

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

284545

**MENİNGİOM HÜCRELERİNDE GLUKOZ VE AMİNO ASİT
TRANSPORTUNUN HIZ VE KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

MERAL ÖZGÜÇ

ANKARA - 1985

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENİNGİOM HÜCRELERİNDE GLUKOZ VE AMİNO ASİT
TRANSPORTUNUN HIZ VE KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

MERAL ÖZGÜÇ

Reh. Öğ. Üyesi : Prof. Dr. Altan Günalp

ANKARA - 1985

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
I- GİRİŞ ve AMAÇ	1-3
II- GENEL BİLGİLER	
-Plazma Zar Yapısı	4-7
-Plazma Zar Fonksiyonları (Transport)	7-12
-Transformasyon ve Hücre Yüzeyi	12-13
-Transformasyon ve Transport	14-15
-SSS Tümörlerinde Glukoz ve Amino Asit Transportu	15-18
III- GEREÇ ve YÖNTEMLER	19-25
IV - BULGULAR	26-49
V - TARTIŞMA	50-58
VI- ÖZET	59-60
VII- KISALTMALAR	61
VIII-KAYNAKLAR	62-67

GİRİŞ ve AMAÇ

Plazma zarı hücreSEL hayat için çok önemli bir organeldir. Hücreler plazma zarı sayesinde düzenli, dış çevreye açık, kontrollü bir termodinamik sistem oluştururlar.

Plazma zarı hücreyi koruyan pasif bir engelden daha çok özgül bir filtre görevi yaparak, besin maddelerinin, iyonların ve hücreSEL artıkların giriş ve çıkışlarını kontrol eder.

Kanserleşme ile paralel olarak hücrenin diğer organellerinde olduğu gibi, hücre zarında da bir takım değişiklikler meydana gelir.⁽¹⁾

Hücre zarında meydana gelen yapısal değişiklikler sonucu, hücre içi besin maddelerinin konsantrasyonlarının artması metabolik hızın artmasında rol oynar. Transport proteinlerinin miktarında veya aktivitesinde artış, hızlı büyüme ve dolayısıyla malignansiye yol açabilir.⁽²⁾ Tümör hücrelerinde glukoz metabolizmasındaki artış ve değişikliklerin plazma zarındaki glukoz transport mekanizmasında meydana gelen değişikliklere bağlı olarak ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.⁽³⁾

Hücre zarında meydana gelen yapısal değişikliklerin çeşitli nedenleri olabilir, örneğin radyasyon, kimyasal ajanlar, viruslar gibi. Meydana gelen değişiklikler hücre zarında bulunan lipid, protein, glikolipid, glikoprotein, gibi

bileşiklerin yapısını etkiler. Fakat yapısal farklılaşmayı incelemek teknik açıdan zordur. Yapısal değişikliğin zar fonksiyonlarını nasıl etkilediğini göstermek amacı ile, transforme hücre zarının fonksiyonlarını incelemek transformasyonunun nedenine ait ipuçları verebilir.

Bu nedenle, çalışmamızda hücre zarının en önemli fonksiyonlarından biri olan transport mekanizmasını incelemeyi amaçladık. Santral sinir sistemi tümörlerinde zar transport çalışmalarına ender rastlanmaktadır. In vitro sistemlerde yapılan çalışmalarda, tümör hücre hatları kullanılmıştır.^(4, 5)

Beyin tümörlerinin glukoz metabolizmasını incelemek amacı ile son yıllarda kullanılan diğer bir teknik ise Positron Emission Tomografidir. Radyoaktif işaretli glukoz analogları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar, hem glukoz transport ve metabolizmasına ışık tutmakta, hem de tümörün derecesi hakkında bilgi verebilmektedir.⁽⁶⁾ Ayrıca beyin kesitleri kullanılarak yapılan çalışmalar da mevcuttur.⁽⁷⁾

Çalışmamızda, in vivo şartlara en yakın bir ortamda şeker ve amino asit transport hız ve mekanizmasını incelemeyi amaçladık. Tümör biyopsi örneklerini in vitro hücre kültürüne almadan hücre süspansiyonu haline getirip çalışmamızı gerçekleştirdik. Glial beyin tümörlerinin heterojen yapıda olmasının teknik zorluklara yol açabileceğini göz önünde bulundurarak tümör örneği olarak meningiom dokusunu seçtik.⁽⁸⁾

Literatürde meningiom dokusunda yapılmış glukoz transport deneylerine rastlanmamıştır. Amino asit transport deneyleri ise glutamat gibi nörotransmitter görevi yapan amino asitlerin üzerindedir ve doku kültüründe yapılmıştır. (9)

Bu nedenle çalışmamız pilot çalışma niteliğinde olup, aynı konuda ileri çalışmalar planlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Plazma Zar Yapısı

Plazma zarı hücrenin iç ortamını sabit tuttuğu gibi, hücreler arası alışverişi ve haberleşmeyi sağlar. Bugün kabul ettiğimiz zar modeli 1972 yılında Singer ve Nicholson tarafından ortaya atılmıştır. (10)

"Sıvı Mozaik" adı verilen bu modele göre zarlar asimetrik fosfolipid çift tabakadan oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda sıvı halinde bulunan bu çift tabakada, lipidlerin polar uçları dıştaki sulu ortama, hidrofobik kısımları ise zarın iç yüzeyine yönelmiştir.

Yapılan nükleer magnetik ve elektron spin rezonans çalışmaları göstermiştir ki lipidler kendi tabakalarında lateral olarak hareket ettikleri halde diğer tabakadaki komşuları ile genelde yer değiştirememektedirler. (11,12)

Plazma zarı yaklaşık olarak % 20 fosfolipidlerden oluşmuştur. Fosfolipidlerin çeşitliliği hücre tip ve organizma türüne göre değişmekle beraber plazma zarında % 43 fosfatidil kolin % 20 fosfatidil etanolamin, % 7 fosfatidol inositol, % 4 fosfatidil serin ve % 23 sifingomiyelin mevcuttur. (13)

Eritrositlerde yapılan deneylerde plazma zarında lipid asimetrisinin mevcut olduğu gözlenmiştir, fosfatidil kolin, ve

sifingomiyelin çift tabakanın dış yüzeyinde, fosfatidil etanolamin ve fosfatidil serin ise iç yüzeyinde yer almıştır.⁽¹⁴⁾

Çeşitli fosfolipidlerin mevcudiyeti, belli enzim reseptör ve taşıyıcıların fonksiyon ve aktivasyonları için gerekli olmaktadır.⁽¹⁵⁾

Plazma zarlarında fosfolipidlerin yanı sıra kolesterol de bulunmaktadır. Kolesterol molekülünde bulunan steroid halkalar polar baş kısımların bulunduğu bölgelere hareketsizlik getirmektedir.⁽¹⁶⁾

Plazma zarında çeşitli glikolipidlerin varlığı gözleendiği halde zardaki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Bazı gangliosidler kolera ve tetanoz gibi bakteri eksotoksinleri için reseptör görevi yapmaktadırlar.⁽¹⁷⁾

Plazma zarlarının ağırlıklarının % 50'sinin proteinler oluşturmaktadır. Proteinler globuler unitler halinde lipid çift tabaka içinde yüzer durumdadırlar. Lipid tabakanın akışkanlığını keserek ona mozaik bir görünüm vermektedirler. Proteinler zardaki konumları açısından iki gruba ayrılırlar. Çevresel (periferal) proteinler zardan yüksek iyon şiddeti gibi ılımlı yöntemlerle çözülebilirler. İç (Integral) proteinler ise lipid çift tabakanın tamamen bozulması halinde serbest olurlar.

Bazı proteinler ise çift tabakayı baştan başa kat ederler. Bu tip proteinler amfoterik özelliğe sahiptir. Deterjan,

organik çözücüler bunların lipid tabakası ile oluşturdukları hidrofobik bağları kırabilir. (18)

Plazma zarının proteinlerinden bir çoğu hareket edebilmektedir. Hücre yüzeyi antijen çalışmaları proteinlerin lateral hareket edebildiklerini göstermiştir. (19)

Zarda bulunan proteinlerin çeşitli biyolojik görevleri vardır. Bazı proteinler zarların geçirgenliğini kontrol ederler. Kanallar ve pompalar meydana getiren proteinler zardan iyonların ve bazı moleküllerin özgül olarak geçmesini sağlarlar.

