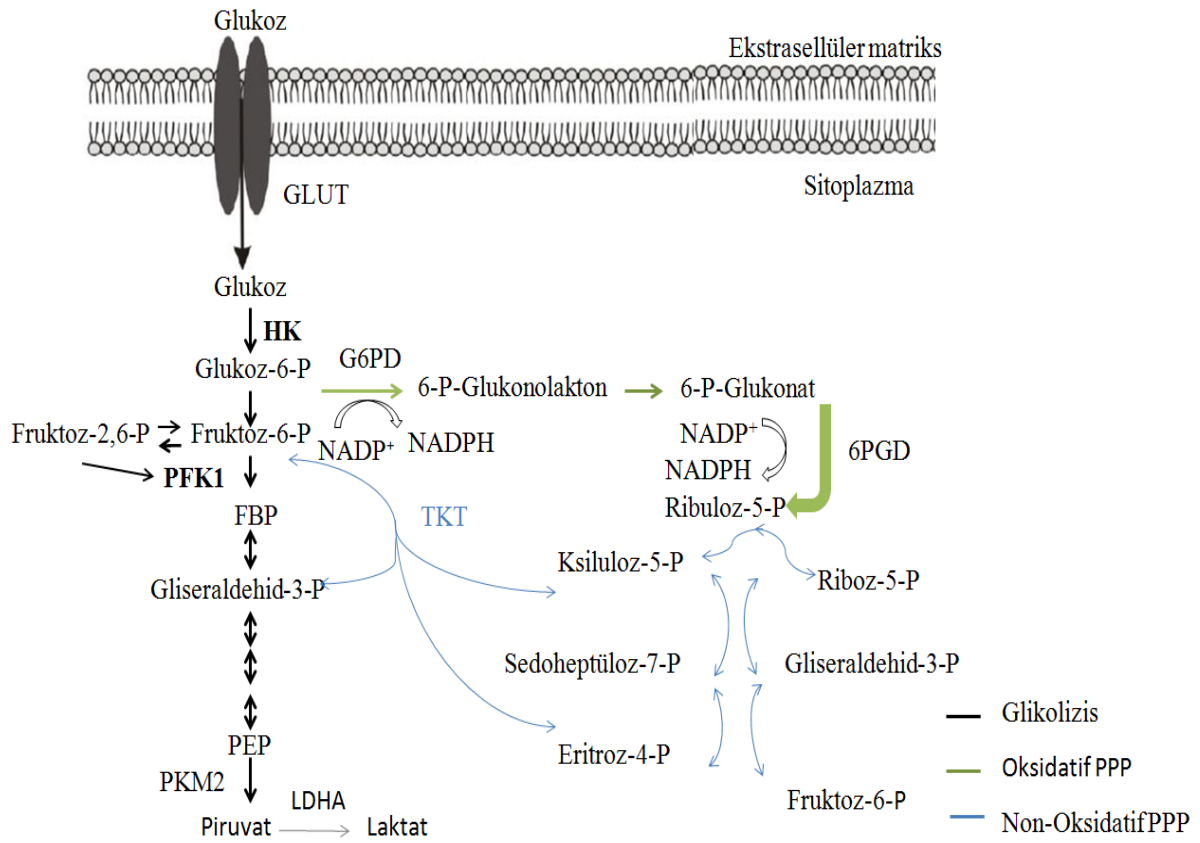
Glukoz, çok hücreli organizmalar için ortak bir yakıttır, hücrelere bir GLUT vasıtasıyla girer ve daha sonra G6P oluşturmak üzere HK ile fosforillenir. G6P daha sonra F6P'a izomerleştirilir ve çeşitli glikolitik enzimler tarafından piruvat haline getirilmek üzere glikoliz yoluyla metabolize edilir, bu da ATP ve diğer esansiyel metabolitlerin üretilmesini sağlar. G6P ayrıca PPP'nin oksidatif dalında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile dehidrojenize edilebilir. Bu reaksiyon fizyolojik koşullar altında geri döndürülemez ve hız sınırlayıcıdır (Jiang ve ark, 2014).

Ayrıca fosfoglukonat yolu veya heksoz monofosfat şantı olarak da bilinen PPP, glukoz metabolizmasının ilk dallanmış adımı olarak glikolizden ayrılır (Kowalik ve ark, 2017). PPP, oksidatif ve oksidatif olmayan yollar içerir. G6PD oksidatif dalda bir kontrol bölgesi olarak işlev gören ilk ve hız sınırlayan enzim iken transketolaz (TKT) ve transaldolaz oksidatif olmayan daldaki iki anahtar enzimdir (Wood, 1986; Kletzien ve ark, 1994; Stanton, 2012). Oksidatif faz da, G6P, G6PD ile 6-fosfoglukano- δ -laktona dönüştürülür. 6-fosfoglukano- δ -lakton, 6-fosfoglukonatın oluşumu için hidrolizlenir; bu daha sonra, beş-karbonlu moleküler ribüloz 5-fosfat (Ru5P)'ı oluşturacak şekilde 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ile oksidatif olarak dekarboksile edilir (Jiang ve ark, 2014) (Şekil 13). Ru5P'den R5P üretimi ve fosforibozil pirofosfata dönüşümü, ribonükleotitlerin sentezi için omurga sağlar (DeBerardinis ve ark, 2008; Patra ve Hay, 2014; Kowalik ve ark, 2017). PPP'nin oksidatif olmayan kolunda ise, F6P ve G3P gibi başka metabolitleri de üreten bir dizi geri dönüşümlü reaksiyon ile ribonükleotit sentezi için pentoz fosfatlar üretilir (Kowalik ve ark, 2017). (Şekil 2.13) PPP dalı ve bu yoldaki enzimlerin allosterik düzenlenmesi, PPP'nin farklı modlarda çalışan hücrelerin metabolik taleplerine adapte olmasını sağlar (Patra ve Hay, 2014).

Hücrelerde G6PD, hem monomerik hem de dimerik formlarda bulunur. Dimerik G6PD aktif formdur, fakat monomerik formu az miktarda katalitik aktiviteye sahiptir veya hiç aktivitesi yoktur. G6PD'nin, fizyolojik koşullar altında sitozolde monomer-dimer durumu dengededir. G6PD aktivitesinin regülasyonunun, monomer-dimer dengesi değiştirilerek

sağlanabileceği varsayılmıştır. Yapılan bir çalışma, tümör baskılayıcı protein p53'ün de doğrudan G6PD'ye bağlanarak ve dimerizasyonunu önleyerek G6PD aktivitesini kontrol ettiğini ortaya koymuştur (Jiang ve ark, 2014).

Kanser hücreleri için özellikle PPP kritiktir, çünkü nükleik asit sentezini arttırmak için sadece pentoz fosfatlar üretmekle kalmaz, aynı zamanda stres koşullarında hem yağ asitlerinin sentezi hem de hücrenin hayatta kalması için gerekli olan NADPH'yi sağlar (Patra ve Hay, 2014). G6PD, PPP'nin ilk geri dönüşümsüz reaksiyonunu katalizleyerek indirgeyici ajan NADPH'yi de üretir. NADPH hem indirgeyici biyosentezde hem de hücrelerin makro moleküllere zarar veren ve sonuçta hücre ölümüne neden olan ROS'tan korunmasında, hayati bir rol oynar. NADPH'nin hücreSEL ROS'u temizlemedeki kritik işlevi nedeniyle, G6PD antioksidan savunmasında önem taşır; gerçekten de G6PD eksikliği olan hücreler genellikle oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Bu enzim PPP'deki oranı sınırlayan enzim olduğundan ve bu yolun bir "kapı bekçisi" olarak işlev gördüğünden, G6PD'nin aktivitesi doğrudan oksidatif PPP'nin akışını yansıtır ve glikoliz ile PPP arasında ayrılan akıyı belirler. Bu nedenle de G6PD ekspresyonu ve aktivitesi hücrelerde sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (Jiang ve ark, 2014). Yüksek G6PD aktivitesinin, hem hücre bölünmesi hem de çoğalması için gerekli olan lipidlerin ve DNA'nın biyosentezinde bir artışa yol açması beklenir. Bu nedenle, hızlı çoğalan hücreler veya kanser hücreleri, çoğalma sırasında biyoenerjetik talepleri karşılamak için G6PD'yi aktive ederek genellikle PPP akışını arttıırırlar. Bunun yanında, oksidatif yolağın diğer NADPH-üreten enzimi olan 6PGD, oksidatif PPP akışının ayarlanmasında rol oynayabilir. G6PD'ye benzer şekilde, 6PGD de NADPH ve R5P üretimini modüle ederek hücreSEL indirgeme biyosentezi ve hücre çoğalmasını düzenleyebilir (Jiang ve ark, 2014). Patra ve Hay (2014), yaptıkları bir araştırmadan elde edilen veriler kanser hücrelerinde neoplastik lezyonların PPP akışını doğrudan veya dolaylı olarak modüle ettiğini göstermiştir. G6PD'nin çoğu memeli türünde yüksek oranda korunduğı ve meme ile adrenal bezler, adipoz doku, dalak, akciğer, karaciğer ve nöron hücreleri gibi birçok normal dokuda mevcut olduğu bulunmuştur. Karaciğer ve yağ dokusunda, G6PD aktivitesinin düzenlenmesi, NADPH gereksinimlerindeki değişiklikleri içeren mekanizmalara dayanır; NADPH tüketimindeki bir artışın G6PD seviyelerindeki bir artışa paralel olduğu, tümör hücrelerinde ve neoplastik dokularda G6PD'nin anlamlı bir şekilde upregüle olduğu ortaya koyulmuştur (Kowalik ve ark, 2017).



Şekil 13. PPP ve glikolizin şematik gösterimi (Jiang ve ark, 2014'ten değiştirilerek alınmıştır).

2.12.5. Piruvat Kinaz (PK)

ATP ve piruvat üretmek için PEP'teki yüksek enerjili fosfat grubunun ADP'ye doğrudan transferini katalizleyen PK enzimi, hücre metabolizmasını düzenleyici önemli bir enzimdir (Israelsen ve Vander Heiden, 2015). Bu reaksiyon glikolizisin hız sınırlayıcı ve son basamağıdır (Mazurek, 2011; Li ve ark, 2018). Dört memeli PK izoformu (PKM1, PKM2, PKR, PKL) vardır (Immamura ve Tanaka, 1982). Memeli PK ailesi bu 4 izoformu (L, R, M1 ve M2) kodlayan PKM ve PKLR adında 2 genden meydana gelir. Karaciğer ve eritrositlerde bulunan L ve R izoformları sırasıyla farklı promotörler kullanılarak PKLR geni tarafından kodlanır. M1 ve M2 izoformları ise PKM geninin alternatif ekleme ürünleridir (Iqbal ve ark, 2014).

PK izoformlarının dağılımı dokuya özgü bir şekilde metabolik gereksinimlerine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Iqbal ve ark, 2014). Bir doku birden fazla PK izoformunu eksprese edebilmesine rağmen hücreler genellikle kayda değer derecede sadece bir izoformu eksprese ederler; çoğu yetişkin doku PKM2'yi eksprese ederken, diğer üç izoformun ekspresyonu farklı bazı dokular ve hücre türleri ile sınırlıdır (Israelsen ve Vander Heiden, 2015). PKR kırmızı kan hücrelerine özgü iken PKL esas olarak karaciğerde olmak üzere böbreklerde de az miktarda eksprese edilir (Li ve ark, 2018).

PKM1 ve PKM2 yapılarındaki ekzon 9 veya ekzon 10'un içeriğinde farklılık gösterir. Bu izoformlar önemli dizi benzerliklerine rağmen PKM1 ve PKM2 çok farklı katalitik ve düzenleyici özelliklere sahiptir (Li ve ark, 2018). PKM1 yapısal olarak yüksek katalitik aktiviteye sahip iken, PKM2 enzim aktivitesi, farklı fizyolojik durumlara karşı hücresel adaptasyona izin vermek adına kompleks düzenlemelere maruz kalır (Gui ve ark, 2013). Yapısal olarak aktif PKM1 izoformu, büyük bir ATP kaynağına ihtiyaç duyan kas, beyin, kalp gibi yüksek katabolik talebi olan dokularda bulunur (Iqbal ve ark, 2014). PKM2 izoformu ise embriyonik hücreler ve yetişkin kök hücreler gibi çoğalan hücrelerin yanı sıra adipoz ve akciğer dokularında eksprese edilir (Mazurek 2011; Mukherjee ve ark, 2013). Yüksek nükleojenez oranına sahip hücreler ve dokular M2 izoformunun ekspresyonu ile karakterize edilirler (Iqbal ve ark, 2014).

PKM, tetramerik ve dimerik olmak üzere 2 oligomerik formdan meydana gelmiştir. Memeli PK, dimer-dimer konfigürasyonunda düzenlenmiş özdeş alt birimlerden oluşan tetramerik bir proteindir (Israelsen ve Vander Heiden, 2015). PKM2'nin tetramerik formu PEP'e yüksek bir afiniteye sahiptir ve oldukça aktiftir (Iqbal ve ark, 2014). Oysa dimerik form düşük bir PEP afinitesi ile karakterize edilir ve fizyolojik koşullar altında neredeyse hiç aktif değildir (Mazurek ve ark, 2005). PKM2 proteini normal dokuda tetramer formu ve dimer formu arasında değişkenlik, kanser hücrelerinde ise dimer olarak var olmaya yönelik belirgin bir eğilim gösterir (Yang ve ark, 2016).

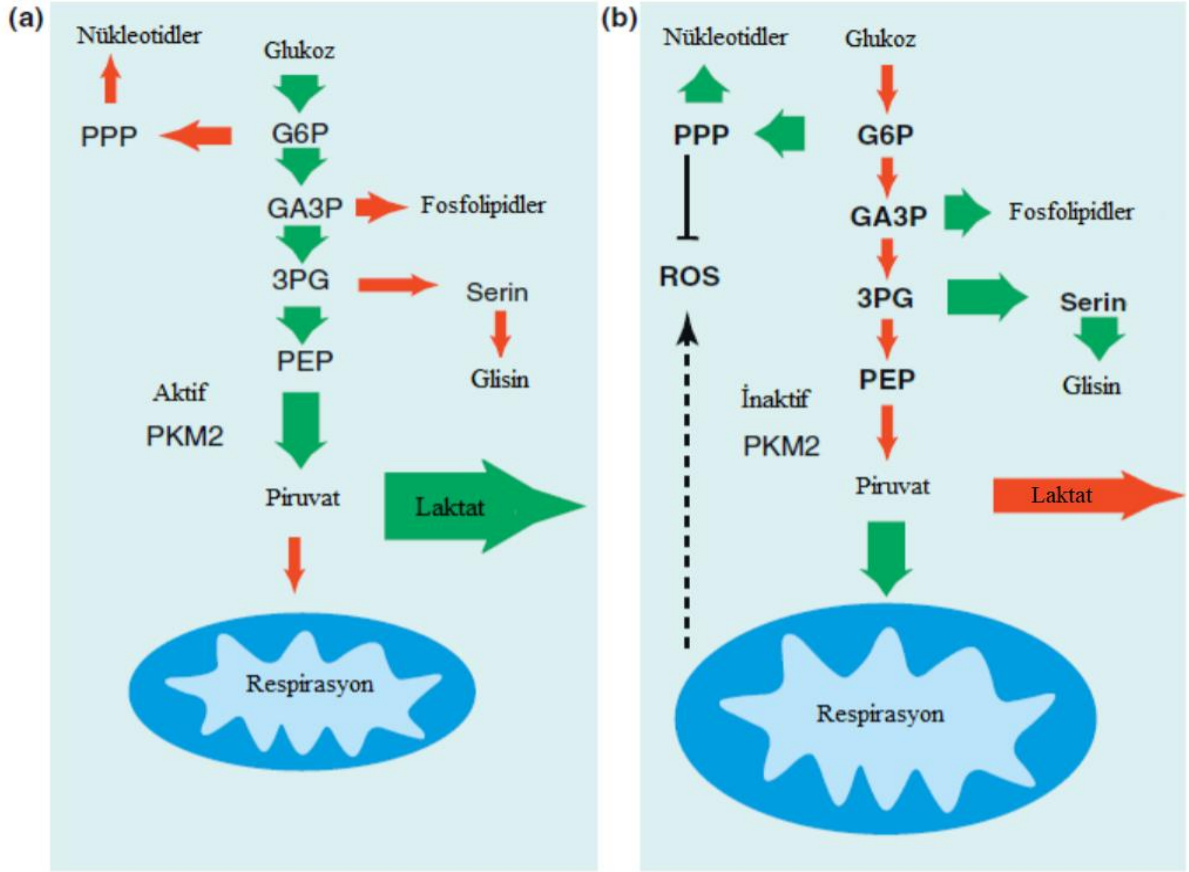
PKM2 tüm proliferasyon hücrelerinin özellikle tümörlerin karakteristik enzimidir (Israelsen ve ark, 2013; Liu ve ark, 2015). Birçok çalışma kanser hücrelerinde PKM2 izoformunun ağırlıklı olarak eksprese edildiğini belirlemiştir (Smith, 2014). Glikoliziste son ve hız sınırlayıcı reaksiyonu katalizleyen PKM2'nin ekspresyonu eş normal dokulara kıyasla akciğer, meme, prostat, kan, serviks, böbrek, mesane, papiller tiroid kanseri gibi çeşitli insan kanseri hücrelerinde artar (Bluemlein ve ark, 2011; Feng ve ark, 2013). Mukherjee ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalar PKM2 proteininin ekspresyonunun ve düzeylerinin

normal beyin dokusu ile karşılaştırıldığında agresif glioblastoma da önemli ölçüde upregüle olduğunu göstermiştir.(Mukherjee ve ark, 2013).

Glikolitik sekansta PKM2'nin konumu, glikolitik ara ürünlerin metabolik akıbetini düzenlemede etkilidir. PKM2 aktivitesi yüksekse enerji rejenerasyonu ile PEP'in pirüvata hızlı dönüşümü ile sonuçlanır (Mazurek ve ark, 2002). Aksine azalan PKM2 aktivitesi, glikolizisten dallanan sentetik prosesler için öncüller olarak PK reaksiyonunun yukarısında yer alan tüm glikolitik ara maddelerin artışına yol açar. PKM2'nin glikoliziste glukoz akışını yeniden yönlendirebilme yeteneği allosterik aktivatör F1,6BP ile kontrol edilir (Mazurek ve ark, 2007). F1,6BP'nin PKM2'ye bağlanması PEP substratına olan ilgisini artırır. Bu nedenle glikolitik sekans içinde PKM2'nin pozisyonu glikoliziste glukoz akışının yönüne karar verirken onu bir "glikolitik valf" görevine sokar (Iqbal ve ark, 2014).

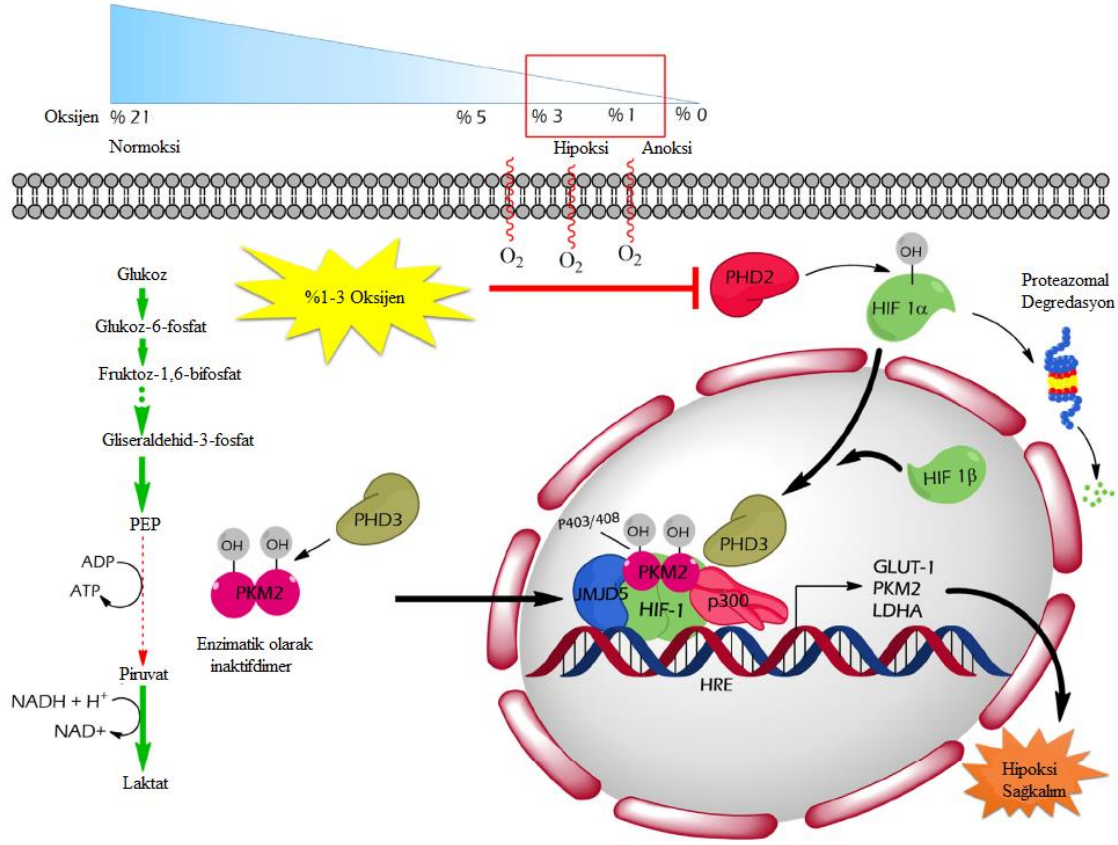
F1,6BP yokluğunda ise PKM2'nin diğer bir doğal ligand ve allosterik aktivatörü serindir (Chaneton ve ark, 2012; Ye ve ark, 2012). Ayrıca L-Sistein hücrelerde PKM2 alt birimlerinin ayrışmasını sağlayarak (tetramerlerden monomer ve dimerlere) aktivitesinin kaybolmasına yol açar. (Nakatsu ve ark, 2015). De nova pürin nükleotid sentez yolağında aracı olan SAICAR, PKM2'yi uyaran bir başka moleküldür. Kanseri hücrelerinde glukoz açlığı üzerine hücreSEL SAICAR konsantrasyonunun salınımlı bir şekilde arttığı ve daha fazla enerji üretimi adına PKM2 aktivitesini uyardığı tespit edilmiştir (Li ve ark, 2018).

Kanseri hücrelerinde görüntülenen glikolitik fenotipe rağmen, PKM2 aktivitesinin transforme hücrelerde düşük olduğu ve bu düşük aktivitesinin, biyosentetik amaçlar için kullanılabilecek glikolitik ara maddelerin birikimini destekleyerek hücre büyümesine ve çoğalmasına katkıda bulunabileceği önerilmiştir. PKM2 tamamen aktif olduğunda, glikolitik oranı yüksektir, solunum kısmen bastırılır ve piruvatın çoğu hızla laktata dönüştürülür. Bu durum normalde glukoz bakımından zengin koşullar altında, PKM2'nin ana aktivatörü olan FBP seviyesi yüksek olduğunda ortaya çıkar (Şekil 14 a). Aksine, PKM2 aktivitesindeki bir azalma, PEP ve 3PG, gliseraldehid 3-fosfat ve G6P gibi diğer glikolitik akışın yukarısındaki ara maddelerin birikimi ile ilişkili olarak laktat üretiminde bir azalmaya yol açar (Şekil 14 b). Sonuç olarak, bu metabolitlerden dallanan sentetik yollarda bir artış vardır. Düşük PKM2 aktivitesi de solunumu artırır ve bununla birlikte ROS üretilir. Bununla birlikte, PPP ile oluşan yüksek akış, mitokondri ile üretilen ROS'lara karşı koyan antioksidanlar sağlar. Bu nedenle, düşük PKM2 aktivitesi, glukoz türevi karbonların hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli olan anabolik işlemlere yönlendirildiği, hızla büyüyen hücreler için faydalı olabilir (Chaneton ve Gottlieb, 2012).



Şekil 14. Piruvat kinaz (PKM2) aktivitesinin M2 izoformundaki değişikliklerin hücre metabolik sonuçları (Chaneton ve Gottlieb, 2012'den değiştirilerek alınmıştır).

Çoğu tümörün ortak özelliği olan hipoksi, transkripsiyon faktörü HIF1 α 'nın stabilizasyonu yoluyla PKM gen ekspresyonunun upregülasyonuna neden olur. Hipoksik tümör hücrelerinin kemo ve radyoterapiye olan direncinin altında yatan neden PKM2'nin hipoksik indüksiyonu olabilir (Iqbal ve ark, 2014). Hipoksik koşullarda PHD3 enzimi ile PKM2'nin 403 ve 408 prolin (p) kalıntılarından hidroksilasyonu, PKM2'nin HIF1 transkripsiyon kompleksi ile etkileşimini sağlar, bu kompleks de p300-asetil transferaz ile etkileşime geçerek metabolik yeniden programlamayı ve hipoksik duruma karşı toleransı yöneten HIF hedef genlerinin transkripsiyonunu kolaylaştırır (Prakasam ve ark, 2018). Ayrıca yapılan bir çalışmada, hipoksik koşullar altında Jumonji C domain içeren dioksijenaz (JMJD5) 'in de PKM2 ile etkileşime girdiği ve kanser hücresi metabolizmasını ve çoğalmasını destekleyen HIF1 aracılı glikolitik enzimlerin transkripsiyonel aktivasyonunu teşvik etmek için nükleer lokalizasyonunu kolaylaştırdığı ortaya konmuştur (Wang ve ark, 2014) (Şekil 15).



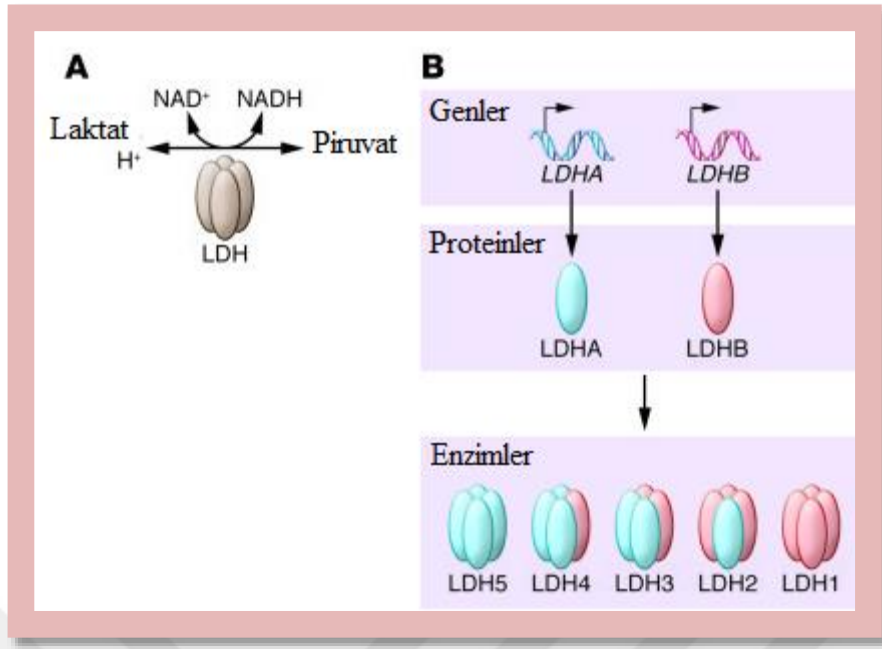
Şekil 15. PKM2'nin glikolitik olmayan nükleer fonksiyonlarının prolin hidroksilasyonu ile regülasyonu (Prakasam ve ark, 2018'den değiştirilerek alınmıştır).

2.12.6. Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Laktat dehidrogenaz (LDH, L-Laktat, NAD^+ oksidoredüktaz) enzimi memelilerde, mayalarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda her yerde bulunan ve 2-hidroksi asit oksidoredüktaz ailesine ait tetramerik bir enzimdir (Gallo ve ark, 2015; Valvona ve ark, 2016). LDH, glikolitik yolun sonunda NAD^+ 'yi kofaktör olarak kullanarak piruvatı laktata dönüştürür (Gallo ve ark, 2015) (Şekil 16). Reaksiyon, NADH 'tan bir hidrit iyonunun piruvatın 2.karbonuna transferini içerir ve bu reaksiyon anaerobik solunum amacıyla hücreler tarafından yaygın olarak kullanılır (Pineda ve ark, 2007). İnsan LDH enziminin farklı izoformlarının yapıları karakterize edilmiştir. LDH, LDH-1'den LDH-5'e kadar numaralandırılmış 5 ana izoenzim halinde bulunan 140 kDa ağırlığında tetramerik bir moleküldür. LDH izoformları tüm dokularda farklı oranlarda bulunur, bu nedenle

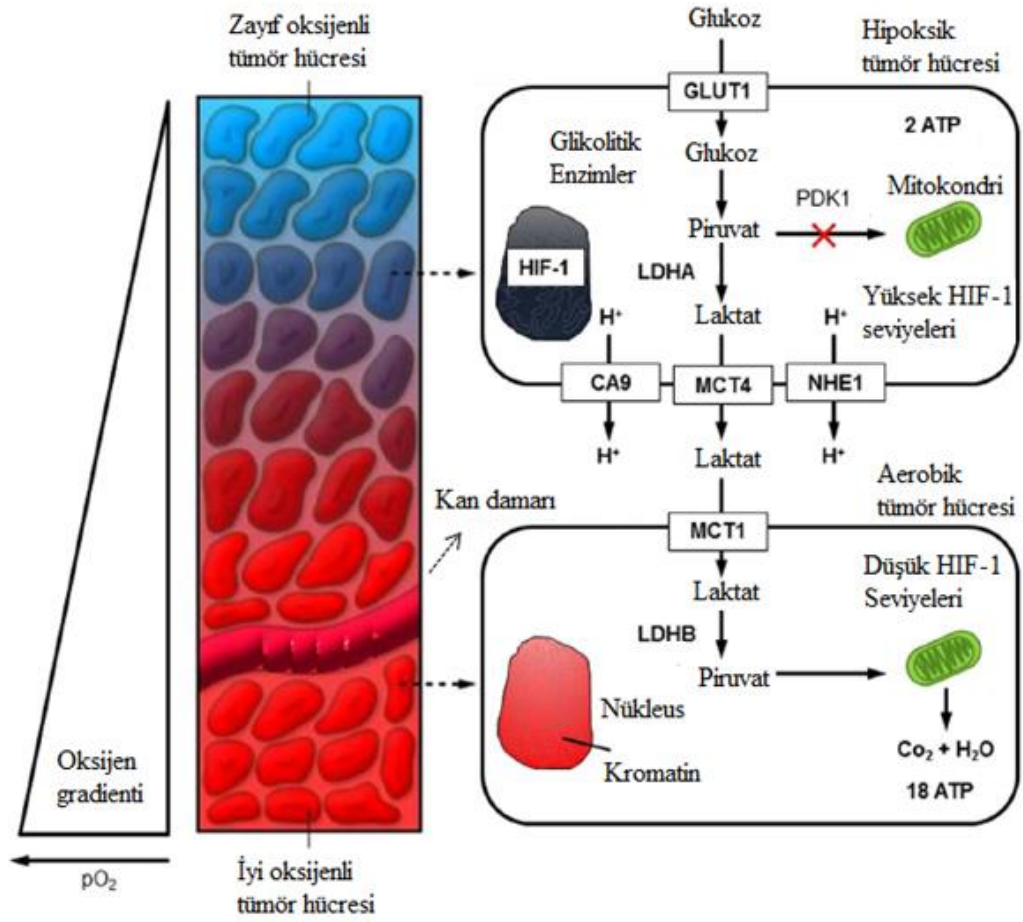
izoenzimatik profilin dokuya özgü olduğu düşünülmektedir. LDH'nin doku ve hücre sel dağılımındaki değişkenlikler muhtemelen izoformlarının substratlara karşı farklı afinitelerinden kaynaklanır. Kalpteki LDH-1 mitokondride bulunurken LDH-5 hem sitozol hem de mitokondriyal matriks içinde eşit olarak dağılmıştır (Gallo ve ark, 2015). Karaciğerde LDH-5 izoformu çoğunlukla mitokondride bulunurken kanserli hücrelerde bu izoform esas olarak sitoplazmada lokalizedir (Maekawa, 1988; Lenzen, 2014). LDH izoformlarının dokularda farklı dağılımının özellikle karaciğer ve kas dokularında bulunan hücre içi laktat mekik mekanizması içindeki temel rolüyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizmaya göre, glikoliz tarafından üretilen laktat sitozolden mitokondriyal membran boşluğuna taşınır, burada bir mitokondriyal LDH ile piruvata oksidasyonundan sonra Krebs siklusuna girmek için mitokondriyal matrikse salınır (Brooks ve ark, 1999; Dhup ve ark, 2012; Gallo ve ark, 2015).

Her ne kadar yapısal olarak benzer olsalar da her LDH izoenzimi farklı kinetik özelliklere sahiptir ve çalışmalar bu durumun aktif bölgeyi sınırlayan yüklü yüzey kalıntılarının farklılıklarından kaynaklandığını göstermektedir (Read ve ark, 2001; Valvona ve ark, 2016). Aktif LDH her biri yaklaşık 35.000 kDa molekül ağırlıklı M (kas) ve H (kalp) türünde iki alt birimden meydana gelmiş bir homo veya heterotetramerdir (Augoff ve ark, 2015). Bunlar sırasıyla kromozom 11p15.4 ve 12p12.2-p12.1 üzerinde bulunan iki ayrı gen LDHA ve LDHB tarafından kodlanır. M ve H monomerlerinin kombinasyonu ile iki homotetramerik izoform LDH-1(H₄) ve LDH-5(M₄) ve 3 heterotetramerik izoform LDH-2 (M₁H₃), LDH-3 (M₂H₂), LDH4 (M₃H₁) elde edilebilir. LDH-1 ve LDH-5 sırasıyla LDHB ve LDHA olarak adlandırılır (Gallo ve ark, 2015) (Şekil 16). LDH-1 ve LDH-5 aynı aktif bölgelere sahiptir ve sadece ilk 22 ve son 38 kalıntıda bulunan ve genel yapı üzerinde minimal bir etkiye sahip olan 332 aminoasit pozisyonunun 81'inde farklılık gösterirler (Read ve ark, 2001; Valvona ve ark, 2016).



Şekil 16. Laktat dehidrogenaz fonksiyonlarının ve gen ekspresyonunun gösterimi. A) LDH, piruvat ve laktatın NAD^+ rejenereasyonu ile birbirine dönüşümünü katalizler. B) LDH, beş farklı izoenzimle sonuçlanan A ve/veya B alt birimlerinden oluşan bir homo- ve hetero-tetramerik enzimdir. (Doherty ve Cleveland, 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).

Her bir LDHA alt birimi -6 net yüke ve piruvat için yüksek bir afiniteye sahip ve tercihen piruvatı laktat ve NADH 'ı NAD^+ 'ye dönüştürür iken, her LDHB alt birimi +1 yüke ve laktat için daha yüksek bir afiniteye sahiptir ve tercihen laktatı piruvata ve NAD^+ 'yi NADH 'ye dönüştürür (Read ve ark, 2001; Valvona ve ark, 2016). Bu gözlemler Kaplan'ın teorisini onaylar. Bu teoriye göre, piruvatın laktata dönüşümü katalizlemek için en yüksek verime sahip olan LDHA (LDH-5) düşük oksijen seviyeli dokularda tercih edilirken, laktattan piruvatın üretilmesini sağlayan LDHB (LDH-1) aksine güçlü bir aerobik metabolizması olan dokularda tercih edilir (Gallo ve ark, 2015) (Şekil 17). Bununla ilgili olarak normal ve tümör dokuları temel olarak benzer LDHB/LDH-1 seviyelerine sahipken, LDHA/LDH-5 öncelikle kanser dokularında eksprese edilir (Miao ve ark, 2013).



Şekil 17. Tümör hücreleri ve normal hücreler arasındaki laktat mekiği (Kalyanaraman, 2017'den değiştirilerek alınmıştır).

2.12.6.1. Hücresel metabolizmada LDHA'nın rolü

Oksijen yetersiz olduğu zaman, hücreler ATP'yi verimli şekilde üretmek amacıyla OXPHOS'u kullanamazlar. Bu senaryoda glikoliz ATP'nin ana jeneratörü olur ve glukoz molekülü başına net 2 ATP üretilir. GAPDH, GADP'yi 1,3BPG'a dönüştürmek için NAD^+ 'yi kullandığından glikolizin bu altıncı basamağının devamını sağlamak adına NAD^+ gereklidir. NAD^+ genellikle OXPHOS aracılığıyla yenilenir, oksijen kaynağı kısıtlandığında ise glikolizisi sürdürmek için LDHA tarafından NADH'dan NAD^+ üretilir; bu anaerobik glikoliz olarak bilinir ve yeterli oksijen olmadığında daha fazla miktarda glukoz tüketimi pahasına kısa vadeli enerji gereksinimlerini karşılamayı sağlar. Vücuttaki dokular farklı LDHA:LDHB oranlarına, enerji gereksinimlerine ve fonksiyonlara sahiptir (Valvona ve ark, 2015). Örneğin

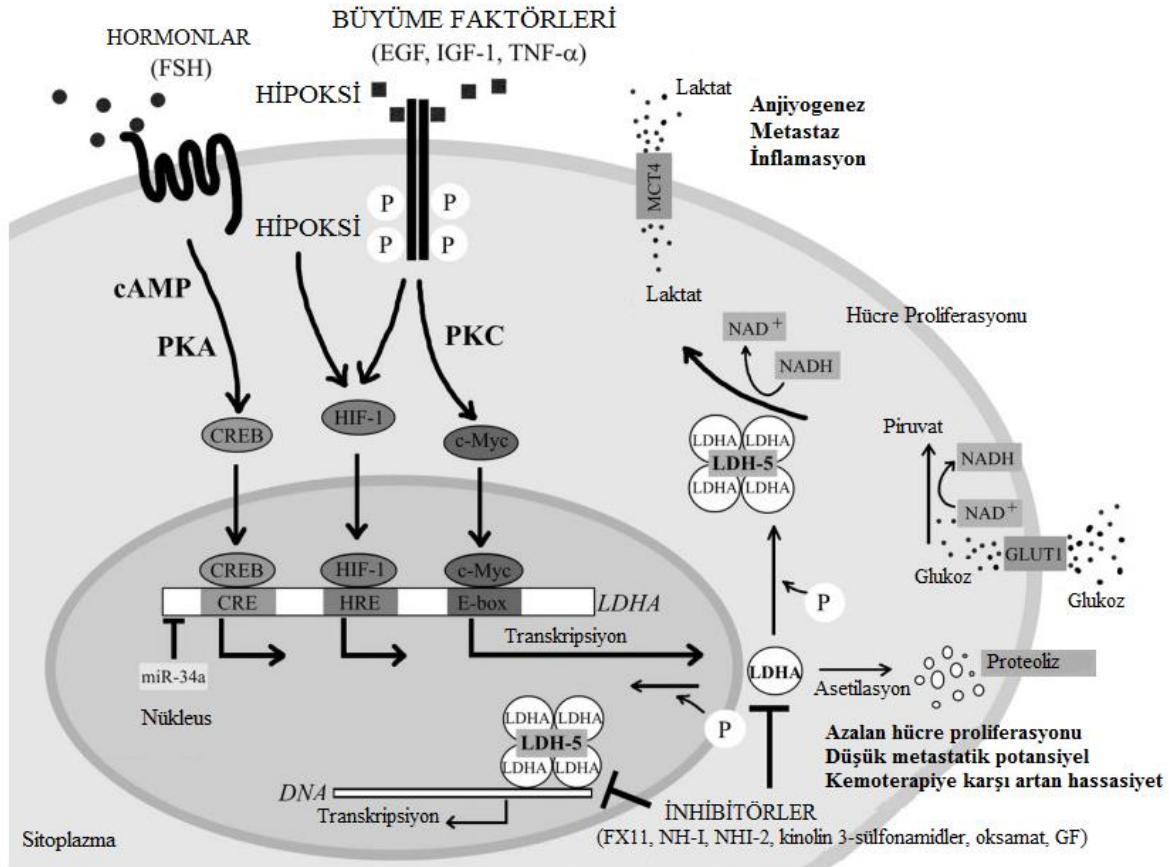
dolaşımdaki laktatın yaklaşık %40'ı iskelet kası tarafından salınırken, karaciğer ve böbrekler baskın olarak laktatı dolaşımdan emerler ve glukoz sentezlemek için okside ederler (Adeva-Andany ve ark, 2014).

LDHA promotör bölgesinin ana transkripsiyon faktörleri olan HIF-1 ve c-myc için konsensus sekansları içerdiği bilinmektedir. Bunun yanında Forkhead box protein M1 (FOXO1) ve Kruppel-benzeri faktör 4 (KLF4) LDHA'nın transkripsiyon düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. LDHA transkripsiyonunun laktat, siklik adenosin monofosfat (cAMP), östrojen, ErbB2 ve ısı şok faktörü 1 gibi birçok faktörden etkilendiği de bilinmektedir (Valvona ve ark, 2016).

c-Myc proto-onkogeni; hücre döngüsü, büyüme, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok anahtar süreci düzenlediği ve genellikle sıkı bir şekilde kontrol edildiği için "ana regülatör" olarak bilinir. c-Myc'nin aşırı ekspresyonu, normoksik koşullar altında HIF-1α stabilizasyonunu sağlayarak ve hipoksik koşullar altında HIF1α ekspresyonunu arttırarak LDHA ekspresyonunu yükseltebilir (Valvona ve ark, 2016). Shim ve ark (1997), c-MYC'nin LDHA promotörünü bağlayıp transaktive edebildiğini ve LDHA transkriptleri ve laktat üretim seviyesinde bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

HIF1α ve LDHA aşırı ekspresyonu bazı kanserlerde belirgin şekilde zayıf bir sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur (Koukourakis ve ark, 2003; Lu ve ark, 2013). HIF1 ile LDHA transkripsiyonunun desteklenmesinin cAMP'nin LDHA promotör bölgesindeki cAMP yanıt elemanına (CRE) bağlanması durumunda da arttırıldığı gösterilmiştir. (Firth ve ark, 1995; Valvona ve ark, 2016) (Şekil 18). HIF-1 ve c-myc uzun zamandan beri LDHA transkripsiyon faktörleri olarak bilinmesine rağmen, hala belirsiz olan birçok yön ve bunların çalıştığı kesin mekanizma ve LDHA transkripsiyonunun nasıl düzenlendiği aktif olarak araştırılmaya devam etmektedir (Valvona ve ark, 2016).

Çoğalan kanser hücrelerinin laktik asit üretimini arttırdığı bilinmektedir, bu yüzden LDHA açısından zengin izoenzimlerin (LDH-4 ve LDH-5) lehine kayma gösteren hücreler LDH izoform modelindeki önemli değişikliklerin transforme hücrelerde ve malign dokularda yaygın olarak görülmesi şaşırtıcı değildir (Timperley ve ark, 1971; Caltrider ve Lehman 1975; Kolev ve ark, 2008; Wang ve ark, 2012). İzoenzim oranlarındaki değişiklikler LDHA/LDHB oranındaki artış ile yansıtılır ve yüksek özgüllüğe sahiptir. Artan LDH-5 aktivitesi nedeniyle üretilen fazla laktat, hücrenin dışına taşınır ve mikroçevreyi etkileyebilir. Laktatın kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimleri teşvik ettiği ve hücre hareketliliğini etkileyerek anjiyogenez ve metastazı desteklediği bulunmuştur (Augoff ve ark, 2015) (Şekil 18).



Şekil 18. Ekstrasellüler faktörler ve hipoksi aracılı LDHA gen regülasyonu ile LDH-5 aktivasyon yollarının şematik gösterimi (Augoff ve ark, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır).

2.12.7. Laktat Metabolizması

Louis Pasteur 1863 yılında kas kasılması esnasında oksijen yetersizliği oluşması nedeniyle laktat üretildiğini öne sürmesiyle beraber laktat üzerine yapılan çalışmalar başlamıştır (Sun ve ark, 2018). Pasteur, Meyerhof ve A.V. Hill tarafından yapılan araştırmalar, glikolitik yolağın ve O₂ eksikliğinin fermentasyon ve laktat birikimine neden olduğu fikrinin yaygınlaşmasını sağlamıştır. Son 50 yılda, laktatın hem güçlü bir yakıt hem de sinyal molekülü olduğu birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir (Goodwin ve ark, 2015).

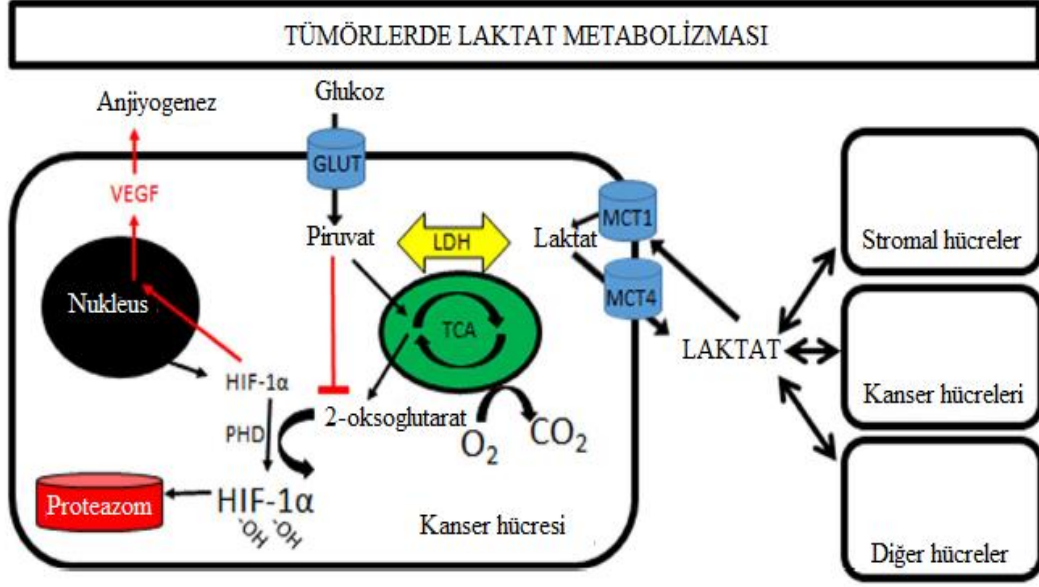
Laktat (2-hidroksipropanoat), insan vücudunda L-laktat ve D-laktat adlı iki iki stereoizomer şeklinde bulunabilen bir hidroksikarboksilik asittir. L-Laktat, fizyolojik olarak daha baskın bir enantiyomerdir (Connor ve ark, 1983; Talasniemi ve ark, 2008). Laktat / laktik asit çiftinin pKa'sı 3.8 olduğundan, anyon laktat insan vücudunda ortaya çıkan baskın

kısımdır. L-laktat, esas olarak insan hücrelerinin sitozolüne yerleştirilmiş olan LDH tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir oksido-indirgeme reaksiyonu ile üretilir veya uzaklaştırılır. Reaksiyonun bir yönünde piruvat, L-laktat üretmek üzere indirgenirken NADH, NAD^+ 'ye oksitlenir. İnsanlarda, hücre içi L-laktatın ana kaynakları glukoz ve alanindir (Adeva-Andany ve ark, 2014).