Bir kısım proteinler ise hücre yüzeyinde reseptör görevi yaparlar. Hormonların, nörotransmitterlerin ve antijenlerin özgül sinyallerinin hücre içine taşınmasını sağlarlar. Bazı zar proteinlerinin ise enzimatik veya antijenik görevleri vardır. (20)

Zarların yapısında bulunan karbonhidratlar, genelde plazma zarının ağırlığının % 10 civarını oluşturur. Karbonhidratlar, oligosakkarit yan zincirler halinde zar proteinlerine veya spingolipidlere kovalan olarak bağlıdır.

Zar glikoproteini ve glikolipidlerinde 10 kadar değişik monosakkarid gözlenir. Bunlardan en önemlileri, galaktoz, mannoz, fukoz, galaktozamin, glukozamin, glukoz ve sialik asittir. (21)

Sialik asit terminal pozisyonunda bulunduğundan bütün memeli hücre yüzeylerinin net negatif yüklü olmasına neden olur. (21)

Plazma Zarı Fonksiyonları

Plazma zarının en önemli görevleri arasında, hücre büyüme kontrolü, hücreler arası iletişim, ve substrat transportunu sayabiliriz.

Hücre içindeki iyonların ve besin maddelerinin konsantrasyonlarının sabit kalması ve hücrenin aktivitesine devam edebilmesi için zardaki transport mekanizmaları gereklidir.

Transport mekanizmasını 3 gruba ayırmamız mümkündür. (22)

I- Aracısız (non-mediated)

II- Aracılı Transport (mediated)

a) Aktif transport

b) Kolaylaştırılmış pasif transport

III- Reseptör aracılığı ile endositoz

Pasif transport mekanizmasında maddelerin zardan geçişi sistemin serbest enerjisindeki düşüşle paraleldir. Sistemin serbest enerjisi termodinamik denge sağlanana kadar düşer ve transport durur. Örneğin; su, ure, ve gazlar beyine bu mekanizma ile taşınır. (35)

Çoğu hücrelerde glukoz ve gliserol gibi moleküller ise zardan kolaylaştırılmış difüzyon mekanizması ile taşınırlar. Bu sistemin metabolik enerjiye gereksinimi yoktur. Zardan geçecek olan madde zardaki bir taşıyıcıyla tersinir olarak bağlanır. Zarın iç yüzeyinde ise taşınan madde kompleksten ayrılıp serbest hale geçer. Taşıyıcı, zarın yine dış yüzeyine döner. (35)

Doyumluluk (saturasyon), özgüllük (specificity) ve rekabet (competition) gibi kinetik parametreler taşıyıcıların varlığında izah edilebilmiştir. Bu modele göre bir maddenin hücre içine hareketi, diğer bir maddenin hücre dışına atılması ile de bağlı olabilir.

Bir maddenin konsantrasyonunun düşük olduğu yerden, yüksek olduğu yere (yokuş yukarı) taşınması gerektiği zaman (metabolik), enerjiye ihtiyaç vardır. Bu bir kimyasal reaksiyondan sağlanabilir (primer aktif transport) veya diğer bir maddenin elektrokimyasal gradient'ine bağlanabilir (Sekonder aktif transport). (23)

Substratlar arasındaki ilişkilerden ötürü taşıyıcı aracılığı ile transport mekanizmalarında bir asimetri söz konusudur. Bir substrat diğer bir substratın aynı yönde taşınmasını taşıyıcı ile rekabete girerek ya engeller (cis- inhibisyon) ya da stimule eder (cis-stimulasyon)

Bir substrat diğer bir subtratin ters yönde taşınmasını engellerse buna trans-inhibisyon sitimle ederse trans-stimulasyon adı verilir. (23)

Reseptör aracılığı ile endositoz (RME) mekanizması plazma proteinleri, hormonlar, virus ve bakteri toksinleri gibi büyük moleküllerin hücre içine alınması için kullanılan bir mekanizmadır.

Taşınacak olan molekül ilk olarak hücre yüzeyinde yerleşik özgül bir reseptöre bağlanır. Bundan sonra ligand-reseptör kompleksi coated pitlerin (kaplı çukur)ların içine alınır. Bu çukurların sitoplazmik yüzeyleri clathrin adlı bir protein ile kaplıdır.

Bundan sonra yüzeyden kopan pitler, kaplı (coated) vesiküller halini alır.

Clathrin proteini daha sonra vesiklerden kopar ve hücre yüzeyindeki yerine döner. Őimdi reseptozom adı verilen cisimcikler içindeki ligand-reseptör kompleksi lizozomlara taşınır, lizozomal enzimler aracılığı ile ligand ve reseptör serbest halde kalır. (24-26)

Hayvan Hücrelerinde Amino Asit Transportu

Mikroorganizmalarda olduğu gibi hayvan hücrelerinde de amino asit transportu hücrenin besin ihtiyaı ile orantılıdır.

Hayvan hücrelerinde nötral amino asitlerin transportu A,L, ASC adı verilen 3 sisteme bölünmüştür. Amino asitlerin taşınımı hücre yoğunluğu, hücre bölünme evresi ve transformasyonla ilgilidir. (27 28)

Sistem A ilk olarak Ehrlich Ascites tümör hücrelerinde gözlenmiştir. Avian ve memeli dokularında mesenkimal ve epitel hücrelerinde görülür, eritrosit ve retikülositlerde bulunmaz.(29)

Alanin glisin, metabolize olmayan analog 2-amino isobutirik asit ve 2-Metil aminoisobutirik asit bu sistemle taşınır. Bu sistem Na^+ iyonuna bağımlıdır, düşük pH da aktivitesini kaybeder. Sistem A intracelluer substratlarla trans-inhibasyona uğrar. (30)

Sistem L ise dallı zincirli ve aromatik amino asitlerin transportuyla görevlidir. Sodyum iyonuna bağımlılığı yoktur ve bazen düşük pH ile stimule olur. Intracelluler substratların varlığı trans-stimulasyon mekanizması ile amino asitlerin transportunu arttırır. (30)

ASC sistemi ise alanin, serin ve sistein transportu ile görevlidir. (31) Ph farklılıklarından etkilenmeyen bu sistem N-metil substrat türevlerini taşıyamaz, bu noktada sistem A dan ayrılır. Hücre için amino asitlerin varlığı bu sistemi, trans-stimüle eder. Bu sistem en çok, tavşan retikülositleri ile güvercin eritrositlerinde etkilidir.(32)

Glukoz molekülünün transportu kas⁽³³⁾ ve yağ dokusu⁽³⁴⁾ gibi dokularda çalışılmıştır. Hayvan hücrelerinde sitozol konsantrasyonu çok düşük olan glukozun plazma konsantrasyonu 5 mM civarındadır. Bu nedenle, pek çok hayvan hücresinde glukoz "yokuş aşağı" bir mekanizmayla, kolaylaştırılmış difüzyon ile alınır. ATP yıkımına ihtiyaç yoktur.

Farklılaşmış dokularda substrat transportu özel uyarlamalar gerektirmektedir. Örneğin; santral sinir sistemi dengesini transport mekanizmasındaki kontroller aracılığı ile sağlar. Santral sinir sistemindeki özel transport mekanizmalarının tümüne (Kan-Beyin basıncı) adı verilir.⁽³⁵⁾

CO₂, O₂, N₂O gibi gazlar beyine difüzyon yolu ile alınır. yağda eriyen maddeler, (ör. ethanol) beyine kolayca difüze olurlar. Glukoz, amino asit ve iyonlar ise taşıyıcılar aracılığı ile taşınırlar.⁽³⁵⁾

Glukoz transport sisteminde sterik özgüllük mevcuttur, beyine D-glukoz taşındığı halde L-glukoz taşınmamaktadır.