Tüm vücut seviyesinde laktat metabolizması şu nedenlerden dolayı önem taşımaktadır: 1) laktat önemli bir enerji kaynağıdır, 2) laktat önemli bir glukoneogenik prekürsördür, 3) laktat; otokrin, parakrin ve endokrin benzeri etkilere sahip bir sinyal molekülüdür ve buna "lactormon" denir. "Hücre- hücre laktat mekiği" ve "hücre içi laktat mekiği" kavramları, oksidatif ve glukoneojenik substratların yanı sıra hücre sinyalizasyonunda laktatın rolünü tanımlar (Brooks, 2018).

Laktat hem glukoz hem de glutamin oksidasyonundan üretilebilir ve ekstrasellüler asidoza katkıda bulunan tümör metabolizmasının bir atık ürünü olduğu düşünülmektedir. Aerobik koşullar altında kanser hücrelerinde artan laktat üretimi, Warburg etkisinin önemli bir gözleimidir (Warburg ve ark, 1927). Tümör hücrelerinin metabolik yeniden programlanması, metabolik akışları değiştirir, Krebs döngüsünü yeniden yapılandırır ve glikolizi arttırır. Artan glikolitik karbon akışı, yüksek miktarda laktik asit üretimine yol açar. Tümör hücrelerinin normal hücrelere göre 40 kat daha fazla laktik asit ürettiği tahmin edilmektedir (Holm ve ark, 1995).

Literatürde laktatın, kalp, karaciğer, kas ve hatta beyin de dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücrelerde (mitokondri içeren herhangi bir hücre) yakıt olarak glukozun yerini kolayca alabileceği tanımlanmıştır. Laktatın ayrıca, HIF1 α 'nın stabilizasyonunu tetikleyen ve anjiyogenez ile sonuçlanan VEGF ekspresyonunu artıran güçlü bir sinyal molekülü olduğu bulunmuştur (Goodwin ve ark, 2015). Laktattaki herhangi bir değişiklik derhal LDH katalizi sonucu piruvat ile dengeye gelir ve bunun tersi durum da geçerlidir. Biriken piruvat, proteazomdaki parçalanma için HIF-1 α 'yı hedefleyen sorumlu molekül olan 2-oksoglutarat oluşumunu inhibe eder. Böylece laktat (piruvat) seviyeleri arttığında HIF-1 α , VEGF ekspresyonu yoluyla anjiyogenezi sağlar (Goodwin ve ark, 2015). Kanser hücreleri ile tümör içindeki diğer kanser hücreleri, tümör stromal hücreleri ve / veya hem lokal hem de tümörlü olmayan diğer hücreler arasında bir laktat mekiği mevcuttur (Şekil 19).



Şekil 19. Tümörlerde laktat metabolizması: Laktatın kanser hücrelerinde izlediği yol ve anjiyogenezi yönlendirmede bir sinyal molekülü olarak potansiyel rolü (Goodwin ve ark, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır).

Laktatın anjiyogenezi üzerindeki etkisi sadece HIF-1 ekspresyonuna bağlı değildir. Végran ve ark (2011), laktatın ayrıca endotel hücreleri tarafından, nükleer faktör-kappa B (NF-kB) stimülasyonu yoluyla, endotel hücreleri tarafından interlökin-8 (IL-8) üretimini indükleyebildiğini göstermiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada laktatın HIF'den bağımsız olarak anjiyogenezi modüle etmede doğrudan bir rolü olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark, 2015). Ekstrasellüler laktat seviyelerindeki değişikliklerin, *in vitro* farklı kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde hücrelerin rastgele göç etmelerini arttırdığı ve bunun da metastazı kolaylaştıracağı gösterilmiştir (Goetze ve ark, 2011; Hirschhaeuser ve ark, 2011).

Hui ve ark (2017) ile Faubert ve ark (2017), birbirinden bağımsız bir şekilde yaptıkları çalışmalar ile laktatın normal dokularda ve tümörlerde mitokondriyal TCA döngüsü için birincil karbon kaynağı olduğunu tespit etmişlerdir. Mueller-Klieser'in grubu (2004) ilk kez laktat birikiminin primer rahim ağzı kanseri agresifliği ile anlamlı bir şekilde bağlantılı olduğu ve laktat miktarının hastanın sağkalımı ile ters orantılı seyrettiği verilerini elde etmişlerdir. Bu negatif korelasyon, laktat ile tedavi edilen baş ve boyun skuamöz karsinomu (HNSCC) olan hastalar için de doğrulanmıştır (Walenta ve Mueller-Klieser, 2004; Ziebart ve ark, 2011). Baş ve boyun, servikal ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli insan kanserlerinde yüksek laktat düzeylerinin metastaz, tümör nüksü ve kötü klinik sonuç ile

korele olduğu tespit edilmiştir (Walenta ve ark, 2000). Laktat seviyeleri, radyasyona direnç ve metastaz olasılığı ile pozitif olarak ilişkili olmasının yanı sıra insan rektal adenokarsinoma, glioblastoma ve prostat tümörü agresifliğinin potansiyel bir belirteci olarak tanımlanmıştır (Walenta ve Mueller-Klieser, 2004; Saraswathy ve ark, 2009; Park ve ark, 2010; Yaligar ve ark, 2012; Keshari ve ark, 2013).

Tümör kaynaklı laktat, tümör hücrelerinin enflamasyonunu ve immün yetmezliğini etkiler (Yabu ve ark, 2011). Laktatın kendisi, T hücreleri ve makrofajlarla interleukin (IL) - 17A üretimini artıran ve tümör mikro-ortamlarında kronik enflamasyonun oluşumu ile sonuçlanan intrinsik bir enflamatuvar aracı olarak işlev görür. Tümör hücrelerinden yüksek laktat salgılanması, T hücrelerinin sekresyonunu inhibe eder, böylece metabolizmalarını ve fonksiyonlarını bozar (Goetze ve ark, 2011).

Tümörler, aerobik ve hipoksik bölgeler içeren heterojen yapılardır (Kalyanaraman ve ark, 2017). Şekil 17’de gösterildiği gibi kan damarlarını çevreleyen tümör hücreleri iyi oksijenlenmiş iken kan damarı uzağında bulunan tümör hücreleri zayıf oksijenlenmiş bölgelere sahiptir. Son zamanlarda, kanser hücrelerinin hipoksik ve aerobik bölgeleri arasında “metabolik bir simbiyozun” varlığı gösterilmiştir (Semenza ve ark, 2008; Semenza ve ark, 2011). Hipoksik hücrelerde glikolizden üretilen laktat salgılanır; aerobik kanser hücreleri tarafından bu laktat protona bağlı karboksilat taşıyıcı-1 (MCT1) yoluyla alınır ve LDH-B ile piruvat haline dönüştürülür. Substrat konumundaki piruvat daha sonra ATP üreten aerobik tümör hücrelerinde OXPHOS'a maruz kalır. Bu mekanizma ile hipoksik kanser hücresi metabolizması ve sağkalımı için daha fazla glukoz ayrılır (Kalyanaraman ve ark, 2017).

Tümör hücreleri, hücrede laktik asit birikimini önlemek için MCT’lerini kullanırlar. MCT1 inhibe edildiğinde, aerobik kanser hücreleri artık laktatı alamaz, glukoz için hipoksik kanser hücreleri ile rekabet edemez ve yeterli glukoz kullanımına sahip hipoksik kanser hücreleri yok olur. Dolayısıyla, MCT1 inhibitörü potansiyel olarak hedeflenmiş bir kemoterapötik ajan olarak işlev görebilir. Özellikle MCT-1 ve MCT-4 izoformları kanser hücre metabolizmasında önemli rol oynar. Bu taşıyıcılar sitoplazmadan hücre dışı sıvıya laktik asit sekresyonunu hızlandırırlar ve böylelikle mikroortamın asidifikasyonuna engel olurlar (Kalyanaraman ve ark, 2017). Glioblastoma, meme kanseri, prostat ve kolon kanserinin de içinde olduğu birçok tümör dokusunda MCT-1 ve MCT-4 seviyelerinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Pinheiro ve ark, 2008; Pinheiro ve ark, 2010; Pertéga-Gomes ve ark, 2011; Miranda-Goncalves ve ark, 2013).

Laktat üretiminin artışına bağlı olarak tümör mikroortamının pH’sı normal dokulara kıyasla (pH 7.2-7.4) daha asidiktir (pH 6.5-6.9) (Estrella ve ark, 2013). Hücre dışı

asidifikasyon, iltihabın ve solid tümör dokusunun patolojik bir özelliğidir (Kato ve ark, 2013). Asidik hücre dışı pH, sadece asidik aralıkta optimal bir pH'da salgılanan lizozomal enzimleri aktive etmekle kalmaz aynı zamanda hipoksiden farklı hücre içi bir sinyal kaskadı vasıtasıyla bazı pro-metastatik faktör genlerinin ekspresyonunu da uyarır (Kato ve ark, 2013). Asidik mikro-ortam hem inflamasyonda hem de kanser hastalarında ağrı için tetikleyici olarak işlev görür (Steen ve ark, 1995; Rocha-González ve ark, 2009). Laktik asidoz bazı kanserlerin metastazlarına da katkıda bulunabilir (Kato ve ark, 2007; Romero-Garcia ve ark, 2016).

Laktat üretimi, tümör asidozu ve hipoksinin genellikle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, birçok çalışma da yüksek laktat konsantrasyonlarının mutlaka hipoksi ile ilişkili olmadığını ve iki olgunun, tümör boyunca farklı bölgelerde meydana geldiğini göstermiştir (Hunt ve ark, 2008; Yaromina ve ark, 2009). Aerobik glikoliz, artmış glutaminoliz ve kan damarlarının düşük perfüzyon oranları da hipoksik olmayan bölgelerde laktat birikimine katkıda bulunabilir (Vaupel ve ark, 1989; Vander Heiden ve ark, 2009; Levine ve Puzio-Kuter, 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- CO₂ inkübatörü
- Laminar akımlı kabin
- Işık mikroskobu
- Mikroskop
- Santrifüj
- Sıcak su banyosu
- -80° Derin Dondurucu
- Buzdolabı
- Hassas terazi
- ELISA Okuyucu
- Spektrofotometre
- Modüler İnkübatör Chamber
- Hemositometre
- Şarjlı pipetör
- Vorteks
- Serolojik pipet
- Mikropipet (1000, 200, 10 µL)
- Kriyo tüp
- 75 ve 25 cm² Flask
- Falkon tüp
- Pipet ucu (1000, 200, 10 µL)
- Steril filtre
- Steril enjektör
- 96'lı ve 6'lı plaka

Kullanılan Kimyasal Maddeler

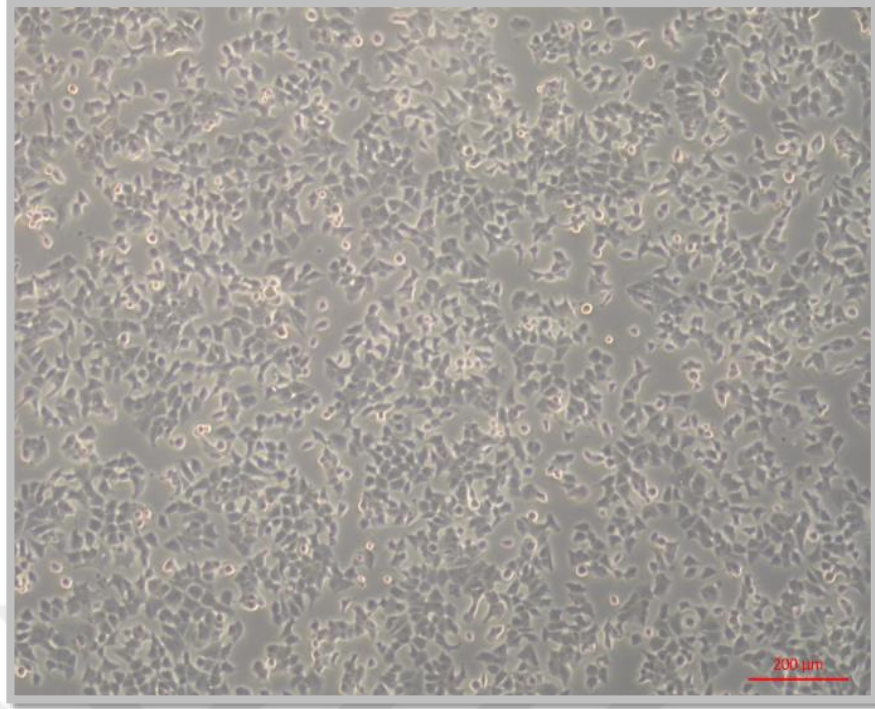
Tablo 1. Kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasallar	Üretici Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
DMEM (glukozsuz)	Gibco
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin	Gibco
L-Glutamin	Gibco
%0.25 Tripsin-EDTA	Gibco
Fosfat Tamponu Çözeltisi (PBS)	Life Technologies™
Non-esansiyel Aminoasit Çözeltisi	Sigma-Aldrich
Sodyum piruvat	Sigma-Aldrich
Glikoz	Sigma-Aldrich
WST-1	Roche

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. MCF-7 Hücresinin Özellikleri

MCF-7 hücreleri, Haziran 1970 tarihinde 64 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomalı bir kadın olgunun plevral efüzyonundan elde edilmiştir (Soule ve ark, 1973). MCF-7 hücre hattı insan meme dokusundan ve metastatik bölgelerden elde edilir. Hücre çeşidi olarak sadece epitel hücreleri içerir (Levenson ve Jordan, 1997). Çalışmada ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı stoklarında bulunan 5. pasaj östrojen pozitif MCF-7 hücre hattı kullanıldı. MCF-7 hücrelerinin görüntüsü Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim 1. MCF-7 hücrelerinin görüntüsü (4x büyütme).

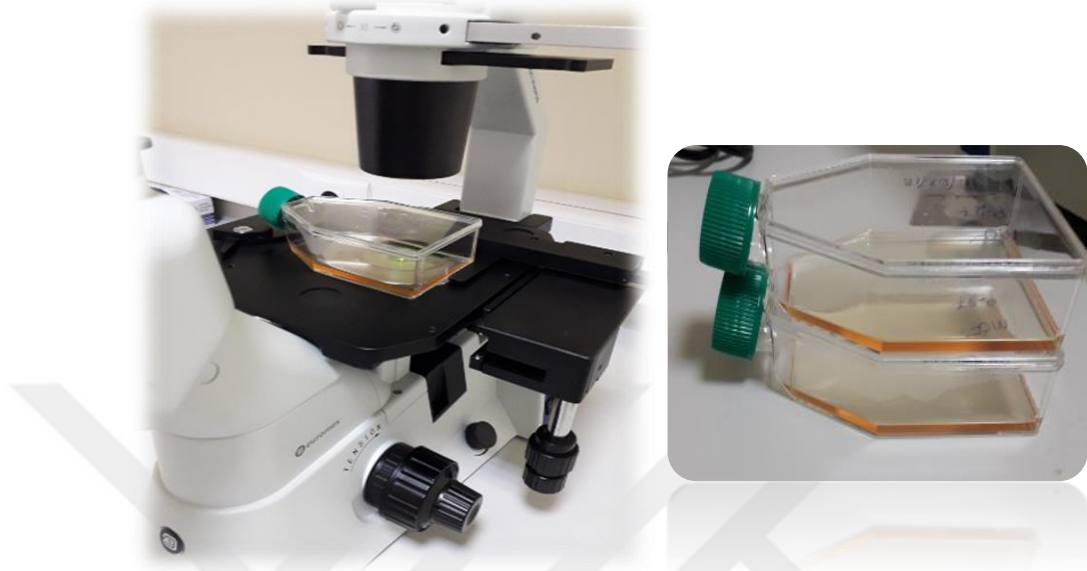
3.2.2. Hücre Kültürü Ortamı

Hücre kültürü çalışması steril sınıf II laminar akışlı mikrobiyolojik güvenlik kabini içinde yürütüldü. MCF 7 meme kanseri hücre hattı; %10 FBS, 1mM sodyum piruvat, 2 mM L-Glutamin, 10 U/mL penisilin ve 10 µg/mL streptomisin içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde üretildi.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklara ekildi ve her iki-üç günde bir yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandı. Hücreleri pasajlama işlemine hazırlamak için flask içindeki vasat alındı, hücreler fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile iki kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm²'lik flask için 2 mL ve 75 cm²'lik flask için 3-4 mL Tripsin-EDTA ilave edilerek 5 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Yüzeye yapışık tüm hücrelerin kaldırılmasının ardından tripsini inhibe etmek amacıyla tripsin-EDTA'nın iki katı miktarda taze besiyeri ortama eklendi. 15 mL hacimli santrifüj falkonlarına alınan

süspansiyon 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant ortamdan uzaklaştırılarak hücrelere taze vasat ilave edildi. Hücreler yoğunluğuna göre 1:2 veya 1:3 oranlarında yeni flasklara bölündü ve invert mikroskopta inceledikten sonra %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre kaldırıldı.



Resim 2. 75 cm²'lik flasklara ekilen MCF-7 hücreleri ve invert mikroskopta incelenmesi.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

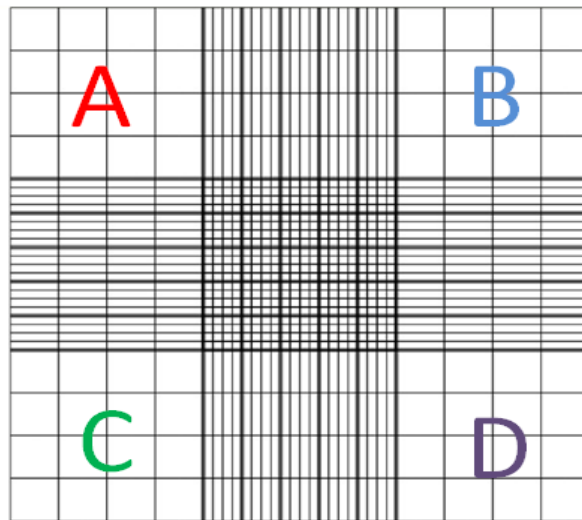
Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler PBS ile 2 kez yıkanıp Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra tripsinin iki katı kadar taze vasat ortama ilave edildi ve 1500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti hücre içi buz kristallerinin oluşmasını engelleyen %5 oranında DMSO ve %20 FBS içeren dondurma vasatında yeniden süspanse edildi. Hücrelere DMSO eklendikten sonra meydana gelen aşırı ısınmayı en aza indirmek ve ozmotik şoktan korumak için FBS ve DMSO içeren solüsyon tüp çeperinden damla damla buz içerisinde ilave edildi. Hücre süspansiyonu daha sonra 1 mL hacimli kriyotüplere bölündü ve ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere sıvı nitrojende (-196 °C) depolanmadan önce kademeli dondurmak için -80 °C’de saklandı.

3.2.5. Hücrelerin Çözülmesi

Hücre kültürünü devam ettirmek için, donmuş hücreler sıvı nitrojen veya -80 °C'den alındı ve 37 °C'deki su banyosunda çözündürüldü. Çözünen hücre süspansiyonu 5-6 mL taze vasat içeren santrifüj falkonuna transfer edilerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. DMSO içeren süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelere bir miktar taze besiyeri yavaşça ilave edilerek yeni bir flaska transferleri gerçekleştirildi. Hücreler konfluent olana kadar gelişimleri izlendi ve konfluent olduğunda pasajlama işlemi yapıldı.

3.2.6. Hücre Sayımı

Hücre sayımı bir ışık mikroskobu altında hemositometre kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonunun 20 µL'si su ile 10 kat seyreltildi. Bu karışımdan bir miktar alınarak hemositometreye yüklendi ve hücreler sayıldı. Hücre sayısı $C=N \times \text{sulandırma faktörü} \times 10^4$ formülünden hesaplandı. Formülde C, mL başına düşen hücre; N, ortalama hücre sayısı ve 10^4 1 mm² için hacim dönüşüm faktörüdür. Burada hücreler 1:10 oranında su ile seyreltildiği için sulandırma faktörü 10 idi. Sonuç olarak 1 mL ortamda ne kadar hücre olduğu tespit edildi. Çalışmada kullanılacak toplam hücre sayısı bu formüle uygun şekilde belirlendi.



Resim 3. Hemositometre.

A, B, C ve D alanlarından herhangi birindeki hücreler sayıldı ve toplam hücre sayısı metinde belirtilen formüle göre hesaplandı.

3.2.7. Hücrelere Farklı Konsantrasyonlarda Glukoz Uygulanması

0, 5.5, 15 ve 55 mM glukoz konsantrasyonlarını içeren vasatlar hazırlandı. Çalışma yapılacak hücrelerin pasajlarının 2. gününde (yaklaşık %60 konfluent olduklarında) üzerlerindeki vasat glukozsuz DMEM ile değiştirildi. Hücreler yaklaşık %80-90 konfluent olduklarında tripsin-EDTA ile kaldırılarak sayım işlemleri yapıldı ve yapılacak deneysel çalışmaya göre yeni steril flasklara veya plakalara ekimleri gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücrelerin üzerindeki glukozsuz DMEM çekilerek; 0, 5.5, 15 ve 55 mM glukoz konsantrasyonlarını içeren vasatlar uygulandı. Daha sonra hücreler 3, 6, 12, 24 ve 48 saat boyunca normoksi (%20 O₂) ve hipoksi (%1 O₂) koşullarına maruz bırakıldı. Deneyler 3 kez tekrarlandı.

3.2.8. Hipoksik Kültür Koşulları/ Hipoksi Modeli Oluşturulması

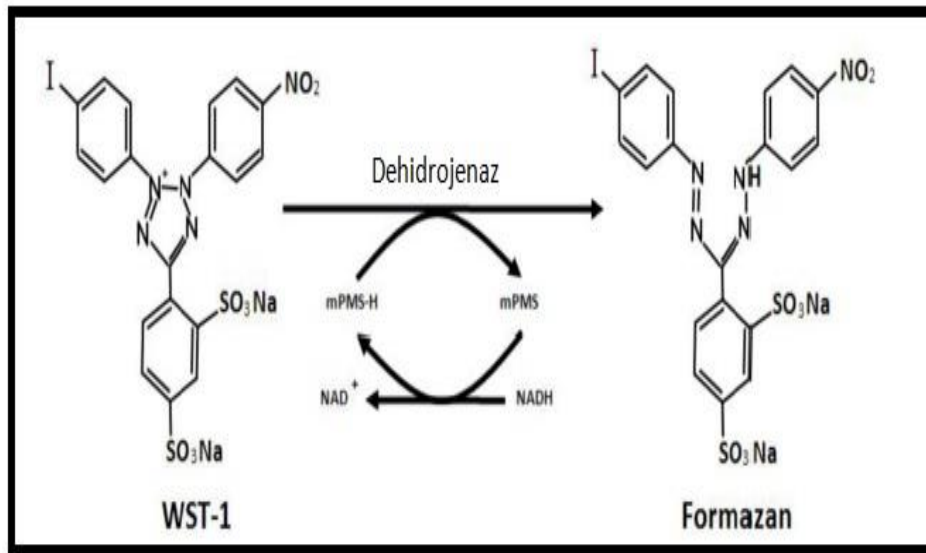
Hücreler farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren vasatların ilavesinden sonra hipoksi ortamına alındı. Hipoksi muamelesi; %1 O₂, %5 CO₂ içeren azot gazı ile doldurulan bir modüler inkübatör chamber da gerçekleştirildi (Resim 4).



Resim 4. Modüler inkübatör chamber.

3.3. Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi)

Test prensibi, tetrazolyum ailesinin bir üyesi olan tetrazolyum tuzu, 4-[3-(4 iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum]-1,3-benzen disülfonat (WST-1)'in mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından formazan tuzlarına dönüştürülebilmesi esasına dayanır (Ishiyama ve ark, 1996). WST-1 reaktifi, mPMS (1-metoksi-5-metil-fenazinyum metil sülfat) gibi ara elektron alıcısı varlığında hücresel dehidrogenazlar tarafından yüksek ölçüde suda çözünabilir formazana indirgenir. Bu mekanizma Şekil 20'de gösterilmiştir (Yin ve ark, 2013). WST-1 testi; anti-kanser ilaçları ve diğer farmasötik bileşenler tarafından sitotoksite analizi olmak üzere birçok uygulamaya sahiptir. Artan sayıda canlı hücre sayısı mitokondriyal dehidrogenazların artan aktivitesini gösterir. Bu yüzden formazan boya oluşumundaki artış doğrudan kültürdeki metabolik olarak aktif olan hücre sayısı ile ilişkilendirilebilir.



Şekil 20. WST-1 redüksiyonunun şematik mekanizması.

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta glukoz içermeyen DMEM vasatı içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve yapışması için 24 saat boyunca 37 °C %5'lik CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Hem normoksi hem de hipoksi koşulları için hazırlanan hücreler farklı glukoz konsantrasyonları (0, 5.5, 15 ve 55 mM) ile 3, 6, 12, 24 ve 48 saat muamele edildi. İnkübasyon süreleri sonunda her bir kuyucuğa üzerlerindeki vasat uzaklaştırılarak %10'luk 100 µL WST-1 solüsyonu ilave edildi. Plakalar 3 saat boyunca 37 °C %5'lik CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda plakaların ELISA okuyucu ile 450 nm'de ölçümü yapıldı.

Hesaplamalarda % canlılık değerini bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı:

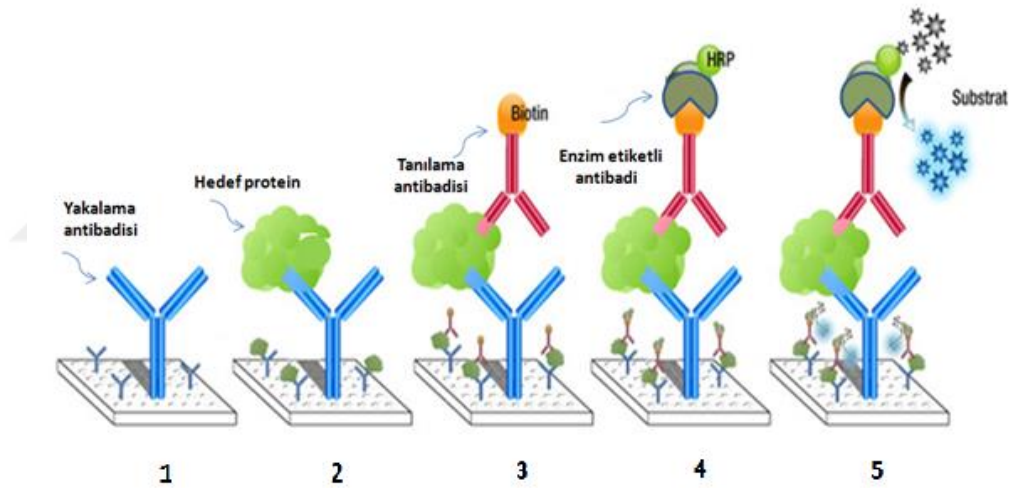
$$\% \text{ canlılık} = (T/K) \times 100$$

K: Glukoz içermeyen (0 mM) DMEM uygulanan kuyucuktaki kontrol absorbansı

T: Glukoz uygulanan (5.5, 15, 20 ve 55 mM) kuyucuktaki test absorbansı

3.4. Glikolitik Enzimlerin ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ile Tayini

Çalışmada sandviç ELISA yöntemi kullanıldı. Sandviç ELISA yöntemi spesifik antikörlerin antijen ile etkileşmesi ve oluşan bu antijen-antikör kompleksinin enzim işaretli antikör ile bağlanarak enzim aktivasyonunun ölçülmesi esasına dayanır (Resim 5). Renkli ürün oluşumu işaretsiz ligandın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Resim 5. Sandviç ELISA yöntemi. ELISA metoduna göre; 1. Örneğin kuyucuklara yüklenmesi, 2. Örneğin plate tabanındaki antikora bağlanması, 3. Biotinin eklenmesi ve örneğe bağlanması, 4. HRP konjugat eklenmesi, 5. Renk değişiminin gözlemlendiğinde sonlandırıcı solüsyonla reaksiyonun durdurulması.

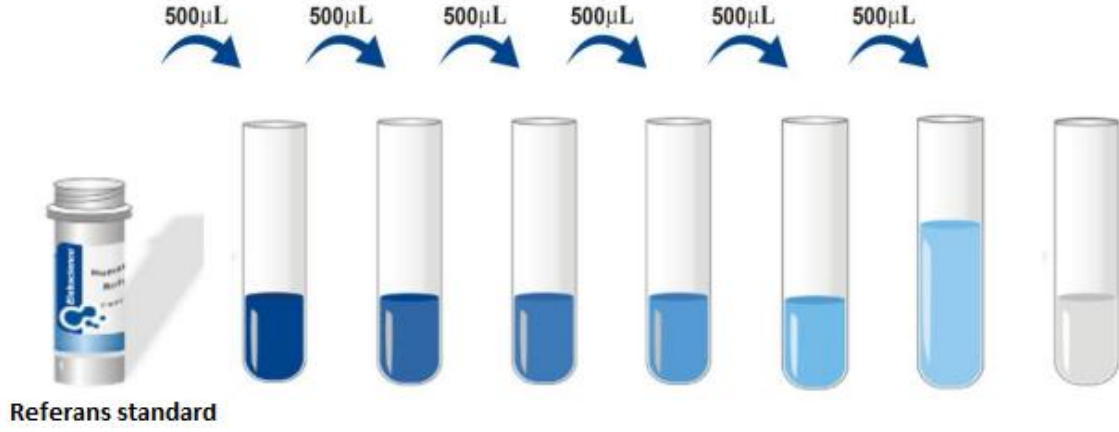
Hazırlanan hücre lizatlarında insan heksokinaz-2 (HK2, Elabscience, E-EL-H1915), fosfofruktokinaz P (PFKP, Elabscience, E-EL-H2210), glukoz-6-fosfat dehidrejenaz (GAPDH, Elabscience, E-EL-H1816), piruvat kinaz (PKM2, Elabscience, E-EL-H1089) ve laktat dehidrogenaz A (LDHA, Elabscience, E-EL-H0556) enzimleri ELISA kiti ile analiz edildi.

Hücre lizatlarının hazırlanışı:

1. Glukoz ve hipoksi muamelesi yapılan hücrelerin 6, 12, 24 ve 48. inkübasyon süreleri sonunda diğer analizlerde kullanmak için üzerlerindeki medyum toplandı. Hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası süpernatantlar atılarak hücre pelletleri 2 mL PBS'de çözüldü ve sayım işlemleri yapıldı.
3. Hücreler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar atıldı. Pelletler 250 µL'de 10^6 hücre olacak şekilde yapılan hesaplama uygun miktarlarda soğuk PBS ile çözüldü ve 2 mL'lik ependorflara alındı.
4. Hücreleri lizis etmek amacıyla sıvı azotta dondur-çöz işlemi uygulandı. Sıvı azotta yaklaşık 2 dakika ve arkasından 37 °C'lik su banyosunda yaklaşık 5 dakika olmak üzere 6-7 kez hızlı dondur-çöz işlemi uygulanarak lizis işlemi gerçekleştirildi.
5. Lizis tamamlanınca 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı.
6. Süpernatantlar 5 ayrı ELISA analizi için daha önceden etiketlenen 0.5 mL'lik ependorflara 120'şer µL paylaştırıldı.

ELISA Yöntemi Deney Aşaması:

1. Çalışma öncesi örnekler oda sıcaklığına getirildi ve standartlar kit prosedürüne uygun bir biçimde hazırlandı (Resim 6).
2. Mikroplate içindeki her bir kuyucuğa 100 µL örnek ve standartlar sıra ile eklendi ve mikroplate üzeri yapışkan bir strip ile kapatıldı. Mikroplate 90 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların içi boşaltılarak her bir kuyucuğa 100 µL Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonundan eklendi ve yeni bir yapışkan strip ile mikroplate yüzeyi örtülerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Her bir kuyucuk tamamen boşaltılıp 350 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. mikroplate içerisinde hiç sıvı kalmamasına özen gösterildi.
5. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat eklenerek mikroplate yüzeyi strip ile kapatılıp 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
6. Yıkama işlemi (adım 4'teki gibi) 5 kez tekrar edildi.
7. Her bir kuyucuğa 90 µL substrat çözeltisi eklenerek 37 °C'de karanlık ortamda 15 dakika bekletildi.
8. Her bir kuyucuğa 50 µL sonlandırma solüsyonu eklenerek maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi. 450 nm'de ölçüm yapıldı.



Resim 6. Stok solüsyonunun dilüsyonu.

3.5. Kolorimetrik Ölçümler

3.5.1. Laktat Tayini

Ekstrasellüler laktat konsantrasyonları, ticari olarak temin edilen kolorimetrik yöntem esasına dayanan laktat kiti (Lactic Acis Assay Kit, Elabsience, BC0043-2) kullanılarak ölçülmüştür. Test prensibi, LDH'ın, H⁺ reseptörü olarak NAD⁺ kullanarak, sırasıyla laktat ve NAD⁺ 'nin piruvik asit ve NADH'ye dönüşümünü kataliz etmesine dayanır. 1-Metoksi-5-metil fenazin metil sülfat (PMS) hidrojeni, NADH'dan NBT'ye transfer ederek NBT'nin mor kromojenik substrata indirgenmesini sağlar. Kromojenik maddenin absorbansı, 530 nm'deki laktik asit içeriği ile doğrusal bir ilişki gösterir.

Laktat ölçümü hem hipoksi hem de normoksi koşullarında farklı glukoz konsantrasyonu (0, 5.5, 15, 55 mM) uygulanan hücrelerin vasatlarından alınan örneklerde gerçekleştirildi.

Laktat ölçümünün protokolü Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Laktat ölçümü işlem adımları.

	Kör	Standart	Numune
Distile su (mL)	0.02		
3 mmol/L standart çözeltisi (mL)		0.02	
Numune çözeltisi (mL)			0.02
Enzim çalışma solüsyonu (mL)	1	1	1
Kromojenik ajan (mL)	0.2	0.2	0.2
10 dakika, 37°C su banyosunda hızlıca karıştır			
Durdurma çözeltisi (mL)	2	2	2

Spektrofotometrede 530 nm dalgaboyunda her bir tüpteki örneğin OD değerleri ölçüldü.

Hesaplama Formülü

Laktik Asit İçeriği (mmol/L) = $(\text{Ölçülen OD} - \text{Kör OD} / \text{Standart OD} - \text{Kör OD}) \times \text{Standart konsantrasyonu (3 mmol/L)} \times \text{Numune seyreltme miktarı.}$

3.5.2. Glukoz Tayini

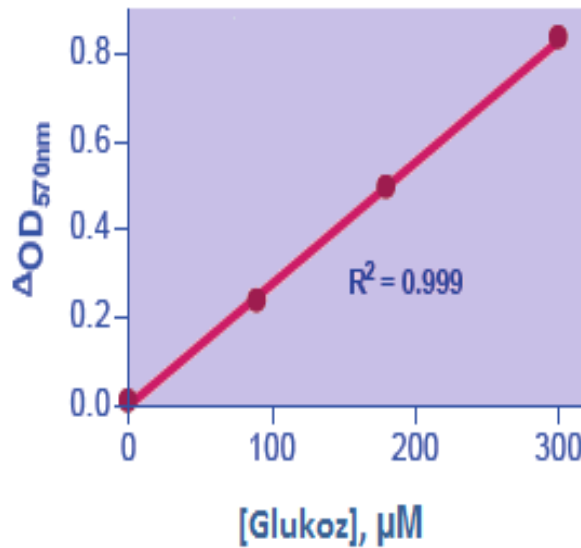
Ekstraselüler glukoz konsantrasyonları, ticari olarak temin edilen glukoz tayin kiti kullanılarak ölçüldü (EnzyChrom™ Glucose Assay Kit, EBGL-100, BioAssay Systems). BioAssay Systems glikoz test kiti, glikoz oksidaz reaksiyonunu ve renk reaksiyonunu bir adımda birleştiren tek bir Çalışma Reaktifi kullanır. Reaksiyon ürününün 570 nm'deki renk yoğunluğu, numunedeki glikoz konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır.

Test Prosedürü

1. Analizde kullanılacak tüm bileşenler oda sıcaklığına getirildi. Deney esnasında, çözülen enzim buz üzerinde tutuldu.
2. **Standart ve numuneler:** 300 mg/dL standarttan protokole uygun olarak 300 µM standart hazırlandı. Standart grafiği için gerekli olan seri dilusyonlar Tablo 3'de belirtildiği gibi hazırlanarak uygun miktarlarda distile su ile seyreltildi. Standart grafiği Şekil 21'de verilmiştir.

Tablo 3. Glukoz standartlarının hazırlanması.

No	300 μ M STD+ H_2O	Hacim (μ L)	Glukoz (μ M)
1	200 μ L + 0 μ L	200	300
2	120 μ L + 80 μ L	200	180
3	60 μ L + 140 μ L	200	90
4	0 μ L + 200 μ L	200	0



Şekil 21. Glukoz standard grafiği.

96'lık plakanın kuyucuklarına sırasıyla 20 μ L standartlar ilave edildi ve normoksi/hipoksi koşullarında farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15, 55 mM) glukoz muamele edilen hücrelerin 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda vasatlarından alınan örnekler PBS ile gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra 20 μ L kuyucuklara eklendi.

- Çalışma Reaktifi:** 85 μ L çalışma tamponu, 1 μ L enzim karışımı ve 1 μ L boya reaktifi temiz bir tüpte karıştırılarak hazırlanan çalışma reaktifinden her bir reaksiyon kuyucuğuna 80 μ L aktarıldı.

4. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirildi ve 570 nm’de optik dansitesi okundu.

Hesaplama Formülü

$$[\text{Glikoz}] = (\text{R}_{\text{NUMUNE}} - \text{R}_{\text{KÖR}}) / \text{Eğim} (\mu\text{M}^{-1}) \times n (\mu\text{M})$$

n: (seyreltme miktarı)

3.6. Wound Healing Testi

Hücre migrasyonunun ve etkileşiminin analiz edildiği bir testtir. 6 kuyucuklu plakalara 2 mL içinde 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra, 200 μL ’lik pipet ucu ile saat 12 yönünden başlanarak saat 6 yönüne doğru her kuyucuğun ortasına düz ve eşit olacak şekilde bir çizgi çizildi. Ardından kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı, ölü hücreler temizlendi ve belirlenen konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz içeren 2 mL besiyeri ile muamele edildi. Plakalar normoksik ve hipoksik ortama alındı (Resim 7). Devamında 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde fotoğraflama yapıldı. Yarıklar Image1.48 programı ile ölçüldü.



Resim 7. Wound healing testi için hipoksi ortamına alınacak 6’lı plakaların modüler inkübatör chamber içine yerleştirilmesi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 22.0 Standart Version Copyright © SPSS Inc. Chicago, IL, USA) hazır paket programı ve MS-Excel 2016 programında yapıldı. Değişimlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Tüm parametreler için tanımlayıcı ifadelerde ortalama ve standart sapma kullanıldı.

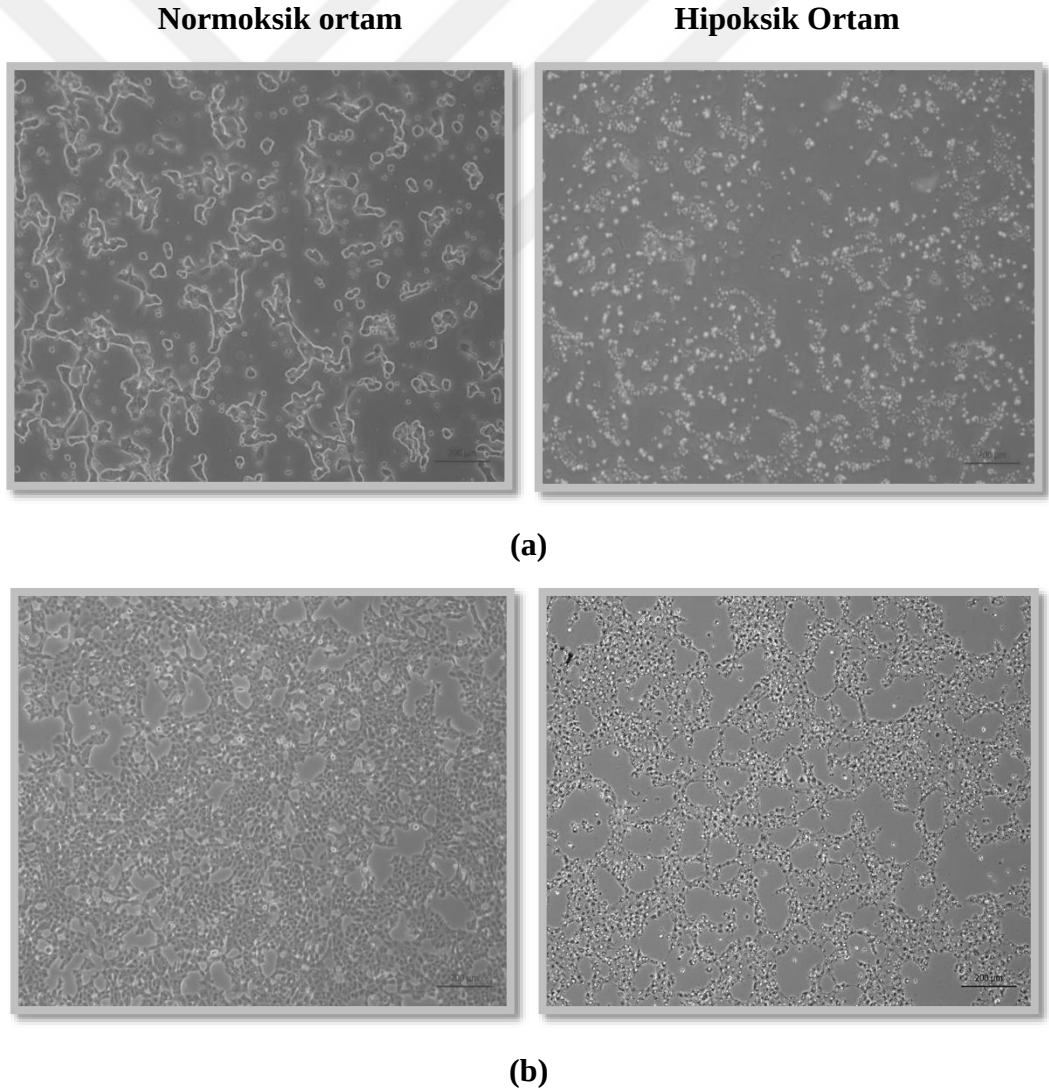
Gruplar arasındaki istatistiki değerlendirmeler tek yön varyans analizi One-Way ANOVA uygulanarak yapıldı, post hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Elde edilen veriler $p < 0.05$ (%95) hipotezini sağlayacak şekilde test edildi.

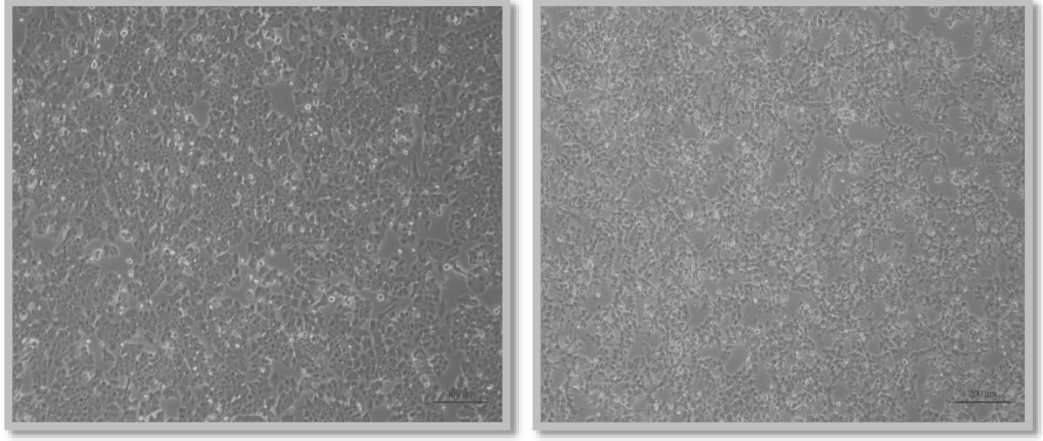


4. BULGULAR

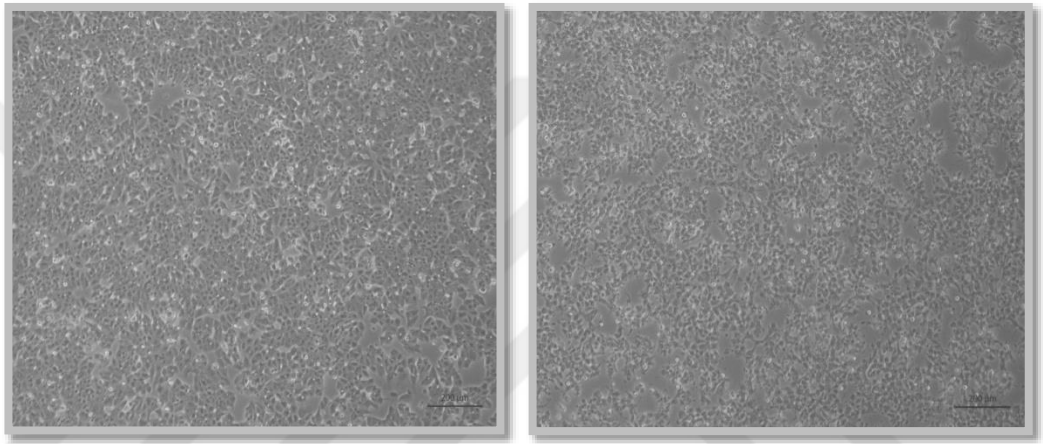
4.1. MCF-7 Hücrelerinin İnvirt-Mikroskop Görüntüleri

MCF-7 hücreleri belli inkübasyon süreleri boyunca 0, 5.5, 15 ve 55 mM glukozu maruz bırakıldı. Özellikle uzun süreli (48 saat) maruziyette glukoz içeren ve glukoz içermeyen (0 mM) ortamlardaki hücrelerin morfolojik görüntüleri arasında belirgin farklar meydana geldi. Normoksik ve hipoksik ortamda glukoz konsantrasyonu azaldıkça hücre proliferasyonunun zamana bağlı azaldığı ve bunun yanında hücrelerin morfolojik görünümünün değiştiği gözlemlendi (Resim 8).





(c)



(d)

Resim 8. MCF7 hücrelerinin normoksik (sol) ve hipoksik ortamda (sağ) 0 mM (a), 5.5 mM (b), 15 mM (c) ve 55 mM (d) glukoz uygulanan gruplarda 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 20X).

4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

MCF7 meme kanser hücrelerinin glukoz konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı değişen proliferasyon oranlarını belirlemek amacıyla hücreler dört farklı konsantrasyonda glukoz (0, 5.5, 15 ve 55 mM) içeren besiyerlerinde 3, 6, 12, 24 ve 48 saat normoksik ve hipoksik koşullarda inkübe edildi ve canlılık oranları WST-1 hücre canlılık testi kullanılarak belirlendi. Gruplara ait % canlılık değerleri Tablo 4, 5, 6 ve 7’de verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda hipoksik ve normoksik koşullarda gerçekleştirilen hücre canlılık analizlerinin zamana göre karşılaştırmaları aşağıda verilmiştir. Normoksik ortamda tüm konsantrasyonlar için dikkat çekici nokta 6. saatte hücre canlılığının

azalmasıdır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). 12.saatte kontrole göre 0, 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında canlılık artışı belirlendi ($p<0,05$). Ancak 12. ve 24. saatler arası tüm konsantrasyon için hücre canlılığında anlamlı bir değişim olmadı ($p>0,05$). 3.saate göre en yüksek canlılık yüzdeleri ise 48.saatte elde edildi ($p<0,001$) (Tablo 4).

Hipoksik koşullarda 6.saatte genel olarak hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlar görüldü ($p>0,05$). 6.saatten itibaren hücrelerin canlılık oranlarında inkübasyon süresi ile paralel artış şekillenmiştir ($p<0,05$). Normoksik ortama benzer şekilde kontrole göre (3.saat) en yüksek canlılık yüzdeleri 48. saatte elde edildi ($p<0,001$). Hem normoksik (%257) hem de hipoksik (%319) koşullar için 55 mM glukoz bulunduran ortamda 48. saatteki hücre canlılığı maksimum düzeydedir (Tablo 5).

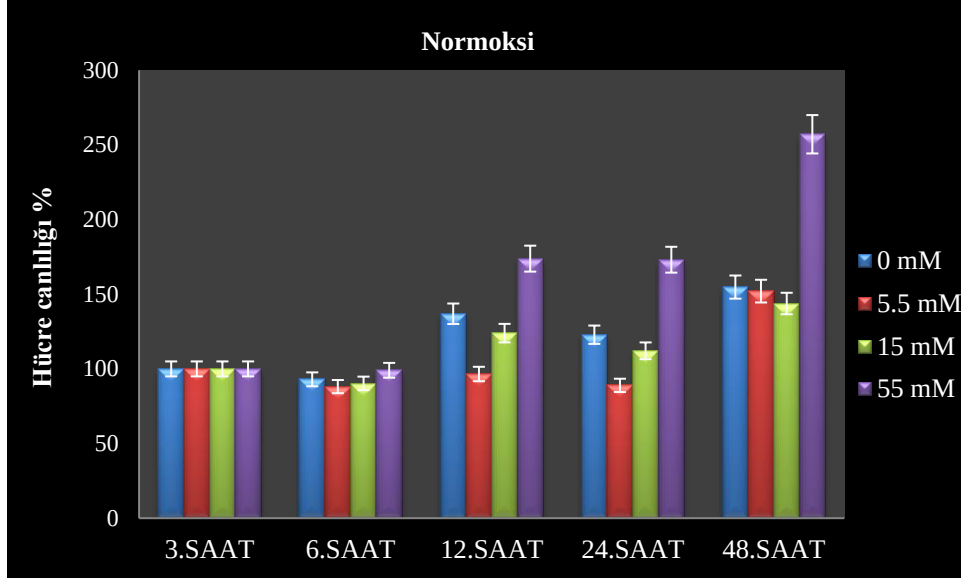
Tablo 4. Normoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda glukoz uygulamasının 3.saat kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri

Normoksi İnkübasyon Süresi	0 mM %canlılık	5,5 mM %canlılık	15 mM %canlılık	55 mM %canlılık
Kontrol	100±0,307 ^a	100±7,63 ^a	100±3,96 ^a	100±4,93 ^a
6.saat	93±4,74 ^a	88±2,89 ^a	90±4,03 ^a	99±4,8 ^a
12.saat	136±2,85 ^{b*}	96±6,45 ^a	123±5,45 ^b	173±8,93 ^{b*}
24.saat	122±7,02 ^b	88±5,08 ^a	112±1,63 ^{ab}	173±15,36 ^{b*}
48.saat	154±2,1 ^{c*}	152±6,2 ^{b*}	143±3,6 ^{c*}	257±8,73 ^{c*}

(Yüzde Canlılık = [ABS ortalama (her bir örnek) / ABS ortalama (kontrol)] x 100)

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

(*Kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı).



Şekil 22. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.

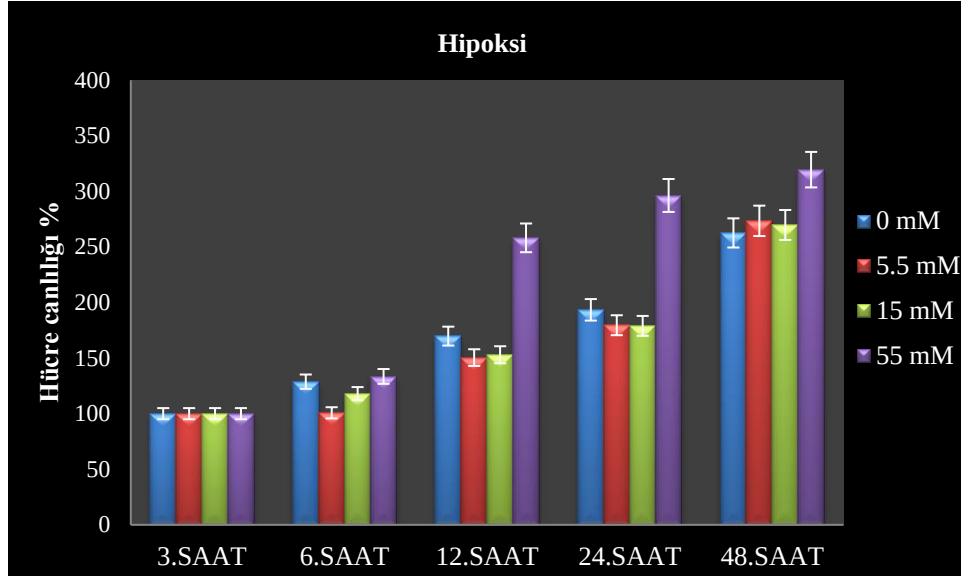
Tablo 5. Hipoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda glukoz uygulamasının 3.saat kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri

Hipoksi İnkübasyon Süresi	0 mM %canlılık	5,5 mM %canlılık	15 mM %canlılık	55 mM %canlılık
Kontrol	100±1,79 ^a	100±10,39 ^a	100±0,66 ^a	100±0,89 ^a
6.saat	128±0,95 ^{ab}	100±1,45 ^a	118±0,81 ^{b*}	133±4,61 ^a
12.saat	169±6,45 ^{bc}	150±1,03 ^b	150±2,9 ^{c*}	258±25,2 ^{b*}
24.saat	192±18,93 ^{c*}	179±11,2 ^{b*}	178±0,48 ^{d*}	296±0,67 ^{bc*}
48.saat	262±6,68 ^{d*}	273±4,56 ^{c*}	269±3,25 ^{e*}	319±8,19 ^{c*}

(Yüzde Canlılık = [ABS ortalama (her bir örnek) / ABS ortalama (kontrol)] x 100)

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

(*Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı).



Şekil 23. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.

WST-1 analizi sonucunda normoksik ortamda Tablo 6'da de görüldüğü gibi 3, 6 ve 48 saatlik inkübasyon süresinde % canlılık değeri 5.5 mM glukoz konsantrasyonunda kontrol grubuna göre (0 mM) anlamlı bir artış göstermiş ($p < 0,05$), 12. ve 24. saatlerdeki canlılık artışı ise anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$). 15 mM glukoz konsantrasyonunda tüm inkübasyon süreleri için kontrole göre anlamlı bir artış söz konusudur ($p < 0,001$). 55 mM konsantrasyonunda 3.saatte kontrole göre anlamlı bir fark belirlenmemiş olup ($p > 0,05$), 6.saatte canlılık yüzdesi artmış, ancak 5.5 ve 15 mM'a kıyasla azalma gerçekleşmiştir ($p < 0,05$). 12., 24. ve 48. saatler de ise kontrole göre yüksek konsantrasyonlu (15 mM ve 55 mM) ortamlarda canlılığın önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Hipoksik ortamda tüm inkübasyon sürelerinde konsantrasyon değişimine bağlı olarak hücre canlılığında artış olmuştur. 5.5 mM glukoz konsantrasyonunda 3. ve 48. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı artışlar (%34 ve %41) şekillenmiştir ($p < 0,05$). 15 mM'da kontrole göre en yüksek canlılık yüzdesi artışı yine 3. ve 48. saatlerde görülürken (%50 ve %55), 6., 12. ve 24. saatlerde canlılık yüzdelерinin aynı oranda arttığı belirlenmiştir. 15 mM ve 55 mM glukoz ortamlarında önceki konsantrasyonlara kıyasla tüm inkübasyon sürelerinde canlılık artışları kaydedilirken, normoksik ortama kıyasla hipoksik ortamda 55 mM'da canlılık yüzdesi artışının daha yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle 12., 24. ve 48. saatlerde 55 mM konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak en yüksek düzeyde canlılık artışları (%126, %128 ve %91) kaydedilmiştir ($p < 0,001$) (Tablo 7).

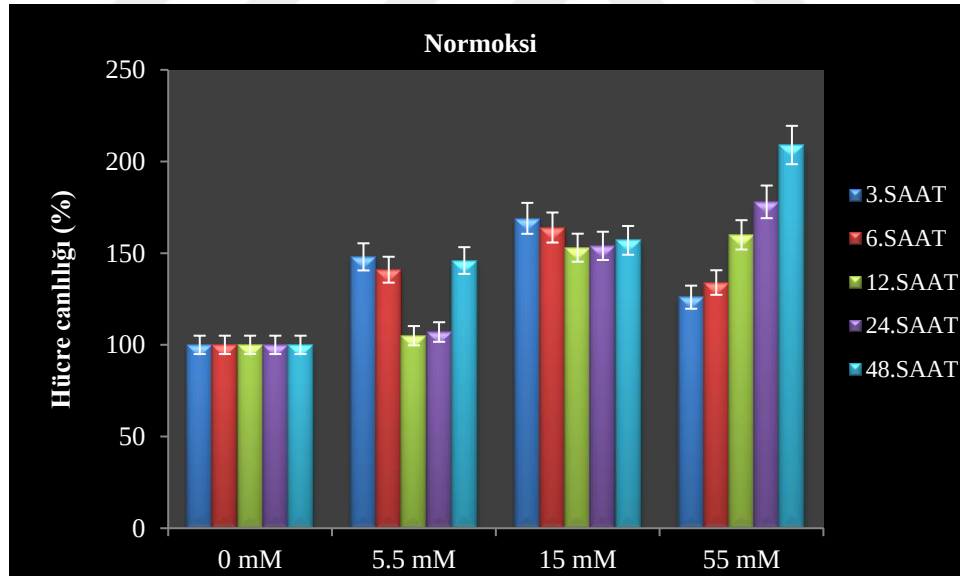
Tablo 6. Normoksik ortamda farklı inkübasyon sürelerindeki (3,6 ve 12, 24 ve 48.saat) glukoz uygulamasının 0 mM kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri.

Normoksi					
Konsantrasyonu	3.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
(mM)	%canlılık	%canlılık	%canlılık	%canlılık	%canlılık
Kontrol	100±0,306 ^a	100±5,10 ^a	100±2,1 ^a	100±5,75 ^a	100±1,36 ^a
5,5 mM	148,93±11,37 ^{bc}	141,12±4,64 ^{bc}	105,03±7,07 ^a	107,81±6,23 ^a	146,31±5,96 ^{b*}
15 mM	169,26±6,72 ^{c*}	164,31±7,36 ^{c*}	153,22±6,77 ^{b*}	154,44±2,25 ^{b*}	157,23±3,97 ^{b*}
55 mM	126,31±6,23 ^{ab}	134,54±6,52 ^b	160,28±8,28 ^{b*}	177,96±15,8 ^{b*}	209,84±7,12 ^{c*}

(Yüzde Canlılık = [ABS ortalama (her bir örnek) / ABS ortalama (kontrol)] x 100)

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark P<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

(*Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı).



Şekil 24. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.

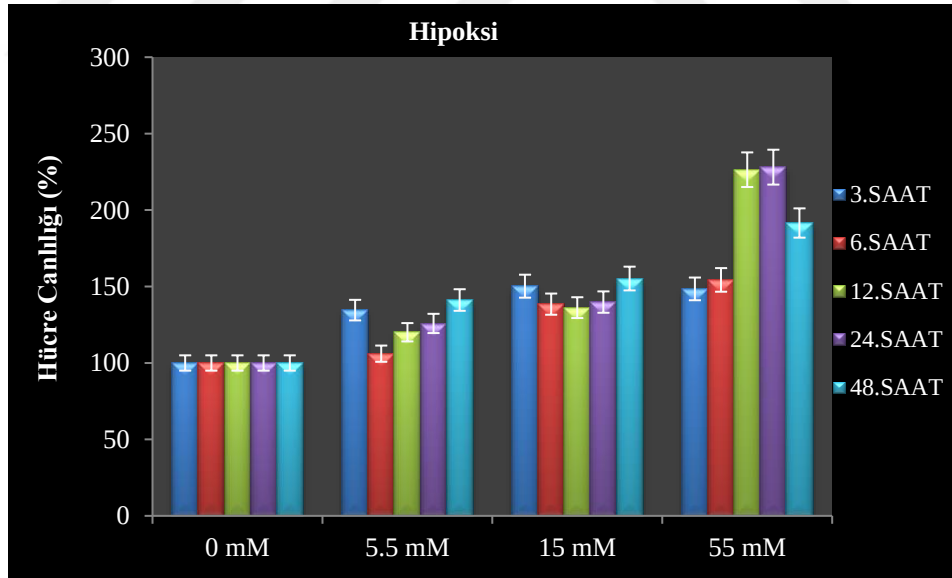
Tablo 7. Hipoksik ortamda farklı inkübasyon sürelerindeki (3, 6, 12, 24 ve 48 saat) glukoz uygulamasının 0 mM kontrol grubuna göre % canlılık oranları ve istatistiksel değerleri.

Hipoksi					
Konsantrasyonu	3.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
(mM)	%canlılık	%canlılık	%canlılık	%canlılık	%canlılık
Kontrol	100±1,79 ^a	100±0,74 ^a	100±3,82 ^a	100±9,9 ^a	100±2,55 ^a
5,5 mM	134,56±1,31 ^b	106,07±1,54 ^a	120,1±0,83 ^a	125,85±7,88 ^{ab}	141,17±2,36 ^{b*}
15 mM	150,22±0,1 ^b	138,48±0,95 ^{b*}	136,2±2,65 ^a	139,83±0,32 ^b	155,23±1,87 ^{c*}
55 mM	148,45±1,33 ^b	154,33±5,35 ^{c*}	226,39±22,1 ^{b*}	228,07±0,52 ^{c*}	191,54±4,92 ^{d*}

(Yüzde Canlılık = [ABS ortalama (her bir örnek) / ABS ortalama (kontrol)] x 100)

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark P<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

(*Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı).



Şekil 25. MCF-7 kanser hücrelerinin (5×10^3 hücre/kuyu) hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık oranları.

4.3. Enzim Miktarlarının Değerlendirilmesi

Farklı glukoz konsantrasyonları ile muamele edilen normoksik ve hipoksik ortamdaki MCF-7 hücrelerinin belli inkübasyon süreleri sonunda kültür ortamına salgılamış olduğu glikolitik enzimlerin (HK2, PFKP, LDHA, G6PD ve PKM2) varlığı ve miktarı ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile tayin edildi.

Uygulama gruplarında elde edilen verilerin istatistiki olarak karşılaştırılması 2 farklı aşamada değerlendirildi:

- 1.Enzim miktarlarının zamana ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin karşılaştırılması
- 2.Normoksi ve hipoksi sonuçlarının karşılaştırılması

4.3.1. ELISA Yönteminden Elde Edilen PKM2 Sonuçları

4.3.1.1. PKM2 enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağlı değişimi

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında uygulama saatlerine ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak PKM2 düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 8).

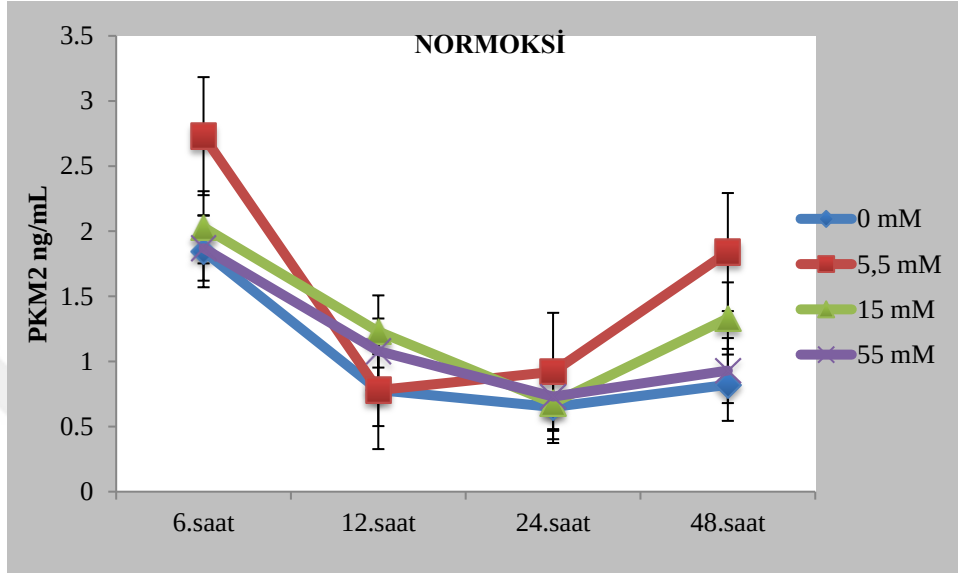
Tablo 8. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PKM2 enzim miktarları ve standart hata değerleri.

Normoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	1,83±0,01 ^{aA}	0,78±0,005 ^{bA}	0,65±0,01 ^{cA}	0,82±0,01 ^{dA}
5.5mM	2,73±0,02 ^{aB}	0,78±0,006 ^{bA}	0,92±0,008 ^{cB}	1,84±0,02 ^{dB}
15mM	2,03±0,005 ^{aC}	1,23±0,005 ^{bB}	0,683±0,005 ^{cC}	1,33±0,005 ^{dC}
55mM	1,87±0,04 ^{aD}	1,08±0,01 ^{bC}	0,73±0,03 ^{cD}	0,93±0,01 ^{dD}
Hipoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	1,07±0,005 ^{aA}	1,32±0,005 ^{bA}	0,45±0,005 ^{cA}	0,19±0,01 ^{dA}
5.5mM	1,21±0,01 ^{aB}	0,91±0,01 ^{bB}	0,51±0,03 ^{cB}	0,17±0,008 ^{dA}
15mM	1,81±0,03 ^{aC}	0,39±0,007 ^{bC}	0,38±0,005 ^{bC}	0,88±0,01 ^{cB}
55mM	1,52±0,005 ^{aD}	0,22±0,005 ^{bD}	0,51±0,005 ^{cB}	0,98±0,005 ^{dB}

abcd aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

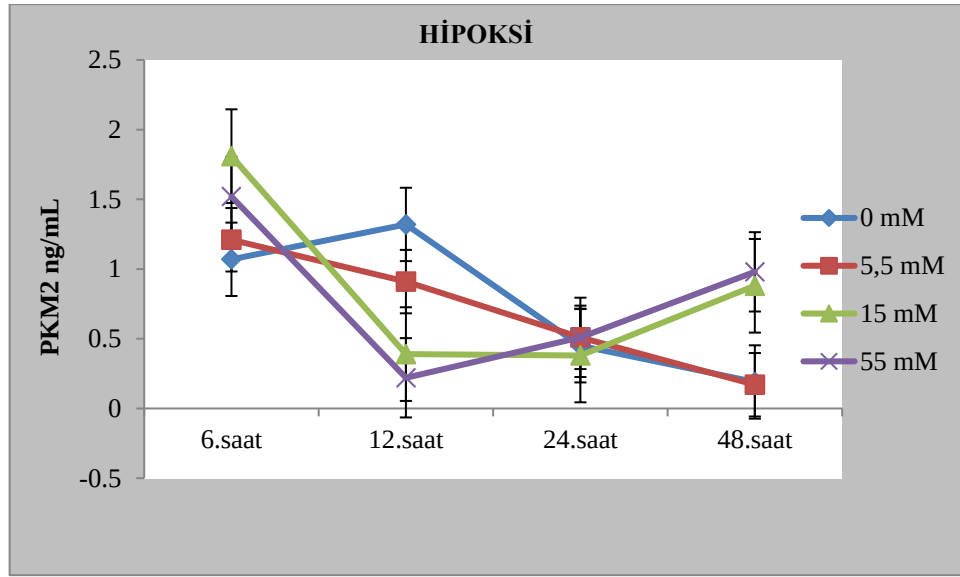
ABCD aynı sütunda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Gruplar arasında zamana bağlı farklılıklara bakıldığında, normoksik koşullarda enzim miktarlarının genel itibariyle 24.saate kadar azalış, 24.saatten sonra ise artış gösterdiği gözlemlendi. En yüksek enzim miktarları 6.saatte görüldü. Tüm inkübasyon süreleri arasında anlamlı bir değişim olduğu saptandı ($p<0,001$) (Tablo 8) (Şekil 26).



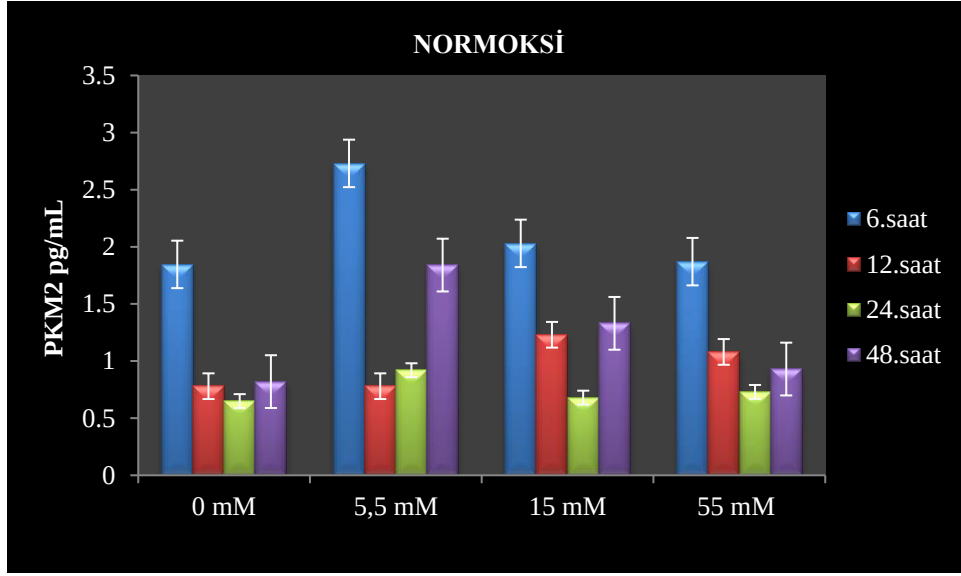
Şekil 26. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PKM2 enzim miktarı düzeyleri.

Hipoksik koşullarda ise 0 mM glukoz içeren uygulama grubunda PKM2 enzim miktarının 6.saatten 12.saate dek artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,001$). 12.saatten sonra ise enzim seviyesinin azalmaya başladığı görüldü ($p<0,001$). 5.5 mM glukoz uygulama grubunda 6.saatten 48.saate kadar enzim miktarında anlamlı bir azalış kaydedildi ($p<0,001$). 15 ve 55 mM glukoz uygulama gruplarında 6.saatten itibaren enzim miktarlarının azaldığı; 24.saatten sonra ise artmaya başladığı belirlendi. Farklı konsantrasyonlardaki glukoz uygulama gruplarında tüm inkübasyon zamanları arası önemli iken ($p<0,001$), sadece 15 mM glukoz içeren ortamlarda 12.ve 24.saat inkübasyon süreleri arasında PKM2 enzim miktarında zamana bağlı anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 8) (Şekil 27).

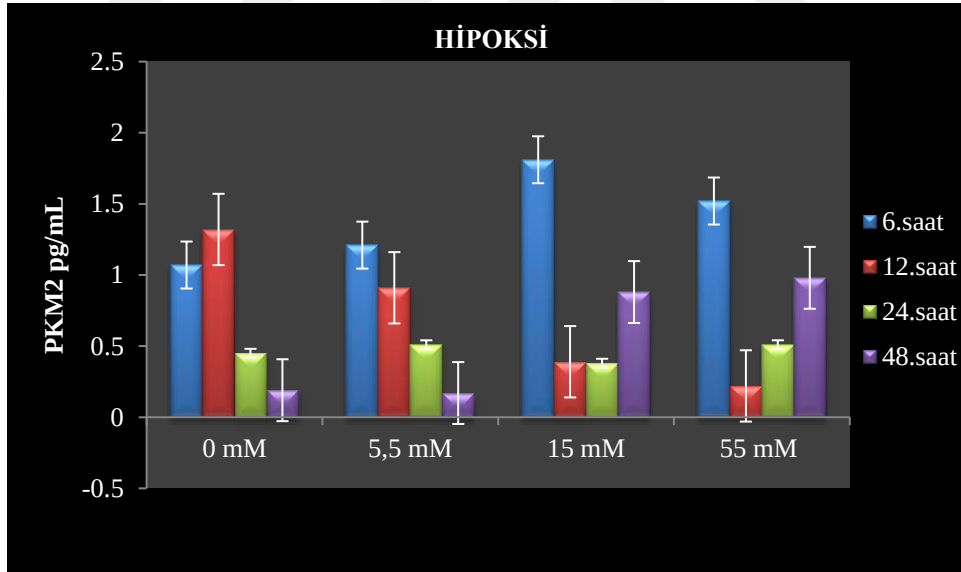


Şekil 27. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PKM2 enzim miktarı düzeyleri.

Konsantrasyon farklılığına bağlı incelenen normoksik ortamdaki MCF-7 hücrelerinin 6, 24 ve 48. saat inkübasyon süreleri için 5.5 mM konsantrasyonda PKM2'nin en yüksek düzeyine ulaştığı, 12. saatte ise 15 mM konsantrasyonda diğer dozlara göre anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0,001$). Hipoksik ortamdaki hücrelerde 6. ve 48. saatlerde doza bağlı bir artış, 12. saatte ise doza bağlı kademeli bir azalış kaydedildi ($p<0,001$). 24. saatte doza bağlı büyük farklar tespit edilmedi. Hipoksik ortamdaki en yüksek PKM2 miktarı 6. saat inkübasyon süresinde 15 mM konsantrasyonunda belirlendi ($p<0,001$) (Tablo 8) (Şekil 28 ve Şekil 29).



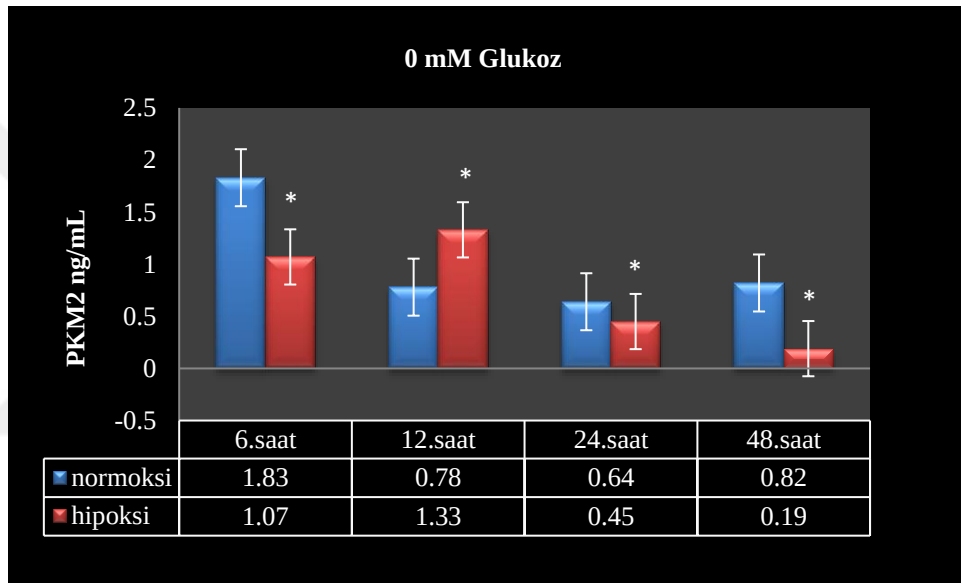
Şekil 28. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PKM2 miktarlarının karşılaştırılması.



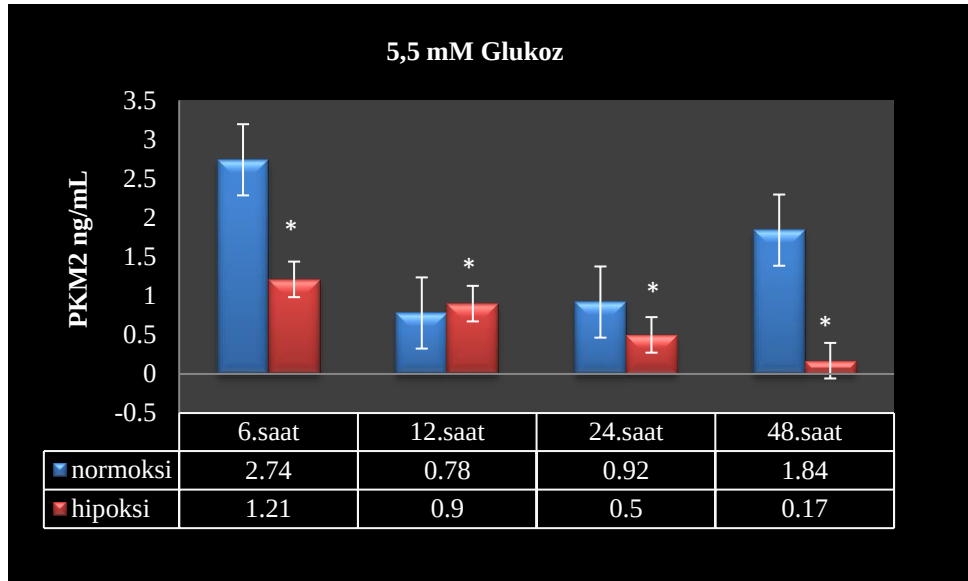
Şekil 29. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PKM2 miktarlarının karşılaştırılması.

4.3.1.2. Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki PKM2 enzim miktarlarının karşılaştırılması

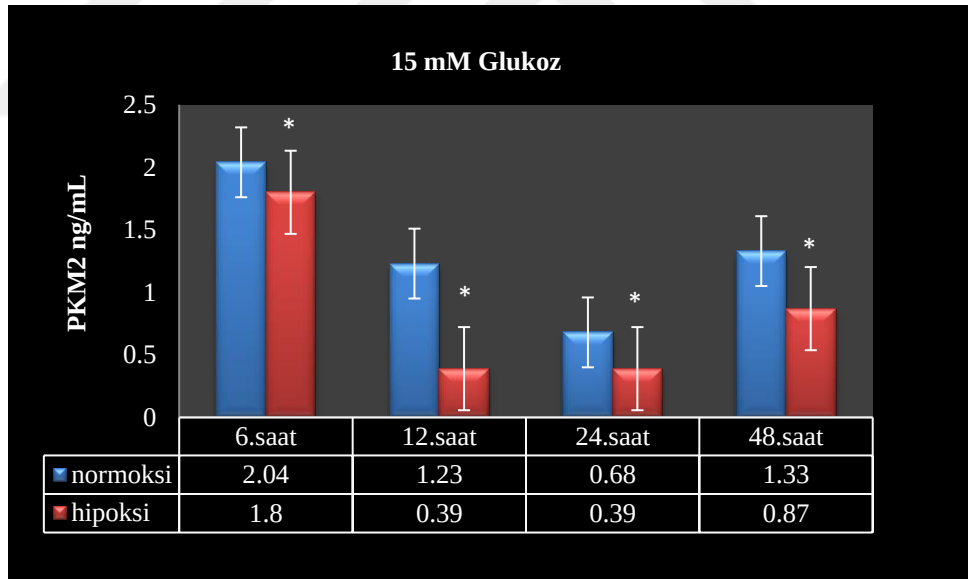
Normoksik ve hipoksik koşullara maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde PKM2 enzim miktarları karşılaştırıldığında genel olarak normoksi ortamına göre hipoksi ortamında enzim miktarının anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($p<0,001$). 0 ve 5.5 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren ortamlarda 48. saatte hipoksik ortamdaki enzim miktarı normoksik ortama göre sırasıyla 4,3 ve 10,8 kat, 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren ortamlarda ise 12. saatte sırasıyla 3,15 ve 4,8 kat azalış gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 30-33).



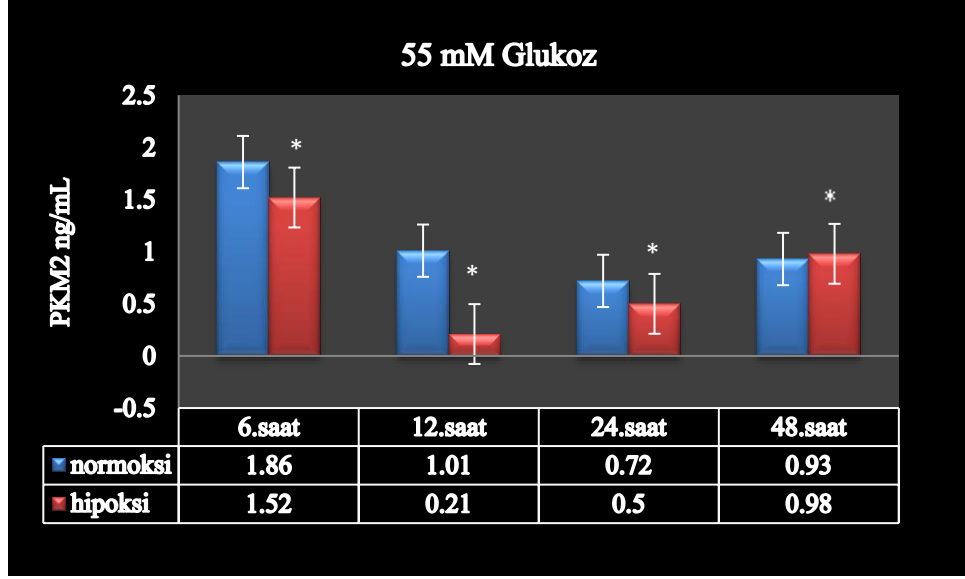
Şekil 30. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p<0,001$



Şekil 31. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 32. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 33. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında PKM2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$

4.3.2. ELISA Yönteminden Elde Edilen LDHA Sonuçları

4.3.2.1. LDHA enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağlı değişimi

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında uygulama saatlerine ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak LDHA düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 9).

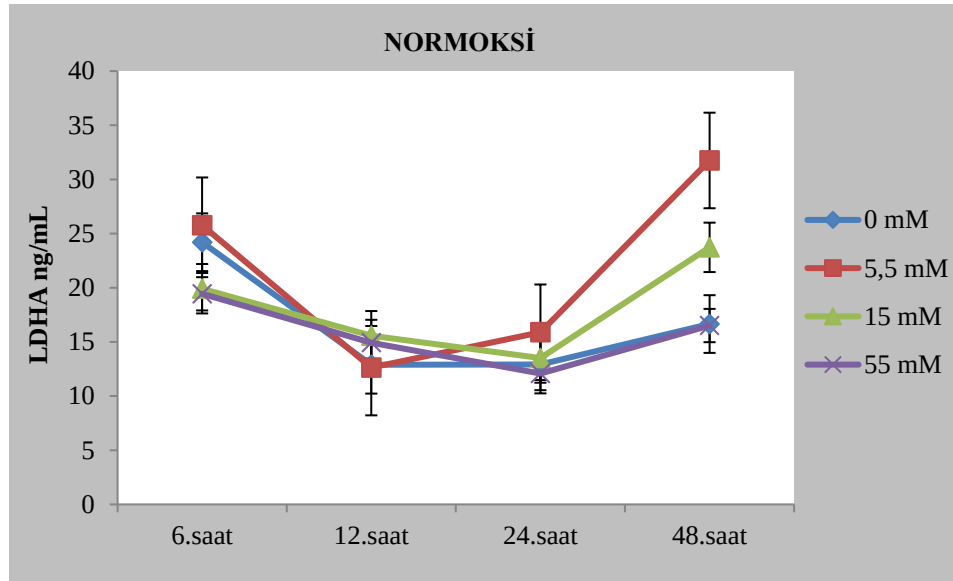
Tablo 9. Normoksik ve hipoksik ortamda MCF-7 hücrelerinin glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen LDHA enzim miktarları ve standart hata değerleri.

Normoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	24,19±0,007 ^{aA}	12,89±0,01 ^{bA}	12,92±0,01 ^{bA}	16,65±0,01 ^{cA}
5.5mM	25,77±0,01 ^{aB}	12,63±0,01 ^{bB}	15,90±0,006 ^{cB}	31,75±0,01 ^{dB}
15mM	19,9±0,01 ^{aC}	15,57±0,01 ^{bC}	13,51±0,005 ^{cC}	23,74±0,003 ^{dC}
55mM	19,45±0,01 ^{aD}	14,93±0,005 ^{bD}	12,08±0,005 ^{cD}	16,51±0,005 ^{dD}
Hipoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	15,26±0,005 ^{aA}	11,81±0,008 ^{bA}	10,94±0,005 ^{cA}	7,17±0,005 ^{dA}
5.5mM	20,46±0,01 ^{aB}	16,87±0,005 ^{bB}	11,51±0,01 ^{cB}	4,55±0,005 ^{dB}
15mM	44,24±0,01 ^{aC}	16,63±0,01 ^{bC}	14,48±0,005 ^{cC}	7,06±0,02 ^{dC}
55mM	24,43±0,02 ^{aD}	8,23±0,007 ^{bD}	7,02±0,005 ^{cD}	6,87±0,01 ^{dD}

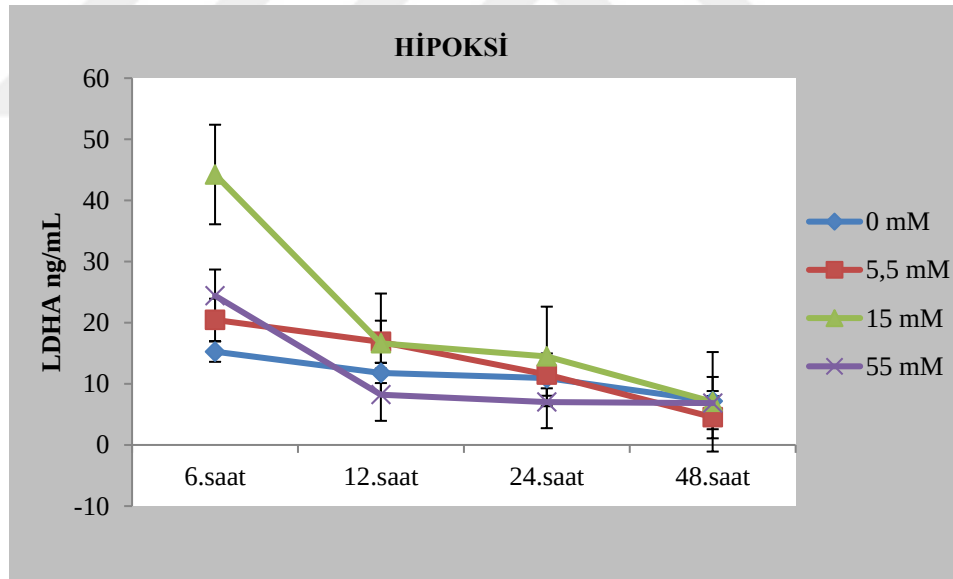
abcd aynı satırda farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

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

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında uygulama saatleri arasında LDHA düzeylerinin nasıl değiştiği incelendi. Gruplar arasında zamana bağlı farklılıklara bakıldığında, normoksik koşullarda enzim miktarlarının genel itibariyle 24.saate kadar azalış, 24. saatten 48.saate kadar ise artış gösterdiği gözlemlendi. Tüm glukoz içeren ortamlarda inkübasyon zamanına bağlı değişimler anlamlı bulundu (p<0,001). Sadece 0 mM glukoz ortamında 12. ve 24. saatler arası LDHA enzim miktarları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p>0,05). Hipoksik koşullarda ise tüm farklı glukoz konsantrasyonları için artan inkübasyon sürelerine paralel olarak enzim miktarlarında anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0,001) (Tablo 9) (Şekil 34 ve 35).



Şekil 34. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen LDHA enzim miktarı düzeyleri.

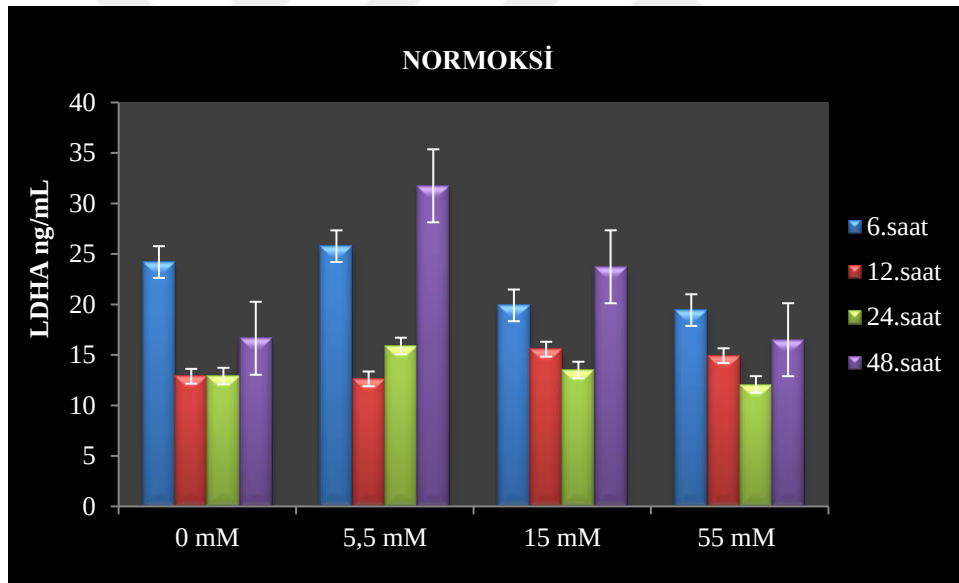


Şekil 35. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen LDHA enzim miktarı düzeyleri.

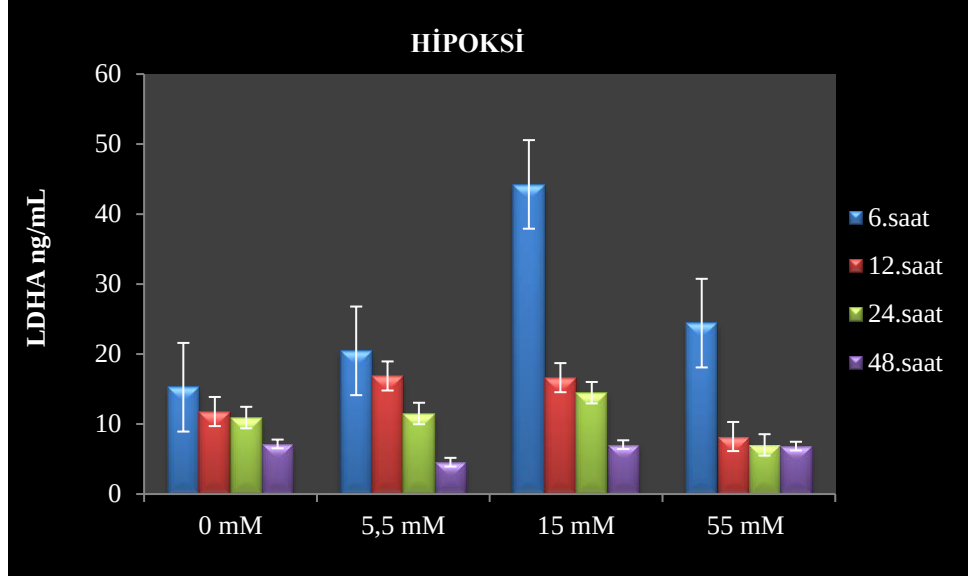
Konsantrasyon farklılığına bağlı incelenen normoksik ortamdaki MCF-7 hücrelerinin 6. ve 48. saat inkübasyon sürelerinde 5.5 mM konsantrasyonda glukoz içermeyen ortama göre

LDHA miktarının yükseldiği, 15 ve 55 mM konsantrasyonlarda ise 5.5 mM glukoz içeren ortama göre enzim miktarlarının azaldığı belirlendi ($p<0,001$). 12. saatte 15 ve 55 mM'da glukoz içermeyen ve 5.5 mM glukoz içeren ortama göre enzim miktarı artarken, 24. saatte 5.5 mM'da LDHA miktarının kontrole göre arttığı, 15 ve 55 mM'da ise tekrar kademeli bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0,001$). En yüksek enzim içeriği 48.saatte 5.5 mM glukoz ortamında belirlendi. Tüm değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 36).

Hipoksik hücrelerde 6. saat inkübasyonunda 15 mM glukoz içeren ortamda en yüksek LDHA miktarı tespit edildi. Ayrıca 6.saatte 5.5 mM glukoz içeren ortama göre 15 mM glukoz ortamında LDHA miktarının 2 kat arttığı; 6., 12. ve 24. saatlerde 55 mM glukoz ortamında 15 mM'a göre enzim miktarlarında 2 kat azalma olduğu görüldü ($p<0,001$). Tüm inkübasyon sürelerinde dozlar arası LDHA miktarları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 37).



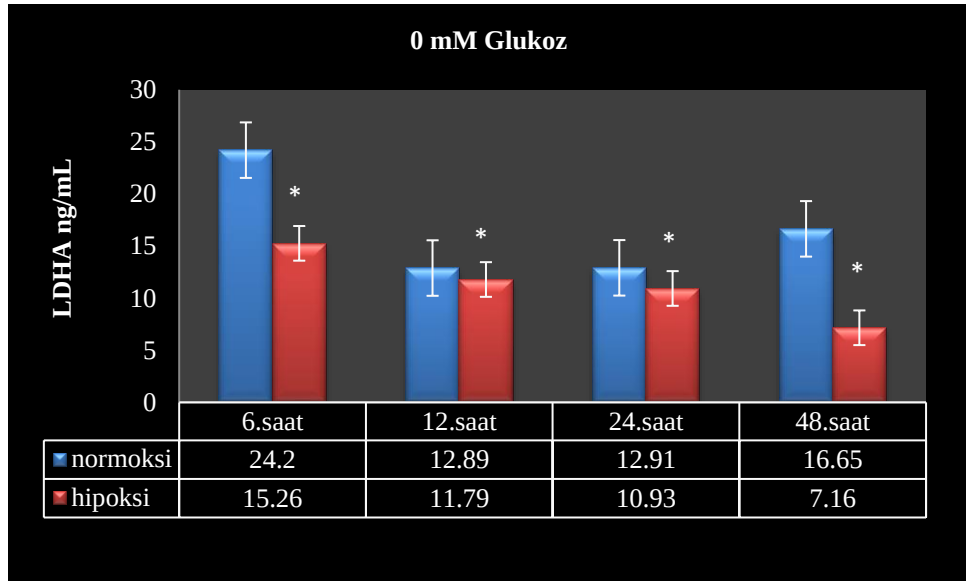
Şekil 36. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında LDHA miktarlarının karşılaştırılması.