Glukoz analogu 2-Deokzi D-glukoz ise D-glukoz ile kolayca rekabet eder ve transport edildikten sonra beyin heksokinaz enzimi aracılığı ile fosforile edilir, fakat daha ileri kademelere metabolize edilemez. Bu yüzden glukoz transport mekanizmasını incelemeye önemli bir yardımcı olarak çok kullanılmaktadır.⁽³⁵⁾

Beyin dokusunda amino asitlerin transport hızlarında farklılıklar büyüktür, DOPA, phenilalanin, lösin, tirozin gibi amino asitler beyine glukoz hızına yakın bir hızda transport edilirler. Diğer amino asitler ise farklı hızlarda transporta uğrarlar. (35)

Beyinde meydana gelen herhangi bir harabiyet, (konvulsiyon, yaralanma, donma, tümör gibi) kan-beyin basıncının çökmesine neden olur. Bunun sonucu beyin transport sistemlerinde değişiklikler baş gösterir. Örneğin yüksek molekül ağırlıklı protein molekülleri bile kolayca beyine girebilirler. (35)

Transformasyon ve Hücre Yüzeyi

Transforme olmuş hücrelerin normal hücrelerden en temel farkları anormal çoğalmaları ve yayılma özelliğine sahip olmalarıdır. Normal hücrelerin büyümesinde önemli görevi olan hücre zarının, transformasyon esnasında yapısal ve fonksiyonel değişikliğe uğraması, kanserli hücrelerin çevrelerindeki doku ve kendi aralarındaki ilişkilerini etkiler. (36)

Tümör hücrelerinin değişmiş hücre yüzeylerinden dolayı edindikleri karakteristikleri şöyle sıralayabiliriz:

1) İyi veya kötü huylu olsun, tümör hücreleri, çevrelerindeki hücrelerden etkilenmeksizin normal limitlerin dışında büyürler. (36)

2) Tümör hücreleri özgül bir fonksiyona sahip bir doku halinde hareket edemezler, hücreler tek tek atonomdur. (36)

3) Serolojik alışmalar sonucunda belirlendiği gibi, tümör hücrelerinin antijenik yapıları farklıdır;

a) Virus ile transforme olmuş hücrelerin yüzeyinde TSTA (Tümöre zgl transplantasyon antijenleri) ve virusa özgül antijenler gözlenir (TAVA).⁽³⁷⁾

b) Karsinoembrionik ve onkoftal antijenler belirir.⁽³⁸⁾

c) Tümör hücreleri normal karşıtlarına göre daha az farklılaşmıştır. Buna sebep dokuya özgül antijenlerin ya azalması ya da tamamen yok olmasıdır.⁽³⁹⁾

In Vitro

a) Doku kültüründe büyüyen transforme olmamış hücrelerin, büyümeleri tek tabaka haline gelince durur. Tümör hücreleri ise dansiteye bağlı büyüme inhibisyonu göstermezler. Hücrelerin birbirine değmesi onların büyümelerini engellemez ve bir kaç tabaka halinde çoğalmaya devam ederler.⁽³⁶⁾

b) Birbirleri arasındaki veya yüzeyinde büyüdükleri tabaka ile aralarındaki yapışkanlık azalmıştır, süspansiyon halinde büyüyebilirler. Bu özelliklere onlara canlı organizmada metastaz yapma ve yayılma olanağı tanır.⁽⁴⁰⁾

Tümör hücreleri bitki lektinleri ile daha kolay aglutine olurlar. Bu da yüzeylerinin normal hücrelere göre farklılaştığına dair başka bir delil oluşturur.⁽⁴¹⁾

Transformasyon ve Transport

Warburg, tümör dokularında yaptığı çalışmalar sonucu, kanserleşmenin temel nedeni olarak, hücrelerin oksidatif metabolizmasındaki bozukluk ve buna bağlı olarak glikoliz hızının artmasını ileri sürmüştür. (42)

Tümör hücrelerinde yüksek glikoliz hızı hala kabul edilen bir hipotezdir. (43,44)

Artış glikoliz nedeni olarak şunlar ileri sürülmüştür:

1) Na⁺-K⁺-ATP az aktivitesinde artma ve yüksek ADP ve Pi seviyesinin glikolizi indüklemesi. (43)

2) Artan glukoz transportu. (45)

3) Fostofruktokinaz ve Piruvat Kinaz gibi glikolitik enzimlerinde artış. (46)

Ayrıca yüksek glukoz transportunun neoplastik transformasyonla yakından ilgili olduğu da bilinmektedir. (45,47)

Son yıllarda ise hücre büyümesinin kontrol sistemlerinin toplandığı bölge olarak plazma zarı üzerinde yoğun araştırmalar başlatılmıştır. (48)

Holley'in hipotezine göre hücre zarında oluşan primer değişikliklerin malignansiye yol açması, zardaki transportu ve buna bağlı olarak besin maddelerinin teminini, ve hücre metabolizmasının hızını artırmaktır. (2)

DNA ve RNA tümör viruslarının meydana getirdiği onkogenik transformasyon, transport çalışmaları için kullanılmıştır. Hücre kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalarda şeker. (49,50) amino asit⁽⁵¹⁾ ve diğer besin maddelerinin transportunun arttığı gözlenmiştir. (52,53)

Santral Sinir Sistemi Tümörlerinde Glukoz ve Amino Asit Transportu

Santral Sinir Sistemi, glial hücreler ile kaplı sinir hücreleri ve onların dentrit ve akson adı verilen uzantılarından oluşmuştur. Organizmanın diğer bölgelerine göre daha iyi korunmuştur. Tüm santral sinir sistemi ideal bir fizyolojik sıvı olan BOS ile yıkanmaktadır. Bu sıvı santral sinir sistemini travmaya karşı koruduğu gibi, elektrolit ve protein dengesini sağlar ve ventriküler basıncı sabit kılar.

Santral sinir sisteminin dış yüzeyi meninks adı verilen ve üç tabakadan (Dura Mater, Araknoid, Pia Mater) oluşan bir zar sistemiyle kaplıdır. BOS pia ve araknoid tabakaları arasında dolaşmaktadır. (35)

Bu kadar iyi korunduğu halde, santral sinir sistemi tümörlerine sıklıkla rastlamaktayız. (54)

Meningioma, meninks zarından köken alan iyi huylu bir santral sinir sistemi tümörüdür. Patolojik olarak 4 ayrı meningioma tipini sıralayabiliriz!⁽⁵⁵⁾

Meningotelyal, Fibroblastik, Malign, Angiomatöz.

Santral sinir sisteminde veya tümörlerinde yapılan substrat transport çalışmaları bu sistemin heterogen yapısı nedeniyle güçleşmektedir. (7)

Bu güçlüğü aşmak için bazı araştırmacılar fraksinasyon teknikleri kullanarak, çeşitli bölgelerin transport hızların özgül olarak ölçmeye çalışmışlardır. (56,57)

Nörotransmitter görevi yapan amino asitlerin, sinir hücrelerindeki transport hız ve mekanizmasının, santral sinir sistemi amino asit metabolizmasını kontrol ettiği bilinmektedir. (58)

Gliyal hücrelerinde bulunan transport mekanizmalarının da bu kontrol mekanizmasında görevleri vardır. (59)

Astrositom ve ependimom gibi insan beyin tümörlerinin kesitlerinde ve 5-8 günlük organ kültürlerinde çeşitli amino asitlerin transport mekanizmaları çalışılmıştır. (7) Snodgrass ve arkadaşlarının yürüttüğü bu çalışmada, radyoaktif işaretli glutamat, glisin, valin, lizin, triptofan, alanin ve fenilalanin substrat olarak kullanılmıştır.

Bu amino asitlerin transportunun matabolik enerji ve Na⁺ iyonuna bağımlı olduğu gözlenmiştir. Kontrol doku olarak kullanılan rodent beyin kesitlerinde, kinetik özelliklerin ve substrat özgüllüğünün tümör dokusuna benzer olduğuna da işaret edilmiştir.

Nörotransmitter görevi yapan glutamatın, sinir hücrelerinden köken almayan beyin fraksiyonlarında transportunu incelemek amacı ile Stewart ve arkadaşları İnsan astrositom, optik glioma ve meningiom hücre kültürleri kullanarak çalışmalar yapmışlardır.

Astrositom hücrelerinde yüksek afiniteli, optik glioma ve menengioma hücrelerinde ise düşük afiniteli glutamat transportu gözlemişlerdir. (60)

Glukoz analogu 2-Deoksi-D glukoz sinir dokusunda, glukoz transport kinetiklerini çalışmak için kullanışlı bir substrattır. Beyin kesitlerinin ve sinaptozomların glukoz transportu için aynı transport sistemini kullandıkları gözlenmiştir. (61,62)

Fishman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 2-Deoksi-D-glukozun, sinaptozomlardaki transportunun enerji ve Na^+ gerektirmeyen pasif transport olduğunu ileri sürmüşlerdir. (62)

Walum ve arkadaşları nöroblastom hücrelerinde glukozun Na^+ bağımsız taşıyıcı sistem yolu ile taşındığını ve bu sistemin metabolik enerji gerektirmediğini göstermişlerdir. (63)

Lust ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise C-6 astrositom, ve C-1300 nöroblastom hücre hatlarının glukoz transport kinetikleri, 2-Deoksi-D-glukoz substrat olarak kullanılarak

alışılımlış; Astrositom hücrelerinde 1.7 mm, nöroblastom hücrelerinde ise 1.0 mm glukoz transport Km (Michaelis Menten sabitesi) değerleri tespit edilmiştir. (5)

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Doku Örnekleri

Kullanılan tümör dokusu Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi nöroşirürji servisine intrakranial kitle ön tanısı ile yatan ve cerrahi girişim sonrası histopatolojik tanımı Meningioma olan vakalardan elde edildi. Biyopsi örneği ameliyat esnasında steril şartlarda alınarak kullanıldı. En uygun kontrol doku örneği olan insan araknoid zar temin güçlüğü karşısında diğer araştırmalarda kullanılmış olan kobay beyin kontrol dokusu olarak seçildi. (9) Kobaylar Hacettepe Üniversitesi Tıp ve Cerrahi Araştırma merkezinden temin edildi. Beyin dokusu kobaylardan anestezi altında çıkartıldı.