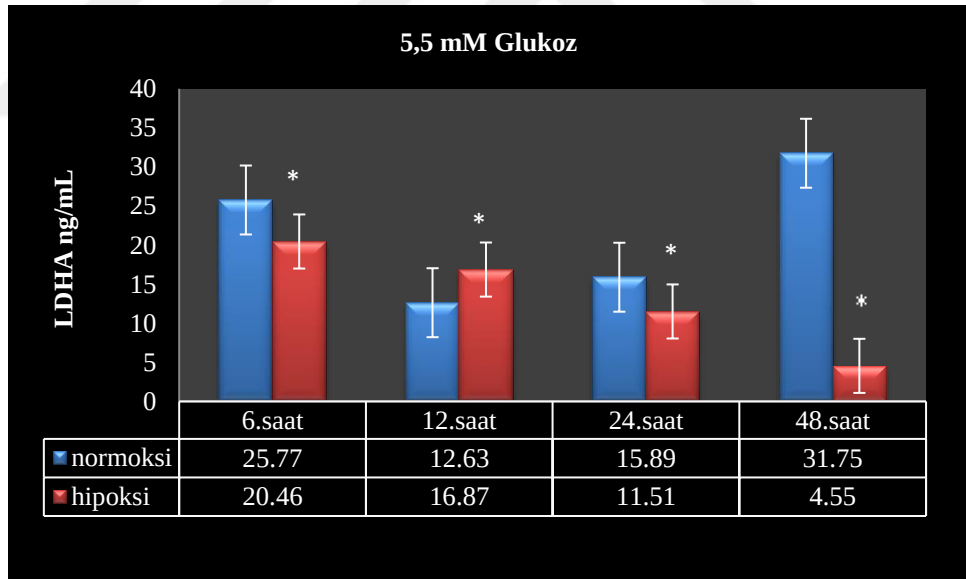
Şekil 37. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında LDHA miktarlarının karşılaştırılması.

4.3.2.2 Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki LDHA enzim miktarlarının karşılaştırılması

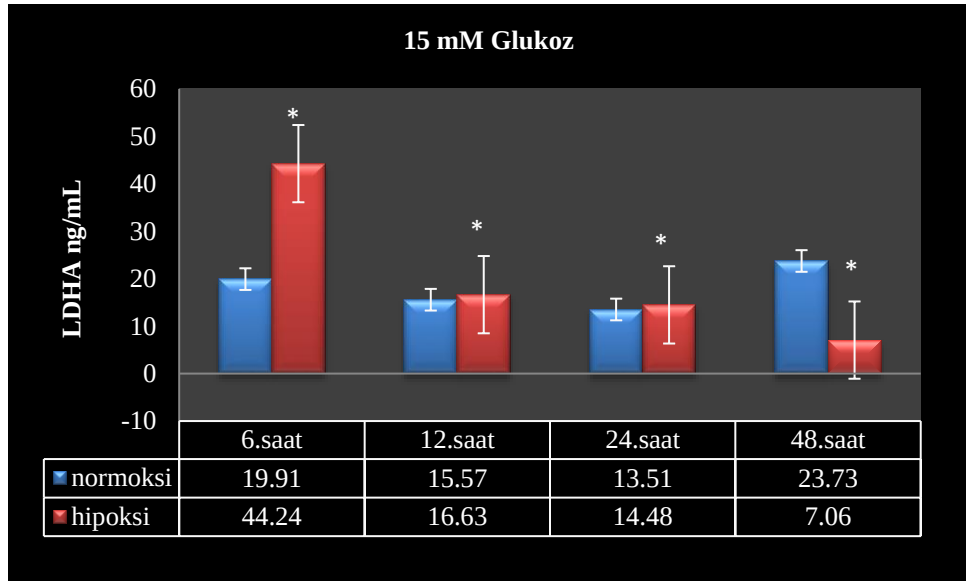
Tüm uygulanan glukoz dozları için her inkübasyon süresinde normoksik kontrole göre hipoksik koşullarda LDHA düzeylerinde önemli farklar kaydedildi ($p < 0,001$). Özellikle 48. saat inkübasyon süresinde normoksi ortamına göre hipoksi ortamında tüm konsantrasyonlar için (0, 5.5, 15 ve 55) sırasıyla 2.3, 7, 2.2 ve 2.4 kat enzim miktarlarında azalma belirlendi ($p < 0,001$). 15 mM konsantrasyonda ise 6. saatte hipoksi ortamındaki enzim miktarı normoksiye göre 2.2 kat artış sergiledi ($p < 0,001$) (Şekil 38-41).



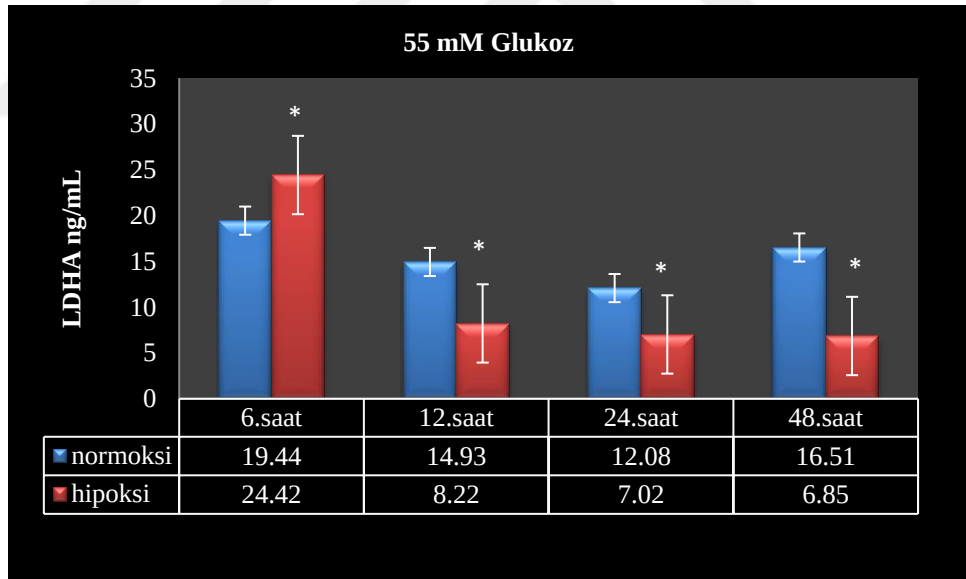
Şekil 38. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 39. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5,5 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 40. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 41. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında LDHA enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$

4.3.3 ELISA Yönteminden Elde Edilen G6PD Sonuçları

4.3.3.1 G6PD enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağlı değişimi

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında uygulama saatlerine ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak G6PD düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 10).

Tablo 10. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PD enzim miktarları ve standart hata değerleri.

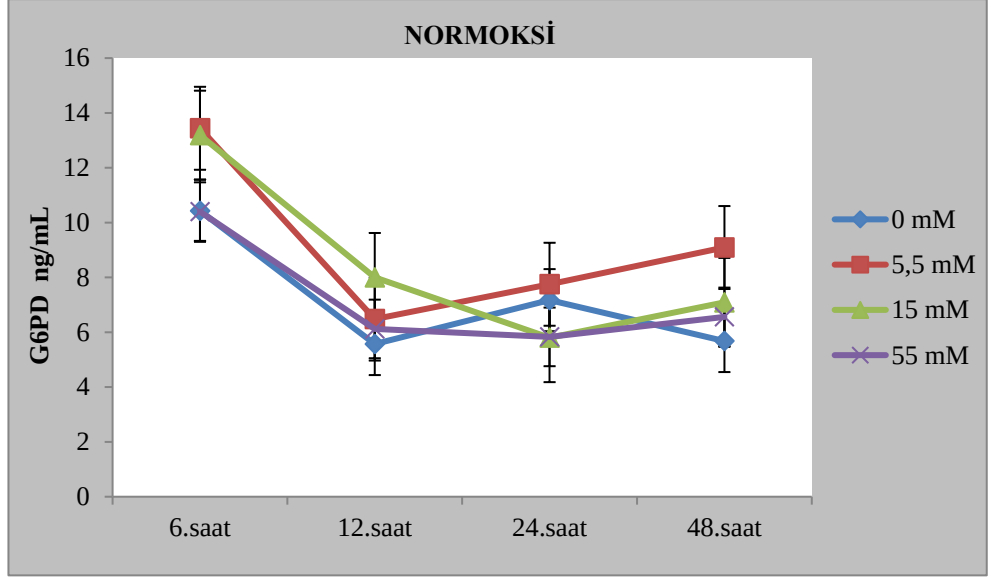
Normoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	10,44±0,01 ^{aA}	5,57±0,01 ^{bA}	7,16±0,01 ^{cA}	5,68±0,01 ^{dA}
5.5mM	13,44±0,003 ^{aB}	6,48±0,01 ^{bB}	7,75±0,01 ^{cB}	9,1±0,006 ^{dB}
15mM	13,2±0,004 ^{aC}	8,00±0,005 ^{bC}	5,84±0,055 ^{cC}	7,1±0,005 ^{dC}
55mM	10,40±0,01 ^{aD}	6,12±0,01 ^{bD}	5,84±0,007 ^{cC}	6,57±0,004 ^{dD}
Hipoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	7,09±0,005 ^{aA}	5,12±0,01 ^{bA}	4,76±0,01 ^{cA}	4,59±0,002 ^{dA}
5.5mM	9,06±0,005 ^{aB}	6,67±0,005 ^{bB}	5,42±0,005 ^{cB}	2,58±0,01 ^{dB}
15mM	8,93±0,007 ^{aC}	4,96±0,01 ^{bC}	5,52±0,005 ^{cC}	5,1±0,007 ^{dC}
55mM	8,65±0,01 ^{aD}	3,52±0,005 ^{bD}	5,77±0,005 ^{cC}	5,5±0,01 ^{dD}

abcd aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

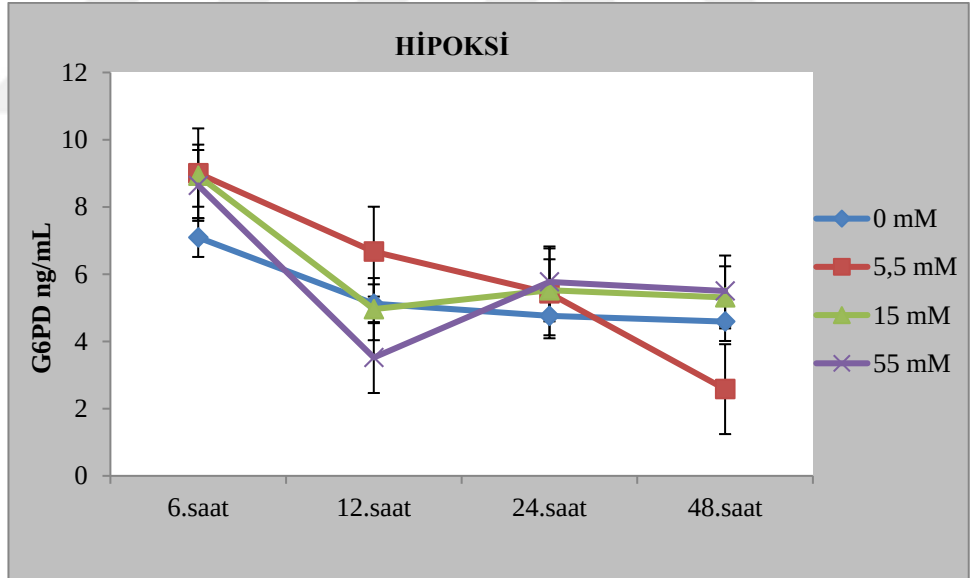
ABCD aynı sütunda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Gruplar arasında zamana bağlı farklılıklara bakıldığında, normoksik koşullarda enzim miktarlarının 12.saate kadar azalış gösterdiği, 0 mM ve 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında 12.saatten sonra, 15 mM ve 55 mM glukoz uygulama gruplarında ise 24.saatten sonra artış başladığı, tüm glukoz uygulama gruplarında inkübasyon süresine bağlı istatistiksel olarak anlamlı değişimler olduğu görüldü (p<0,001) (Tablo 10) (Şekil 42).

Hipoksik koşullarda ise tüm glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim miktarlarının 12.saate kadar azaldığı, 15 ve 55 mM glukoz uygulama gruplarında 12.saatten itibaren enzim miktarında artış, 5.5 mM glukoz uygulama grubunda ise azalış olduğu belirlendi (p<0,001). 24.saatten 48.saate kadar 0, 15 ve 55 mM glukoz uygulama gruplarında enzim miktarında çok büyük bir değişim olmadığı görülürken, 5.5 mM uygulama grubunda ise yaklaşık 2 kat azalma kaydedildi (p<0,001). (Tablo 10) (Şekil 43).



Şekil 42. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PD enzim miktarı düzeyleri.

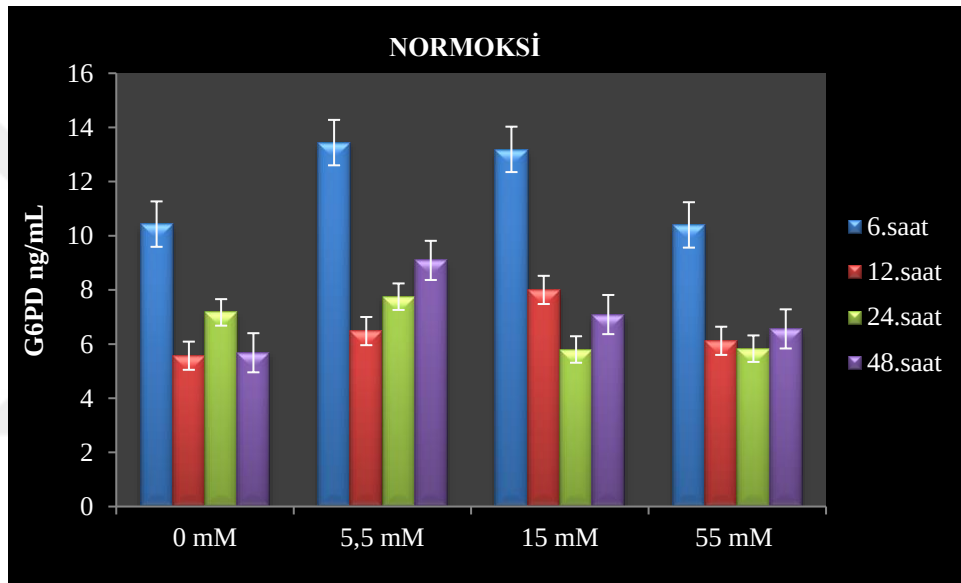


Şekil 43. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen G6PD enzim miktarı düzeyleri.

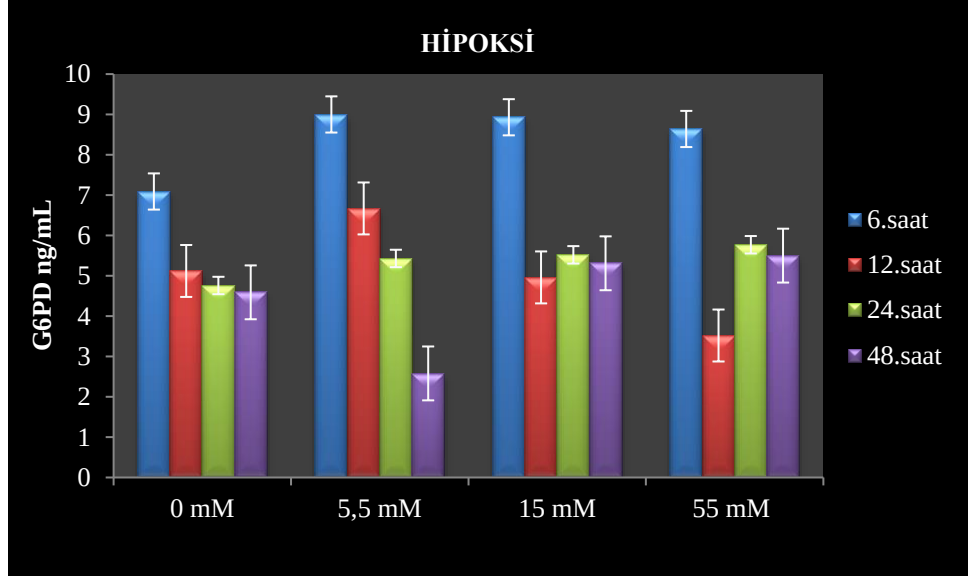
Konsantrasyonlar arası farklılıklara bakıldığında normoksik ortamda 6. ve 12.saatte 5.5 ve 15 mM'da 0 mM'a göre enzim miktarlarında artış olduğu, 55 mM'da tekrar azaldığı; 24.

saatte glukozsuz ve 5.5 mM glukoz içeren ortamlarda enzim miktarlarının aynı düzeyde seyrettiği, yüksek dozlarda ise bu miktarların azaldığı; 48.saatte 5.5 mM'da kontrole göre G6PD düzeylerinde artış olup 15 ve 55 mM'da düşmeye başladığı görüldü. 24. saatte yüksek dozlar arasındaki değişim dışında, tüm farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$) (Şekil 44).

Hipoksik ortamda konsantrasyona bağlı incelediğimiz enzim miktarlarının 6.,12. ve 24. saatte kontrole göre 5.5 mM'da artış, 48. saatte ise 2 kat azalma olduğu, 6. ve 12. saatte yüksek dozda glukoz içeren ortamlarda enzim miktarlarında azalma, 48. saatte ise artış gerçekleştiği görüldü. 6., 24. ve 48. saatlerin yüksek dozlu uygulamalarında enzim miktarları hemen hemen aynıdır (Şekil 45).



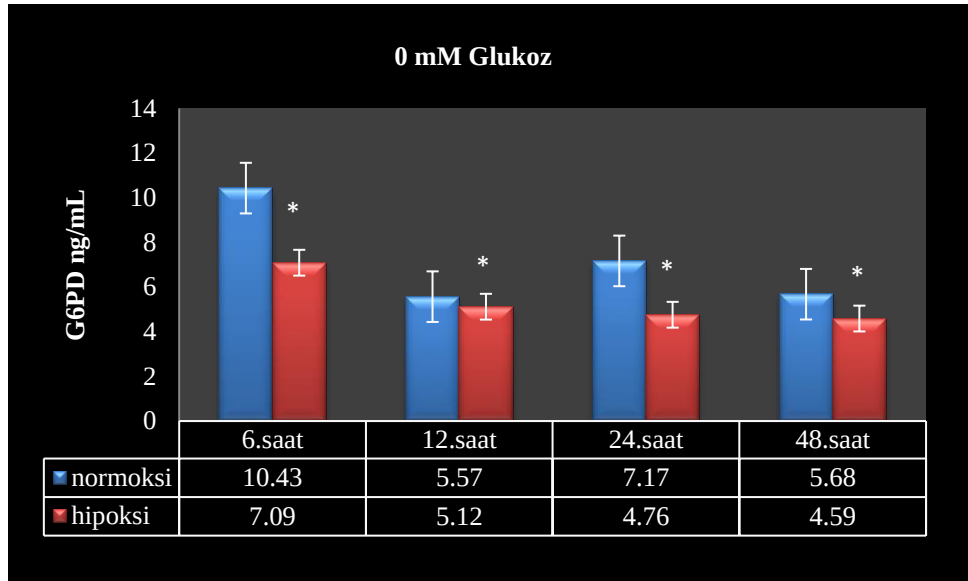
Şekil 44. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında G6PD miktarlarının karşılaştırılması.



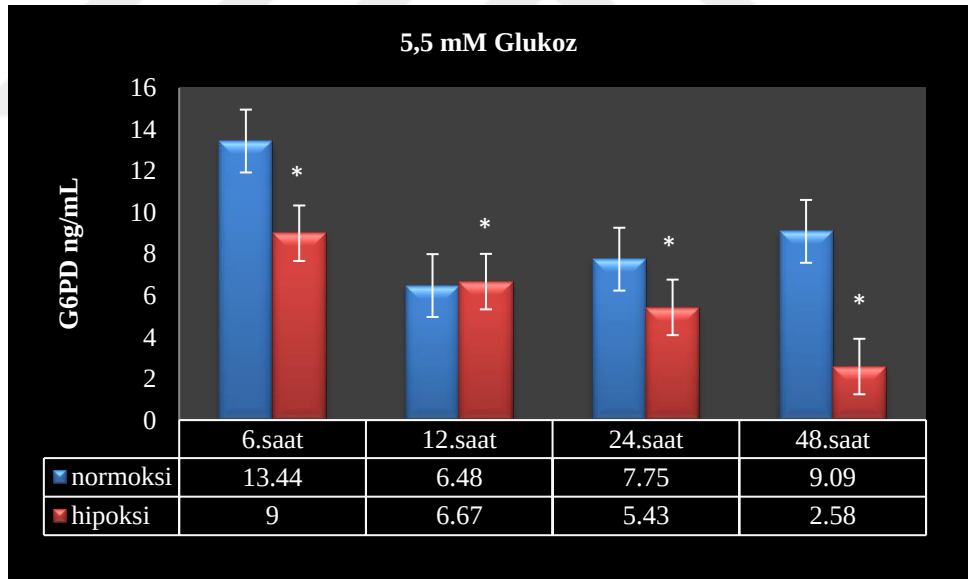
Şekil 45. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında G6PD miktarlarının karşılaştırılması.

4.3.3.2 Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki G6PD enzim miktarlarının karşılaştırılması

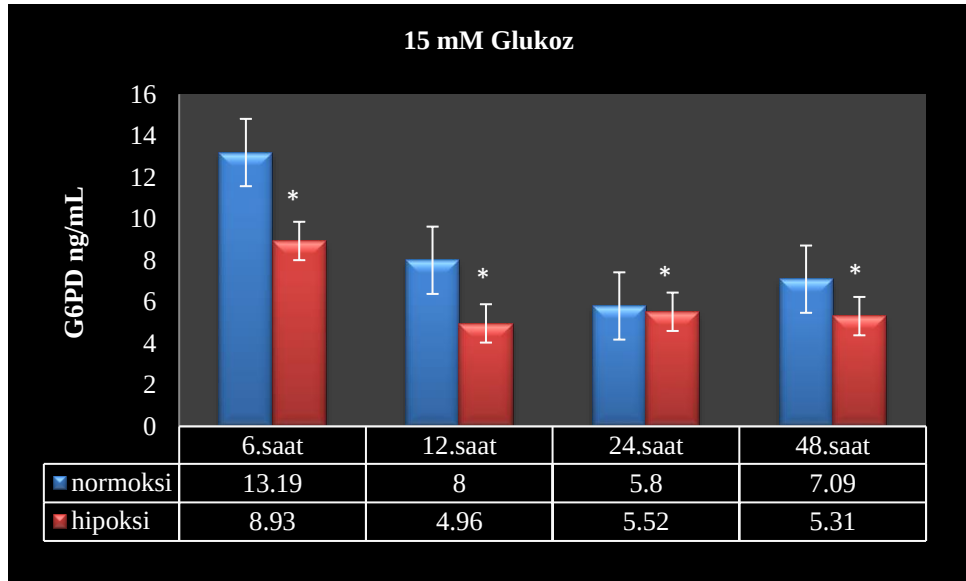
Tüm uygulanan glukoz dozları için her inkübasyon süresinde normoksik kontrole göre hipoksik koşullarda G6PD enzim düzeylerinde önemli azalmalar kaydedildi ($p < 0,001$). 0 ve 5.5 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren ortamlarda 12. saatte enzim miktarlarında çok büyük farklar görülmezken, 15 ve 55 mM glukoz içeren ortamlarda normoksiye göre hipoksiste sırasıyla 1.6 ve 1.7 kat azalma tespit edildi ($p < 0,001$). Diğerleri ile kıyaslandığında enzim miktarındaki en büyük azalma (3,5 kat) normoksiye kıyasla hipoksiste 5.5 mM glukoz içeren ortamda 48. saatte görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 46-49).



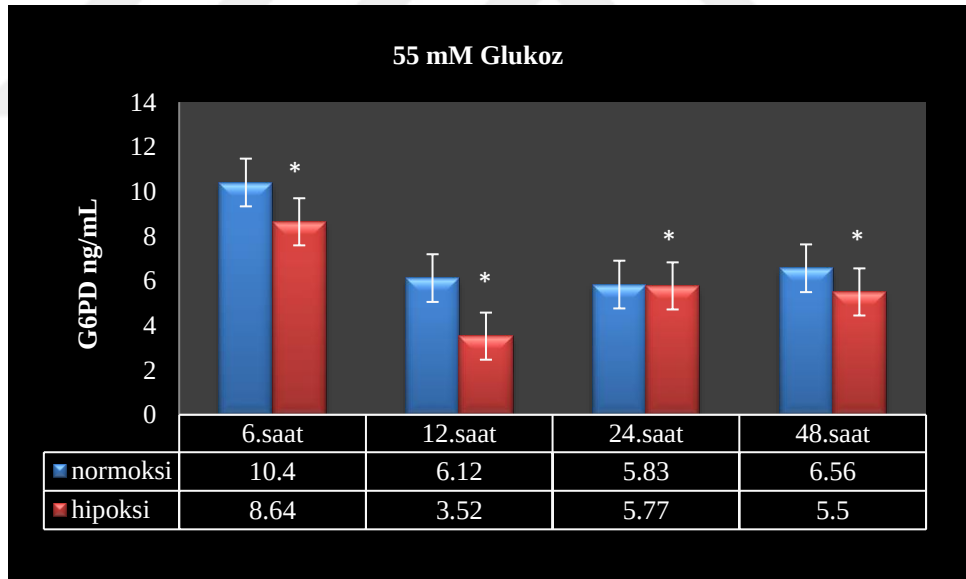
Şekil 46. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 47. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 48. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 49. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında G6PD enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$

4.3.4 ELISA Yönteminden Elde Edilen HK2 Sonuçları

4.3.4.1 HK2 enzim miktarının zamana göre değişimi

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında uygulama saatlerine ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak HK2 düzeylerinin (pg/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 11).

Tablo 11. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK2 enzim miktarları ve standart hata değerleri.

Normoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	206±0,55 ^{aA}	208±0,56 ^{aA}	212±0,71 ^{aA}	210±0,55 ^{aA}
5.5mM	196±0,59 ^{aB}	160±0,55 ^{bB}	118±0,53 ^{cB}	126±0,57 ^{dB}
15mM	92±0,54 ^{aC}	246±0,57 ^{bC}	62±0,52 ^{cC}	240±0,59 ^{bC}
55mM	154±0,54 ^{aD}	288±0,58 ^{bD}	126±0,61 ^{cD}	232±0,78 ^{dD}
Hipoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	130±0,58 ^{aA}	278±0,54 ^A	106±0,58 ^{cA}	198±0,77 ^{dA}
5.5mM	102±0,55 ^{aB}	134±0,55 ^{bB}	208±0,58 ^{cB}	196±0,66 ^{dA}
15mM	130±0,45 ^{aA}	66±0,54 ^{bC}	188±0,57 ^{cC}	146±0,56 ^{dB}
55mM	236±0,56 ^{aC}	100±0,50 ^{bD}	152±0,51 ^{cD}	250±0,51 ^{dC}

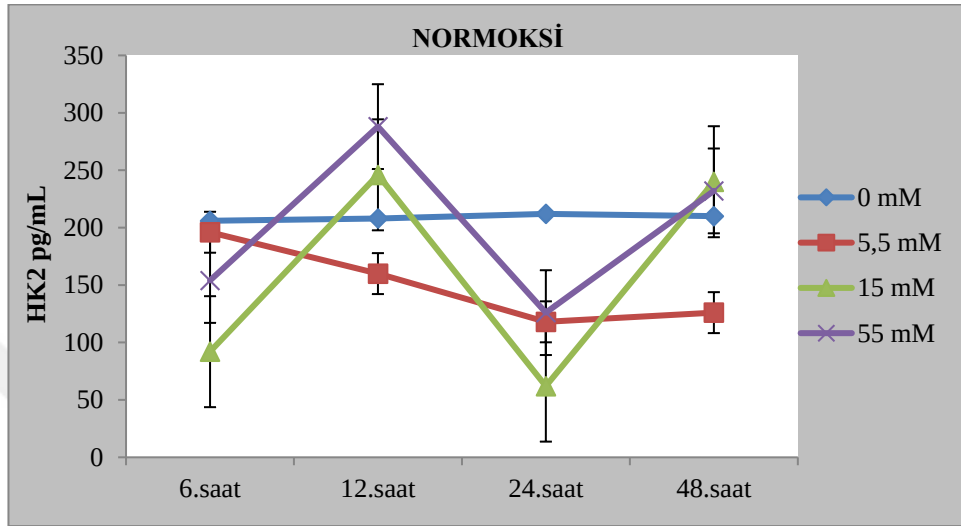
abcd aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

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

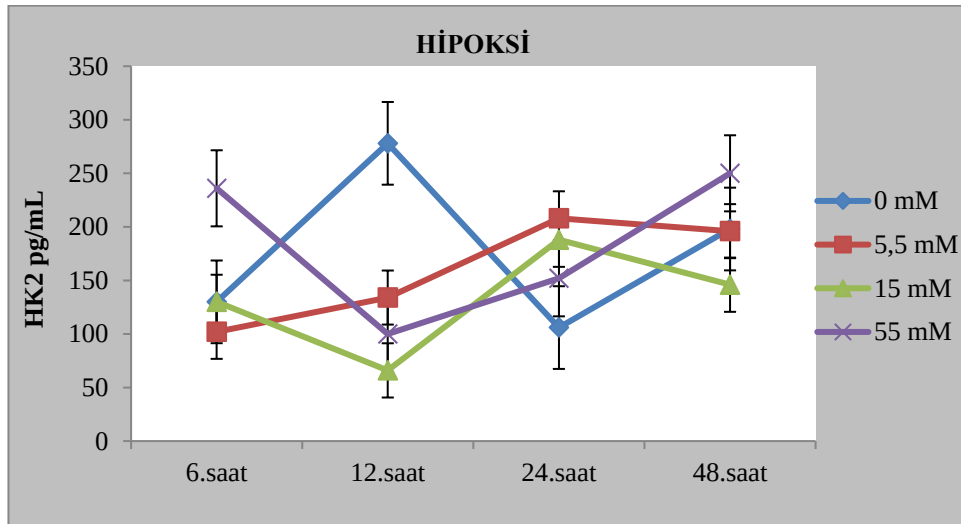
Gruplar arasında zamana bağlı farklılıklara bakıldığında, normoksik koşullarda enzim miktarlarının 0 mM konsantrasyonunda glukoz içeren ortamda inkübasyona bağlı anlamlı bir değişim göstermediği (p>0,05); 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren uygulama gruplarında genel itibariyle enzim miktarında 6. saatten 12. saate kadar artış, 12. saatten 24. saate kadar azalış, 24. saatten 48.saate kadar ise tekrar bir artış olduğu belirlendi (p<0,001). 15 mM konsantrasyonunda glukoz içeren uygulama gruplarında 12. ve 48. saatler arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi (p>0,001). 5.5 mM konsantrasyonunda glukoz içeren ortamda 6. saatten 24. saate kadar enzim miktarında anlamlı bir azalma olduğu (p<0,001), 24. saatten 48.saate kadar ise enzim miktarının tekrar yükseldiği kaydedildi (p<0,001) (Tablo 11) (Şekil 50).

Hipoksik koşullarda ise normoksiden farklı olarak 0 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim miktarlarının 6.saatten 12.saate kadar artış, 12.saatten 24. saate kadar azalış ve 24.

saatten 48.saate kadar tekrar artış gösterdiği belirlendi ($p<0,001$). 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında ise 6.saatten 24.saate kadar enzim miktarında kademeli bir artış gerçekleştiği görüldü ($p<0,001$). 15 ve 55 mM glukoz uygulama gruplarında 6. saatten 12.saate kadar enzim miktarlarında bir azalış, 12. saatten 48.saate kadar ise tekrar bir artış izlendi ($p<0,001$). (Tablo 11) (Şekil 51).



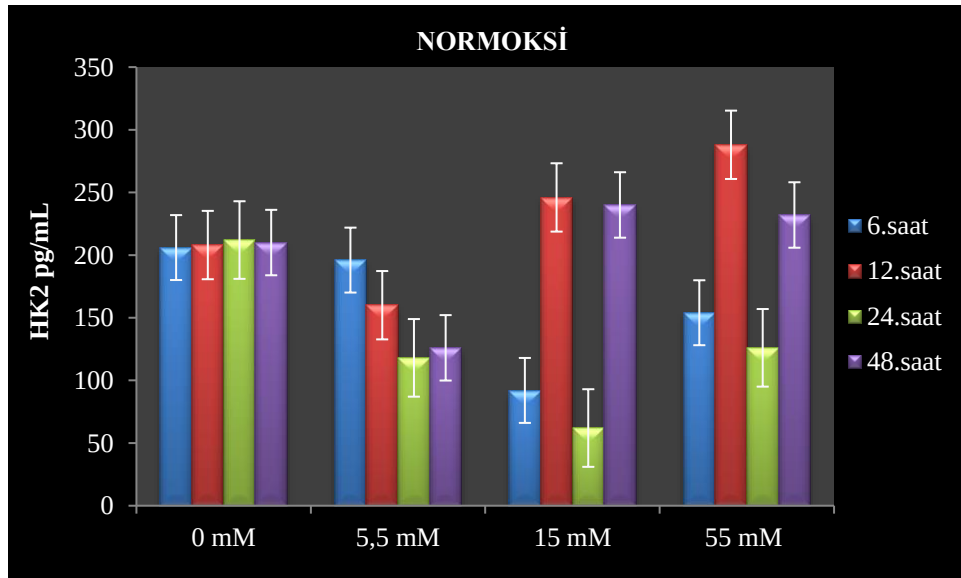
Şekil 50. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK2 enzim miktarı düzeyleri.



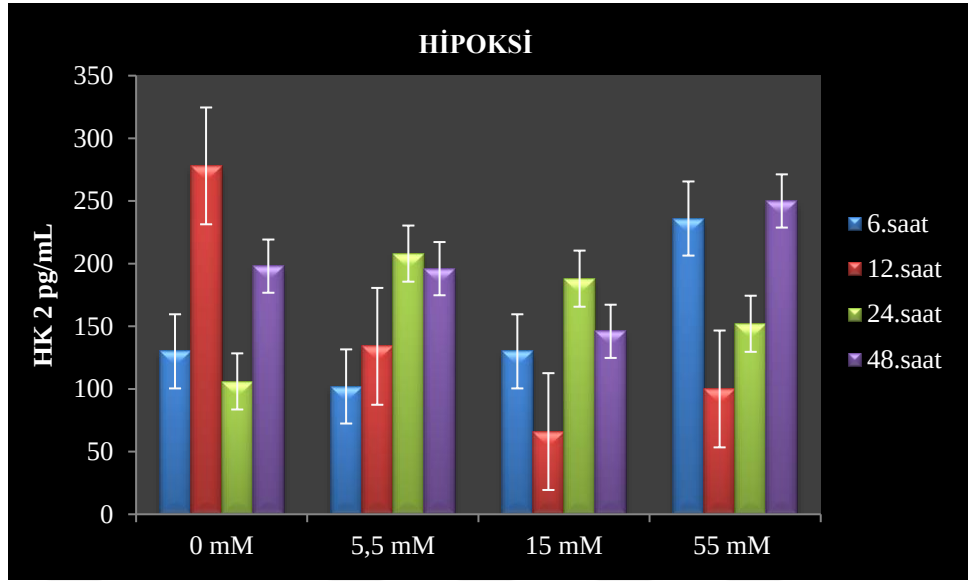
Şekil 51. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen HK2 enzim miktarı düzeyleri.

Konsantrasyon farklılığına bağlı incelenen normoksik ortamdaki MCF-7 hücrelerinin 5.5 mM glukoz içeren ortamda glukozsuz ortama göre tüm inkübasyon sürelerinde HK2 düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu, 15 mM glukoz ihtiva eden ortamda 6. ve 24. saatlerde bu anlamlı azalmanın devam ettiği, 12. ve 48. saatlerde ise 0 ve 5.5 mM ortamlarına göre enzim miktarının yükseldiği görüldü ($p<0,001$). En yüksek enzim içeriği ise 12.saat de 55 mM glukoz ortamında belirlendi. Tüm değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 52).

Hipoksik hücrelerde 0 mM glukoz ortamında 12. saat inkübasyonunda en yüksek HK2 miktarı tespit edildi. 6. ve 12. saatlerde 5.5 mM glukoz ortamında 0 mM'a göre enzim miktarlarında anlamlı bir azalma, 24. saatte ise artış görüldü ($p<0,001$). 15 mM glukoz ortamında 5.5 mM glukoz içeren ortama göre 6. saatte enzim miktarında artış olurken, diğer inkübasyon sürelerinde hem glukozsuz ortamlara hem de 5.5 mM glukoz içeren ortamlara göre enzim düzeyleri anlamlı ölçüde düştü ($p<0,001$). 55 mM glukoz ortamında 6. ve 48. saatlerde tüm konsantrasyonlara göre önemli ölçüde enzim miktarlarında bir yükselme olup, 15 mM glukoz ortamına göre 12. saatte anlamlı bir artış, 24. saatte ise anlamlı bir azalış kaydedildi ($p<0,001$) (Şekil 53).



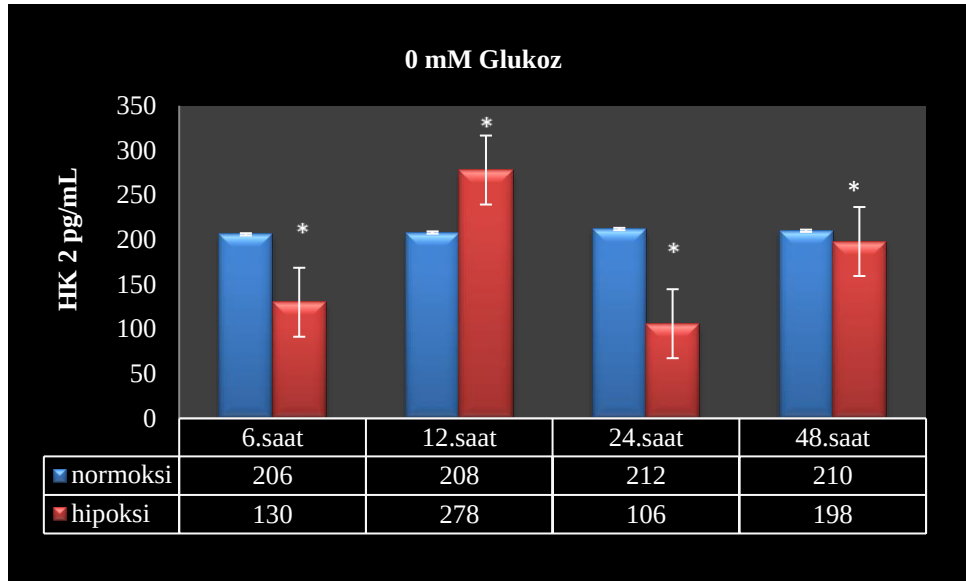
Şekil 52. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında HK2 miktarlarının karşılaştırılması.



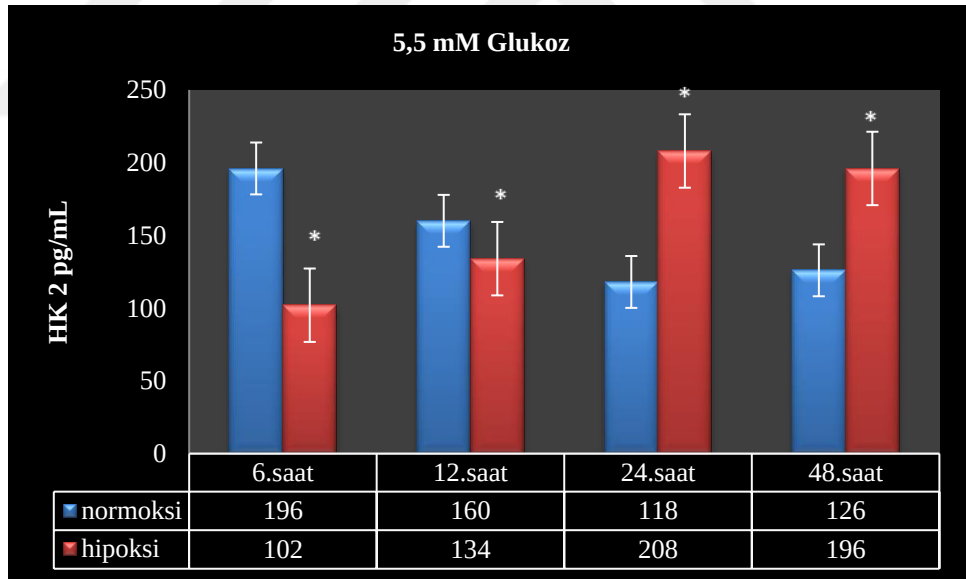
Şekil 53. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında HK2 miktarlarının karşılaştırılması.

4.3.4.2 Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki HK2 enzim miktarlarının karşılaştırılması

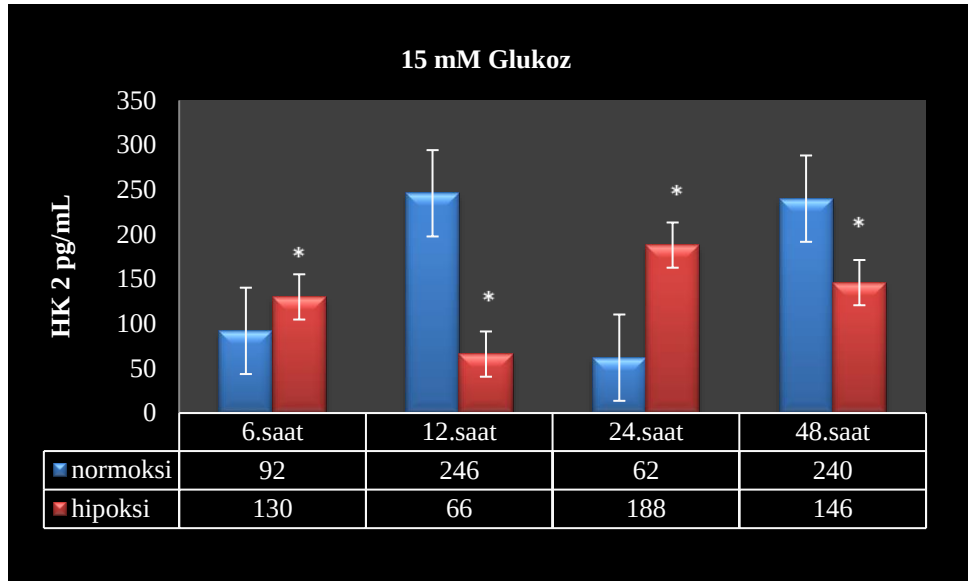
Tüm uygulanan glukoz dozları için her inkübasyon süresinde normoksik kontrole göre hipoksik koşullarda HK2 enzim düzeylerinde önemli değişimler kaydedildi ($p < 0,001$). Normoksiye göre hipoksiste 0 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren ortamlarda 6. saatte 2 kat, 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında 12. saatte sırasıyla 3,7 ve 2,8 kat enzim miktarlarında azalma; 15 mM konsantrasyonda 24. Saatte ise enzim miktarlarında 3 kat artış görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 54-57).



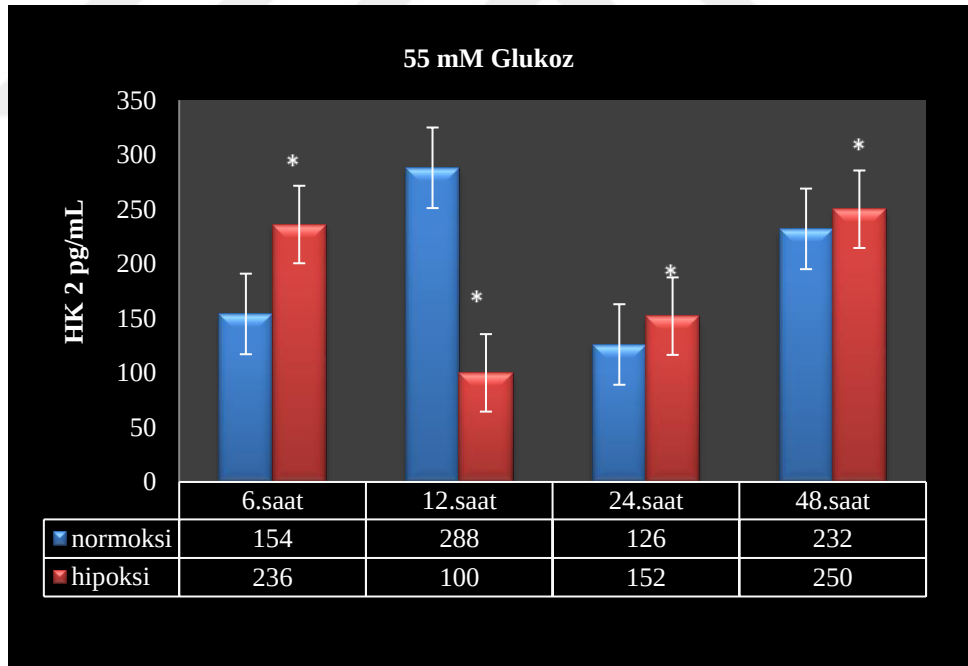
Şekil 54. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 55. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5,5 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 56. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 57. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında HK2 enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$

4.3.5 ELISA Yönteminden Elde Edilen PFKP Sonuçları

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında uygulama saatlerine ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak PFKP düzeylerinin (ng/mL) nasıl değiştiği incelendi (Tablo 12).

4.3.5.1 PFKP enzim miktarının zamana ve konsantrasyona bağlı değişimi

Tablo 12. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFKP enzim miktarları ve standart hata değerleri.

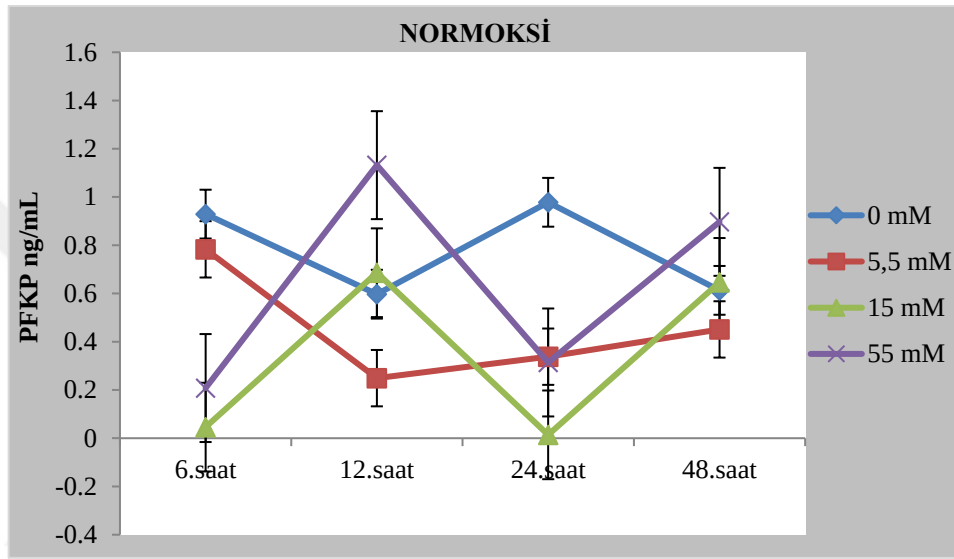
Normoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	0,92±0,01 ^{aA}	0,59±0,01 ^{bA}	0,97±0,01 ^{aA}	0,61±0,01 ^{cA}
5.5mM	0,78±0,01 ^{aB}	0,24±0,02 ^{bB}	0,33±0,06 ^{cB}	0,45±0,07 ^{dB}
15mM	0,04±0,005 ^{aC}	0,68±0,01 ^{bC}	0,01±0,01 ^{aC}	0,64±0,01 ^{bA}
55mM	0,20±0,04 ^{aD}	1,13±0,08 ^{bD}	0,31±0,005 ^{cB}	0,89±0,03 ^{dC}
Hipoksi	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	0,82±0,01 ^{aA}	0,62±0,06 ^{bA}	0,67±0,01 ^{bA}	0,23±0,01 ^{cA}
5.5mM	0,24±0,04 ^{aB}	0,25±0,01 ^{aB}	0,48±0,01 ^{bB}	0,67±0,03 ^{cB}
15mM	0,68±0,01 ^{aC}	0,02±0,08 ^{bC}	0,79±0,005 ^{cC}	0,66±0,01 ^{aB}
55mM	0,57±0,01 ^{aD}	0,22±0,01 ^{bB}	0,39±0,01 ^{cD}	0,77±0,01 ^{dC}

abcd aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

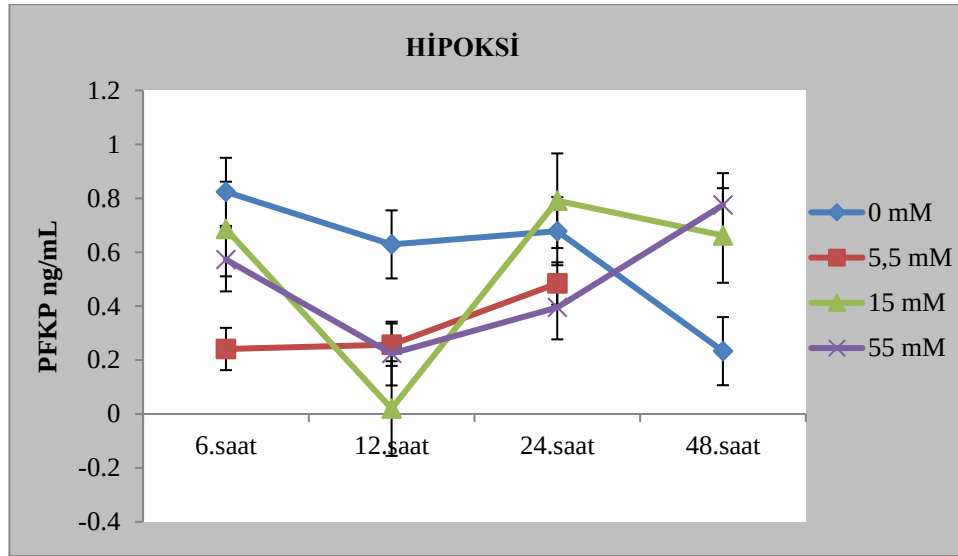
ABCD aynı sütunda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

Gruplar arasında zamana bağlı farklılıklara bakıldığında, normoksik koşullarda enzim miktarlarının 0 ve 15 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren ortamlarda 6.ve 24. saatler arası anlamlı bir değişim göstermediği (p>0,05), hem normoksik hem de hipoksik koşullarda 0 mM'da 6.saatten 12.saate kadar enzim miktarının düştüğü, 12. saatten 24.saate kadar ise yükseldiği ve 24. saatten 48. saate kadar tekrar azalış sergilediği görüldü. 5.5 mM konsantrasyonunda enzim miktarında 6. saatten 12. saate kadar azalış, 12. saatten 48. saate kadar ise artış belirlendi. 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren uygulama gruplarında PFKP düzeylerinde 6. saatten 12. saate kadar artış, 12. saatten 24. saate kadar azalış, 24. saatten 48.saate kadar ise tekrar bir artış olduğu kaydedildi (p<0,001) (Tablo 12) (Şekil 58).

Hipoksik koşullarda ise 0 mM glukoz uygulama gruplarında 12. ve 24. saatler arası; 5.5 mM konsantrasyon gruplarında 6. ve 12. saatler arası ve 15 mM glukoz gruplarında ise 6. ve 48. saatler arası farklar anlamlı bulunamadı ($p>0,05$). Hipokside 5.5 ve 15 mM glukoz ortamlarında 12. saatten sonra PFKP miktarlarında artışlar görüldü. 55 mM glukoz ortamlarında tüm inkübasyon süreleri arası enzim miktarları arasındaki farklar anlamlı olup, 6. saatten 12. saate kadar PFKP düzeyinde düşme ve 12. saatten 48. saate geçen zamanda yükselme belirlendi ($p<0,001$) (Tablo 12) (Şekil 59).



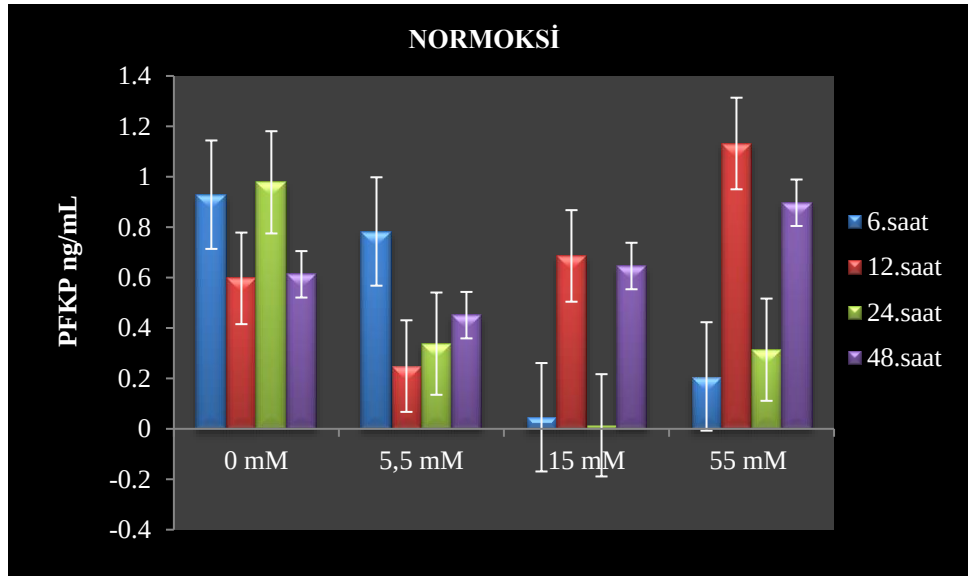
Şekil 58. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFKP enzim miktarı düzeyleri.



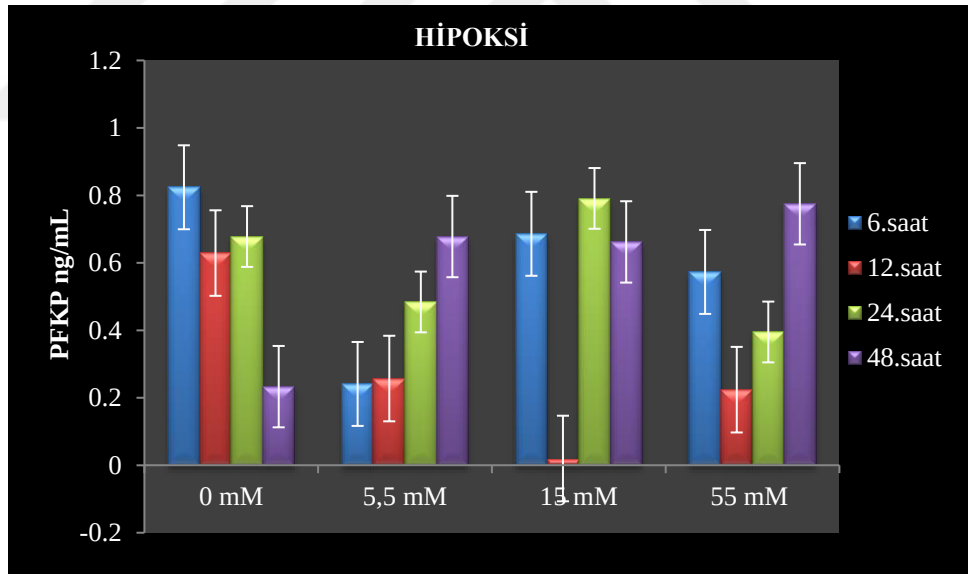
Şekil 59. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen PFKP enzim miktarı düzeyleri.

Konsantrasyon farklılığına bağlı incelenen normoksik ortamdaki kanser hücrelerinin 5.5 mM glukoz içeren ortamda 0 mM glukoz içeren ortama göre tüm inkübasyon sürelerinde PFKP düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu, 15 mM glukoz ihtiva eden ortamda 6. ve 24. saatlerde bu anlamlı azalmanın şiddetli şekilde devam ettiği ($p<0,001$), 12. ve 48. saatlerde ise 0 ve 5.5 mM ortamlarına göre enzim miktarlarının yükseldiği görüldü. 55 mM'da her inkübasyon süresi için enzim miktarları 15 mM'a göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,001$). En yüksek enzim içeriği ise 12.saat de 55 mM glukoz ortamında belirlendi (Şekil 60).

Hipoksik hücrelerde 0 mM glukoz ortamında 6. saat inkübasyonunda en yüksek PFKP miktarları tespit edildi. 6., 12. ve 24. saatlerde 5.5 mM glukoz ortamında 0 mM'a göre enzim miktarlarında anlamlı bir azalma, 48. saatte ise anlamlı bir artış görüldü ($p<0,001$). 15 mM glukoz ortamında kontrole göre 12.saat hariç tüm inkübasyon sürelerinde enzim seviyesinde anlamlı bir yükselme belirlenmekle beraber, 6. ve 24. saatlerde 5.5 mM glukoz ortamına göre anlamlı bir artış olduğu ($p<0,001$), 48. saatte ise bu ortama göre anlamlı bir fark olmadığı kaydedildi ($p>0,05$). 55 mM'da 6. ve 24. saatlerde tüm diğer konsantrasyonlara göre PFKP düzeyleri önemli bir azalma göstermiş, 12. ve 24. saatte ise 15 mM glukoz ortamlarına göre enzim miktarları istatistiksel olarak artmıştır ($p<0,001$) (Şekil 61).



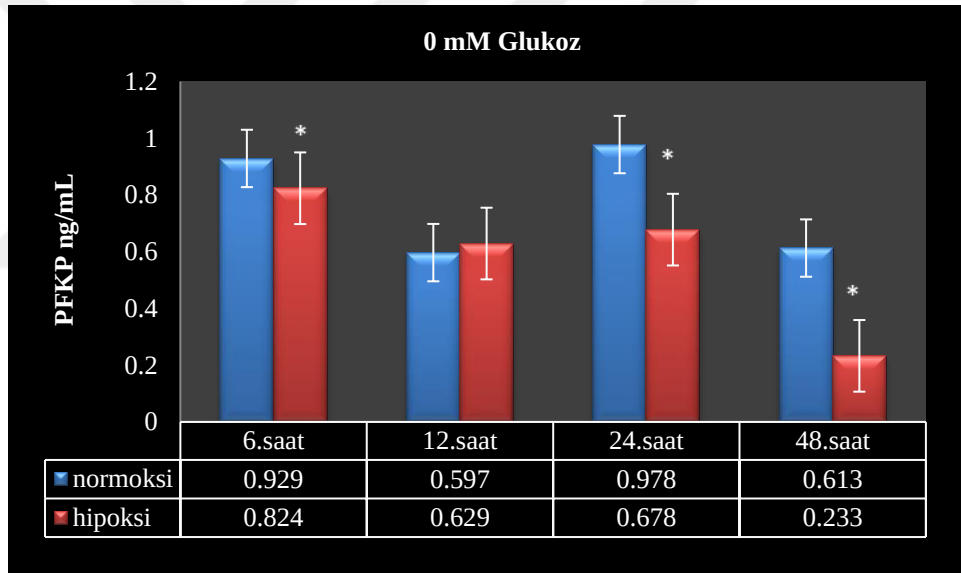
Şekil 60. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PFKP miktarlarının karşılaştırılması.



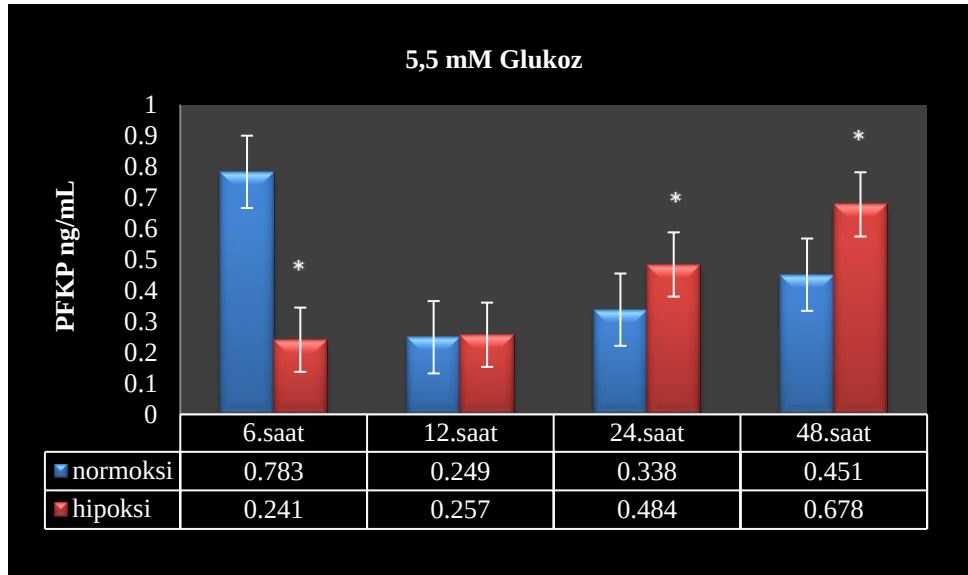
Şekil 61. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi ortamında 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında PFKP miktarlarının karşılaştırılması.

4.3.5.2 Aynı konsantrasyonlu glukoz uygulamalarında normoksik ve hipoksik ortamdaki PFKP enzim miktarlarının karşılaştırılması

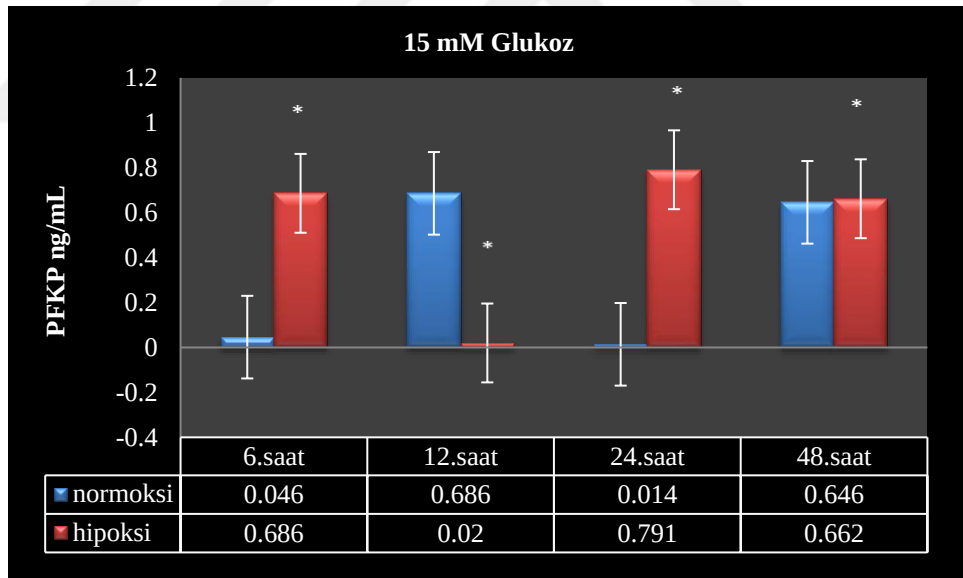
12. saat inkübasyon sürelerinde 0 ve 5.5 mM glukoz içeren normoksi ve hipoksi ortamları arasında istatistiksel önemli bir fark görülmezken ($P>0,05$), diğer tüm uygulanan glukoz dozları için her inkübasyon süresinde normoksik kontrole göre hipoksik koşullarda PFKP enzim düzeylerinde önemli değişimler kaydedildi ($P<0,001$). Normoksiye göre hipoksiste 6. saat inkübasyon süresinde 0 ve 5.5 mM konsantrasyonlarında sırasıyla 1,12 ve 3,24 kat azalış, 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında ise sırasıyla 14,91 ve 2,75 kat artış belirlendi ($P < 0,001$). 15 ve 55 mM glukoz içeren ortamlarda 12. saatlerde ise 34,2 ve 5,05 kat azalış, 15 mM glukoz ihtiva eden ortamda 24. saatte ise normoksiye göre hipoksiste 56,5 kat enzim miktarında artış olduğu olduğu kaydedildi ($P < 0,001$) (Şekil 62-65).



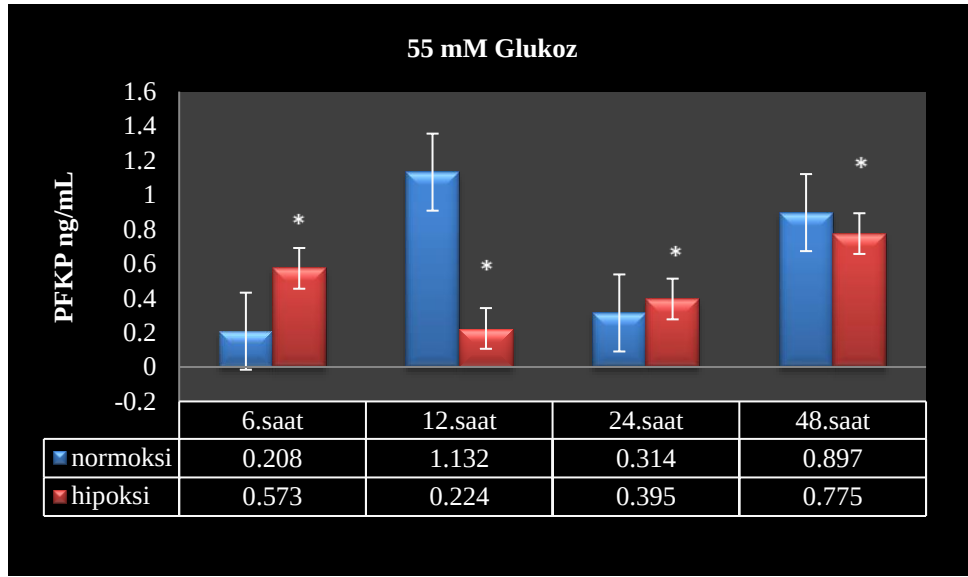
Şekil 62. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 0 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 63. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 64. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 65. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında PFKP enzim düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,001$

4.4 Kolorimetrik Laktat Tayini

4.4.1 Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Zamana Bağlı Hücre Dışı Laktat Salınımı

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında inkübasyon sürelerinde ekstrasellüler laktat düzeylerinin nasıl değiştiği incelendi (Tablo 13).

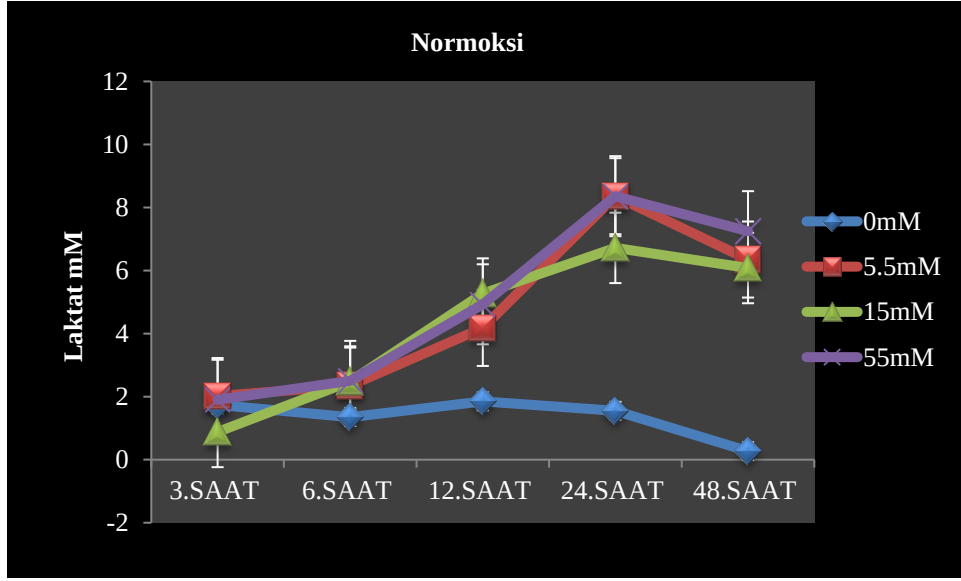
Tablo 13. Normoksik ve hipoksik ortamda glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen ekstrasellüler laktat miktarları ve standart hata değerleri.

Normoksi	3.Saat	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	1,74±0,01 ^{aA}	1,35±0,01 ^{aA}	1,85±0,01 ^{aA}	1,55±0,01 ^{aA}	0,27±0,016 ^{aA}
5.5mM	2,02±0,01 ^{aA}	2,35±0,01 ^{abA}	4,18±0,01 ^{abA}	8,36±0,005 ^{cB}	6,35±0,01 ^{bcB}
15mM	0,88±0,01 ^{aA}	2,48±0,01 ^{abA}	5,27±0,01 ^{bcA}	6,72±0,01 ^{cB}	6,08±0,005 ^{bcB}
55mM	1,9±0,005 ^{aA}	2,5±0,009 ^{aA}	4,93±0,01 ^{abA}	8,36±0,01 ^{bB}	7,25±0,005 ^{bB}
Hipoksi	3.Saat	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	1,32±0,007 ^{aA}	2±0,204 ^{aA}	1,59±0,005 ^{aA}	1,96±0,006 ^{aA}	1,08±0,214 ^{aA}
5.5mM	1,92±0,013 ^{aA}	2,17±0,144 ^{aA}	4,15±0,03 ^{aAB}	10,04±1,534 ^{bB}	9,48±2,083 ^{bB}
15mM	0,68±0,001 ^{aA}	2,69±0,01 ^{abA}	5,85±0,01 ^{bB}	6,26±0,01 ^{bB}	13,01±4,124 ^{cBC}
55mM	1,97±0,005 ^{aA}	2,72±0,008 ^{aA}	4,84±0,106 ^{aB}	9,78±0,849 ^{bB}	15,04±6,146 ^{cC}

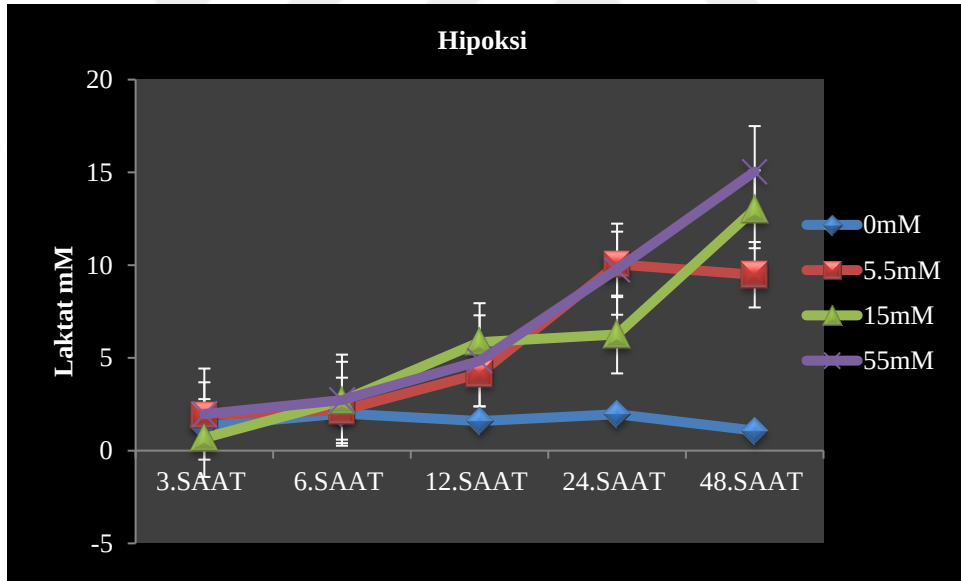
abcd aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

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

Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda glukoz bulunmayan ortamda inkübe edilen meme kanser hücreleri dışında diğer uygulama gruplarında genel olarak hücre dışına laktat salınımı zamana bağlı olarak artış gösterdi. Her iki ortamda da 15 mM glukoz uygulama grubu için 12., 24. ve 48. saatlerde, 5.5 ve 55 mM glukoz grupları için ise 24. ve 48. saatlerde görülen laktat artışı ve azalışlarının 3.saate göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu kaydedildi (p<0,001) (Tablo 13) (Şekil 66 ve 67).



Şekil 66. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.

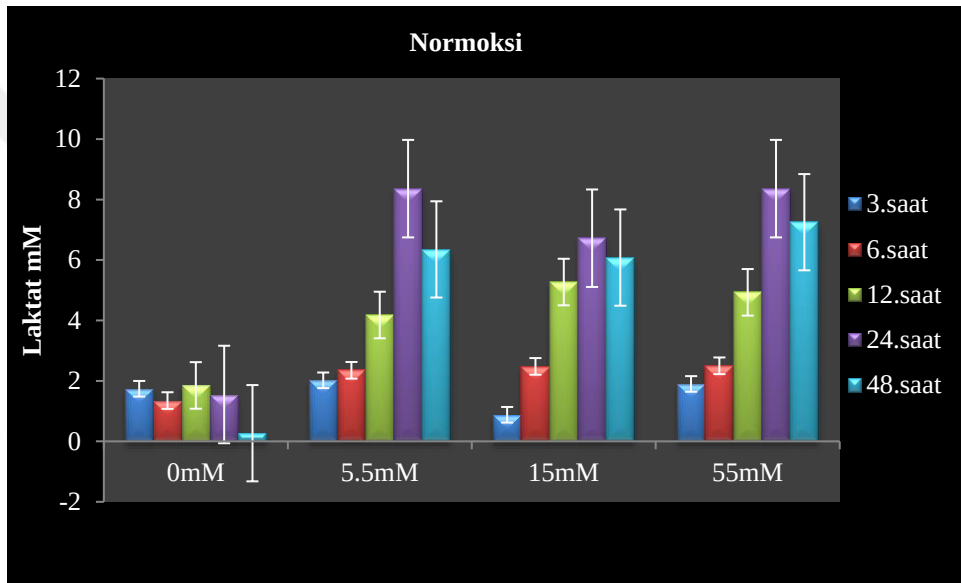


Şekil 67. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.

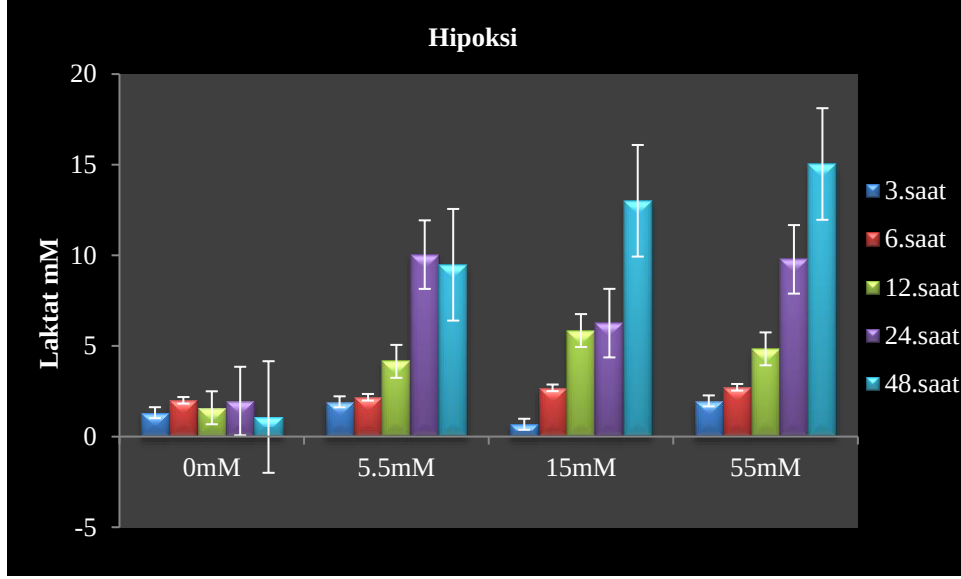
Gruplar arasındaki konsantrasyona bağlı farklılıklara bakıldığında, normoksik koşullarda glukoz içermeyen (0 mM) hücrelerin özellikle hücre dışına saldıkları 24. ve 48.saat laktat düzeylerinin, 5.5, 15 ve 55 mM'lık uygulama gruplarında belirlenen laktat miktarlarına

göre çok düşük olduğu belirlendi ($p<0,05$). 3, 6 ve 12 saat farklı miktarlarda glukoz içeren ortamlarda inkübe edilen MCF-7 kanser hücrelerinin hücre dışı laktat salgısı, glukoz içermeyen hücrelerden fazla olmasına rağmen bu fark istatistiki olarak önemsiz bulundu ($p>0,05$) (Tablo 13) (Şekil 68).

Hipoksik koşullarda ise hücrelerin 5.5, 15 ve 55 mM glukoz içeren medyumlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrası ekstrasellüler sıvıdaki laktat miktarı, glukoz içermeyen hücrelere göre oldukça yüksek bulundu ($p<0,05$). Ayrıca 0 mM ve 15 mM 12.saat uygulama grupları laktat miktarları arasında $p<0,05$ düzeyinde farklılık görüldü. 3. ve 6. saatlerde konsantrasyonlar arasında önemli bir değişim bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 13) (Şekil 69).



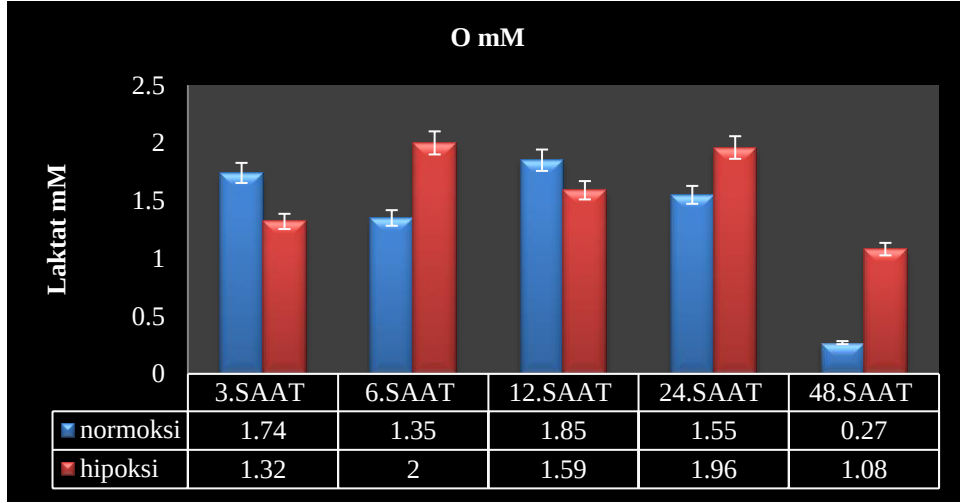
Şekil 68. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.



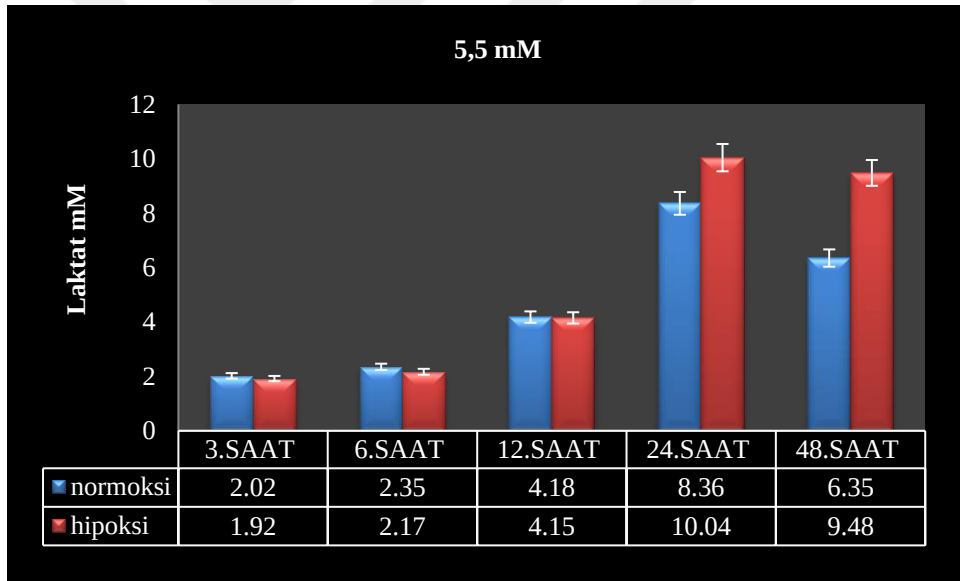
Şekil 69. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen laktat üretim miktarları.

4.4.2 Aynı Konsantrasyonlu Glukoz Uygulamalarında Normoksik ve Hipoksik Ortamdaki Ekstrasellüler Laktat Miktarlarının Karşılaştırılması

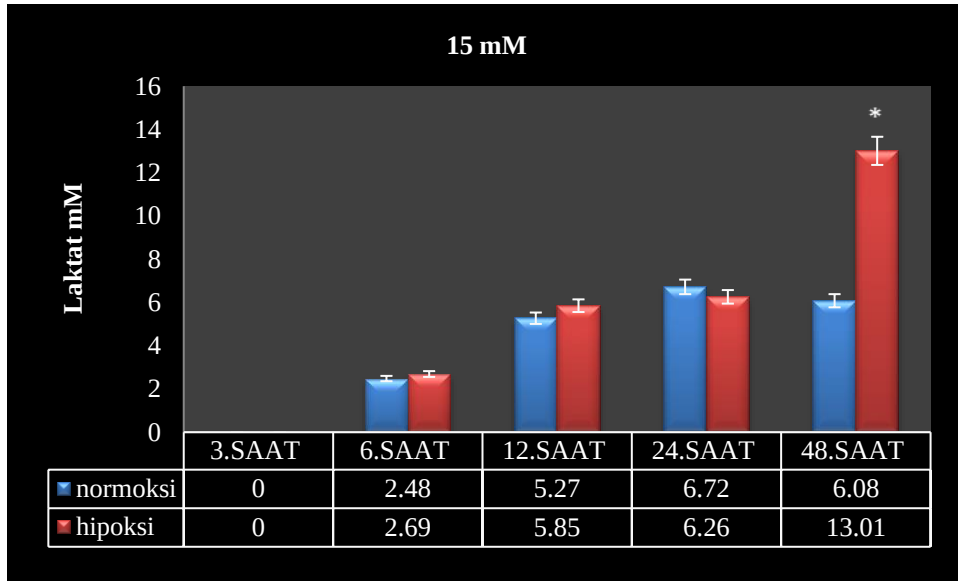
15 mM ve 55 mM uygulama gruplarında 48.saat inkübasyon süresinde hipoksik ortamdaki hücrelerden salınan laktat miktarı normoksik ortamdaki hücrelere göre yaklaşık 2 kat anlamlı bir artış sergiledi ($p < 0,05$). Diğer tüm uygulama gruplarında ise normoksik ve hipoksik hücrelerin laktat düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Şekil 70-73).



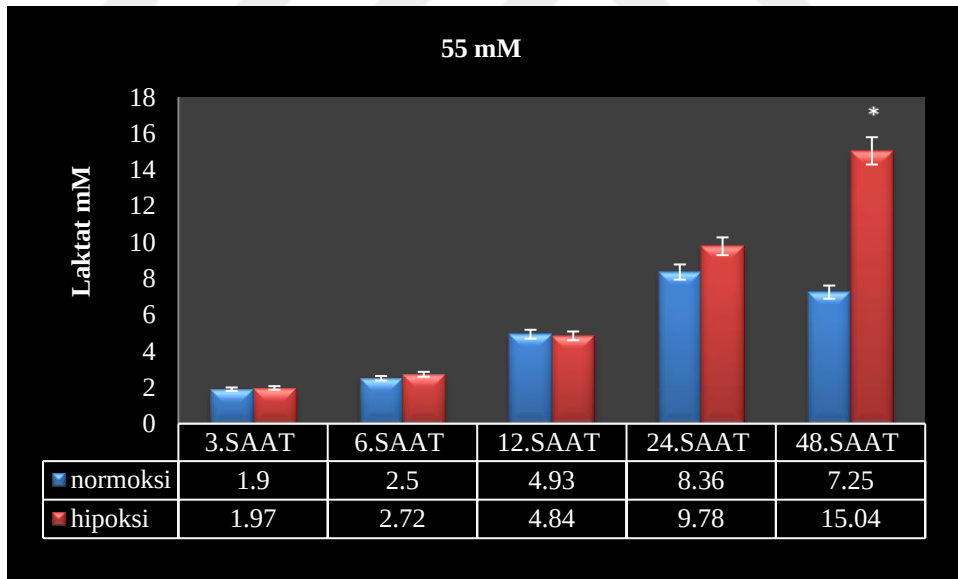
Şekil 70. 0 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 71. 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 72. 15 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,05$



Şekil 73. 55 mM glukoz uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik koşulların ekstrasellüler laktat salınımı düzeylerinin karşılaştırılması. * $p < 0,05$

4.5 Glukoz Tüketim Miktarlarının Belirlenmesi

4.5.1 Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Glukoz Tüketim Miktarı

Normoksik ve hipoksik koşullarda glukozun farklı dozlarına maruz bırakılan MCF-7 meme kanser hücre hattı gruplarında hücrelerin büyüdüğü ortama ilave edilen glukozdan nasıl yarar sağladıklarını belirlemek amacıyla, ilk ilave edilen glukoz miktarından uygulama süresi sonunda hücrelerin kullandıkları glukoz miktarı çıkarılarak tüketilen miktar hesaplandı (Tablo 14 ve 15).

Normoksik ortamda 5.5 mM glukoz ilave edilen MCF-7 hücrelerinin glukoz tüketimi 6.saatte arttı, 12.saate kadar azaldı ve 12. saatten 48.saate kadar tekrar artış sergiledi ($p<0,001$). 15 mM glukoz ilavesi, hücrelerde glukoz tüketimini 6.saatten itibaren zamana bağlı olarak arttırdı, 24.saatten 48.saate kadar ise glukoz tüketiminde azalma kaydedildi ($p<0,001$). 55 mM glukoz içeren gruplarda en yüksek glukoz tüketimi 12. saatte görülmekle birlikte, 12.saatten 48.saate kadar glukoz tüketiminde bir düşme gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 14) (Şekil 74).

Tablo 14. Normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları ve standart hata değerleri.

	3.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
0mM	0,00±0,147 ^A	0,01±0,000 ^A	0,00±0,000 ^A	0,00±0,000 ^A	0,00±0,000 ^A
5.5mM	0,26±0,045 ^{aA}	1,11±0,035 ^{bB}	0,67±0,208 ^{abA}	2,29±0,072 ^{cB}	5,22±0,005 ^{dB}
15mM	0,46±0,000 ^{aA}	0,57±0,208 ^{abB}	2,92±0,046 ^{cB}	4,52±0,153 ^{dC}	1,39±0,005 ^{bC}
55mM	27,33±0,057 ^{aB}	13,92±0,057 ^{bC}	37,47±0,060 ^{cC}	18,02±0,010 ^{dD}	12,09±0,005 ^{eD}

abcde aynı satırda farklı harfler $p<0,001$ düzeyinde önemi ifade etmektedir.

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

Hipoksik koşullarda ise 3.saate göre 5.5 mM'lık uygulamanın 12. 24. ve 48. saat, 15 mM'lık ve 55 mM'lık uygulamanın tüm inkübasyon sürelerinde glukoz tüketim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar belirlendi ($p<0,001$). 5.5 mM ve 15 mM glukoz uygulama gruplarının her ikisinde de 24. ve 48. saatler arasında glukoz tüketimleri arasında önemli bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 15) (Şekil 75).

Glukozun hücre içine girişinin 5.5 ve 15 mM glukoz ortamında 6.saatte, 55 mM glukoz ortamında ise 3.saatte önem kazandığı görüldü ($p<0,001$). Yüksek ve düşük glukoz ilavesinin

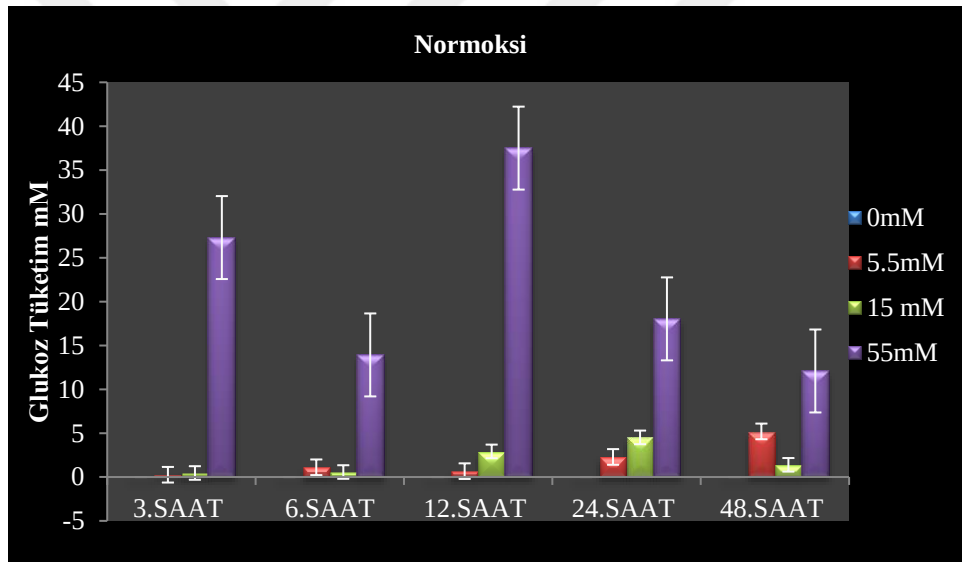
glukoz tüketimi üzerine etkisi incelendiğinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda glukoz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak glukoz tüketiminin arttığı saptandı.

Tablo 15. Hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları ve standart hata değerleri.

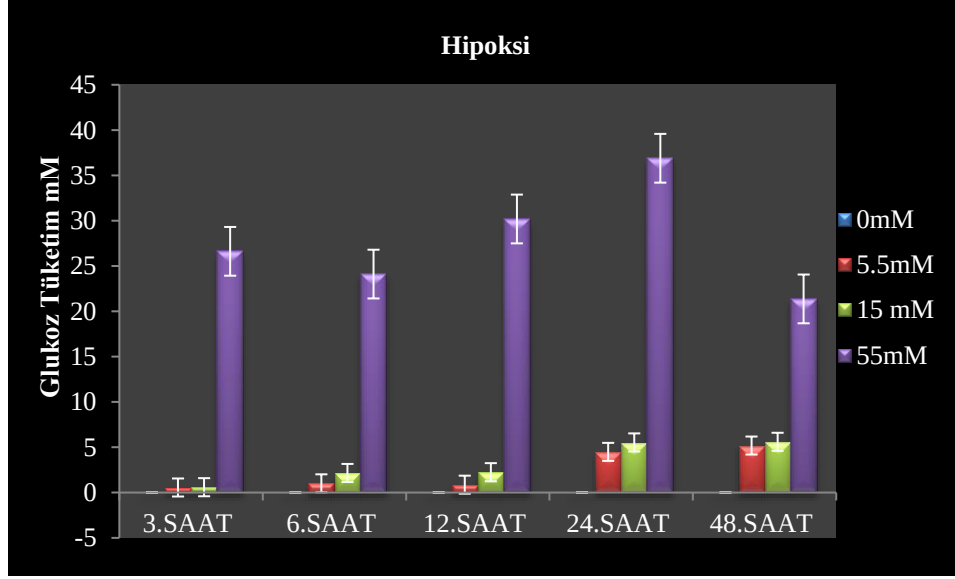
	3.Saat	6.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat
0mM	0,00±0,278 ^A	0,00±0,000 ^A	0,00±0,000 ^A	0,00±0,000 ^A	0,00±0,000 ^A
5.5mM	0,56±0,010 ^{aA}	1,01±0,011 ^{abB}	0,87±0,100 ^{bcB}	4,49±0,005 ^{dB}	5,19±0,010 ^{dB}
15mM	0,59±0,00 ^{aA}	2,16±0,045 ^{bc}	2,25±0,005 ^{cB}	5,53±1,256 ^{dB}	5,6±0,754 ^{dB}
55mM	26,62±0,057 ^{aB}	24,11±0,057 ^{bD}	30,19±0,100 ^{cC}	36,89±1,16 ^{dC}	21,37±0,45 ^{eC}

abcde aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

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



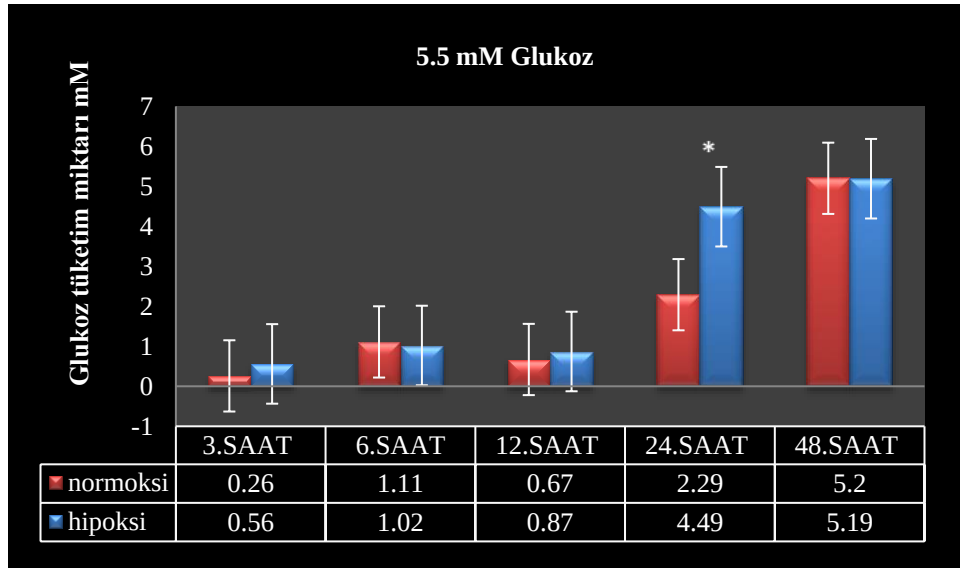
Şekil 74. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6,12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları.