Kullanılan çözeltiler

PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4

NaCl 8.0 g/l

KCl 0.20 g/l

KH_2PO_4 0.91 g/l

Hank's (10 X)

Unit 1: NaHCO_3 3.5 g/l

Unit 2: NaCl 80 g/l

KCl 4.0 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.3 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/l KH_2PO_4 0.6 g/l

Unit 3: CaCl_2 1.4 g/l

Histopaque 1077-Sigma

Ficoll, 400 5.7 g/dl, Sodyum Diatrizot 9.0 g/l

Bray sayım çözeltisi

Naftalin (Fisher Scientific Company) 80 g.
PPO(2,5-Difeniloksazol, Packard) 4.0 g.
POPOP(1,4 bis 5 fenil 2 oksasolil benzen -2-2'fenilen bis
5 fenil oksazol, Packard) 0.2
Metanol (Merck), PürKimya 100 ml.
Etilen glikol (Merck) 21 ml.
Volüm 1 litreye dioksan ile tamamlanır.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-Deoksi-D-(1³H) glukoz (Amersham) TRK 383, 15.2 Ci/mMole
2-Amino (1¹⁴C) Isobütirik Asit (Amersham) CFA 203. 58 mCi/mMole
2-Deoksi-D-Glukoz.D-8375 (Sigma)
2 Amino Isobütirik Asit A-8504 (Sigma)
Albumin, Bovine A-4503 (Sigma)
Collagenase (Boehringer Mannheim)
Phloretin (3-(4-Hidroksifenil)-1-(2,4,6-trihidroksifenil)
-1-propanon) Sigma
Sodyum Azid (NaN₃) (Merck)
2,4 , Dinitrofenol (BDH)
L-Lösin (L-8000) Sigma
Triton-X % 0.1

Aletler

Manyetik Karıştırıcı

IEC Santrifüj

MSE Micro Centaur Mikro Santrifüj

Beta sayacı, Packard 3380 (^3H , ^{14}C kanalları: % 50 randıman)

Baush-Lomb spektrofotometre

Hücre süspansiyonunun hazırlanışı

Doku 3 kez PBS pH 7.4 ile yıkandıktan sonra, tartıldı ve makasla çok ufak parçalara bölündü. Üzerine 5ml/gr doku oranında Hank's çözeltisi , ve 0,2 mg/gr doku oranında Collegenase ilave edildi. (64)

2-Deoksi - D-glukoz transport deneyleri için PBS ve Hanks solusyonları glukozdan arı olarak hazırlandı. Hücre süspansiyonu manyetik karıştırıcı üzerinde 100 rpm de $1-1^{1/2}$ saat karıştırıldı. Bu müddet sonunda hücre süspansiyonu, parçalanmamış doku parçacıklarını uzaklaştırmak üzere gazlı bezden süzüldü. Bu süspansiyon Histopaque-1077 üzerine yayıldı (1 histopaque: 4 volüm hücre) 1300 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ölü hücreleri ve eritrositleri uzaklaştıran bu gradient sonucu, interfazdan elde edilen hücrelerin canlılığı tripan-mavisi testi ile tespit edildi. Canlılığı % 85 üzerinde olan hücre süspansiyonları çalışmaya dahil edildi. Hücreler 1X PBS ile yıkandı. Bir kısım hücre -52°C 'ta dondurularak, protein tayini için bekletildi.

Transport Hızının Ölçülmesi

Transport hızı, radyoaktif işaretli substratın 37°C 'ta hücre içine alınımının zamana bağımlı takibi ile ölçüldü. (65-67)

Hücre yüzeyine bulaşık radyoaktiviteyi yok etmek için kullandığımız yöntem A sonucu örnek II teki radyoaktivite miktarının ihmal edilir düzeyde olduğu tespit edildi ve ikinci mikro yöntem ile (yöntem B) hücre içi radyoaktivite seviyesi ölçülmeye başlandı

Bu yöntemde inkubasyon ortamından alınan 0.1 ml örnek 1.0 cc Hanks (+4°C) içinde dilue edildi ve 1 dakika 6500 rpm de, mikro santrifujde santrifüj edildi.

Supernatandan 0.1 ml örnek alındı (örnek I). Pellet 1 X PBS ile yıkandı, ve 0.1 ml % 0.1, (v/v) Triton-X içinde çözüldü ve 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Ertesi gün bu nümune sayım şişesine alındı, santrifuj tüpü 0.1 ml Triton-X ile yıkandı ve bu örnek de sayım şişesine alındı (örnek III) örnekler 5.0 cc Bray solüsyonu içerisinde 5 dakika B-sayacında sayıldı.

Hücre içine transport edilen substrat miktarı (III/I), % alınımlar olarak değerlendirildi.

Transport mekanizmasında inhibisyon ve substrat rekabeti

Amino Asit ve glukoz transportunun meningiom ve normal dokuda metabolik enerjiye bağımlılığını araştırmak üzere, hazırlanan hücre süspansiyonları final konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde 2,4, Dinitrofenol ve Sodyum Azid varlığında 1 saat, 37°C ta inkübe edildi ve transport deneyi bu sürenin sonunda yapıldı.

Transportun sodyum iyonuna bağımlılığını araştırmak amacı ile, kullanılan Hanks solusyonu Na^+ yerine stokiometrik ölçüde Kolin kullanılarak hazırlandı ve transport deneyi yapıldı.

2-Deoksi-D-glukoz ve glukoz rekabeti, transport ortamına -glukoz ilavesi ile araştırıldı. Amino asit rekabeti deneyi için 2-Amino-Isobutirik aside yapısal benzerlik gösteren L-Lösin kullanıldı.

Bray Solüsyonunun Hazırlanışı

Radyoaktif sayım için kullanılan Bray solüsyonu hazırlanmadan evvel dioksan (Merck) hidrojen peroksit'ten arıtıldı. Bunun için 48 saat metalik sodyum varlığında bekletilen dioksan, distillenerek saflaştırıldı.

Protein Tayini

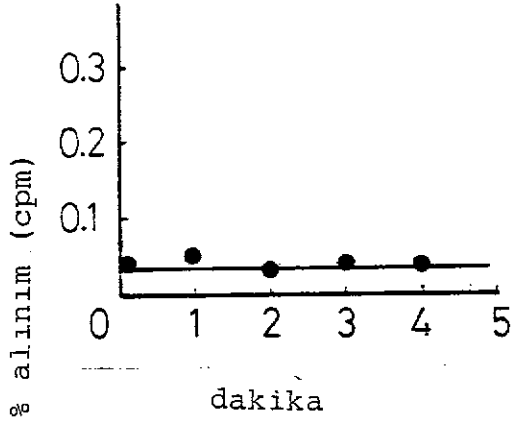
Hazırlanan hücre süspansiyonlarındaki protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi.⁽⁶⁸⁾ Protein standardı olarak Bovin Serum Albumin kullanıldı. Örneklerin optikal dansitleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Hücre pelletinde radyoaktivite miktarı (cpm) protein (mg) değerine bölünerek, örnekler kendi aralarında normalize edildi.