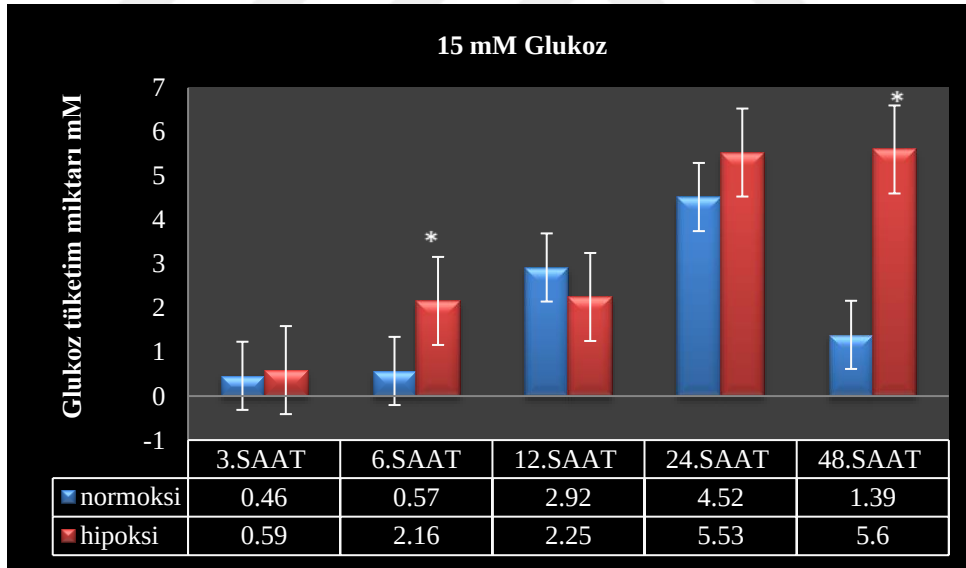
Şekil 75. MCF-7 kanser hücrelerinin hipoksi altında glukozun farklı konsantrasyonlu uygulama gruplarında 3,6,12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen glukoz tüketim miktarları.

4.5.2 Normoksik ve Hipoksik Koşulların Glukoz Tüketim Miktarı Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması

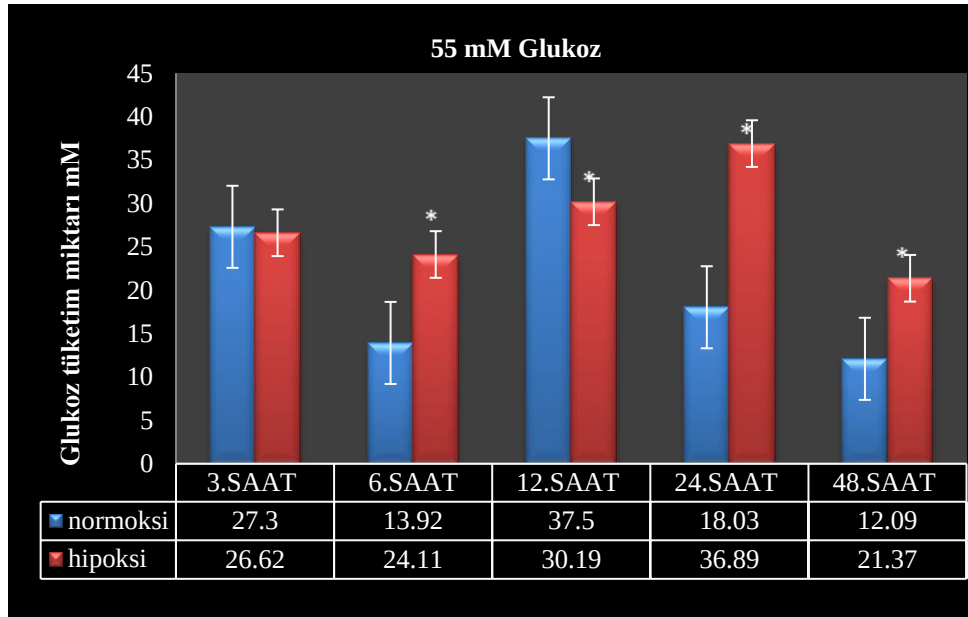
5.5 mM ve 15 mM glukoz ilave edilen uygulama gruplarında normoksik ve hipoksik hücrelerin glukoz tüketimi arasında inkübasyon sürelerine bağlı genel itibariyle önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Yalnızca 5.5 mM 24.saat uygulama grubu ile 15 mM 6.saat ve 48.saat uygulama grubunun hipoksik ortamdaki hücrelerinin glukoz tüketimi normoksik ortamdakilere göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0,001$). Yüksek dozda glukoz uygulanan MCF-7 meme kanser hücrelerinde ise fark daha belirgindi. 55 mM glukoz içeren ortamlarda 6., 24. ve 48. saat inkübasyon sonucu hipoksik hücrelerin glukoz tüketimi normoksik hücrelerle karşılaştırıldığında 2 kata yakın artış olduğu belirlendi ($p<0,001$). 12. saat de ise aksine hipoksik ortamda normoksik ortama göre glukoz tüketiminde azalma görüldü ($p<0,001$) (Şekil 76-78).



Şekil 76. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında glukoz tüketim miktarlarının karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 77. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 15 mM glukoz uygulama gruplarında glukoz tüketim miktarlarının karşılaştırılması. * $p < 0,001$



Şekil 78. MCF-7 kanser hücrelerinin normoksik ve hipoksik ortamdaki farklı inkübasyon süreli 55 mM glukoz uygulama gruplarında glukoz tüketim miktarlarının karşılaştırılması. * $p < 0,001$

4.6. Wound Healing Test Sonuçları

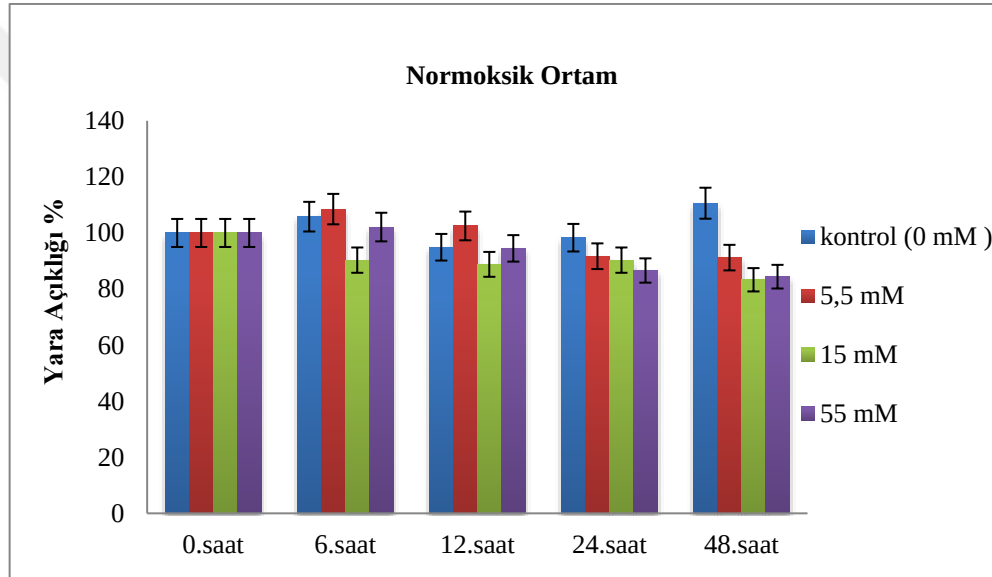
Çeşitli konsantrasyonlarda glukoz (0, 5.5, 15 ve 55 mM) içeren besiyerleri ile muamele edilen ve normoksi/hipoksi ortamlarına alınan MCF-7 hücrelerinde 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde başlangıçta açılan yarıkların durumu (kapanıp-kapanmadığı) mikroskopla incelenip görüntüleri alındı ve imageJ 1.48 programı kullanılarak analizleri yapıldı. 5.5 mM uygulama için yara açıklığı yüzdeleri, normoksik ortamda 6. ve 12. saatlerde (ilk inkübasyon süreleri) kontrole (0.dakika) göre daha yüksek bulundu. 0 mM glukoz konsantrasyonunda ise hem normoksi hem de hipoksi ortamında 12. saatten itibaren artan inkübasyon süresi ile yara açıklığının arttığı ($p < 0,001$), glukozsuz ortamın hücre morfolojilerini inkübasyon süresi artışına bağlı olarak değiştirdiği gözlemlendi. Her iki ortamda da 55 mM glukoz içeren gruplarda artan inkübasyon süresi ile 6.saate göre yara açıklığı mesafelerinin azaldığı görüldü ($p < 0,001$). 15 ve 55 mM konsantrasyon grupları için tüm inkübasyon sürelerinde normoksik ortamda hipoksik ortamdakilere kıyasla yara kapanışlarının kontrole göre daha yüksek düzeyde olduğu belirlendi. Normoksi ve hipoksi ortamında elde edilen Wound Healing test sonuçları Tablo 16 ve 17; hücrelerin morfolojik görüntüleri ise Resim 8 ve 9’da verilmiştir.

Tablo 16. Normoksi ortamında glukoz muamelesinin MCF-7 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç potansiyeli üzerine etkisi.

NORMOKSİ Yara Mesafesi (µm)	0.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
Kontrol (0 mM)	845,64±0,01 ^{aA}	895,17±0,01 ^{bA}	802,29±0,08 ^{cA}	831,14±0,01 ^{dA}	935,61±0,01 ^{eA}
5,5 mM	849,09±0,04 ^{aB}	921,18±0,06 ^{bB}	869,86±0,01 ^{cB}	778,32±0,03 ^{dB}	774,37±0,03 ^{eB}
15 mM	609,74±0,01 ^{aC}	550,84±0,005 ^{bC}	541,23±0,06 ^{cC}	550,45±0,01 ^{dC}	508,11±0,01 ^{eC}
55 mM	667,81±0,05 ^{aD}	681,81±0,02 ^{bD}	631,36±0,01 ^{cD}	578,57±0,04 ^{dD}	563,87±0,01 ^{eD}

abcde aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

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



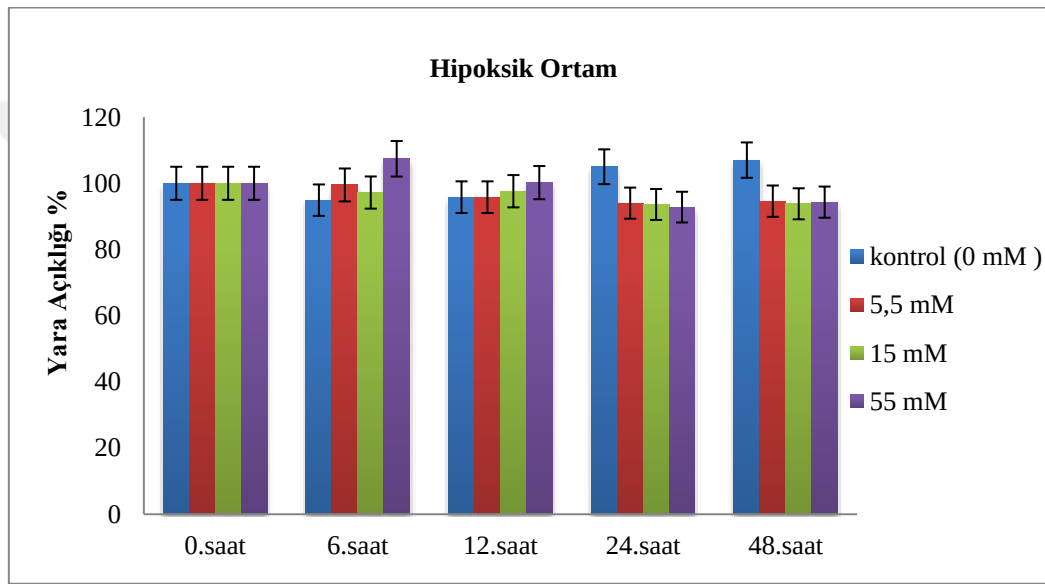
Şekil 79. Normoksik ortamdaki MCF7 hücrelerinin 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz muameleleri sonucu oluşan yara açıklığı yüzdeleri.

Tablo 17. Hipoksi ortamında glukoz muamelesinin MCF-7 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç potansiyeli üzerine etkisi.

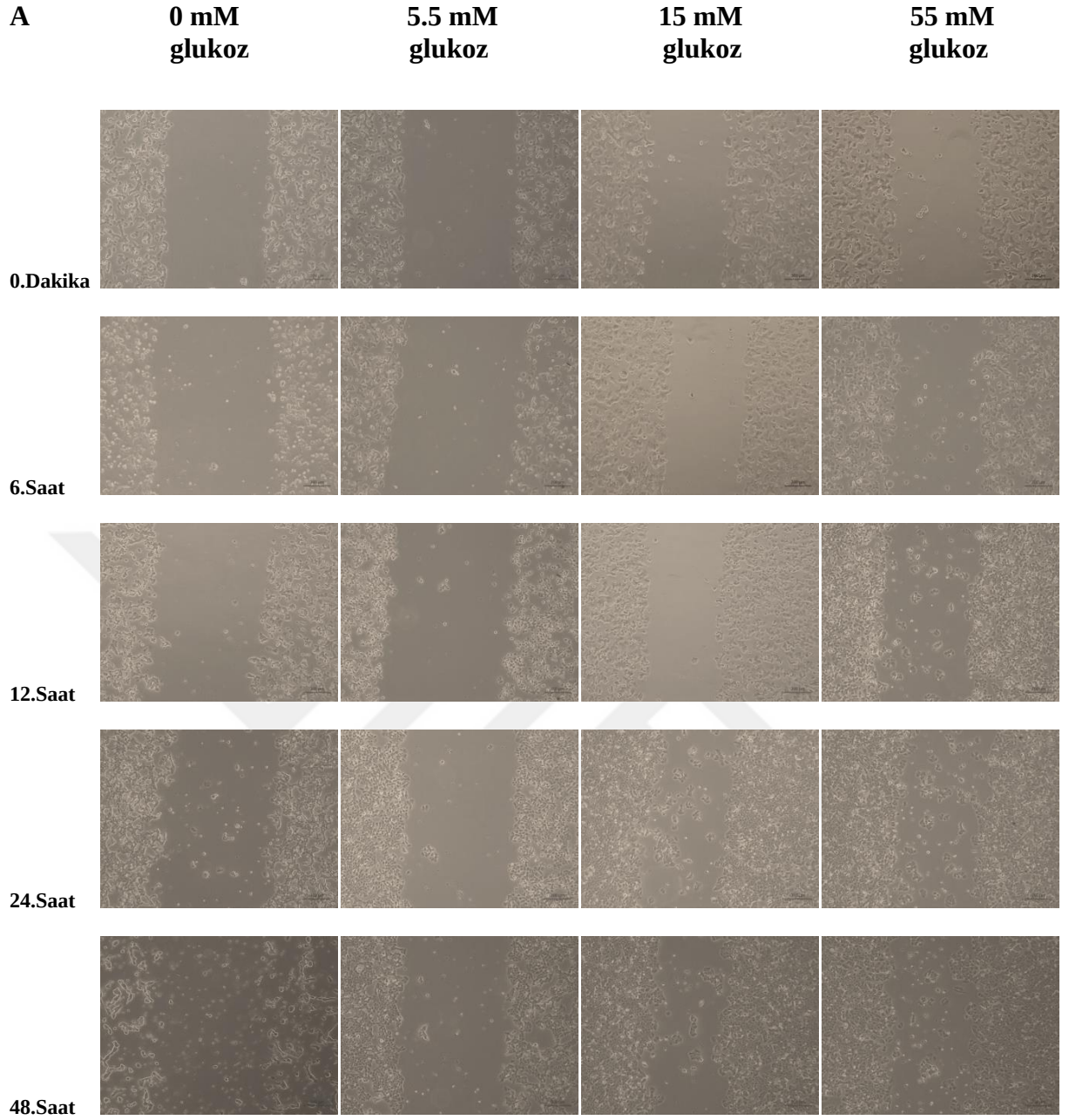
HİPOKSİ Yara Mesafesi (μ m)	0.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
Kontrol (0 mM)	767,36 $\pm$ 0,01 ^{aA}	728,6 $\pm$ 0,01 ^{bA}	735,18 $\pm$ 0,04 ^{cA}	805,87 $\pm$ 0,01 ^{dA}	821,35 $\pm$ 0,01 ^{eA}
5,5 mM	835,52 $\pm$ 0,05 ^{aB}	831,35 $\pm$ 0,01 ^{bB}	800,43 $\pm$ 0,01 ^{cB}	784,56 $\pm$ 0,01 ^{dB}	790,42 $\pm$ 0,03 ^{eB}
15 mM	837,56 $\pm$ 0,01 ^{aC}	814,51 $\pm$ 0,07 ^{bC}	817,61 $\pm$ 0,01 ^{cC}	784,09 $\pm$ 0,02 ^{dC}	786,02 $\pm$ 0,01 ^{eC}
55 mM	821,19 $\pm$ 0,01 ^{aD}	881,65 $\pm$ 0,01 ^{bD}	822,95 $\pm$ 0,03 ^{cD}	761,96 $\pm$ 0,01 ^{dD}	774,54 $\pm$ 0,01 ^{eD}

abcde aynı satırda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.

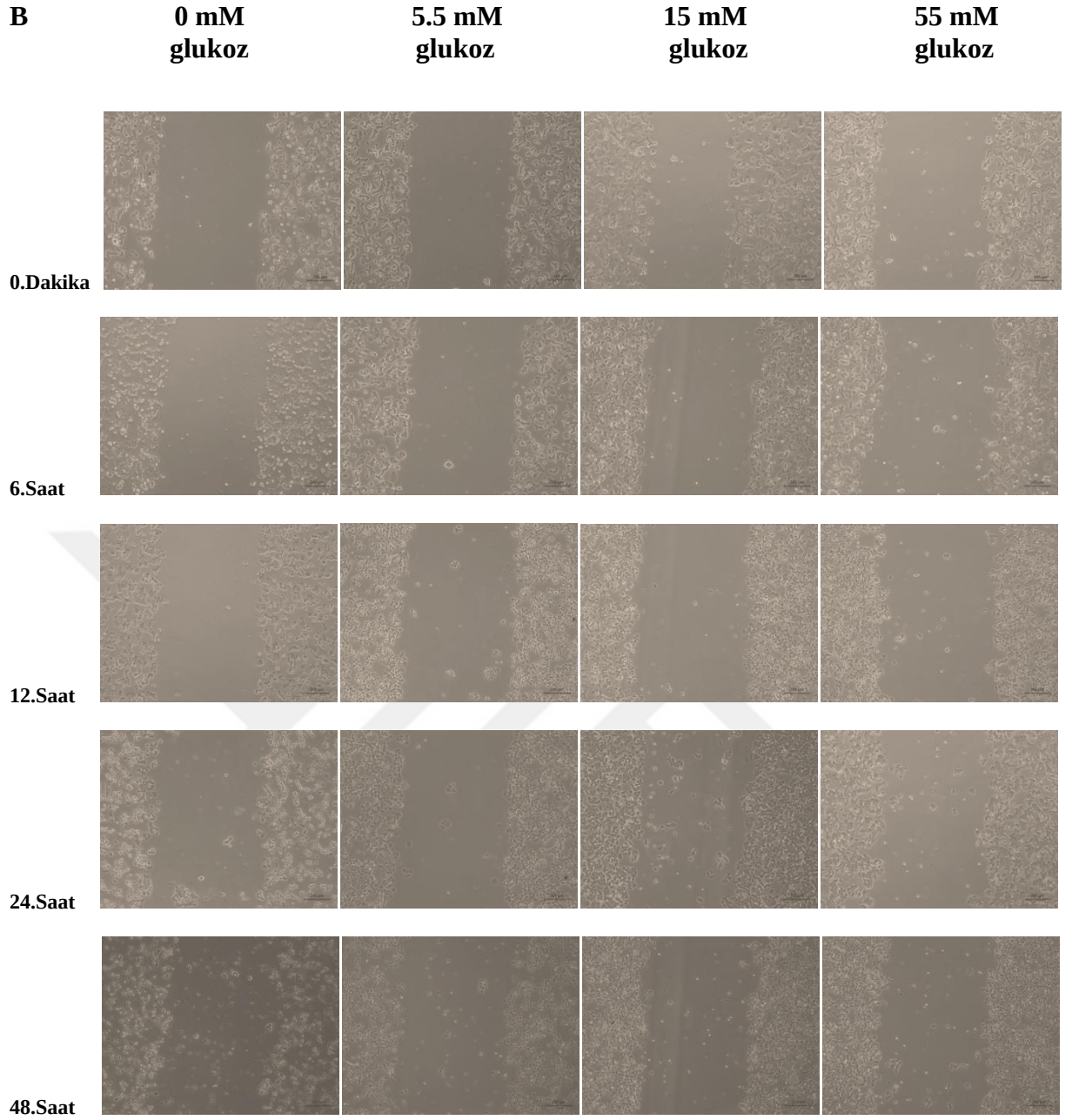
ABCD aynı sütunda farklı harfler p<0,001 düzeyinde önemi ifade etmektedir.



Şekil 80. Hipoksik ortamdaki MCF7 hücrelerinin 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz muameleleri sonucu oluşan yara açıklığı yüzdeleri.



Resim 9. Normoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz uygulanan MCF7 hücrelerinde 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreler sonunda görülen yara iyileşmesi test fotoğrafları.



Resim 10. Hipoksik ortamda farklı konsantrasyonlarda (0, 5.5, 15 ve 55 mM) glukoz uygulanan MCF7 hücrelerinde 0., 6., 12., 24 ve 48 saat süreler sonunda görülen yara iyileşmesi test fotoğrafları.

5. TARTIŞMA

Glukoz, kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için temel bir enerji ve besin kaynağıdır (Han ve ark, 2015). Yüksek glukozun kanser hücre büyümesi üzerine olan etkilerini araştırmak için Bao ve ark (2019), yaygın ve agresif bir kanser türü olan glioblastoma (GBM) U87 hücrelerini 24, 48 ve 72 saat boyunca normal (5.5 mM) ve yüksek glukoz (25 mM) maruz bırakmış ve tüm inkübasyon sürelerinde yüksek glukozun hücre proliferasyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışma insan pankreatik kanser (PC) hücre hatları olan PaCa-2 ve BxPC-3 üzerinde yapılmış, hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 5.5 (kontrol), 25 ve 50 mM glukoz konsantrasyonunda inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aynı inkübasyon sürelerinde, ortamdaki glukoz konsantrasyonu 5.5'dan 55 mM'ye yükseltildikçe, proliferasyon oranının yavaş yavaş arttığını göstermiştir. Aynı çalışmada, 55 mM'deki BxPC-3 hücrelerinin proliferasyon oranı, 72 saatlik grupta 25 mM'dan daha düşük olmasına rağmen ($P<0.05$), 5.5 mM'dan daha yüksek bulunmuştur. Diğer yandan, aynı glukoz konsantrasyonu için, 48 ve 72 saatteki çoğalma oranlarının da 24. saatteki oranlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Han ve ark, 2011). Yapılan başka bir çalışmada birden fazla meme kanseri hücre hattı 0, 5.5 (normal fizyolojik seviye), 7, 10 ve 17 mmol/L glukoz konsantrasyonu içeren ortamlara alınmıştır. Glukoz bulunmayan ortamda hücre proliferasyonu inhibe olurken 5-7 mmol/L'den 10 ve 17 mmol/L'ye doğru glukoz konsantrasyonu arttıkça hücre proliferasyonunda artış şekillenmiştir (Wahdan-Alaswad ve ark, 2013). Wu ve ark (2016)'larının yaptıkları çalışmada MCF-7 hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca 5.5, 11 ve 22 mM glukoz konsantrasyonuna maruz bırakılmış, zamana ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle 22 mM glukoz grubunda, 48 saatlik maruziyetten sonra hücre canlılığının, 5.5 mM glukoz grubuna kıyasla %153.2 oranında yükseldiği belirlenmiştir. Düşük glukozun kanserli ve kanserli olmayan hücrelerdeki hem siklinlerin hem de CDK4'ün downregülasyonu ile ilişkili bir mekanizma yoluyla hücre döngüsünü durdurduğu bilinmektedir (Marín-Hernández ve ark, 2016).

Yapılan araştırmada, normoksik ortamda glukozun hücre proliferasyonuna olan etkisi zamana bağlı incelendiğinde tüm konsantrasyonlar için 6.saatte hücre canlılığının 3.saate göre azalış gösterdiği, 12.saatten itibaren arttığı belirlenmiş ve 48.saatte en yüksek canlılık oranları tespit edilmiştir. Normoksik ortamda glukozun hücre proliferasyonuna olan etkisi

konsantrasyona bağılı incelendiğinde ise, normal fizyolojik seviye olan 5.5 mM glukozun hücre canlılığını kontrole göre (0mM) 3.,6. ve 48. saatlerde önemli derecede arttırdığı (%48, %41 ve %46) ($p<0.001$), 12. ve 24. saatlerde ise kontrole göre önemli bir fark oluşmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bu verilere bakarak çeşitli onkogenlerin aktivasyonu sonucu (PI3K, AKT, MYC gibi) 3. ve 6. saatte glukozun kanser hücreleri tarafından hücreye etkin bir şekilde girişinin ve hücrede kullanımının gerçekleştiği söylenebilir. Dolayısıyla 5.5 mM glukoz ortamının ilerleyen inkübasyon sürelerinde hücre için yeterli gelmediği ve hücredeki siklinler ve CDK4 gibi moleküllerin downregülasyonu sonucu hücre döngüsünün durduğu yorumu yapılabilir. 15 mM glukoz ortamında ise tüm inkübasyon süreleri için kontrole göre anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0.001$). Standart kültür koşullarında kullanılan 15 mM glukoz dozunda hücre canlılığının inkübasyon süresine bağılı büyük bir değişiklik göstermemesi hücrelerin bu glukoz miktarını metabolizması için dengeli şekilde tükettiğinin bir kanıtı olabilir. 55 mM glukoz ortamında 3. ve 6. saatlerde hücre canlılığının (%126 ve %134) 12., 24. ve 48. saatlere göre (%160, %178 ve % 209) oldukça düşük seyretmesi ise ortamdaki yoğun glukoz miktarının ilk 6 saatte bir miktar sitotoksik etki yaratabileceğinin ve proliferasyonu azaltabileceğinin, 12. saatten 48.saate kadar ise hücrenin yüksek glukozu verimli bir şekilde kullanabildiğinin bir göstergesidir. Burada çeşitli sinyalizasyon yollarının aktivasyonu sonucu (örneğin PI3K-AKT yolu) hücrelere glukoz alımı ve hücrelerde glukoz kullanımının hızlandırıldığı düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen veriler genel anlamda literatüre de uygun şekilde normoksida hiperglisemik ortamın kanser hücresi çoğalmasına ve sağ kalımına katkı sağladığını göstermektedir.

Hızlı büyüyen kanser hücrelerinin yaşaması normal hücrelere nazaran daha fazla enerji gerektirir. Kanser hücresi büyümesi ve çoğalması için DNA, RNA, proteinler ve lipidlerin sentezini sağlamak amacıyla hem katabolik hem de anabolik öncüler üretmek için artan glukoz tüketimi ve artan glikoliz gereklidir (Liu ve ark, 2011). Liu ve ark (2013) yaptıkları bir çalışmada, normoksik ortamda MiaPaCa2 hücrelerini 2.8-11.1 ve 16.7 mM glukoz maruz bırakmış, 16.7 mM glukoz ortamında daha fazla glukoz tüketimi gözlemişlerdir. Ortamdaki 5 mM glukoz, insan kanındaki normal fizyolojik seviyelere (100 mg/dl) karşılık gelirken, 25 mM glukoz kontrol edilemeyen ciddi diyabetli bir hastaya eşdeğerdir (Leontieva ve ark, 2014; Han ve ark, 2015). İki endometrial kanser hücre hattı olan ECC-1 ve Ishikawa, 3 farklı glukoz konsantrasyonu ile (düşük glikoz (LG 1 mM), normal glukoz (NG 5 mM) ve yüksek glukoz (HG 25 mM), muamele edilmiş ve yüksek konsantrasyonda glukoz muamelesinin 12 saat boyunca her iki hücre hattında da glukoz alımını ve hücreye glukoz girişi sağlayan GLUT1'in ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Leontieva ve ark, 2014; Han ve ark, 2015).

Yapılan çalışmada, 5.5 mM glukoz içeren normoksik ortamlarda inkübe edilen MCF7 hücrelerinin glukoz tüketimi 3. saatten sonra artmaya başlamış, 6.saatten sonra azalmış ve 12. saatten 48. saate kadar tamamen glukoz tüketimi sağlanmıştır ($p<0,001$). Elde edilen bu sonuç normal O_2 koşulları altında fizyolojik seviyedeki glukoz miktarının uzun sürede hücre içinde tamamen kullanıldığının ve hücrede glikolizi tetiklediğinin bir göstergesi olabilir. 55 mM yüksek glukoz içeren ortamda ise 3.saatten itibaren glukoz hızlı bir şekilde hücre içine alınmıştır. Bu durum yüksek miktar glukozun, glukoz alımı ve glukoz taşıyıcılarının ekspresyonunu uyardığına dair literatürde verilen bilgilerle paralellik göstermektedir. 24.saatten 48.saate kadar ise 15 ve 55 mM glukoz içeren ortamlarda glukoz tüketimi giderek azalmıştır ($p<0,001$).

Marín-Hernández ve ark (2016), kültür ortamında glukozun 25 mM'dan 2.5 mM'a düşürülmesinin, HeLa hücrelerinin glikolitik akışında belirgin bir artışla ilişkilendirilebilen GLUT'lar (1 ve 3) ve HKI seviyelerini 2'den 3 kata kadar arttırdığını belirtmişlerdir. İki ortam birbiri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı, glikolitik akış ve OXPHOS protein seviyelerinde fark bulunamamıştır. Her 12 saatte bir ortamı değiştirilen normoglisemi veya hipoglisemi ve normoksi altında hücre büyümesi gerçekleştirilen deneylerde 12 saat sonra hücre dışı medyumdaki glukozun sırasıyla 5 mM'dan 0.5 ± 0.15 mM'a (normoglisemi/normoksi) ve 2.5 mM'dan 0.1 ± 0.01 mM'a (hipoglisemi/normoksi) azaldığı tespit edilmiştir (Marín-Hernández ve ark, 2016). Tüm bu sonuçlar hücre dışı glukozun hipoksi ve HIF-1 α 'dan bağımsız olarak da glukoz tüketimini arttırdığını, Warburg etkisine katkı sağlayabildiğini göstermektedir.

Hipoksi, çeşitli kanser türlerinde tedaviye yanıt ve sağkalım için negatif bir prognostik faktör olarak kabul edilir (Sumiyoshi ve ark, 2006; Wilson ve Hay, 2011; Jin ve ark, 2016). Solid tümörlerde hipoksik bölgelerin gelişimi malign fenotip, metastaz, kemo-, immüno ve radyoterapi direnci, yüksek genetik instabilite ve apoptoz toleransı ile ilişkilendirilen tipik bir özelliktir (Graeber ve ark, 1996; Bristow ve Hill, 2008). Bu proseslerin bazıları; anjiyogenez, hücresel proliferasyon, eritropoietik ve vaskülarizasyon yollarında yer alan proteinlerin gen transkripsiyonunu düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörü olan HIF1- α ile modüle edilir (Weidemann ve Johnson, 2008). Hipoksik bir bölgede, hücreler normal oksijen gerilimi (normoksi) altında büyüyen hücrelere kıyasla daha düşük bir proliferasyon oranına sahiptir ve tedaviye daha dirençlidirler (Trédan ve ark, 2007; Kondoh ve ark, 2010). Orta dereceli hipokside (%1 O_2) akut HIF-1 α stabilizasyonunun c-myc transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsü durmasına neden olduğu bildirilmiştir (Koshiji ve ark, 2004). HIF-1 α , c-Myc degradasyonunu da destekleyebilir (Zhang ve ark, 2007). Bunun yanında HIF1 α

metabolik seviyede hemen hemen tüm glikolitik enzimlerin ve taşıyıcıların spesifik izoenzimlerinin gen transkripsiyonunu artırır ve glikolitik aktivasyonu sağlayarak kanser hücreleri proliferasyonu için gerekli metabolitlerin sentezini destekler (Marín-Hernández ve ark, 2009).

Hipoksi ve normoksi koşullarının hücre büyümesi üzerine nasıl etki gösterdiğine dair yapılan bir çalışmada, HT29 hücreleri standart kültür koşullarında her iki ortamda büyütülmüş ve normoksi altında 72 saat sonra HT29 hücre büyümesinin 11 kat, hipoksik koşullar altında ise sadece 2 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde SW480 hücre büyümesi normoksi altında 16 kat, hipoksi altında sadece 5 kat artmıştır. Böylece hipoksinin, HT29 ve SW480 hücrelerinin hücre büyüme yeteneğini önemli ölçüde inhibe ettiği, hipoksik koşullar altında hücre kültürünün, G0/G1 fazında hücre döngüsü durdurulmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Muroño ve ark, 2012). *In vivo* da dahil edildiği başka bir çalışmada A549 insan akciğer kanseri hücrelerinden (akciğer kanseri tümörü) oluşan tümörlerin nakledildiği sıçanlar, farklı süreler ve farklı oksijen seviyelerinde hipoksiye maruz bırakılmıştır (Yu ve Hales, 2011). Ayrıca A549 akciğer kanseri hücreleri kronik hipoksi ile tedavi edilmiş ve daha sonra hipoksi ile ön işleme tabi tutulmuş bu kanser hücreleri farelere implante edilmiştir. Hipoksiye uzun süreli maruz kalmanın sıçanlarda ksenograft ve ortotopik modellerinde akciğer kanseri tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği, *in vitro* hücre döngüsü ilerlemesini ve akciğer kanseri hücre proliferasyonunu durdurduğu tespit edilmiştir (Yu ve Hales, 2011). Tátrai ve ark (2017), çalışmalarında hipoksinin (%1 ve %5 O₂ seviyeleri) *in vitro* tümör hücre hatlarında hücre proliferasyonu üzerine etkilerini incelemiştir. % 1 O₂, HT1080 hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır. HT168-M1 melanoma ve HT25 kolon karsinom hücre hatlarının proliferasyon kapasitesi normoksiye kıyasla hem % 1 hem de % 5 O₂ seviyelerinde artarken, HT29 kolon karsinom hücrelerinin proliferasyonu, özellikle % 1 O₂ seviyesinde azalmıştır. Bu sonuçlar hipoksi etkisinin hücre tipine bağlı olarak da değişebildiğini göstermiştir.

MCF-7 hücrelerinde hipoksinin Warburg etkisine olan katkısı ve hücre canlılığını nasıl değiştirdiği araştırılan çalışmada, hipoksik ortamda tüm glukoz konsantrasyonları için hücre canlılığının zamana bağlı olarak artış sergilediği, kontrole kıyasla (3.saat) en yüksek hücre canlılıklarının 48. saatte olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Normalde kanser hücrelerinde artan hipoksinin temel bir hücre döngüsü düzenleyicisi ve onkogeni olan c-myc'nin transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe etmek suretiyle hücre döngüsünü durdurması ve proliferasyonu azaltması beklenirken bu sonuçlara bağlı olarak uzun süreli hipoksiye maruz kalan hücrelerin ortama direnç kazandığı ve bu durumun yüksek canlılığı teşvik ettiği

öngörülmüştür. Ayrıca glukoz içermeyen ortamda inkübasyon süresine bağlı canlılığın artışı hücrelerin sağ kalım adına ortamdaki glutaminden de beslenebilme olasılıklarını da göstermiştir.

Hiperglisemi ve hücresel hipoksi yakından ilişkilidir. Hipoksinin glikoliz ile bağlantısını belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada orta ve şiddetli hipoksinin (%0,1 O₂ ve %1 O₂) kanser hücreleri 25 mM glukoz (hiperglisemik) ile kültürlendiği zaman tüm glikolitik proteinlerin içeriği ve aktivitesini indüklediği ancak hipoglisemik ortamda hipoksinin glikolitik akışa etki etmediği bildirilmiştir. Hipoglisemik koşullar altında gözlenen ATP kaynağında veya proliferasyon için gerekli olan anabolik öncüllerin miktarında bir düşme sonucu düşük proliferasyon hızının şekillendiği ve tümör çoğalmasını önleyen ROS miktarında artış olduğu tespit edilmiştir (Marín-Hernández ve ark, 2016). Rodríguez-Enríquez ve ark (2010), uzun süreli hipoksiden (%0,1 O₂, 24 saat) sonra MCF-7 ve HeLa hücrelerinde HIF1 α 'daki protein seviyelerinin 4 kata kadar ve sırasıyla glikolitik akışların 3.7 ve 6 kat arttığını gözlemlemiştir. Bu da uzun süreli hipoksik ortamın HIF1 α yolu ile glikolizi tetiklediğinin bir göstergesidir. Tümör hücrelerinde, yüksek glukoz seviyelerinin ise hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında HIF-1 α ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (Dehne ve ark, 2010).

Yapılan çalışmada, hipoksik ortamda tüm inkübasyon sürelerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında artış olmuş, özellikle 12. saatten sonra 55 mM konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak en yüksek düzeyde canlılık artışları belirlenmiştir (p<0,001). Bu sonuçlar literatürlere de uygun şekilde hipoksinin ortamdaki glukoz yoğunluğuna bağlı olarak HIF-1 α yolağına bağlı glikolizi indüklediğini ve dolayısıyla hücre gelişimini ve proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. En düşük hücre canlılığı oranı kontrole göre 5.5 mM glukoz dozu için 6. saatte belirlenmiş (p>0,05) olup, bu sonucun literatürdeki normoglisemik ortamda hipoksinin özellikle kısa süreli inkübasyonda hücre proliferasyonunu azalttığına dair raporları desteklediği kaydedilmiştir.

Liu ve ark (2018) yaptıkları çalışmada, hipergliseminin hipoksiyi indükleyebileceğini ve normal pankreasta ve pankreas kanserinde HIF-1 α 'nın ekspresyonunu artırabildiğini göstermişlerdir. Liu ve ark (2013), wt- ve si-MiaPaCa2 hücrelerini hipoksi veya normoksida farklı miktarlarda glukoz maruz bırakmış ve glukoz metabolizmaları ile hipoksi, glukoz ve HIF-1 α 'nın glukoz metabolizmalarını ve enerji homeostazisini düzenlemek için birbirleriyle işbirliği içinde olup olmadığını incelemişlerdir. Aynı glukoz konsantrasyonlarıyla inkübe edilen farklı MiaPaCa2 hücrelerinde bağlı glikoliz seviyeleri karşılaştırıldığında, hipoksik wt- ve si-MiaPaCa2 hücreleri normoksik hücrelerden daha yüksek glikoliz seviyeleri göstermiştir.

Guillaumond ve ark (2013), aerobik glikoliz (Warburg etkisi) sergileyen hücrelerle karşılaştırıldığında pankreatik hipoksik hücrelerin daha yüksek glikolitik potansiyel sergilediğini ve bu durumun glukoz alımı ile laktik asit oluşumunda rol oynayan tüm enzimlerin ve taşıyıcıların daha güçlü bir aktivasyonu ile sonuçlandığını ortaya koymuşlardır.

Araştırmada, hipoksi koşullarında 5.5 mM glukoz içeren ortamda 12.saatten sonra ve 15 mM glukoz içeren ortamda ise 3. saatten sonra MCF7 hücrelerinin glukoz tüketimi artış göstermiştir. 55 mM glukoz bulunan normoksik ortamdaki gibi 3.saatten itibaren hücre içine glukoz alımı gerçekleşmiş olup, 48.saatte glukoz tüketimi azalmıştır ($p<0.001$). Elde edilen bulgular literatürü destekler nitelikte ileri inkübasyon sürelerinde (24 ve 48) hipoksik hücrelerde glukozun hücre içine girişinin normoksik hücrelerden daha yüksek oranda olduğunu, yüksek konsantrasyonda glukozun da bu artışa katkı sağladığını göstermiştir. Dolayısıyla hipoksik ve hiperglisemik ortamda glukoz tüketimi ve hücre canlılığı sonuçları birbiri ile paraleldir.

Warburg etkisinin tümör hücresi proliferasyonunu ve migrasyonu desteklediği rapor edilmiştir (Harada ve ark, 2016; Liu ve Yin, 2017). Zhu ve ark (2013) yaptıkları bir deneysel çalışmada, yara iyileşmesi yöntemiyle yüksek glukozun MCF-7 kanserinde hücre göçü ve invazyonu üzerine nasıl etki gösterdiği araştırılmış, 48 saat boyunca 11 mM ve 22 mM glukoz ile tedavi edilen hücrelerde nispi yara kapanması olduğu ve istilacı hücre sayısının ise önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Yang ve ark (2016) da, farklı glukoz konsantrasyonlarında uygulamada bulundukları Caco2 hücreleri için, yara iyileşme analizi gerçekleştirmiş ve 0. saatte 5mM, 10mM ve 15mM glukoz konsantrasyonları için hücrelerarası boşluk mesafelerinin sırasıyla 1.84 mm, 1.84 mm ve 1.88 mm olduğunu belirlemişlerdir. 24 saatlik inkübasyondan sonra, boşluk mesafeleri 5 mM glukoz ortamında 1.64 mm'ye, 10 mM glukoz ortamında 0.76 mm'ye ve 15 mM glukoz ortamında ise 0.72 mm'ye düşmüştür. 48 saat sonra boşluk mesafeleri ise, 5 mM için 0,48 mm'ye, 10 mM için 0,08 mm'ye ve 15 mM glukoz ortamı için ise 0 mm'ye kadar daralmıştır. Bu durum uzun süreli yüksek dozda glukoz muamelesinin hücre migrasyonunu arttırdığını göstermiştir. SW480 ve SW620 hücreleri için de değişen D-glukoz konsantrasyonlarına bağlı hücre göçü incelenmiştir. Yüksek glukoz koşullarının kolon kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu artırabildiği, G0 / G1 fazındaki hücre popülasyonunun durdurulmasını azaltabildiği ve hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir (Yang ve ark, 2016).

Farklı konsantrasyonlarda glukoz uygulaması yapılan MCF-7 kanser hücrelerinde başlangıçta (0.dakika) oluşturulan hücrelerarasındaki yarıkların 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde mesafeleri ölçülmüş ve glukozun normoksi ve hipoksi ortamındaki göç üzerine olan etkileri

tain edilmiştir. Sonuçların WST-1 testi ile benzerlikler taşıdığı kaydedilmiştir. Hem normoksik hem de hipoksik ortamlarda yüksek konsantrasyonda (55 mM) glukoz muamelesi yapılan gruplarda 6.saatten sonra yara açıklıklarının kapanıyor olması ($p<0,001$), bu inkübasyon süresi itibariyle artış gösteren hücre canlılığı sonuçları ile paraleldir. 5.5 mM uygulama için yara açıklığı yüzdeleri, her iki ortamda da ileri inkübasyon sürelerinde azalmıştır ve bu sonucun 48.saatteki yüksek hücre canlılığı ile uyumlu olduğu görülmüştür. Glukozsuz ortamda hem normoksik hem de hipoksik hücrelerin morfolojik görüntüleri değişmiş, ayrıca inkübasyon süresi arttıkça yara açıklığı yüzdeleri de artmış, yani hücre göçü azalmıştır. Bu durum glukozun kanser hücrelerinin sağlıklı bir büyüme göstermeleri ve dokuya yayılımları adına gerekli bir besin olduğunun kanıtıdır.

HIF-1 α ; hücre çoğalması, yer değiştirmesi ve metastazını teşvik etmek için çok çeşitli genlerin ekspresyonunu transkripsiyonel olarak düzenleyen anahtar bir aracı görevi görür (Liu ve Yin, 2017). HIF-1 α siRNA'sının BxPC-3 hücrelerinin yüksek glukoz kaynaklı invaziv ve göç yetenekleri üzerine etkileri test edilmiştir (Li ve ark, 2018). Yüksek glukoz varlığında artan BxPC-3 hücre istilası ve migrasyonunun HIF-1 α yıkımı ile önemli ölçüde inhibe edildiği bulunmuştur. Bu veriler, yüksek glukoz seviyesinin, HIF-1 α bağımlı bir şekilde pankreas kanseri invazyonuna ve migrasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Hiperglisemi, pankreas kanserinin büyümesini, istilasını ve metastazını teşvik eder. Yüksek glukoz konsantrasyonlarının pankreas kanseri invazyonunu desteklemedeki rolü, HIF-1 α 'nın upregülasyonunu içerir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar hipoksik ortamda hiperglisemi ve normogliseminin benzer migrasyon oranları yarattığını göstermiştir. HIF-1 α bağımlı yolağın proliferasyon ve migrasyonu desteklediğinin bir göstergesi olarak 55 mM uygulama gruplarında ileri inkübasyon sürelerinde yara kapanışları yani migrasyon hızları artış göstermiştir. Normoksiye göre hipokside yara kapanış oranları özellikle hiperglisemik ortam için ilk 12 saatte daha düşüktür. Bu durum hipoksinin 12. saatten sonra hücrelerin migrasyon hızını arttırmasına yönelik etki gösterdiğinin bir kanıtı olabilir. Glukozsuz ortam ise hücrelerin agresifliğinin artmasına, migrasyon oranlarının azalmasına, hücrelerin büzülerek sağlıklı görüntülerinin kaybolmasına sebebiyet vermiştir.

Artan aerobik glikoliz laktik asit üretimi ve salgılanmasında da artışa yol açar. Gatenby ve Gillies (2004), aerobik glikolizin, kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmasını ve doku istilasını destekleyen güçlü, seçici bir büyüme avantajı sergileyen aside dirençli bir fenotip gelişimine yol açabileceğini göstermiştir. Laktat, kanserde metabolik bir anahtar oyuncudur (Jiang ve ark, 2015). Baş ve boyun, servikal ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi

çeşitli insan kanserlerinde yüksek laktat düzeylerinin metastaz, tümör nüksü ve kötü klinik sonuç ile korele olduğu tespit edilmiştir (Walenta ve ark, 2000). Laktat seviyeleri, radyasyona direnç ve metastaz olasılığı ile pozitif ilişkili olmasının yanı sıra insan rektal adenokarsinoma, glioblastoma ve prostat tümörü agresifliğinin potansiyel bir belirteci olarak tanımlanmıştır (Walenta ve Mueller-Klieser, 2004; Saraswathy ve ark, 2009; Park ve ark, 2010; Yaligar ve ark, 2012; Keshari ve ark, 2013). Primer serviks kanserinde laktat birikiminin hastanın sağkalımı ile ters orantılı olduğu da gösterilmiştir (Walenta ve ark, 2000; Jiang ve ark, 2015).

Mitokondriyal OxPhos ile enerji üretimi için normoksik tümör hücreleri tarafından alınacak ve kullanılacak olan laktat, hipoksik glikolitik tümör hücreleri tarafından üretilir ve ihraç edilir (Draoui ve Feron, 2011). Bu laktat transferi işlemi, çoğu tümörde aşırı eksprese edilen, esas olarak hücreden laktat salınımı için MCT4 ve hücreye laktat alımı için MCT1 yoluyla gerçekleştirilir (Pinheiro ve ark, 2012). Meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231), MCT izoformlarının (1 ve 4) dağılımı ile laktat oluşumunda görevli enzim LDH'nin izoformlarının (A ve B) ekspresyon profili arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Hussien ve A.Brooks, 2011). MDA-MB-231 hücre hattında, LDHA piruvatı laktata dönüştürmek için ve MCT4 laktatı serbest bırakmak için bol miktarda bulunurken, MCF-7 hücre hattında ise MCT1 laktat alımı için aşırı eksprese edilir ve LDHB, TCA döngüsüne enerji sağlamak adına laktatı piruvata dönüştürmek için bol miktarda bulunur. Böylece kanser hücreleri, verimli enerji temini için glikolitik fenotiplerini düzenler (Abdel-Wahab ve ark, 2019).

Glukozun enerji akışını nasıl etkilediğinin incelendiği bir çalışmada, yumurtalık kanseri hücrelerinde ATP ve laktatın hücresel seviyeleri ölçülmüştür. 24 saat boyunca çeşitli glukoz konsantrasyonlarında (0, 2.5, 5.5 ve 25 mM) inkübe edilen hücrelerde glukoz konsantrasyonu artışına bağlı olarak hücresel ATP seviyesi ve laktat üretimi önemli ölçüde yükselmiştir (Sun ve ark, 2017). Guillaumond ve ark (2013) yaptıkları çalışmada, *in vitro* epitelyal kanser hücre modeli (PK4A hücreleri) % 1 O₂ ortamına alınmış ve glikolitik enzimler, glukoz ve laktat taşıyıcılarını kodlayan genlerin transkripsiyonu, normoksik PK4A hücrelerinininki ile karşılaştırıldığında upregüle olduğu tespit edilmiştir (iki ila yedi kat). Ayrıca 48 ve 72 saat hipoksiden sonra normoksik hücrelere göre iki kat daha fazla glukoz ve laktat tükettiği ve salgıladığı, bu nedenle metabolik olarak oldukça aktif oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar, yüksek glikolitik hücreler içeren PDAC-hipoksik bölgelerin, tümör kitlesinde yaygın olan aşırı agresif bölgeleri temsil ettiğini göstermektedir. Glikolitik hücreler tarafından salgılanan laktat fazlasının, tümör istilasını teşvik etmenin yanı sıra, kolon kanseri hücre hatlarında tarif edildiği gibi komşu normoksik kanser hücreleri tarafından glukozu alternatif bir karbon

kaynağı olarak kullanılabileceği iyi bilinmektedir (Sonveaux ve ark, 2008). Yine MDA-MB-231 hücrelerinin, hipoksi (% 1O₂) koşulları altında, % 20 O₂ içeren ortamda olduğundan daha yüksek miktarda (3 kat daha fazla) laktat salgıladığı ve laktatın sinyal yollarını aktive ederek tümör hücrelerine doğru göçü arttırdığı iddia edilmiştir (Rattigan ve ark, 2012).

MCF-7 hücrelerinde yapılan bu çalışmada, hücre dışına salınan laktat düzeylerinin hem normoksik hem de hipoksik ortamda zamana bağlı olarak tüm konsantrasyonlar için artış gösterdiği, sadece glukoz içermeyen ortamda büyük bir değişim olmadığı görülmüştür. Normoglisemi ve hiperglisemi ortamlarında laktat salınım düzeyleri birbirine yakın olmakla beraber, glukoz içermeyen kontrol gruplarına göre önemli artışlar kaydedilmiştir. Özellikle ileri inkübasyon sürelerinde fark istatistiksel olarak oldukça önem arz etmektedir ($p < 0,05$). Normoksi ortamında dahi hücrelerin aerobik glikolize yöneldiği görülmektedir. Ayrıca hipoksiye maruz bırakılan hücrelerin laktat salınımı istatistiksel olarak önem göstermese de normoksik ortamdaki hücrelerden daha fazla bulunmuştur. Özellikle uzun süreli (48 saat) hipoksi, laktat salınımını konsantrasyona bağlı kademeli olarak yükseltmiştir. Bu sonuçlar, elde edilen glukoz tüketimi, hücre migrasyonu ve hücre canlılıkları verileri ile de uyumludur. Glukoz konsantrasyonuna bağlı artışlar kanserin bir fenomeni olan Crabtree etkisinin çalıştığını göstermektedir.

Piruvattan laktatın oluşumu LDHA enzimi ile gerçekleştirilir. Bazı kanser hücrelerinde LDHA upregüle edilir ve agresif tümör oluşumu ile alakalıdır. LDHA'nın özofagus skuamoz hücreli karsinom, pankreatik kanser ve oral skuamoz hücreli karsinom gibi kanser türlerinde upregüle olduğu gösterilmiştir (Grimm ve ark, 2013; Rong ve ark, 2013; Yao ve ark, 2013). Mide karsinomlu bir hastada LDHA'nın aşırı ekspresyonunun intratümöral anjiyogenez, hipoksi ve prognoz dahil birçok klinopatolojik parametreyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Kolev ve ark, 2008; Gallo ve ark, 2015). LDHA aşırı eksprese olan hastalar yetersiz enzim ekspresyonuna sahip olanlara göre düşük sağ kalım oranına sahip bulunmuştur (Kolev ve ark, 2008). LDH'nin upregülasyonunun, hem etkili bir anaerobik/glikolitik metabolizmayı hem de tümör hücrelerinin hipoksik koşullar altında oksijene daha az bağımlı olmasını sağladığı önerilmiştir (Faloppi ve ark, 2016). Bu bilgiler ışığında LDHA'nın tümörün proliferasyonu ve malign özellikler sergilemesinde merkezi rol oynadığı ve tümör hücrelerinin hipoksik bir ortamda sağ kalabilmesinin büyük ölçüde LDHA aktivitesine bağlı olduğu görülmüştür.

ECC-1 ve Ishikawa hücre hatları glikolitik yol değişimlerini değerlendirmek için kültür ortamında farklı glukoz konsantrasyonu ile (düşük glukoz (LG 1 mM), normal glukoz (NG 5 mM) ve yüksek glukoz (HG 25 mM) muamele edilmiş ve her iki hücre hattında da yüksek glukoz gruplarında azalan bir PDH protein ekspresyonu ve artan bir LDHA ekspresyonu

gözlemlenmiştir (Han ve ark, 2015). Marín-Hernández ve ark (2014) ise yaptıkları çalışmada, HeLa hücrelerinin normoksik koşulda normoglisemi (5 mM, fizyolojik koşul) , hipoglisemi (2.5 mM) ve hiperglisemi (25 mM) ortamında 24 saat boyunca kültürlendiğinde hiperglisemiye kıyasla hipoglisemi altında LDHA protein seviyelerinde 7.5-9.3 kat artış olduğunu ancak normoglisemi altında önemli bir değişim olmadığını gözlemlemişlerdir. Hipoglisemik hücrelerde daha yüksek glikolitik akışın, esas olarak, yüksek afiniteli GLUT3 ve HKI izoformları yoluyla glukoz taşınması ve HK reaksiyonlarının artmasından kaynaklandığını ve kanser hücrelerinde glikolizisi arttırmayı tetiklemek için dış glukoz konsantrasyonunu 2.5 mM veya daha azına maruz bırakmak gerektiğini belirlemişlerdir (Marín-Hernández ve ark, 2014).

Yapılan çalışmada, normoksik ortamda 6, 24 ve 48. saatlerde glukozsuz ve 5.5 mM glukoz içeren ortamlarda LDHA miktarlarının 15 ve 55 mM glukoz içeren ortamlara nazaran daha yüksek seyretmesi literatürdeki bilgiyi doğrular niteliktedir.

Cui ve ark (2017), insan pankreatik kanser (PC) hücre hatları olan PANC-1 ve CFPAC-1'i, hipoksi (% 0.1 O₂) veya normoksi (% 20 O₂) koşullarına tabi tutmuş, hipoksi altında kültürlen hem PANC-1 hem de CFPAC-1 hücrelerinde LDHA mRNA düzeylerinin normoksik ortama göre önemli ölçüde arttığını (p <0.01) tespit etmişlerdir. Marín-Hernández ve ark (2016) ise, orta şiddette hipoksi (%1 O₂)/hipoglisemi altında (hipoksi/normoglisemiye karşı) LDH miktarı ile aktivitesinin ve glikolitik akışın değişmediğini gözlemlemişlerdir. Aynı sonuç şiddetli hipoksik ortamda (%0,1 O₂) da görülmüştür. Burada ROS tarafından veya p53 aktivasyonu ile dolaylı olarak glikolitik inaktivasyonun gerçekleşmiş olabileceğine dair bir yorumda bulunulmuştur.

MCF-7 hücrelerinde normoksik ortamda zamana bağlı olarak incelenen LDHA miktarlarının ilk 24 saat boyunca her konsantrasyon için azalım gösterdiği, 24.saatten sonra ise enzimin arttığı; hipoksik koşullarda ise zamana bağlı kademeli bir şekilde sürekli azaldığı görülmüştür. Bu durum LDHA'nın normoksik ortamda HIF-1α'dan bağımsız bir yolla glikolizin tetiklemesi sonucu etkin bir şekilde üretildiğini, uzun süreli hipoksida ise literatürde görüldüğü gibi oluşan ROS miktarına bağlı glikolitik akışın inhibe olduğunu düşündürmüştür. Konsantrasyona bağlı incelendiğinde özellikle hipoksida yüksek glukoz (55 mM) içeren ortamda enzim seviyesinin 15mM glukoz ortamına göre 2 kat azalış göstermesi de glukoz konsantrasyonu artışına bağlı olarak yüksek miktarda laktat oluşumunun LDHA enzim sentezini bloke etmiş olabileceğini göstermiştir.

Glikolitik metabolizmanın anahtar bir enzimi olan PKM2, tümör hücrelerinde glikolitik enerji rejenerasyonu ve hücre yapı taşlarının sentezi arasındaki dengeyi sağlar (Spoden ve ark,

2009). PKM2 kanser metabolizmasında düzenleyici rolünün yanı sıra aynı zamanda kanser hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerinde de önemli etkilere sahiptir ve PKM2'nin tümör büyümesi, tümör istilası ve metastazda büyük bir rol oynadığı da ortaya konmuştur (Christofk ve ark, 2008; Shuch ve ark, 2013; Li ve ark, 2019). Prostat, meme, serviks, böbrek, mesane ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde PKM2'nin ekspresyonunun artış gösterdiği saptanmıştır (Bluemlein ve ark, 2011; Feng ve ark, 2013). Yapılan çalışmalar ortamdaki aşırı glukozun glikolitik ilişkili gen HK2 ve PKM2 ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (Mathupula ve ark, 2006; Liu ve ark, 2013; Yang ve Lu, 2013). Christofk ve ark (2008), PKM2 ekspresyonunun artan glukoz alımı ve laktat üretimi ile ilişkili olduğunu ve kanser hücrelerinde O₂ tüketimini azalttığını rapor etmişlerdir.

Marín-Hernández ve ark (2014), farklı glukoz koşullarına maruz bırakmış olduğu HeLa hücrelerinin hiperglisemiye (25 mM) kıyasla hipoglisemik (2,5 mM) ortamda piruvat kinaz izoformlarının (PK-R, PK-L, PK-M2) ve LDHA protein seviyelerinin 7,5-9,9 kat artış gösterdiğini belirlemiştir. Wang ve ark (2017) ise, yüksek glukoz ortamında kültürlen (11.1mM, 16.7mM ve 25.0mM) dil skuamöz karsinom hücrelerinde (TSCC) normal glukoz ortamında kültürlenene göre PKM2 protein seviyelerinde artış gözlemlemişlerdir. Yüksek glukozun PKM2 yolunun uyarılması yoluyla TSCC'nin metastatik potansiyelini arttırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada, MCF-7 hücrelerinde glukoz konsantrasyonundan ziyade inkübasyon sürelerinin PKM2 enzim miktarları üzerine etkisi daha belirgin olmuştur. Normoksik ortamda ilk 6 saatte enzim miktarının maksimum düzeyde olması hücrelerin kısa süreli inkübasyon içinde glikoliz yolağını çalıştırdığının ve PKM2 sentezini başlattığının göstergesi olabilir. İlerleyen sürelerde enzim miktarı azalması, bu inkübasyonlarda enzim sentezinin durdurulduğunu, ortamda birikim gösteren PEP, 3PG, G6P gibi glikolitik akışın yukarıdaki diğer ara maddelerin anabolik öncül molekülleri ve antioksidanları sentezleyebilmek adına PPP gibi diğer yollara yönlendirildiğini düşündürmüştür. 24. saatten sonra ise PKM2 enzim miktarında tekrar artış şekillenmiştir.

PKM2 sadece glikolizde rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda nukleusta bir protein kinaz veya transkripsiyonel koaktivatör görevi görür. PKM2'nin HeLa servikal karsinom ve Hep3B hepatoblastom hücrelerinin nukleusunda HIF-1 α ile etkileştiği ve transkripsiyonel bir koaktivatör olarak işlev gördüğü bulunmuştur (Luo ve Semenza, 2011). PKM2'nin HIF-1 α ile bağlanması hedef genler olan SLC2A1 (glukoz taşıyıcı 1 kodlayan), LDHA ve PDK1'in HeLa ve Hep3B hücrelerinde transaktivasyonunu arttırmıştır. HIF-1 hedef genlerinin PKM2 ile uyarılan ekspresyonu, oksidatif fosforilasyondan glikolitik metabolizmaya geçişi teşvik eder

(Luo ve Semenza, 2011). Metabolizmanın hipoksik regülasyonunda da bir rolü olup olmadığını belirlemek amacıyla insan embriyonik kök hücrelerinde (hESCs)'lerde PKM2 ekspresyonu araştırılmıştır (Christensen ve ark, 2015). Oksijen seviyeleri değişken kültür koşullarına tabi tutulan hücrelerde normoksik ortamdaki (%20 O₂) hESCs'lerde PKM2 ekspresyonu hipoksik ortamdaki (%5 O₂) hücelere kıyasla önemli oranda daha düşük bulunmuştur.

Hipoksik ortamda gözlemlenen MCF-7 hücrelerinde, normoksik ortamdakine benzer şekilde 0 mM hariç diğer tüm uygulama gruplarında 6.saatte enzim miktarının maksimum olduğu ve bu saatten sonra giderek enzim seviyelerinde düşme gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonlu glukoz ortamlarında 24. saatten sonra enzim miktarında tekrar artış şekillendiği görülmüştür. Bu durum 24. saatten sonra 15 ve 55 mM glukoz ortamlarında hipoksinin HIF1 α yolağını tetiklediğini ve yüksek glukoz varlığı ile birlikte glikolitik enzimlerin ve glikolitik yolağın işlediğini göstermektedir. Normoksik ortamda enzim miktarlarının hipoksik ortama göre daha yüksek seyretmesi literatürdeki bazı sonuçlar ile çelişmektedir. Bu durum enzimlerde, hücrenin bulunduğu ortama ve hipoksiden aldığı etkiye bağlı olarak mRNA ve protein varyasyonlarındaki oluşumların değişkenlik gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Glikolizin hipoksi ile aktivasyonu, glukoz kullanan diğer metabolik yollarla koordine edilmelidir (Gao ve ark, 2004). Bu metabolik yollardan biri olan PPP'de önemli rol oynayan G6PD enzimi, riboz-5-fosfat ve NADPH üreten hız sınırlayıcı kilit bir enzimdir. Antioksidan sistemin tüm bileşenleri hücre sağ kalımı için önemli olmasına rağmen, G6PD, peroksidazların antioksidan etkisini destekleyen hücre içi indirgeyici NADPH'nin ana kaynağı olduğu için benzersiz bir role sahiptir (Zhang ve ark, 2010). Hafif G6PD eksikliğinin bile fare beyinde redoks kontrolü ve oksidatif mutajenezin bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir (Felix ve ark, 2002).

Gao ve ark (2004) yaptıkları bir çalışmada, sıçan feokromositoma PC12 hücrelerinde, G6PD gen ekspresyonu ve aktivitesinin doza ve zamana bağlı bir şekilde kronik hipoksi tarafından indüklendiğini tespit etmişlerdir. Uzun süreli (72 saat) kronik hipoksik (%3 O₂) muamele kontrole (0. Saat) göre G6PD gen ekspresyonunu 2 katına kadar arttırmıştır. Kronik hipoksi tedavi sonrası G6PD transkriptindeki artışın daha sonra fizyolojik fonksiyonun artmasına neden olup olmadığını da değerlendirmek adına G6PD'nin enzimatik aktivitesi ölçülmüş ve 48 ile 72 saatlik %3 O₂ uygulamasından sonra sırasıyla %30 ve %50 artış gerçekleşmiştir. Aynı çalışmada HIF aktivasyonuna oldukça duyarlı bir gen olan PGK-1 enzimi için hızlı hipoksik indüksiyon gözlenirken G6PD için çok daha yavaş bir indüksiyon

olmuştur, çünkü muhtemelen G6PD HIF'e daha az duyarlıdır ve daha da önemlisi G6PD'nin hipoksik indüksiyonuna ROS aracılık eder ve ortamda ROS birikimi ve düşük pO_2 'ye uzun süre maruz kalmayı gerektirir. Uzun süre hipoksiye maruz kalma esnasında G6PD'nin antioksidan ve koruyucu etkisi, ROS birikimini ve hücre ölümünü önlemek için gerekli olabilir.

MCF-7 hücreleri ile yapılan çalışmada, hipoksik ortama maruz bırakılan hücrelerde ilk 6 saat G6PD miktarlarının daha yüksek olduğu, inkübasyon süresine bağlı enzim seviyelerinin azaldığı kaydedilmiştir ($p<0,001$). Özellikle 48.saate kadar 5.5 mM glukoz içeren ortamdaki G6PD miktarı en büyük azalışı (2 kat) sergilemiştir ($p<0,001$). Hipoksiste PKM2 ile G6PD enzimlerinin her ikisinin de tüm konsantrasyonlar için kısa süreli inkübasyonda (6.saat) en yüksek düzeyde olduğu ve dengeli çalıştıkları görülmektedir. Bu veriler kanser hücrelerinde kısa süreli hipoksik müdahalenin hem glikolitik yolağı hem de PPP'nu aktive ettiğini göstermektedir. Ortamda zamanla birikim gösteren glikoliz yolağındaki 3PG'nin G6PD sentezinin durmasına neden olabileceğı ve bu nedenle ileri inkübasyon sürelerinde enzimin azalma göstermesi de olasıdır. Normoksik ortamda enzim seviyelerinin hipoksik ortamdakilerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum normoksiste glukozun PPP'na yönlendirildiğinin, hipoksik ortamda ise HIF-1 α yolu ile glikoliz basamaklarının çalıştırıldığı bir göstergesi olabilir. Bu sonuca literatüre bağılı olarak da G6PD'nin HIF'e diğerk glikolitik enzimlerden daha az duyarlı olması kanıt gösterilebilir. Hem normoksik hem de hipoksik ortamlarda ilk saatlerde metabolizmanın ortamdaki glukoz miktarını ayırt etmeksizin ROS oluşumuna bağılı olarak savunma sistemleri olan G6PD sentezini arttırdığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar, G6PD'nin lösemi, melanom kanseri, endometrial karsinomlar, meme kanserleri ve kolon kanserleri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde arttığını göstermiştir (Philipson ve ark, 1985; Battetta ve ark, 1999; Van Driel ve ark, 1999; Polat ve ark, 2002; Hu ve ark, 2013; Fang ve ark, 2016). Hızla büyüyen bir kanserin büyük biyosentetik talepleri ve stresli ortamlara uyumu nedeniyle, PPP'nin kanser ilerlemesini ve tedavi direncini arttırdığı önerilmiştir (Riganti ve ark, 2012). Glukozun fosforillenmesi sonucu oluşan G6P, ya F6P'a izomerleşerek piruvat oluşumuna doğru gider ya da G6PD enzimi ile PPP'nin oksidatif dalında yolculuğuna başlar. Glukozun bu reaksiyonlar zincirinin gidişatında rolü büyüktür.

Normoksik ortamda konsantrasyon değişimine bağılı değişken enzim miktarları elde edilirken, yüksek dozda glukozun enzim düzeyleri üzerine büyük bir etkisi olmadığı görülmüştür. Hipoksiste ise 6.saatte farklı konsantrasyondaki uygulama gruplarında G6PD miktarları birbirinden çok farklı olmamakla beraber, 12. saatte değişim başlamıştır. Özellikle

yüksek dozda (55 mM) glukoz içeren ortamda 12. saatte enzim miktarının diğer uygulama gruplarına göre daha düşük seyretmesi ($p<0,001$), bu inkübasyon süresinde PPP'nun değil glikolizin terih edildiğini göstermektedir.

HIF-1 α , tümör hücresi glikolizinde önemli bir bağlantıdır ve glikoliz yolundaki çeşitli proteinleri indükler. HIF-1 α 'nın, HK2, PFK ve PKM2 hedef genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek meme kanserinin metabolik fenotipinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Marín-Hernández ve ark, 2009). Hem “Warburg etkisi” hem de kanser hücresi immortalizasyonunda HK2 önemli bir oyuncudur (Lis ve ark, 2016). HK2, G6P üretmek için glukozu fosforile eder ve bu ürün daha sonra glikoliz, OXPHOS veya pentoz fosfat yollarından geçer. Bu yollardan gelen ara metabolitler ayrıca anabolik metabolizmalarda substrat olarak da işlev görebilir. Bu nedenle HK hemen hemen tüm glukoz metabolizmalarında büyük rol oynar (Liu ve ark, 2013). Dikkat çekici bulgulardan biri ise HK2 promotörünün, glikolizin ilk substratı olan glukoz varlığında hipoksik koşullarla beraber yedi kat aktive edildiğidir (Mathupala ve ark, 2001).

Liu ve ark 2013, normoksik wt-MiaPaCa2 (HIF-1 α -negatif), hipoksik wt-MiaPaCa2 (HIF-1 α -pozitif) ve hipoksik si-MiaPaCa2 (HIF-1 α 'dan yoksun) hücre hatlarında, hücre dışı artan glukozun HK2 ekspresyonunu uyardığını belirlemiştir. Bu verilere göre glukozun hipoksi ve HIF-1 α 'dan bağımsız olarak HK2 ekspresyonunu indükleyebilir olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında hipoksi ortamında hücre dışı glukoz, wt-MiaPaCa2 hücrelerinde si-MiaPaCa2 hücrelerinde olduğundan daha büyük HK2 ekspresyonuna neden olmuştur. Bu nedenle glukozun ayrıca HIF-1 α 'ya bağlı bir mekanizma ile de HK2 ekspresyonunu indüklediği sonucuna varılmıştır.

Tümör hücresi kültürlerinde düşük glukozun, GLUT1, GLUT3, HK2 ve PFK2'yi kodlayan genlerin mRNA düzeylerinde önemli bir artışı (2-3 kat) desteklediği bildirilmiştir (Yun ve ark, 2005; Natsuizaka ve ark, 2007; Marín-Hernández ve ark, 2014). Hipoglisemik hücrelerde daha yüksek glikolitik akışın, esas olarak yüksek afiniteli GLUT3 ve HKI izoformları yolu ile glukoz taşınımı ve HK reaksiyonlarının artışından kaynaklanan bir durum olduğu sonucuna varılmıştır. Bu davranışın açıklaması, kararlı durumlarda enzim/taşıyıcı aktivitelerinin doygunluğun altındaki substrat seviyelerinde (hipoglisemi) çalıştığıdır (Marín-Hernández ve ark, 2014).

Yapılan çalışmada, glukoz içermeyen normoksik ortamda HK2 enzim seviyelerinin zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği gözlenmiş ($p>0,05$), ancak 0 mM ortamında tüm diğer konsantrasyonlara göre en yüksek enzim düzeyi ölçülmüştür ($p<0,001$). Bu veriler glukozsuz ortamda enzimin yüksek oranda sentezlendiğinin kanıtıdır.

15 ve 55 mM konsantrasyonlarında glukoz içeren uygulama gruplarında genel itibariyle enzim miktarında 6. saatten 12. saate kadar artış, 12. saatten 24. saate kadar azalış, 24. saatten 48. saate kadar ise tekrar bir artış olması metabolizmanın glikoliz akışında dalgalı bir gidişat seyrettiğinin ve muhtemel 12. ve 24. saat aralığında ortamda daha fazla HK2 ihtiyacı olmaması sonucu sentezin durması, ilerleyen saatlerde ise ilgili substratı ile etkileşmesi amaçlı tekrar enzim üretiminin başlatıldığı yorumu yapılabilmektedir. 5.5 mM glukoz içeren ortamlarda 6. saatten 24. saate kadar enzim miktarında anlamlı bir azalma olması ($p<0,001$), düşük konsantrasyonda glukoz tüketiminin zamana bağlı artışı ile paraleldir ve glikoliz ürünlerinin ortamda birikimi sonucu ileri inkübasyon sürelerinde HK2 enzim sentezinin durdurulduğu söylenebilir. Burada aslında oluşan ürünlerin inhibisyon derecelerini ölçmek adına aktivite tayini yapmak da önem teşkil etmektedir. 48. saatte özellikle yüksek glukoz ihtiva eden ortamlarda enzim oluşumu artış göstermiştir ($p<0,001$).

Hipoksik ortamda glukoz içermeyen uygulama gruplarında enzim miktarlarının normoksi ortamına göre daha düşük olduğu (12. saat hariç), saatlere bağlı anlamlı azalış ve artışlar gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,001$). Hem 0 mM hem de 5.5 mM glukoz uygulama gruplarında 6. saatten 12. saate kadar enzim miktarlarında kademeli bir artış gerçekleşmesi (5.5 mM'da 24. saate kadar artış devam ediyor), glukoz içermeyen veya normoglisemik+hipoksik koşullar altında özellikle kısa süreli hipoksi maruziyetinde enzim artışının tetiklenmiş olduğunu, ayrıca normoksida görülen azalmaya nazaran hipoksik ortamda normoglisemik koşulda gerçekleşen enzim artışının HIF-1 α 'ya bağlı bir mekanizma yolu ile gerçekleştiğini düşündürmüştür. Yüksek miktar glukozun (55 mM) ileri inkübasyon sürelerinde ise hipoksi ile işbirliği içinde çalışarak glikolizi indüklediği bu nedenle ortamda HK2 enzimi artışının gerçekleştiği görülmüştür. Buna rağmen normoksiye kıyasla özellikle 12. saatte bu konsantrasyonlar için (15 ve 55 mM) enzim miktarlarında büyük bir azalma söz konusudur ($p<0,001$). Bu durum HIF1 α yolundan bağımsız çalışan diğer yolların normoksida glukoz miktarına bağlı enzimin indüklenmesinde daha baskın işlediğinin de bir göstergesi olabilir.

Natsuizaka ve ark (2007), Hem DNA mikroarray hem de Real-time PCR analizi ile hipoksi-indüklenebilir genlerden GLUT-1, GLUT-3, HKI ve HKII'nin ekspresyonlarının normal glukoz+normoksik koşullar (NN) ile karşılaştırıldığında glukoz içermeyen+hipoksik koşullar (HL) altında arttığını göstermiştir. Marín-Hernández ve ark (2016) yaptıkları çalışmada, orta şiddette hipoksi (%1 O₂/24 saat) ve hipoglisemi (2,5 mM glukoz)'nin muhtemel AMPK-aracılı mekanizma yolu ile GLUT1 ve GLUT3, HKII mRNA seviyelerinde belirgin bir artışı (6-40 kat) indüklediğini ortaya koymuşlardır.

Rodríguez-Enríquez ve ark (2010) yaptıkları bir çalışmada, kısa süreli hipoksi (%0,1 O₂, 8 saat) den sonra HeLa hücrelerinde normoksiye kıyasla GLUT1 mRNA ve protein içeriklerinin arttığını, HKII transkripti değişmeden kalmasına rağmen HKII protein içeriğinde 3.2 kat bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. MCF7 hücrelerinde de GLUT1 ve HKII mRNA'larında önemli bir değişim gözlenmezken HeLa hücrelerine benzer şekilde GLUT ve HKII protein seviyelerinde önemli miktarda değişim olmuştur. Uzun süreli hipoksiden sonra (%0,1 O₂, 24 saat) ise HIF1 α transkripsiyon seviyelerinde değişim gözlenmemiş veya bir azalış olmuş ancak HIF1 α protein içeriği her iki kanser hücresinde de 4 kata kadar artmıştır. HIF1 α 'daki protein oluşumu artan GLUT1 (1.9 kat ve 2.3 kat) ve HKII (1.5 kat) mRNA'larında görüldüğü gibi her iki tümörde de aktif bir transkripsiyonel fonksiyon ile korelasyon göstermektedir. Buna karşılık, sitozolik HKII (1.4-2.2 kat) aktivitesinin yanı sıra GLUT1 (2.3 kat) ve HKII (4.5-5.5 kat) protein seviyesi de ayrıca artmıştır. Ayrıca MCF-7 ve HeLa hücrelerinde glikolitik akış da sırasıyla 3.7 ve 6 kat artış göstermiştir. Elde edilen bulgular hipoksiye transkripsiyonel cevabın büyük olasılıkla hücreler hücumu maruz kaldıktan kısa bir süre sonra ortaya çıktığını ve 24 saatte görülen mRNA kararlı durum seviyelerinin her mRNA'nın sentez ve bozulma süreçlerine bağlı farklı yarılanma ömürlerinden kaynaklandığını göstermiştir (Rodríguez-Enríquez ve ark, 2010).

HK2, PKM2 gibi önemli glikolitik kilit enzimlere ek olarak ayrıca fosfosfruktokinazı (PFK) kodlayan genler de HIF1 α aracılı diferansiyel ekspresyona uğrayarak Warburg etkisine katkı sağlarlar. PFK'nin, diğer glikolitik enzimler gibi hücresel süreçleri düzenlediğine dair kanıtlar vardır (Lincet ve Icard, 2015). PFK-M, PFK-L ve PFK-P, sırasıyla kasta, karaciğerde ve trombositlerde eksprese edilen başlıca izoformlardır (Sola-Penna ve ark, 2010). Vora ve ark (1985), L ve P PFK izoformlarının, Warburg etkisinin aracılığı ile tümör ilerlemesinde oynadığı etkiyi tarif etmişlerdir. Daha yakın zamanlarda, insan meme kanseri hücrelerinin agresifliğinin ve glikolitik etkinliğin PFK-L ekspresyonu ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zancan ve ark, 2010). Cardim Pires ve ark (2017), HeLa hücrelerinin önceki çalışmalara uygun olan PFK-P izoformunu eksprese ettiğini bulmuşlardır. Šmerc ve ark (2011) ise, memeli kanser hücrelerinde PFK-M'nin post-translasyonel modifikasyonunun, kanserde glikolitik akı düzenlemesinde önemli bir değişikliği tetikleyebilen değişen kinetik parametrelere sahip aktif kısa PFK-M fragmanlarının oluşumuna yol açtığını ve bunun Warburg etkisi üzerinde etkisi olabildiğini göstermişlerdir.

Yapılan çalışmada, normoksik ortamda konsantrasyona bağlı elde edilen PFKP sonuçları HK2 verileri ile paralellik taşımaktadır ve bu durum her iki kilit enzimin normoksi ortamında birbirleriyle destek halinde çalıştığını göstermektedir. HK2 ile uyumlu şekilde

saatlere bağı olarak uygulama gruplarında dalgalı bir değişim (artış-azalış) söz konusudur. 15 ve 55 mM konsantrasyonlarında 12. ve 48. saatte enzim miktarlarının zamana bağı yükseldiğı görölmektedir. Bu saatlerde, glikolitik akışın hızlanması sonucu substratı olan F6P ile hızlı bir şekilde etkileşmesi amacıyla enzim sentezinin artış gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu durum aynı zamanda bu inkübasyon sürelerinde hiperglisemik koşulların Warburg etkisi yoluyla ortamdaki PFKP enzim seviyesini arttırdığını kanıtlar niteliktedir.

Olbryt ve ark (2006), glikolitik akıya hipoksinin etkisini değerlendirdikleri bir çalışmada, hipoksi maruziyetine uğratılan kanser hücrelerinin, PFKP'yi aşırı eksprese ettiği tespit etmişlerdir. Hipoksi sırasında karides hepatopankreasında glikolitik PFK ve glukoneojenik fruktoz bifosfataz (FBP) ekspresyonunun indüklendiğı gösterilmiştir (Cota-Ruiz ve ark, 2016). Hiperglisemi, pankreas kanseri glikolizini destekler. Pankreas kanseri BxPC-3 hücrelerinde LDHA aktivitesi ve HK2 ile PFKP ekspresyonunun hiperglisemik koşullar altında önemli ölçüde upregüle olduğu belirlenmiştir (Cheng ve ark, 2019). HIF-1 α yıkımı ise, LDHA aktivitesini ve HK2 ile PFKP ekspresyonunu downregüle etmiş ve laktat üretimini azaltmıştır. Hipoksi koşulunda hipergliseminin, HIF-1 α 'ya bağımlı ve bağımsız mekanizmalar ile pankreatik glikolizi indüklediğı rapor edilmiştir (Cheng ve ark, 2019).

Hipoksik koşullarda glukozsuz ortamda enzim miktarlarının 6., 12. ve 24. saatlerde diğer konsantrasyonlara göre yüksek olduğu görölmektedir ($p<0,001$). 5.5 mM glukoz ortamında enzim seviyelerinin glukozsuz ortama göre ilk 24 saat düştüğü, 24. saatten sonra ise yükseldiğı görölmüştür ($p>0,001$), bu durum uzun süreli hipoksinin normoglisemik ortamda enzim sentezini başlattığının bir kanıtı olabilir. Yüksek glukoz dozlarında ilk 6 saat konsantrasyona bağı enzim miktarının yüksek olması ($p<0,001$), hiperglisemik ortamda kısa süreli hipoksinin etkin olduğunu, 12. saatteki enzim seviyesindeki düşüşün ise metabolizmanın hipoksiye uyumlanarak enzim sentezini azaltmış olabileceğini düşündürmüştür. Uzun süreli (48 saat) hipokside enzim miktarı tekrar artmıştır. Normoksik ortamda HK2 ile PFKP düzeyleri benzer değişimler (artış-azalış) gösterirken, aynı benzerlik hipokside mevcut değildir. Elde edilen veriler hipoksinin her iki enzim üzerine olan etkinliğinin farklılığını kanıtlamıştır. Yüksek glukoz dozları için normoksi ve hipoksi arasındaki farklılıklar daha belirgin olmakla beraber 15 mM glukoz ortamında 6. ve 24. saatlerde hipokside normoksiye göre sırasıyla 14,91 ve 56,5 kat artış kaydedilmiştir. Bu durum bu inkübasyon sürelerinde hipoksi ile HIF1 α -bağı glikolitik akının indüklendiğini göstermektedir. 15 ve 55 mM glukoz ortamları için 12. saatlerde normoksiye göre hipokside enzim miktarlarında yüksek ölçüde azalma olması ise bu inkübasyonda normoksik ortamdaki

glikolitik akışın HIF1 α 'dan bağımsız farklı onkogenler vasıtasıyla tetiklendiğini ortaya koymaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser hücresi enerji metabolizması normal dokularınkinden önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir. Çok sayıda çalışma, bu hücrelerin metabolizmalarını yeniden programladıklarını ve düzenlenen metabolizmanın kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edildiğini göstermiştir. Birçok kanser hücresi, normoksik veya hipoksik durum altında olsun ya da olmasın, enerji üretimi ve gerekli katabolik ve anabolik öncül maddelerini üretebilmek adına aerobik glikolize yönelirler. Dolayısıyla glikolitik yolağın içerisinde yer alan enzimler ve hücrede oluşan metabolitlerin hedeflenmesi yeni nesil antikanser ajanları geliştirmeyi amaçlayan kanser araştırmalarına etkili bir yaklaşım sağlamaya yardımcı olacaktır.

Yapılan çalışmada,

- Normoksik/hipoksik ve hiperglisemik ortamın Warburg etkisi yoluyla kanser hücresi çoğalmasına ve sağ kalımına katkı sağladığı, ayrıca hücrede glukoz tüketimini arttırdığı görülmüştür.
- Normoksiye kıyasla hipoksik hücrelerde glukozun hücre içine girişinin daha yüksek oranda olduğu ve hipergliseminin bu artışa muhtemel HIF1 α yolu aracılığı ile katkı sağladığı ayrıca hipoksi maruziyetinin uzaması sonucu hücrelerin ortama direnç kazanarak canlılıklarını koruyabildikleri gözlenmiştir.
- Hem normoksik hem de hipoksik ortamdaki hiperglisemik (55 mM glukoz) hücrelerde 6. saatten itibaren hücre migrasyonu hızlanmış, yara açıklığı yüzdeleri azalmıştır. Uzun süreli hipoksi maruziyeti yüksek miktarda glukoz içeren ortamda hücrelerin göç potansiyelini arttırmıştır.
- Hücrelerin glukozsuz kalması hem normoksi hem de hipokside hücre canlılığı ve yara iyileşmesi oranlarını azaltmış, hücrelerin morfolojilerinde büyük değişimlere sebebiyet vermiştir. Elde edilen sonuçlar, glukozun kanser hücreleri için ne kadar önemli bir besin kaynağı olduğunu gösterir niteliktedir.
- Çalışmanın laktat sonuçları ise, MCF 7 hücrelerinde Crabtree etkisinin baskın çalıştığını, hem normoksi hem de hipokside kanser hücrelerinin glikolizi tercih ettiğini kanıtlamıştır. Yüksek laktat miktarları, hücrelerin canlılıkları ve migrasyon kabiliyetleri ile doğru orantılı değişim sergilemiştir.

- Ekstrasellüler laktat oluşumu ile LDHA düzeyleri arasında hipoksik ortamda ters bir orantı olduğu belirlenmiş ve bu durumun hipoksinin glikolitik akıyı hızlandırması sonucu ortamda biriken laktat seviyelerinin enzim sentezini durdurması yoluyla gerçekleştiği kanaatine varılmıştır.
- Glukoz konsantrasyonundan ziyade inkübasyon sürelerinin PKM2 enzimi üzerine etkisinin daha net olduğu ve ilk 6 saatte enzim miktarlarının maksimum düzeyde seyrettiği görülmüştür. Hiperglisemik koşulda uzun süreli hipoksik müdahale de enzim sentezini arttırmıştır.
- Hipoksik ortamda ilk 6 saat PKM2 ve G6PD enzimlerinin tüm konsantrasyonlar için en yüksek düzeyde olduğu ve birbiriyle denge halinde çalıştığı belirlenmiştir. Bu veriler, kanser hücrelerinde kısa süreli hipoksik maruziyetin hem glikolitik yolağı hem de PPP'nu aktive ettiğini göstermiştir. Normoksida G6PD enzimi seviyelerinin hipoksiye göre yüksek seyretmesi, normoksida G6P'ın PPP'na, hipoksida ise glikolitik akışa yönlendirildiğinin bir göstergesi olabilir.
- Normoksida glukozsuz ortamlarda HK2 enzim seviyesinin diğer tüm konsantrasyonlara nazaran yüksek miktarda seyrediyor olması önemli bir öncül madde olan glukozun eksikliğinin bu enzim miktarını arttırmaya yönelik bir tetikleme gösterdiğini kanıtlamıştır. Literatürde buna yönelik hipoglisemik (2,5 mM glukoz) ortamlarda enzim/taşıyıcı miktar ve aktivitelerinin doygunluğun altındaki substrat seviyelerinde çalıştığı gösterilmiş olup ileride yapılacak çalışmalarda 0-5.5 mM aralığındaki glukoz konsantrasyonlarının da enzim üzerine olan etkinliklerinin incelenmesi gerekliliği saptanmıştır.
- Normoksik ortamda iki kilit enzim olan HK2 ve PFKP enzimlerinin inkübasyon süresine bağlı olarak miktarlarında benzer değişimler (artış-azalış) olduğu ve bu koşulda denge halinde çalıştıkları belirlenmiştir. Aynı durum hipoksida mevcut olmayıp, hipoksinin enzimler üzerine olan etkinliğinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Enzimlerin tümünün ileri inkübasyon süresinde (48. Saat) özellikle normoksik ve hiperglisemik (15 ve 55 mM) ortamlarda seviyelerinin arttığı, Warburg etkisinin çalıştığı izlenmiştir.
- Çalışmada tüm uygulama gruplarında yer alan MCF-7 meme kanseri hücrelerinden elde edilmiş olan farklı düzeyde enzim miktarları, oksijen gerilimine uyumlanmada

hücrelerin birbirlerinden ayrı potansiyel kapasitelere ve değişen mekanizmalara sahip olduğunu da göstermiştir.

Glikolitik yolaktaki enzimlerin miktarlarındaki değişimlerin glikolitik yol akışı ile ilgili tüm oluşumları tam olarak yansıtamadığı açıktır. Glikolitik regülasyondaki farklılıkların genetik bazlı modülasyonlara ek olarak, translasyon seviyesindeki değişiklikler, yol enzimlerinin veya sinyal moleküllerinin alternatif post-translasyonel modifikasyonları, enzimlerdeki nokta mutasyonları ve doğrudan veya dolaylı metabolik geri besleme yoluyla meydana gelmesi mümkündür (Vander Heiden ve ark, 2009; Fritz ve Fajas, 2010; Levine ve Puzio-Kuter, 2010; Herling ve ark, 2011; Blount, 2013). Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalar için hipoksinin enzimlere olan metabolik etkilerinin transkripsiyon düzeyinde ve protein varyasyonlarındaki değişimler ile birlikte ele alarak ayrıca aktivite parametrelerinin tamamının da ölçülmesine gerek olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında kanser metabolizmasının aydınlatılmasında hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmaların paralel yürütülmesi daha bütünsel sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab AF, Mahmoud W, Al-Harizy RM.** Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: prospective of anti-glycolytic cancer therapy. *Pharmacological Research* 2019, 150, 104511.
- Adamaki M, Georgountzou A, Moschovi M.** Cancer and the Cellular Response to Hypoxia. *Pediatrics & Therapeutics* 2012, S1:002.
- Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, Ameneiros-Rodríguez E, Donapetry-García C, Vila-Altesor M, Rodríguez-Seijas J.** Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* 2014, 17C,76–100.
- Ahn WS, Dong W, Zhang Z, Cantor JR, Sabatini DM, Iliopoulos O, Stephanopoulos G.** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase modulates nonoxidative pentose phosphate pathway to provide anabolic precursors in hypoxic tumor cells. *AlChe Journal* 2018, 64, 12.
- Alam MM, Lal S, FitzGerald KE, Zhang L.** A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. *Clinical and translational medicine* 2016, 5 (3).
- Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang JK, Shen M, Bellinger G, Sasaki AT, Locasale JW, Auld DS, Thomas CJ, Vander Heiden MG, Cantley LC.** Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 2011, 334 (6060),1278-1283.
- Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R.** Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Letters* 2015, 358, 1-7.
- Ausina P, Da Silva D, Majerowicz D, Zancan P, Sola-Penna P.** Insulin specifically regulates expression of liver and muscle phosphofructokinase isoforms. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018, 103, 228-233.
- Baenke F.** Metabolic dependencies of breast cancer cells, Doktora Tezi, Londra Üniversitesi Kanser Araştırma Enstitüsü, Londra 2012, 325.

Bao Z, Chen K, Krepel S, Tang P, Gong W, Zhang M, Liang W, Tivett A, Zhou M, Wang JM. High Glucose Promotes Human Glioblastoma Cell Growth by Increasing the Expression and Function of Chemoattractant and Growth Factor Receptors. *Translational Oncology* 2019, 12 (9), 1155-1163.

Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2016, 65(2),124-139.

Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007, 39 (3), 223-229.

Batetta B, Pulisci D, Bonatesta RR, Sanna F, Piras S, Mulas MF, Spano O, Putzolu M, Broccia G, Dessì S. G6PD activity and gene expression in leukemic cells from G6PD-deficient subjects. *Cancer Letters* 1999, 140 (1-2), 53-58.

Baumann MU, Zamudio S, Illsley NP. Hypoxic upregulation of glucose trans-porters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-induciblefactor-1. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007, 293, C477–C485.

Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266 (24), 15563-15566.

Bensinger SJ, Christofk HR. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Seminars in Cell&Developmental Biology* 2012, 23, 352-361.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2008, 8 (12), 967-975.

Blount KG. Cancer Systems Biology: Is the devil in the glycolytic detail? Doktora Tezi, University of Manchester School of Chemical Engineering and Analytical Sciences, Manchester 2013.

Bluemlein K, Grüning NM, Feichtinger RG, Lehrach H, Kofler B, Ralser M. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2011, 2 (5), 393-400.

Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Ketones and lactate ‘fuel’ tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 2010, 9, 3506–3514.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters* 2007, 581(19), 3582-3591.

Bristow RG, Hill RP. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8, 180–192.

Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 1999, 96, 1129-1134.

Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism* 2018, 27(4), 757-785.

Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research* 1998, 58 (7), 1408-1416.

Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer* 1993, 72 (10), 2979-2985.

Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. Cancer Cell Metabolism. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 2011, 76, 299-311.

Caltrider NC, Lehman JM. Changes in lactate dehydrogenase enzyme pattern in Chinese hamster cells infected and transformed with Simian virus 40. *Cancer Research* 1975, 35(8), 1944-1949.

Cardim Pires TR, Albanese JM, Schwab M, Marette A, Carvalho RS, Sola-Penna M, Zancan P. Phosphofructokinase-P Modulates P44/42 MAPK Levels in HeLa Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2017, 118(5), 1216-1226.

Cerella C, Dicato M, Diederich M. Modulatory roles of glycolytic enzymes in cell death. *Biochemical Pharmacology* 2014, 92 (1), 22-30.

Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin A.C.L, Maddocks O.D.K, Chokkathykalam A, Coyle JE, Jankevics A, Holding FP, Vousden KH, Frezza C, O'Reilly Marc, Gottlieb E. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* 2012, 491,458-462.

Chaneton B, Gottlieb E. Rocking cell metabolism: revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 2012, 37(8), 309-316.

Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1826, 370-384.

Cheng L, Qin T, Ma J, Duan W, Xu Q, Li X, Han L, Li W, Wang Z, Zhang D, Ma Q, Lei J. Hypoxia-inducible Factor-1 α Mediates Hyperglycemia-induced Pancreatic Cancer Glycolysis. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2019, 19(12), 1503-1512.

Christensen DR, Calder PC, Houghton FD. GLUT3 and PKM2 regulate OCT4 expression and support the hypoxic culture of human embryonic stem cells. *Scientific Reports* 2015, 5, 17500.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Centley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 2008, 452, 181-186.

Clem B, Telang S, Clem A, Yalcin A, Meier J, Simmons A, Rasku MA, Arumugam S, Dean WL, Eaton J, Lane A, Trent JO, Chesney J. Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008, 7 (1), 110–120.

Coelho WS, Costa KC, Sola-Penna M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Molecular genetics and metabolism* 2007, 92(4), 364-370.