BULGULAR

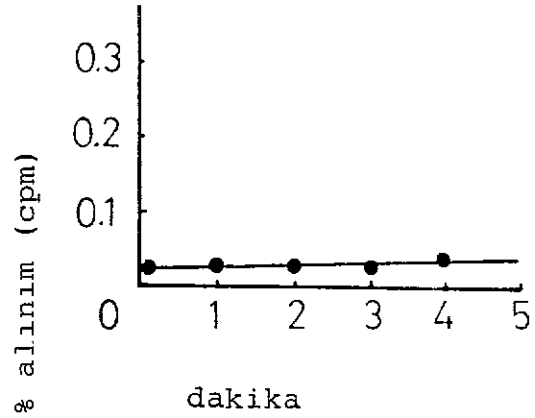
Amino Asit Transport Hız ve Kinetiği

Meningiom hücrelerinde amino asit transport hızının ölçülmesi için yapılan deneyler, 37°C ta 2-AIB asit subtrat olarak kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre içi substrat miktarı (1^{14}) radyoaktif işaretli 2-AIB asit kullanılarak takip edildi.

Şekil 1 ve 2 de görüldüğü gibi, 1 ve 3 mM 2-AIB asit konsantrasyonlarında transport hızı çok düşük seviyede kaldı.



Şekil 1.



Şekil 2.

Zamana bağımlı transport eğrisi Zamana bağımlı transport eğrisi

Hücre Tipi : Meningiom

Hücre tipi : Meningiom

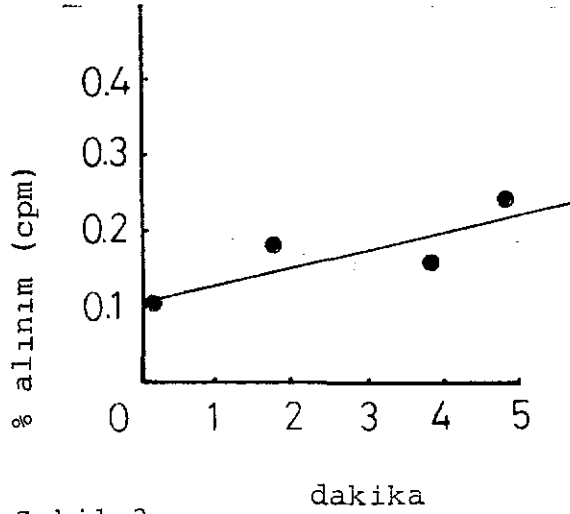
Sıcaklık : 37°C

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 1 mM 2-AIB asit

Substrat : 3 mM 2-AIB asit

5 mM 2-AIB asit konsantrasyonunda ise zamana bağlı olarak transport hızında artış gözlenmektedir. (Şekil 3)



Şekil 3.

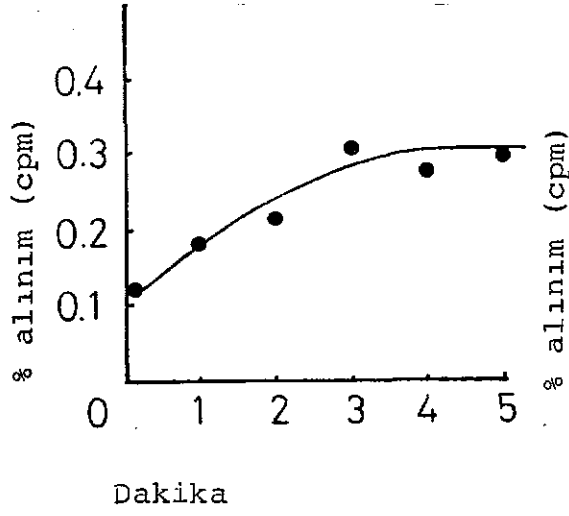
Zamana bağımlı transport eğrisi

Hücre tipi : Meningiom

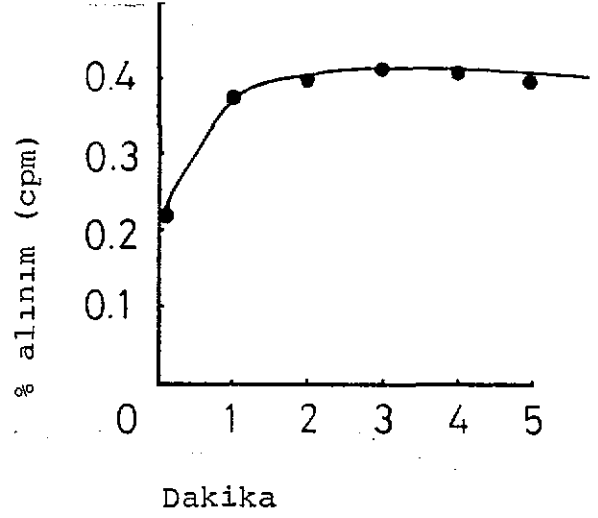
Sıcaklık : 37°C

Substrat : 5 mM 2-AIB asit

10 ve 20 mM 2-AIB asit konsantrasyonlarında ise şekil 4 ve şekil 5 te görüldüğü gibi ikinci dakikaya kadar doğrusal devam eden transport hızında bu zaman aralığından sonra hızlı bir yavaşlama ve durma söz konusudur.



Şekil 4.



Şekil 5.

Zamana bağımlı transport eğrisi Zamana bağımlı transport eğrisi

Hücre Tipi : Menenjiom

Hücre tipi : Menenjiom

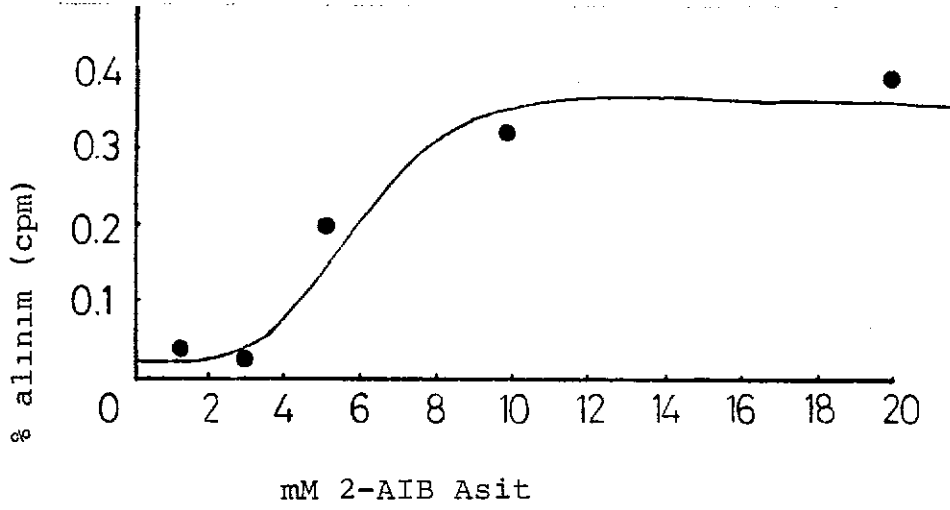
Sıcaklık : 37°C

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 10 mM 2-AIB asit

Substrat : 20 mM 2-AIB asit

Menenjiom hücrelerinde 2-AIB asit transportunun substrat konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içine alınımların profil şekil 6'da görülmektedir. Transport kinetiği bu şekilde görüldüğü gibi sigmoidal bir karaktere sahiptir.



Şekil 6.

Konsantrasyona bağımlı transport eğrisi

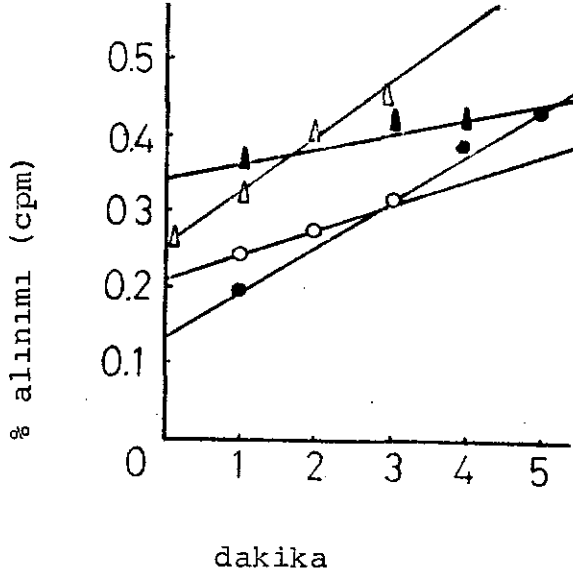
Hücre tipi : Meningiom

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-AIB asit

Transport süresi : 5 dakika

Kontrol doku olarak kullandığımız kobay beyinde ise meningiom dokusundan farklı olarak, değişik 2-AIB asit konsantrasyonlarında yapılan deneylerde transport hızında zamana bağlı olarak artış devam etmektedir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında meningiom örneğinde olduğu gibi kısa bir zaman aralığında transport hızında yavaşlama ve durma söz konusu değildir.



Şekil 7.

Zamana bağımlı transport eğrisi

Substrat:

1 mM 2-AIB asit ●—●

Hücre tipi : Kobay beyni

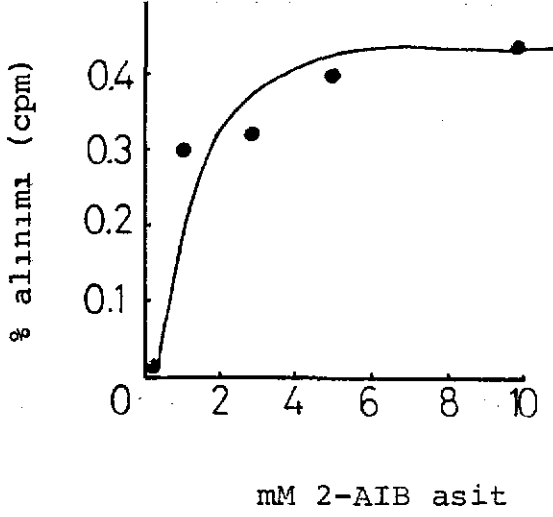
3 mM 2-AIB asit ○—○

Sıcaklık : 37°C

5 mM 2-AIB asit ▲—▲

10 mM 2-AIB asit Δ—Δ

Kobay beyninde 2-AIB asit transportunun konsantrasyona bağlı kinetiği meningiom hücrelerinden farklı bir özellik taşımakta, Şekil 8 de görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde sigmoid yerine hiperbolik eğriyle karakterize bir kinetik sergilenmektedir.



Şekil 8.

Konsantrasyona bağımlı transport eğrisi

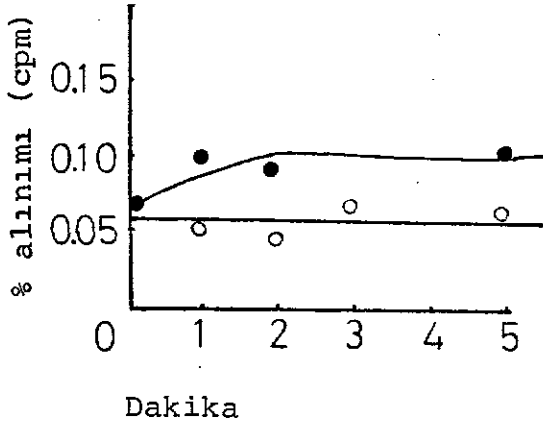
Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-AIB asit

Transport Süresi: 5 dakika

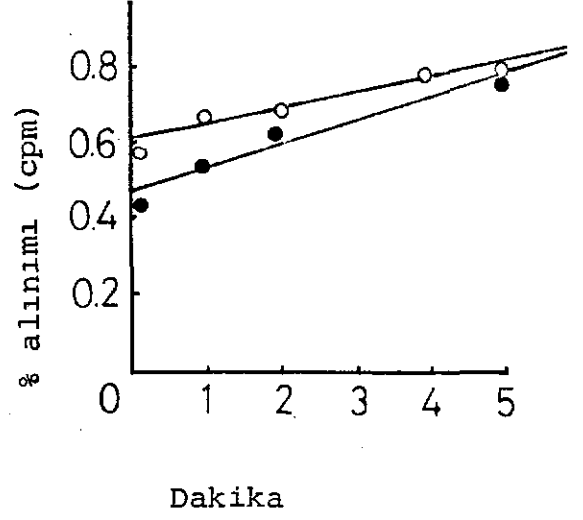
Meningiom ve kobay beyin hücrelerinde 2-AIB asidin hangi amino asitlerle ortak transport sistemini kullandığını araştırmak amacıyla 2-AIB aside yapısal benzerlik gösteren L-Lösin kullanıldı. Bu amino asit varlığında transport sistemindeki rekabet sonucu, meningiom hücrelerinde 2-AIB asit transportunda inhibisyon söz konusu olduğu halde kobay beyinde sadece kısmi bir inhibisyon söz konusudur. (Şekil 9 ve Şekil 10)



Şekil 9.

2-AIB asit transportunun
L-Lösin ile inhibisyonu
Hücre tipi : Meningiom

○—○ 5 mM 2-AIB asit (+) 10 mM Lösin
●—● 5 mM 2-AIB asit (+) 25 mM Lösin



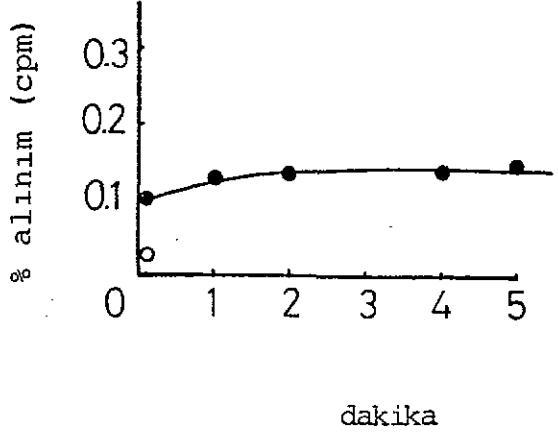
Şekil 10.

2-AIB asit transportunun
L-Lösin ile inhibisyonu
Hücre tipi : Kobay beyni

○—○ 5 mM 2-AIB asit (-) Lösin
●—● 5 mM 2-AIB asit (+)
10 mM Lösin

Meningiom hücrelerinde ve kobay beyinde amino asit transportunun metabolik enerjiye bağımlılığını araştırmak üzere hücrede enerji metabolizmasını inhibe eden 2,4, Dinitrofenol ve Sodyum Azid kullanılarak transport deneyleri gerçekleştirildi.

Şekil 11 de görüldüğü gibi, bu kimyasal ajanlar meningiom hücrelerinde 2-AIB asit transportunu inhibe ettikleri halde, kobay beyinde inhibisyon söz konusu değildir. (Şekil 12)



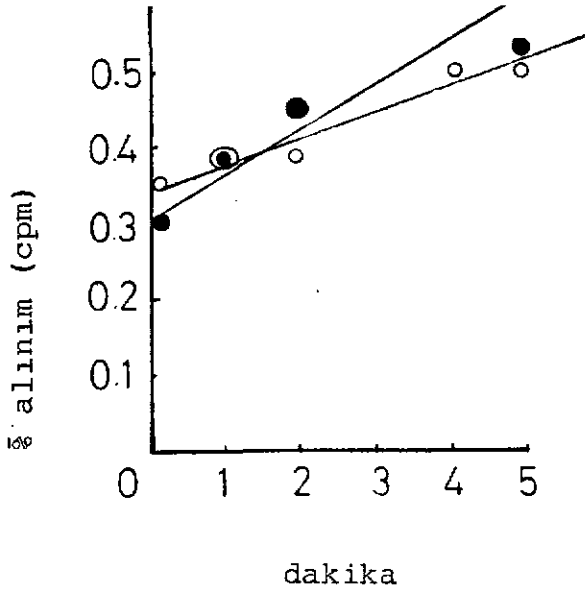
Şekil 11

2-AIB Asit transportunun metabolik enerji zehirleriyle inhibisyonu.

Meningiom hücre süspansiyonu 1 saat 0.1 mM sodyum azid ve 0.1 mM 2,4 Dinitrofenol varlığında bekletildi.

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 5 mM 2-AIB asit



Şekil 12.

2-AIB asit transportunun metabolik enerji zehirleriyle inhibisyonu.

Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 37°C

Hücre süspansiyonu 1 saat 0.1 mM Sodyum Azid ve 0.1 mM 2,4 Dinitrofenol varlığında bekletildi.

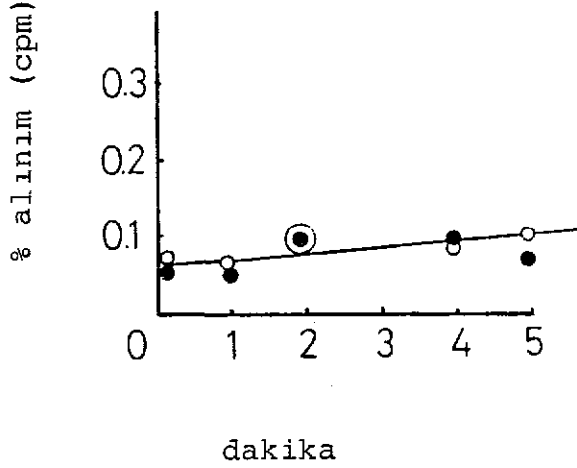
●—● 5 mM 2-AIB asit

5 mM 2-AIB asit (+)

○—○ 0.1 mM Sodyum Azid, 0.1 mM 2,4 Dinitrofenol

Amino asit transport mekanizmasının kullandığımız hücrelerde, sodyum iyonuna bağımlılığı, transport inkübasyon ortamında sodyum yerine kolin kullanılarak araştırıldı.