Colell A, Green DR, Ricci JE. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell death and differentiation* 2009, 16 (12), 1573-1581.

Comşa Ş, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* 2015, 35, 3147-3154.

Connor H, Woods HF, Ledingham JG. Comparison of the kinetics and utilisation of D(-)- and L(+)-sodium lactate in normal man. *Annals of Nutrition & Metabolism* 1983, 27(6),481-487.

Costa Leite T, Da Silva D, Guimarães Coelho R, Zancan P, Sola-Penna M. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *The Biochemical Journal* 2007, 408 (1),123-130.

Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal* 1929, 23, 536–545.

Cui XG, Han ZT, He SH, Wu XD, Chen TR, Shao CH, Chen DL, Su N, Chen YM, Wang T, Wang J, Song DW, Yan WJ, Yang XH, Liu T, Wei HF, Xiao J. HIF1/2 α mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 2017, 8(15), 24840-24852.

Dakubo GD. The Warburg phenomenon and other metabolic alterations of cancer cells. In: Mitochondrial genetics and cancer. Springer-Verlag, Heidelberg, 2010, 39–66.

Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 1999, 24, 68–72.

Danhier P, Bariski P, Payen VL, Grasso D, Ippolito L, Sonveaux P, Porporato PE. Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et biophysica acta Bioenergetics* 2017, 1858 (8), 556-572.

DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2016, 2, e1600200.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G and Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* 2008, 7(1),11-20.

Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics & development* 2008, 18, 54-61.

Dehne N, Hintereder G, Brüne B. High glucose concentrations attenuate hypoxia-inducible factor-1 α expression and signaling in non-tumor cells. *Experimental Cell Research* 2010, 316 (7), 1179-1189.

DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2016, 66, 31-42.

Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Current Pharmaceutical Design* 2012,10, 1319-1330.

Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation* 2013, 123(9),3685-3692.

Dong W, Keibler MA, Stephanopoulos G. Review of metabolic pathways activated in cancer cells as determined through isotopic labeling and network analysis. *Metabolic Engineering* 2017, 43, 113-124.

Draoui N, Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease Models & Mechanism* 2011, 4 (6), 727–732.

Eales KL, Hollinshead KER, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 2016, 5, e190.

El-Bacha T, de Freitas MS, Sola-Penna M. Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Molecular genetics and metabolism* 2003, 79, 294-299.

Elstrom RL, Bauder DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research* 2004, 64 (11), 3892-3899.

Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Research* 2013, 73(5),1524-1535.

Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, Olayide I, Emuowhochere R. Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of glucose metabolism* 2017, 3(2), 45–51.

Faloppi L, Bianconi M, Memeo R, Casadei Gardini A, Giampieri R, Bittoni A, Andrikou K, Del Prete M, Cascinu S, Scartozzi M. Lactate Dehydrogenase in Hepatocellular Carcinoma: Something Old, Something New. *BioMed Research International* 2016, 2016, 7196280.

Fang M, Shen Z, Huang S, Zhao L, Chen S, Mak TW, Wang X. The ER UDPase ENTPD5 promotes protein Nglycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway. *Cell* 2010, 143,711–724.

Fang Z, Jiang C, Feng Y, Chen R, Lin X, Zhang Z, Han L, Chen X, Li H, Guo Y, Jiang W. Effects of G6PD activity inhibition on the viability, ROS generation and mechanical properties of cervical cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 2016, 1863 (9), 2245-2254.

Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG,¹ Yang C, Do QN, Doucette S, Burguete D, Li H, Huet G, Yuan Q, Wigal T, Butt Y, Ni M, Torrealba J, Oliver D, Lenkinski RE, Malloy CR, Wachsmann JW, Young JD, Kernstine K, DeBerardinis RJ. Lactate metabolism in human lung tumors. *Cell* 2017, 171(2), 358–371.

Favaro E, Lord S, Harris AL, Buffa FM. Gene expression and hypoxia in breast cancer. *Genome Medicine* 2011, 3-55.

Felix K, Rockwood LD, Pretsch W, Nair J, Bartsch H, Bornkamm GW, Janz S. Moderate G6PD deficiency increases mutation rates in the brain of mice. *Free Radical Biology& Medicine* 2002, 32 (7), 663-673.

Feng C, Gao Y, Wang C, Yu X, Zhang W, Guan H, Shan Z, Teng W. Aberrant overexpression of pyruvate kinase M2 is associated with aggressive tumor features and the BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013, 98 (9), E1524-1533.

Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 21021–21027.

Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreessen R, Krause SW, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007, 109 (9), 3812-3819.

Fritz V, Fajas L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene* 2010, 29 (31), 4369–4377.

Gallo M, Sapio L, Spina A, Naviglio D, Calogero A, Naviglio S. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview. *Frontiers in Bioscience* 2015, 20, 1234-1249.

Gao L, Mejías R, Echevarría M, López-Barneo J. Induction of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression by chronic hypoxia in PC12 cells. *FEBS Letters* 2004, 569(1-3), 256-260.

Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 2006, 312, 1158 -1159.

Garcin ED. GAPDH as a model non-canonical AU-rich RNA binding protein. *Seminar in Cell & Development Biology* 2019, 86, 162-173.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews cancer* 2004, 4, 891-899.

Gerszon J, Rodacka A. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegenerative processes and the role of low molecular weight compounds in counteracting its aggregation and nuclear translocation. *Ageing Research Reviews* 2018, 48, 21-31.

Gess B, Hofbauer KH, Deutzmann R. Hypoxia up-regulates triosephosphate isomerase expression via a HIF-dependent pathway. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 2004, 448 (2), 175-180.

Gill KS, Fernandes P, O'Donovan TR, McKenna SL, Doddakula KK, Power DG, Soden DM, Forde PF. Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response. *Biochimica et biophysica acta* 2016, 1866 (1), 87-105.

Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *The Journal of experimental biology* 1998, 201,1129-1139.

Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Mendez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1995, 27, 583-596.

Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *International Journal of Oncology* 2011, 39 (2), 453-463.

Goodwin ML, Gladden LB, Nijsten MWN, Jones KB. Lactate and cancer: revisiting the Warburg effect in an era of lactate shuttling. *Frontiers in Nutrition* 2015, 1, 27.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996, 379, 88–91.

Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 24446-24453.

Grimm M, Alexander D, Munz A, Hoffmann J, Reinert S. Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis* 2013, 30(4), 529-540.

Gui DY, Lewis CA, Vander-Heiden MG. Allosteric Regulation of PKM2 Allows Cellular Adaptation to Different Physiological States. *Science Signaling* 2013, 6,7.

Guillaumond F, Leca J, Olivares O, Lavaut MN, Vidal N, Berthezene P, Dusetti NJ, Loncle C, Calvo E, Turrini O, Lovanna JL, Tomasini R, Vasseur S. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013, 110 (10), 3919–3924.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* 1999, 31, 261-272.

Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK, Sheng X, Zhou C, Bae-Jump VL. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecologic Oncology* 2015, 138 (3), 668-675.

Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G, Xu Q, Zhou S, Wu E. High Glucose Promotes Pancreatic Cancer Cell Proliferation via the Induction of EGF Expression and Transactivation of EGFR. *PLoS One* 2011, 6 (11), e27074.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, 100 (1), 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5), 646-674.

Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *Journal of Radiation Research* 2016, 57, i99–i105.

Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2016, 49 (1), 276-284.

Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway – new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science* 2004, 117, 5479–5487.

Harris AL. Hypoxia a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer* 2002, 2 (1), 38-47.

Hasawi NA, Alkandari MF, Luqmani YA. Phosphofructokinase: A mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2014, 92 (3), 312-321.

Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, Murata Y. Induction of glucosetransporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypox-ic conditions in trophoblast-derived cells. *The Journal Endocrinology* 2004, 183, 145–154.

Herling A, König M, Bulik S, Holzhütter HG. Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal* 2011, 278, 2436-2459.

Hildebrandt T, Knuesting J, Berndt C, Morgan B, Scheibe R. Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biological chemistry* 2015, 396 (5), 523-537.

Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Research* 2011, 71(22), 6921-6925.

Hitosugi T, Kang S, Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K, Dong S, Lonial S, Wang X, Chen GZ, Xie J, Gu TL, Polakiewicz RD, Roesel JL, Boggon TJ, Khuri FR, Gilliland DG, Cantley LC, Kaufman J, Chen J. Tyrosine Phosphorylation Inhibits PKM2 to Promote the Warburg Effect and Tumor Growth. *Science Signalling* 2009, 2, ra73.

Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J, Kang HB, Seo JH, Shan C, Dai Q, Zhang L, Xie J, Gu TL, Jin P, Aleckovic M, LeRoy G, Kang Y, Sudderth JA, DeBerardinis RJ, Luan CH, Chen GZ, Muller S, Shin DM, Owonikoko TK, Lonial S, Arellano ML, Khoury HJ, Khuri FR, Lee BH, Ye K, Boggon TJ, Kang S, He C, Chen J. Phosphoglycerate Mutase 1 Coordinates Glycolysis and Biosynthesis to Promote Tumor Growth. *Cancer cell* 2012, 22, 585-600.

Ho N, Choomber BL. Hexokinase II expression is correlated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Treatment Communications* 2016, 6, 11-16.

Holm E, Hagmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Research* 1995, 55, 1373–1378.

Houddane A, Bultot L, Novellademunt L, Johanns M, Gueuning MA, Vertommen D, Coulie PG, Bartrons R, Hue L, Rider MH. Role of Akt/PKB and PFKFB isoenzymes in the control of glycolysis, cell proliferation and protein synthesis in mitogen-stimulated thymocytes. *Cellular Signalling* 2017, 34, 23-37.

Hsia CC, Schmitz A, Lambertz M, Perry SF, Maina JN. Evolution of air breathing: oxygen homeostasis and the transitions from water to land and sky. *Comprehensive Physiology* 2013, 3(2), 849-915.

Hu T, Zhang C, Tang Q, Su Y, Li B, Chen L, Zhang Z, Cai T, Zhu Y. Variant G6PD levels promote tumor cell proliferation or apoptosis via the STAT3/5 pathway in the human melanoma xenograft mouse model. *BMC Cancer* 2013, 13, 251.

Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2014, 46 (3), 214–219.

Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, Esparza LA, Reya T, Le Zhan, Yanxiang Guo J, White E, Rabinowitz JD. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature* 2017, 551(7678),115-118.

Hunt TK, Aslam R, Hussain Z, Beckert S. Lactate, with oxygen, incites angiogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 2008, 614,73-80.

Hussien R, A.Brooks G. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiological Genomics* 2011, 43 (5), 255-264.

Icard P, Shulman S, Ferhat D, Steyaert JM, Alifano M, Lincet H. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2018, 38,1-11.

Imamura K, Tanaka T. Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods in Enzimology* 1982, 90, 150-165.

Iqbal MA, Gupta V, Gopinath P, Mazurek S, Bamezai RNK. Pyruvate kinase M2 and cancer: an updated assessment. *FEBS Letters* 2014, 588 (16), 2685-2692.

Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1996, 19 (11), 1518-1520.

Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer. *Seminars in Cell &Developmental Biology* 2015, 43, 43-51.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of

O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes&Development* 1998, 12(2),149-162.

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *The American journal of physiology* 1996, 271,C1172-1180.

Jiang P, Du W, Wu M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein&Cell* 2014, 5 (8), 592-602.

Jiang XP, Elliot RL, Head JH. Exogenous normal mammary epithelial mitochondria suppress glycolytic metabolism and glucose uptake of human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 2015, 153, 519-529.

Jin MS, Lee H, Park IA, Chung YR, Im SA, Lee KH, Moon HG, Han W, Kim K, Kim TY, Noh DY, Ryu HS. Overexpression of HIF1 α and CAXI predicts poor outcome in early-stage triple negative breast cancer. *Virchows Archives* 2016, 469(2),183-190.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular Cell* 2005,18, 283–293.

Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/ polyol transport facilitators: *me*, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Molecular Membrane Biology* 2001,18, 247–256.

Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94(11), 5667-5672.

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 α by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274 (10), 6519-6525.

Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biology* 2017, 12, 883-842.

Karim S, Adams DH, Lalor PF. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal of Gastroenterology* 2012, 18 (46), 6771-6781.

Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International* 2013,13, 89.

Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St-Pierre Y, Hata R. Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *The FEBS Journal* 2007, 274, 3171–3183.

Keller KE, Tan IS, Lee YS. SAICAR Stimulates Pyruvate Kinase Isoform M2 and Promotes Cancer Cell Survival in Glucose -Limited Conditions. *Science* 2012, 338 (6110), 1069–1072.

Keshari KR, Sriram R, Van Criekinge M, Wilson DM, Wang ZJ, Vigneron DB, Peehl DM, Kurhanewicz J. Metabolic reprogramming and validation of hyperpolarized ¹³C lactate as a prostate cancer biomarker using a human prostate tissue slice culture bioreactor. *The Prostate* 2013, 73 (11), 1171-1181.

Khatri S, Yepiskoposyan H, Gallo CA, Tandon P, Plas DR. FOXO3a regulates glycolysis via transcriptional control of tumor suppressor TSC1. *The Journal of Biological Chemistry* 2010, 285, 15960–15965.

Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer research* 2006, 66 (18), 8927-8930.

Kim JW, Zeller KI, Wang Y, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV. Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Molecular and cellular biology* 2004, 24 (13), 5923-5936.

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB Journal* 1994, 8, 174-181.

Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Annals of Surgical Oncology* 2008, 15 (8), 2336-2344.

Kondoh E, Mori S, Yamaguchi K, Baba T, Matsumura N, Cory Barnett J, Whitaker RS, Konishi I, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK. Targeting slow-proliferating ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer* 2010, 126 (10), 2448-2256.

Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1 alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO Journal* 2004, 23 (9), 1949–1956.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Research* 2006, 66 (2), 632-637.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, Harris AL. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer* 2003, 89 (5), 877–885.

Kowalik MA, Columbano A, Perra A. Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology* 2017, 11 (7), 87.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008, 13 (6), 472-482.

Le QT, Chen E, Salim A, Cao H, Kong CS, Whyte R, Donington J, Cannon W, Wakelee H, Tibshirani R, Mitchell JD, Richardson D, O'Byrne KJ, Koong AC, Giaccia AJ. An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, 12,1507-1514.

Leach RM, Treacher DF. Oxygen transport-2. Tissue hypoxia. *Bmj* 1998, 317,1370-1373.

Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute* 2015, 107 (7).

Lee DC, Sohn HA, Park ZY, Oh S, Kang YK, Lee KM, Kang M, Jang YJ, Yang SJ, Hong YK, Noh H, Kim JA, Kim DJ, Bae KH, Kim DM, Chung SJ, Yoo HS, Yu DY, Park KC, Yeom YI. A lactate-induced response to hypoxia. *Cell* 2015, 161(3), 595-609.

Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *The Journal of Biological Chemistry* 2014, 18, 12189-12194.

Leontieva OV, Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Rapamycin reverses insulin resistance (IR) in high-glucose medium without causing IR in normoglycemic medium. *Cell Death&Desease* 2014, 5(5), e1214.

Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research* 1997, 57(15), 3071-3078.

Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 2010, 330 (6009), 1340-1344.

Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT, Lee LA, Dang CV. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and cellular biology* 2005, 25 (14), 6225-6234.

Li H, Xu H, Xing R, Pan Y, Li W, Cui J, Lu Y. Pyruvate kinase M2 contributes to cell growth in gastric cancer via aerobic glycolysis. *Pathology, research and practice* 2019, 215(6), 152409.

Li J, Han X. Adipocytokines and breast cancer. *Current Problems in Cancer* 2018, 42, 208-214.

Li N, Tan W, Li J, Li P, Lee S, Wang Y, Gong Y. Glucose Metabolism in Breast Cancer and Its Implication in Cancer Therapy. *International Journal of Clinical Medicine* 2011, 2, 110-128.

Li W, Liu H, Qian W, Cheng L, Yan B, Han L, Xu Q, Ma Q, Ma J. Hyperglycemia aggravates microenvironment hypoxia and promotes the metastatic ability of pancreatic cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2018, 16, 479-487.

Liberti MV, Dai Z, Wardell SE, Baccile JA, Liu X, Gao X, Baldi R, Mehrmohamadi M, Johnson MO, Madhukar NS, Shestov AA, Chio IIC, Elemento O, Rathmell JC, Schroeder FC, McDonnell DP, Locasale JW. A Predictive Model for Selective Targeting of the Warburg Effect through GAPDH Inhibition with a Natural Product. *Cell Metabolism* 2017, 26, 648–659 e648.

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences* 2016, 41 (3), 211-218.

Lincet H, Icard P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene* 2015, 34 (29), 3751-3759.

Lis P, Dyląg M, Niedźwiecka K, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ulaszewski S. The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2016, 15, 21(12).

Liu H, Ma Q, Li J. High glucose promotes cell proliferation and enhances GDNF and RET expression in pancreatic cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2011, 347(1–2), 95–101.

Liu H, Hu YP, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ. Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry* 2001, 40(18), 5542-5547.

Liu T, Yin H. PDK1 promotes tumor cell proliferation and migration by enhancing the Warburg effect in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports* 2017, 37(1), 193-200.

Liu WR, Tian MX, Yang LX, Lin YL, Jin L, Ding ZB, Shen YH, Peng YF, Gao DM, Zhou J, Qiu SJ, Dai Z, He R, Fan J, Shi YH. PKM2 promotes metastasis by recruiting myeloid-derived suppressor cells and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2015, 6, 846-861.

Liu XS, Little JB, Yuan ZM. Glycolytic metabolism influences global chromatin structure. *Oncotarget* 2015, 6 (6),4214-4225.

Liu Y, Huo Y, Wang D, Tai Y, Lie J, Pang D, Zhang Y, Zhao W, Du N. MiR-216a-5p/Hexokinase 2 axis regulates uveal melanoma growth through modulation of Warburg effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018, 501, 885-892.

Liu Z, Jia X, Duan Y, Xiao H, Sundqvist KG, Permert J, Wang F. Excess glucose induces hypoxia-inducible factor-1 α in pancreatic cancer cells and stimulates glucose metabolism and cell migration. *Cancer Biology&Therapy* 2013, 14 (5), 428-435.

Liu Z, Jia X, Duan Y, Xiao H, Sundqvist KG, Permert J, Wang F. Excess glucose induces hypoxia-inducible factor-1 α in pancreatic cancer cells and stimulates glucose metabolism and cell migration. *Cancer Biology&Therapy* 2013, 14 (5), 428-435.

Locasale JW, Cantley LC. Altered metabolism in cancer. *BMC Biology* 2010, 8, 88.

Locasale JW. New concepts in feedback regulation of glucose metabolism. *Current Opinion in Systems Biology* 2018, 8, 32–38.

Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidativemetabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters* 2015, 356, 156-164.

Lu R, Jiang M, Chen Z, Xu X, Hu H, Zhao X, Gao X, Guo L. Lactate dehydrogenase 5 expression in Non-Hodgkin lymphoma is associated with the induced hypoxia regulated protein and poor prognosis. *PLoS ONE* 2013, 8, e74853.

Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011, 145, 732–744.

Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget* 2011, 2 (7), 551–556.

Maekawa M. Lactate dehydrogenase isoenzymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1988, 429, 373-398.

Marín-Hernández A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, Rodríguez- Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Reviews in Medicine Chemistry* 2009, 9 (9), 1084-1101.

Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores- Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sossa Garrocho M, Moreno-Sánchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. *The FEBS Journal* 2006, 273 (9), 1975-1988.

Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Del Mazo-Monsalvo I, Robledo-Cadena DX, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Hypoglycemia Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasiveness, and Restrains the Warburg Phenotype, in Hypoxic HeLa Cell Cultures and Microspheroids. *Journal of Cellular Physiology* 2016, 232(6), 1346-1359.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Modeling cancer glycolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, 1807(6), 755-767.

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

Marinho-Carvalho MM, Costa-Mattos PV, Spitz GA, Zancan P, Sola-Penna M. Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, 1794 (8), 1175-1180.

Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 30778–30783.

Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta pharmaceutica Sinica B* 2015, 5 (5), 378-389.

Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 2006, 25(34), 4777-4786.

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276 (46), 43407-43412.

Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the “Warburg effect” and a pivotal target for effective therapy. *Seminars in Cancer Biology* 2009, 19 (1), 17-24.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology* 2005, 15, 300–308.

Mazurek S, Drexler HC, Troppmair J, Eigenbrodt E, Rapp UR. Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible glycolytic stop or go mechanism. *Anticancer Research* 2007, 27(6B), 3963-3971.

Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *The British Journal of Nutrition* 2002, 87, S1, 23-29.

Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011, 43 (7), 969-980.

Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biological Research* 2002, 35 (1), 9-26.

Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 2013, 65 (11), 904-910.

Minchenko O, Opentanova I, Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1–4) expression in vivo. *FEBS Letters* 2003, 554 (3), 264-270.

Miranda-Gonçalves V, Honavar M, Pinheiro C, Martinho O, Pires MM, Pinheiro C, Cordeiro M, Bebiano G, Costa P, Palmeirim I, Reis RM, Baltazar F. Monocarboxylate

transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-oncology* 2013, 15(2),172-188.

Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes, *Histology and Histopathology* 2005, 20, 1327–1338.

Moellering RE, Cravatt BF. Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite. *Science* 2013, 341,549–553.

Morgan HP, O'Reilly FJ, Wear MA, O'Neill JR, Fothergill-Gilmore LA, Hupp T, Walkinshaw MD. M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. *PNAS* 2013, 110 (15), 5881-5886.

Mukherjee J, Phillips JJ, Zheng S, Wiencke J, Ronen SM, Pieper RO. Pyruvate kinase M2 expression, but not pyruvate kinase activity, is up-regulated in a grade-specific manner in human glioma. *PLoS One* 2013, 8 (2), e57610.

Mulukutla BC, Yongky A, Le T, Mashek DG, Hu WS. Regulation of Glucose Metabolism—A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends in Biotechnology* 2016, 34 (8).

Murono K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Hongo K, Kaneko M, Hiyoshi M, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takashi K, Kitayama J. SN-38 Overcomes Chemoresistance of Colorectal Cancer Cells Induced by Hypoxia, through HIF1alpha. *Anticancer Research* 2012, 32, 865-872.

Nakatsu D, Horiuchi Y, Kano F, Noguchi Y, Sugawara T, Takamoto I, Kubota N, Kadowaki T, Murata M. L-cysteine reversibly inhibits glucose-induced biphasic insulin secretion and ATP production by inactivating PKM2. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 2015, 112 (10), E1067-1076.

Natsuizaka M, Ozasa M, Darmanin S, Miyamoto M, Kondo S, Kamada S, Shindoh M, Higashino F, Suhara W, Koide H, Aita K, Nakagawa K, Kondo T, Asaka M, Okada F, Kobayashi M. Synergistic up-regulation of Hexokinase-2, glucose transporters and angiogenic factors in pancreatic cancer cells by glucose deprivation and hypoxia. *Experimental Cell Research* 2007, 313 (15), 3337-3348.

Nelson DL, Cox MM. Biyokimyanın ilkeleri (Principles of Biochemistry) (3 nd ed), Kılıç N. (Edt), Ankara, Palme Yayıncılık, 2005, 486, 532-539.

Nishida Y, Rardin MJ, Carrico C, He W, Sahu AK, Gut P, Najjar R, Fitch M, Hellerstein M, Gibson BW, Verdin E. SIRT5 Regulates both Cytosolic and Mitochondrial Protein Malonylation with Glycolysis as a Major Target. *Molecular Cell* 2015, 59 (2), 321-232.

Noh H, Park J, Shim M, Lee YJ. Trichostatin A enhances estrogen receptor-alpha repression in MCF-7 breast cancer cells under hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016, 470 (3), 748-752.

Nowak N, Kulma A, Gutowich J. Up-regulation of key glycolysis proteins in cancer development. *Open Life Sciencies* 2018, 13, 569–581.

Okar DA, Lange AJ, Manzano A, Navarro-Sabatè A, Riera L, Bartrons R. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences* 2001, 26 (1), 30-35.

Olbryt M, Jarzab M, Jazowiecka-Rakus J, Simek K, Szala S, Sochanik A. Gene expression profile of B16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. *Gene Expression* 2006, 13,191–203.

Park I, Larson PE, Zierhut ML, Hu S, Bok R, Ozawa T, Kurhanewicz J, Vigneron DB, Vandenberg SR, James CD, Nelson SJ. Hyperpolarized ¹³C magnetic resonance metabolic imaging: application to brain tumors. *Neuro-oncology* 2010, 12 (2),133-144.

Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences* 2014, 39 (8), 347-354.

Pértiga-Gomes N, Vizcaíno JR, Miranda-Gonçalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, Monteiro P, Henrique RM, Reis RM, Lopes C, Baltazar F. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC* 2011, 11, 312.

Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 2001, 292, 504-507.

Philipson KA, Elder MG, White JO. The effects of medroxyprogesterone acetate on enzyme activities in human endometrial carcinoma. *Journal of Steroid Biochemistry* 1985, 23 (6), 1059-1064.

Pineda JR, Callender R, Schwartz SD. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase. *Biophysical Journal* 2007, 93, 1474–1483.

Pinheiro C, Albergaria A, Paredes J, Sousa B, Dufloth R, Vieira D, Schmitt F, Baltazar F. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* 2010, 56 (7), 860-867.

Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2012, 44 (1), 127-139.

Pinheiro C, Longatto-Filho A, Ferreira L, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jubé LF, Queiroz GS, Schmitt F, Baltazar F. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology* 2008, 27 (4), 568-574.

Polat MF, Taysi S, Gul M, Cikman O, Yilmaz I, Bakan E, Erdogan F. Oxidant/antioxidant status in blood of patients with malignant breast tumour and benign breast disease. *Cell Biochemistry and Function* 2002, 20 (4), 327-331. ,

Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology* 2011, 2, 49.

Prakasam G, Iqbal MA, Bamezai RNK, Mazurek S. Posttranslational Modifications of Pyruvate Kinase M2: Tweaks that Benefit Cancer. *Frontiers in Oncology* 2018, 8, 22.

Pugh CW, Tan CC, Jones RW, Ratcliffe PJ. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88 (23), 10553-10557.

Puzone R, Savarino G, Salvi S, Dal Bello MG, Barletta G, Genova C, Rijavec E, Sini C, Esposito AI, Ratto GB, Truini M, Grossi F, Pfeffer U. Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase gene over expression correlates with poor prognosis in non small cell lung cancer patients. *Molecular cancer* 2013, 12 (1), 97.

Rajendran R. TEZ The transcriptional cofactor PCAF as mediator of the interplay between p53 and HIF-1 alpha and its role in the regulation of cellular energy metabolism, Doktora Tezi, University of Manchester, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Manchester 2011.

Rattigan YI, Patel BB, Ackerstaff E, Sukenick G, Koutcher JA, Glod JW, Banerjee D. Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Experimental cell research* 2012, 318(4), 326–335.

Read JA, Winter VJ, Eszes CM, Sessions RB, Brady RL. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins* 2001, 43,175–185.

Ren BF, Deng LF, Wang J, Zhu YP, Wei L, Zhou Q. Hypoxia regulation of facilitated glucose transporter-1 and glucose transporter-3 in mouse chondrocytes mediated by HIF-1alpha. *Joint, Bone, Spine* 2008, 75 (2), 176-181.

Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *The Biochemical Journal* 2004, 381(Pt 3), 561-579.

Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Aldieri E, Ghigo D. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a cross road in tumor cell fate. *Free Radical Biology & Medicine* 2012, 53, 421–436.

Rocha-González HI, Herrejon-Abreu EB, López-Santillán FJ, García-López BE, Murbartíán J, Granados-Soto V. Acid increases inflammatory pain in rats: effect of local peripheral ASICs inhibitors. *European Journal of Pharmacology* 2009, 603 (1-3), 56-61.

Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandavol V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. “Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in

cervix carcinoma”, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2010, 42 (10), 1744–1751.

Rodríguez-Enríquez S, Juárez O, Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *European Journal of Biochemistry* 2001, 268 (8), 2512-2519.

Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MMB, Prado-Garcia H, Sánchez-García FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Frontiers in Immunology* 2016, 7, 52.

Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biology* 2013, 34(3),1523-1530.

Roy D, Sheng GY, Herve S, Carvalho E, Mahanty A, Yuan S, Sun L. Interplay between cancer cell cycle and metabolism: Challenges, targets and therapeutic opportunities. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2017, 89, 288-296.

Ruddon RW. Cancer Biology (4 nd ed), Oxford, Oxford University Press, 2007, 4.

Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, Seo BB, LeBoeuf SE, Gay LJ, Yagi T, Felding-Habermann B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation* 2013, 123 (3), 1068-1081.

Saraswathy S, Crawford FW, Lamborn KR, Pirzkall A, Chang S, Cha S, Nelson SJ. Evaluation of MR markers that predict survival in patients with newly diagnosed GBM prior to adjuvant therapy. *Journal of Neuro-oncology* 2009, 91(1), 69-81.

Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 2001, 21 (10), 3436-3444.

Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88 (13), 5680-5684.

Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 23757-23763.

Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwalla Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Foundation Symposium* 2001, 240, 251-260.

Semenza GL. HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007, 39 (3), 231-234.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012, 148 (3), 399-408.

Semenza GL. Oxygen homeostasis. Wiley interdisciplinary reviews. *Systems biology and medicine* 2010, 2 (3), 336-361.

Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *The New England Journal of Medicine* 2011, 365 (6), 537-547.

Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of Clinical Investigation* 2008, 118 (12), 3835-3837.

Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 2009, 9 (8), 563-575.

Shestov AA, Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Hung YP, Huang L, Kim D, Le A, Yellen G, Albeck JG, Locasale JW. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife* 2014, 9, 3.

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94 (13), 6658-6663.

Shuch B, Linehan WM, Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2013, 13, 711–719.

Šmerc A, Sodja E, Legiša M. Posttranslational modification of 6-phosphofructo-1-kinase as an important feature of cancer metabolism. *PLoS One* 2011, 6, e19645.

Smith HB. Metabolic Adaptations to MicroEnvironmental Stress in Tumour Spheroids, Doktora Tezi, University of Oxford Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, Oxford 2014.

Sola-Penna M, Da Silva D, Coelho WS, Marinho-Carvalho MM, Zancan P. Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life* 2010, 62 (11), 791-796.

Song K, Li M, Xu XJ, Xuan L, Huang GN, Song XL, Liu QF. HIF-1 α and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2014, 15 (4),1823-1829.

Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2008, 118(12),3930-3942.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S and Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1973, 51, 1409-1416.

Spoden GA, Rostek U, Lechner S, Mitterberger M, Mazurek S, Zwerschke W. Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply. *Experimental Cell Research* 2009, 315(16), 2765-2774.

Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life* 2012, 64, 362-369.

Steen KH, Issberner U, Reeh PW. Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation. *Neuroscience Letters* 1995, 199(1),29-32.

Sumiyoshi Y, Kakeji Y, Egashira A, Mizokami K, Orita H, Maehara Y. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clinical Cancer Research* 2006, 12 (17), 5112-5117.

Sun L, Suo C, Li S, Zhang H, Gao P. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 2018, 1870, 51-66.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences* 2017, 13 (11), 1387-1397.

Sussman I, Erecínska M, Wilson DF. Regulation of cellular energy metabolism. The Crabtree effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1980, 591, 209-223.

Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, 97(9), 4748-4753.

Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer metastasis reviews* 2007, 26 (2), 299-310.

Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 835 (2), 164-169.

Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O, Hirano H. Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1990, 173, 67–73.

Talasniemi JP, Pennanen S, Savolainen H, Niskanen L, Liesivuori J. Analytical investigation: assay of D-lactate in diabetic plasma and urine. *Clinical Biochemistry* 2008, 41(13), 1099-1103.

Tao L, Wei L, Liu Y, Ding Y, Liu X, Zhang X, Wang X, Yao Y, Lu J, Wang Q, Hu R. Gen-27, a newly synthesized flavonoid, inhibits glycolysis and induces cell apoptosis via suppression of hexokinase II in human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 2017, 125, 12-25.

Tátrai E, Bartal A, Gacs A, Paku S, Kenessey I, Garay T, Hegedűs B, Molnár E, Cserepes MT, Hegedűs Z, Kucsma N, Szakács G, Tóvári J. Cell type-dependent HIF1 α -mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells. *Oncotarget* 2017, 4, 8 (27), 44498–44510.

Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging and value of its measurement in managing cancer therapy. *International Journal of Radiation Biology* 2006, 82 (10), 699-757.

Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews* 2010, 10, 267-277.

Thamrongwarangoon U, Seubwai W, Phoomak C, Sangkhamanon S, Cha'on U, Boonmars T, Wongkham S. Targeting hexokinase II as a possible therapy for cholangiocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018, 484 (2), 409-415.

Timperley WR. Lactate dehydrogenase isoenzymes in tumours of the nervous system. *Acta Neuropathologica* 1971, 19 (1), 20-24.

Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of The National Cancer Institute* 2007, 99 (19), 1441-1454.

Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling* 2011, 23, 317–323.

Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology* 2016, 26, 3-17.

Van Den Brenk HA, Jamieson D. Potentiation by anaesthetics of brain damage due to breathing high-pressure oxygen in mammals. *Nature* 1962, 194, 777-778.

Van Driel BE, Valet GK, Lyon H, Hansen U, Song JY, Van Noorden CJ. Prognostic estimation of survival of colorectal cancer patients with the quantitative histochemical assay of G6PDH activity and the multiparameter classification program CLASSIF1. *Cytometry* 1999, 38(4), 76-83.

Van Heerden JH, Wortel MT, Bruggeman FJ, Heijnen JJ, Bollen YJ, Planqué R, Hulshof J, O'Toole TG, Wahl SA, Teusink B. Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells. *Science* 2014, 343(6174), 1245114.

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

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research* 1989, 49 (23), 6449-6465.

Vazquez A, Liu J, Zhou Y, Oltvai ZN. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Systems Biology* 2010, 4, 58.

Végran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Research* 2011, 71 (7), 2550-2560.

Vora S, Halper JP, Knowles DM. Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: Transformation- and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Research* 1985, 45, 2993–3001.

Wagner GR, Bhatt DP, O'Connell TM, Thompson JW, Dubois LG, Backos DS, Yang H, Mitchell GA, Ilkayeva OR, Stevens RD, Grimsrud PA, Hirschey MD. A Class of Reactive Acyl-CoA Species Reveals the Non-enzymatic Origins of Protein Acylation. *Cell Metabolism* 2017, 25 (4), 823-837.e8.

Wagner GR, Hirschey MD. Nonenzymatic protein acylation as a carbon stress regulated by sirtuin deacylases. *Molecular cell* 2014, 54 (1), 5-16.

Wahdan-Alaswad R, Fan Z, Edgerton SM, Liu B, Deng XS, Arnadottir SS, Richer JK, Anderson SM, Thor AD. Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell Cycle* 2013, 12 (24), 3759–3769.

Walenta S, Mueller-Klieser WF. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in Radiation Oncology* 2004, 14 (3), 267-274.

Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *The American Journal of Pathology* 1997, 150 (2), 409-415.

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundf r K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Research* 2000, 60 (4), 916-921.

Wang G, Xu Z, Wang C, Yao F, Li J, Chen C, Sun S. Differential phosphofructokinase-1 isoenzyme patterns associated with glycolytic efficiency in human breast cancer and paracancer tissues. *Oncology Letters* 2013, 6, 1701-1706.

Wang HJ, Hsieh YJ, Cheng WC, Lin CP, Lin YS, Yang SF, Chen CC, Izumiya Y, Yu JS, Kung HJ, Wang WC. JMJD5 regulates PKM2 nuclear translocation and reprograms HIF-1alpha-mediated glucose metabolism. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 2014, 111 (1), 279–284.

Wang L, Xiong H, Wu F, Zhang Y, Wang J, Zhao L, Guo X, Chang LJ, Zhang Y, You MJ, Koochekpour S, Saleem M, Huang H, Lu J, Deng Y. Hexokinase 2-Mediated Warburg Effect Is Required for PTEN- and p53-Deficiency-Driven Prostate Cancer Growth. *Cell Reports* 2014, 8, 1461-1474.

Wang W, He Q, Yan W, Sun J, Chen Z, Liu Z, Lu Z, Hou J, Shao Y, Zhou X, Wang A. High glucose enhances the metastatic potential of tongue squamous cell carcinoma via the PKM2 pathway. *Oncotarget* 2017, 8 (67), 111770-111779.

Wang ZY, Loo TY, Shen JG, Wang N, Wang DM, Yang DP, Mo SL, Guan XY, Chen JP. LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012, 131 (3), 791-800.

Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *The Journal of General Physiology* 1927, 8, 519-530.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956, 123, 309-314.

Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 alpha. *Cell Death and Differentiation* 2008,15, 621–627.

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB Journal* 2003, 17 (2), 271-273.

Wigerup C, Pählman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology&therapeutics* 2016, 164, 152-169.

Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* 2011, 11 (6), 393-410.

Wojtczak L. The Crabtree effect: a new look at the old problem. *Acta Biochimica Polonica* 1996, 43 (2), 361-368.

Wood T. Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochemistry&Function* 1986, 4, 241-247.

Wu Q, Li W, Zhu S, Li J, Wu J, Li X, Chen C, Wei W, Sun S, Wang C. High glucose induced human breast cancer cell MCF-7 viability, migration and invasion via the expression of AKT, MAPKs and STAT3. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2016, 9 (6), 11260-11267.

Xie H, Simon MC. Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *JBC* 2017, 292(41) 16825–16832.

Xu XD, Shao SX, Jiang HP, CAo YW, Wang YH, Yang XC, Wang YL, Wang XS, Niu HT. Warburg Effect or Reverse Warburg Effect? A Review of Cancer Metabolism. *Oncology Research and Treatment* 2015, 38, 117–122.

Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, Akazawa T, Inoue N. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *International Immunology* 2011, 23 (1), 29–41.

Yaligar J, Thakur SB, Bokacheva L, Carlin S, Thaler HT, Rizwan A, Lupu ME, Wang Y, Matei CC, Zakian KL, Koutcher JA. Lactate MRSI and DCE MRI as surrogate markers of prostate tumor aggressiveness. *NMR in Biomedicine* 2012, 25 (1), 113-122.

Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *The Biochemical Journal* 1999, 337, 1-11.

Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990, 16, 170 (1), 223-30.

Yan N. A Glimpse of Membrane Transport through Structures-Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *Journal of molecular biology* 2017, 429 (17), 2710-2725.

Yang IP, Tsai HL, Huang CW, Lu CY, Miao ZF, Chang SF, Juo SHH, Wang JW. High blood sugar levels significantly impact the prognosis of colorectal cancer patients through down-regulation of microRNA-16 by targeting Myb and VEGFR2. *Oncotarget* 2016, 5, 7 (14), 18837-18850.

Yang W, Lu Z. Regulation and function of pyruvate kinase M2 in cancer. *Cancer Letters* 2013, 339, 153–158.

Yang X, Borg LA, Eriksson UJ. Altered metabolism and superoxide generation in neural tissue of rat embryos exposed to high glucose. *The American Journal of Physiology* 1997, 272(1 Pt 1), E173-180.

Yang YC, Cheng TY, Huang SM, Su CY, Yang PW, Lee JM, Chen CK, Hsiao M, Hua KT, Kuo ML. Cytosolic PKM2 stabilizes mutant EGFR protein expression through regulating HSP90-EGFR association. *Oncogene* 2016, 35 (26), 3387.

Yao F, Zhao T, Zhong C, Zhu J, Zhao H. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biology* 2013, 34(1), 25-31.

Yaromina A, Quennet V, Zips D, Meyer S, Shakirin G, Walenta S, Mueller-Klieser W, Baumann M. Co-localisation of hypoxia and perfusion markers with parameters of glucose metabolism in human squamous cell carcinoma (hSCC) xenografts. *International journal of radiation biology* 2009, 85, 972-980.

Yasuda S, Arii S, Mori A, Isobe N, Yang W, Oe H, Fujimoto A, Yonenaga Y, Sakashita H, Imamura M. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor-1 α and its significance. *Journal of Hepatology* 2004, 40(1), 117-123.

Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, Thompson CB. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 2012, 109 (18), 6904-6909.

Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard III WA, Peters EC, Driggers EM, Hsieh-Wilson LC. Phosphofructokinase 1 Glycosylation Regulates Cell Growth and Metabolism. *Science* 2012, 337, 975-980.

Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells" *International Journal of Medical Sciences* 2013, 10 (1), 68-72.

Yu L, Hales CA. Long-term exposure to hypoxia inhibits tumor progression of lung cancer in rats and mice. *BMC Cancer* 2011, 11, 331.

Yun H, Lee M, Kim SS, Ha J. Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280 (11), 9963-9972.

Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio II, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross SS, Cantley LC. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science* 2015, 350 (6266), 1391-1396.

Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Da Silva D. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Molecular genetics and metabolism* 2010, 100(4), 372-378.

Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007, 11(5), 407–420.

Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, Zhang GJ, Cui YK. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biology & Medicine* 2015, 12, 10-22.

Zhang Z, Huang S, Wang H, Wu J, Chen D, Peng D, Zhou Q. High expression of hexokinase domain containing 1 is associated with poor prognosis and aggressive phenotype in hepatocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016, 474 (4), 673-679.

Zhang Z, Liew CW, Handy DE, Zhang Y, Leopold JA, Hu J, Guo L, Kulkarni RN, Loscalzo J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *FASEB Journal* 2010, 24(5), 1497-505.

Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current genomics* 2007, 8 (2), 113-128.

Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999, 259, 523-526.

Zhu S, Yao F, Li WH, Wan JN, Zhang YM, Tang Z, Khan S, Wang CH, Sun SR. PKC δ -dependent Activation of the Ubiquitin Proteasome System is Responsible for High Glucose-induced Human Breast Cancer MCF-7 Cell Proliferation, Migration and Invasion. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013, 14 (10), 5687-5692.

Ziebart T, Walenta S, Kunkel M, Reichert TE, Wagner W, Mueller-Klieser W. Metabolic and proteomic differentials in head and neck squamous cell carcinomas and normal gingival tissue. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2011, 137, 193-199.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : BAYAR, İrem
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : İzmir / 20.08.1989
E-mail : irem.bayar@selcuk.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi	
Y. Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi	2014
Lisans	Pamukkale Üniversitesi	2011

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Tübitak 1001 Projesi Bursiyer (01/11/2011-01/02/2014)

Tübitak 1002 Projesi Bursiyer (15/04/2018-15/04/2019)

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2019- Devam ediyor	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD	Öğr.Gör.
15.09.2014-15.09.2017	Saranel Koleji	Kimya Öğr.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Bildik A. ve Bayar İ. Inhibition of Apoptotic Pathways in Cancer. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences* 2018; 9(2):42-51.

2.PROJELER

TÜBİTAK 1001 Projesi /Proje No: 111T404 (01/11/2011-01/02/2014)

Hayvansal Gıda Örneklerindeki (Sığır Eti, Süt, Tavuk Eti, Yumurta Ve Kültür Balığı) Sülfonamid, Florokinolon ve Penisilin Grubu Antibiyotiklerinin Ekstraksiyonu İçin İyonik Sıvı ile Modifiye Edilmiş Kitosan Admisel Sorbentlerinin Hazırlanması ve Sıvı Kromatografisi (UHPLC) ile Tayinleri.

TÜBİTAK 4004 Projesi

Akdeniz'den Toroslar'a Bilim ve Doğa Eğitimi, Tübitak, Temmuz 2013, Mersin.

TÜBİTAK 1002 Projesi /Proje No: VTF-117Z735 (15/04/2018-15/04/2019)

MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Warburg Etkisinin ve Hipoksinin Glikoliz Enzimleri Gen Ekspresyonu Düzeyinde Araştırılması

3.BİLDİRİLER

1. Determination of Penicillins Using Ionic Liquid Based Chitosan", İrem Bayar, Paniz Tanizhakkori, Deniz Erdoğan, Mine Antep, Nalan Tüzmen, Melek Merdivan and Serap Seyhan Bozkurt 44th World Chemistry Congress, Istanbul- Turkey, 1 - 16 August, 2013.

2. "Development of Solid Phase Sorbents Based on Mono and Dicationic Imidazolium Ionic Liquids for Determination of Sulfonamides", İrem Bayar, Paniz Tanizhakkori, Deniz Erdoğan, Mine Antep, Nalan Tüzmen, Melek Merdivan and Serap Seyhan Bozkurt 44th World Chemistry Congress, Istanbul- Turkey, 1 - 16 August, 2013.

3. "Use of Hydrophilic and Hydrophobic Ionic Liquids in Solid Sorbents for Quantitative Determination of Fluoroquinolones by HPLC", İrem Bayar, Paniz Tanizhakkori, Deniz Erdoğan, Mine Antep, Nalan Tüzmen, Melek Merdivan and Serap Seyhan Bozkurt 44th World Chemistry Congress, Istanbul- Turkey, 1 - 16 August, 2013.
4. Bayar İ., İnci A., Aypak S.Ü. ve Bildik A. Fatty acid compositions in the muscle tissues of two freshwater fish species from Büyük Menderes River (Aydın), Turkey. Mediterranean Veterinary Congress coupled with 7th REEV-MED General Assembly, Kırıkkale University, Turkey, 13-14 December 2018.

4. SERTİFİKALAR

1. Kozmetik Ürün Yönetimi, Kimyagerler Derneği, 02/04-03/04.2011.
2. Temel Bilgisayar Eğitimi, Ege Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (EGESEM), 14/01/2012-04/03/2012 (60 saat).
3. Pedagojik Formasyon Sertifikası, Pamukkale Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Mezuniyet Tarihi: 23.01.2012.
4. Son Gelişmeler Işığında Teorik ve Uygulamalı HPLC Eğitimi Katılım Belgesi, 27/04-29/04.2013.
5. 44th World Chemistry Congress, IUPAC, 11/08-16/08.2013.
6. THERMO SCİENTİFİC ICAP Q ICP-MS Sistemi Kullanım Sertifikası, Redoks Lab, 11/03/2014-12/03/2014.
7. THERMO SCİENTİFİC ICE 3300 AAS Sistemi Kullanım Sertifikası, Redoks Lab, 07/04/2014-08/04/2014.
8. THERMO SCİENTİFİC ISQ GC-MS Sistemi Kullanım Sertifikası, Redoks Lab, 03/06/2014-04/06/2014.
9. THERMO SCİENTİFİC ULTİMATE 3000 HPLC Sistemi Kullanım Sertifikası, Redoks Lab, 05/06/2014-05/06/2014.
10. Mediterranean Veterinary Congress 7th REEV-Med General Assembly, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 13/12-14/12/2018.

5. EĞİTİMLER

1. Son Gelişmeler Işığında Teorik ve Uygulamalı HPLC Eğitimi Bahar Okulu, TÜBİTAK, 27/04-29/04.2013.
2. Akdeniz'den Toroslar'a Bilim ve Doğa Eğitimi, TÜBİTAK 4004 Projesi, 07.07-15.07.2013.
3. ARLAB 12. Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Mezuniyet Sonrası Eğitim Kurulu, 01/03-02/03/2016.
4. Temel Hücre Kültürü ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu-IV, Hücre Ölümü Araştırma Derneği, 14/06-16/06/2017.
5. Laboratuvar Uygulamalarında Moleküler Tekniklerin Yeri ve Kullanım Kursu, Çukurova Üniversitesi, 29/01-02/02/2018.