Şekil 13 ve 14 te görüldüğü gibi meningiom ve ko-
bay beyin hücrelerinde sodyum arı ortamda transport inhi-
bisyonu gözlenmektedir. Bu bulguya dayalı olarak her iki
hücre tipinde de amino asit transportunun sodyuma bağımlı
gerçekleştiğini söylememiz mümkün olabilir.



Şekil 13.

2-AIB asit transportunun Na^+ iyonuna bağımlılığı

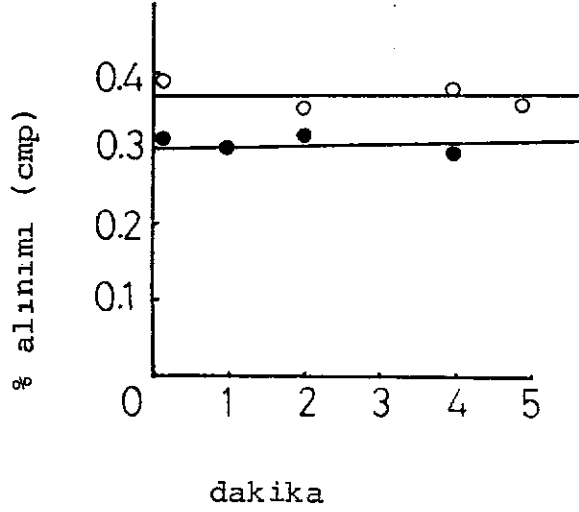
Hücre tipi : Meningioma

Sıcaklık : $37^{\circ}C$

Transport ortamı sodyum yerine kolin kullanılarak hazırlandı.

●—● 5 mM 2-AIB asit

○—○ 10 mM 2-AIB asit



Şekil 14.

2-AIB asit transportunun Na^+ iyonuna bağımlılığı

Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 37°C

Transport ortamı şekil 13 ile aynı

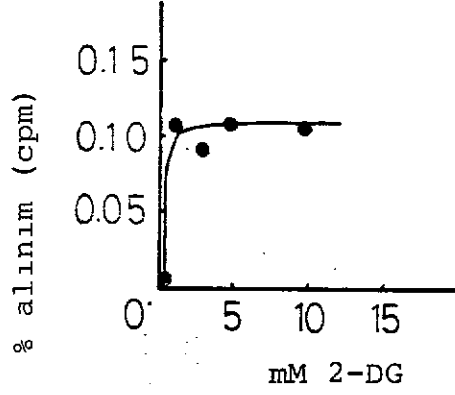
●—● 5 mM 2-AIB asit

○—○ 10 mM 2-AIB asit

Glukoz transport Hız ve Kinetiği

Meningiom ve kontrol hücrelerde glukoz transport mekanizması 2-DG substrat olarak kullanılarak incelendi. Hücre içine alınan substrat miktarı ise radyoaktif işaretli (1^3H) 2-DG ile takip edildi.

37°C de gerçekleştirilen transport deneylerinde Şekil 15 te gözlendiği gibi llmeyecek kadar hızla doygunluğa ulaşan kinetik elde edildi.



Şekil 15.

Glukoz transportunun konsantrasyon bağımlılığı

Hücre tipi : Meningiom

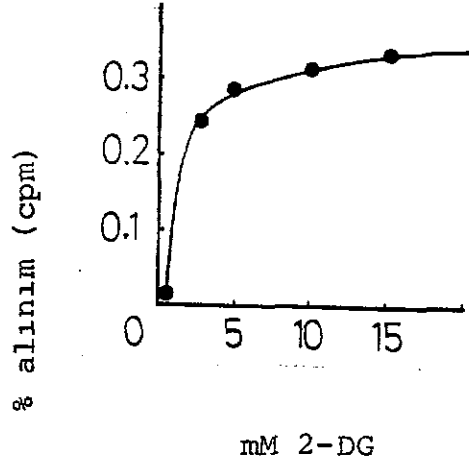
Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-DG

Transport süresi: 5 dakika

Bu nedenle meningiom hücrelerinde glukoz transportunun sıcaklığı bağımlılığı incelendi.

22°C ta tekrarlanan deneylerde Şekil 16 da olduğu gibi 37°C a kıyasla daha yüksek Km değerli transport kinetiği elde edildi.



Şekil 16.

Glukoz transportunun konsantrasyon bağımlılığı

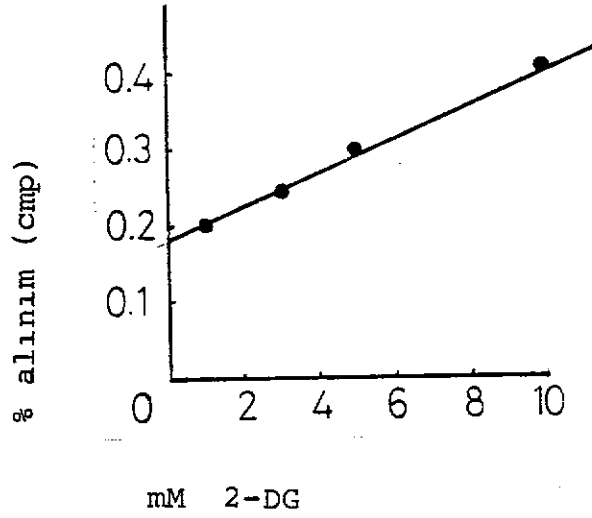
Hücre tipi : Meningiom

Subtrat : 2-DG

Transport süresi : 5 dakika

Sıcaklık : 22°C

Şekil 15 ve 16 da görüldüğü gibi kullanılan 2DG konsantrasyonlarında 37°C ve 22°C sıcaklıklarda doyuma ulaşan bir transport kinetiği söz konusudur. 4°C ta tekrarlanan deneylerde ise Şekil 17 de görüldüğü gibi doyumluluk söz konusu değildir, bu konsantrasyon aralıklarında glukoz transportu pasif difüzyon yöntemi ile gerçekleşmektedir.



Şekil 17.

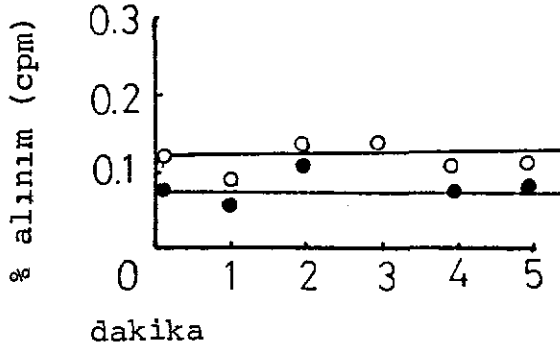
Glukoz transportunun konsantrasyon bağımlılığı

Hücre tipi : Meningiom

Sıcaklık : 4°C

Substrat : 2-DG

37°C ta glukoz transportunun zamana bağımlılığı şekil 18 ve şekil 19 ta görülmektedir. 1 ve 3 mM 2DG konsantrasyonlarında zamana karşı artış gözlenmemektedir. 5 mM 2DG konsantrasyonunda ise zamana karşı doğrusal artış mevcuttur. 10 mM substrat konsantrasyonunda ise bir dakikadan itibaren doğrusal artış kaybolmakta, ve transport hızı yavaşlamaktadır.



Şekil 18.

Glukoz transportunun zaman
bağımlılığı

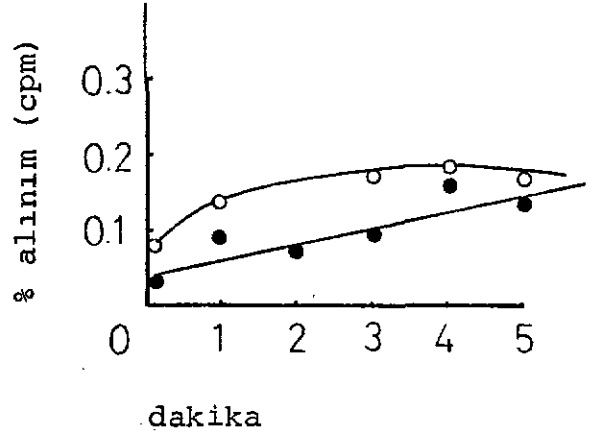
Hücre tipi : Meningiom

Substrat : 2-DG

Sıcaklık : 37°C

●—● 1 mM

○—○ 3 mM



Şekil 19.

Glukoz transportunun zaman
bağımlılığı

Hücre tipi : Meningiom

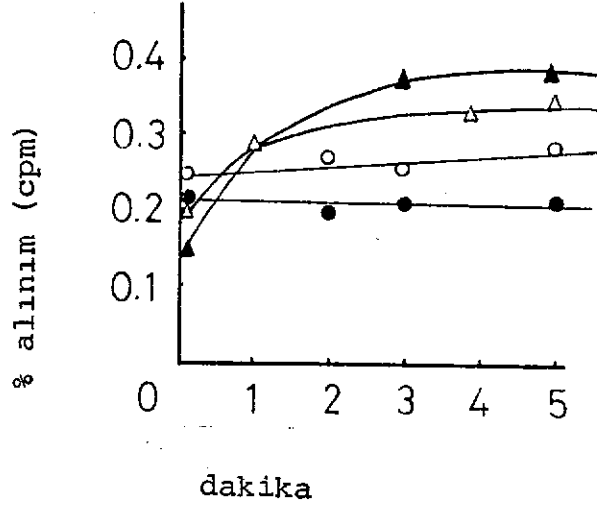
Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-DG

●—● 5 mM

○—○ 10 mM

Şekil 20 de 22°C ta 2 DG transportunun zamana bağımlı mekanizması görülmektedir. 2 ve 5 mM 2 DG konsantrasyonlarında yavaş ilerleyen transport hızı elde edilmiştir. 10 ve 15 mM konsantrasyonlarında transport hızı iki dakikaya kadar doğrusal devam etmekte, bu zaman aralığından sonra transport durmaktadır.



Şekil 20.

Glukoz transportunun zamana bağımlılığı

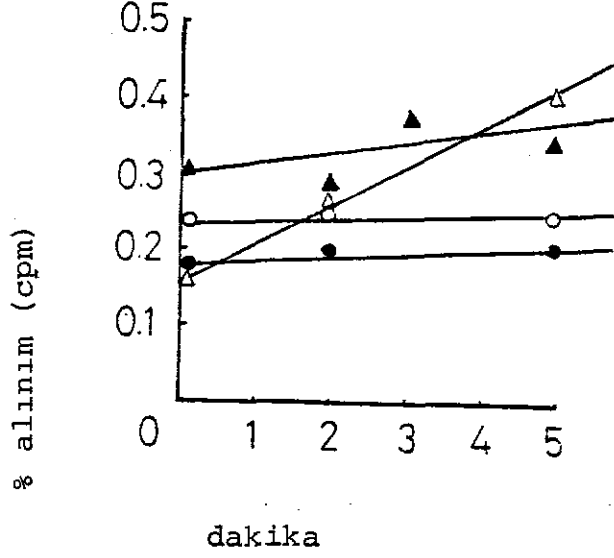
Hücre tipi : Meningiom

Sıcaklık : 22°C

Substrat : 2-DG

- 2 mM 2-DG
- 5 mM 2-DG
- △—△ 10 mM 2-DG
- ▲—▲ 15 mM 2-DG

4°C ta gerçekleştirilen glukoz transport deneyleri şekil 21 de görülmektedir. Zamana bağımlı olarak her konsantrasyonda artış gözlenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda olduğu gibi yüksek substrat konsantrasyonlarında zamana bağlı çok hızlı artış ve duraklama söz konusu değildir.



Şekil 21.

Glukoz transportunun zamana bağımlılığı

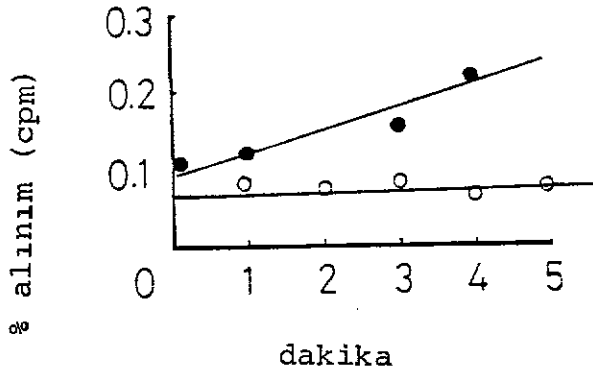
Hücre tipi : Meningiom

Sıcaklık : 4°C

Substrat : 2-DG

- 1 mM 2-DG
- 0.03 mM 2-DG
- ▲—▲ 5 mM 2-DG
- △—△ 10 mM 2-DG

2 DG un meningiom hücrelerinde glukoz ile ortak bir transport sistemini kullanıp kullanmadıklarını araştırmak amacı ile 5 mM 2DG konsantrasyonundaki transport deneyi 40 mM glukoz varlığında tekrar edildi. Şekil 22 de görüldüğü gibi glukoz 2-DG transportunu inhibe etmektedir. Bu bulgu her iki molekülünün aynı taşıyıcı protein sistemi ile hücre içine alındığına ait bir delildir.



Şekil 22.

Glukoz ve 2-DG un transport rekabeti

Hücre tipi : Meningiom

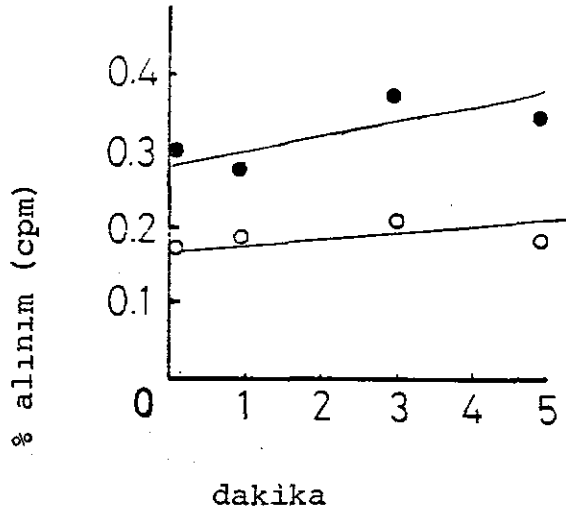
Sıcaklığı : 37°C

Transport deneyi 40 mM glukoz varlığında gerçekleştirildi.

●—● 5 mM 2-DG (-) Glukoz

○—○ 5 mM 2-DG (+) 40 mM Glukoz

Phloretin memeli hücrelerinde glukoz transportunu inhibe eden bir kimyasaldır. Meningiom hücrelerinde 2-DG transportunun kolaylaştırılmış difüzyon yöntemi ile, taşıyıcı protein varlığında gerçekleştiğini kanıtlamak açısından, transport deneyleri 0.1 mM Phloretin varlığında gerçekleştirildi. Şekil 23 te görüldüğü gibi 5 mM 2-DG transportu Phloretin varlığında inhibisyona uğramaktadır.



Şekil 23.

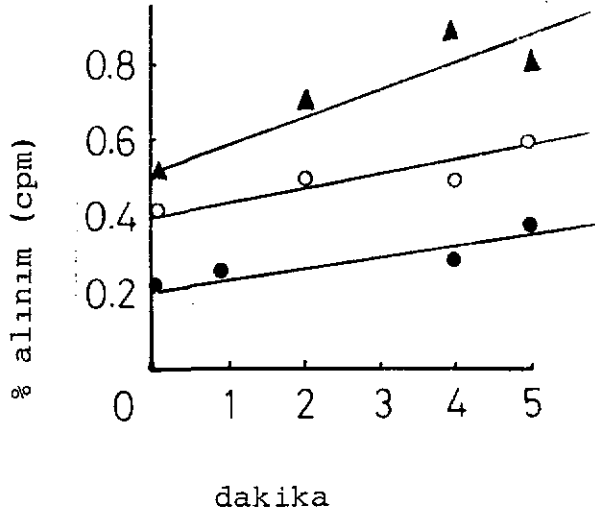
Glukoz transportunun Phloretin ile inhibisyonu

Hücre tipi : Meningiom

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-DG, 5 mM ●—●

Hücre süspansiyonu 1 saat 1.0 mM phloretin ile inkübe edildi. ○—○



Şekil 24.

Glukoz transportunun zaman bağımlılığı

Hücre tipi : Kobay beyni

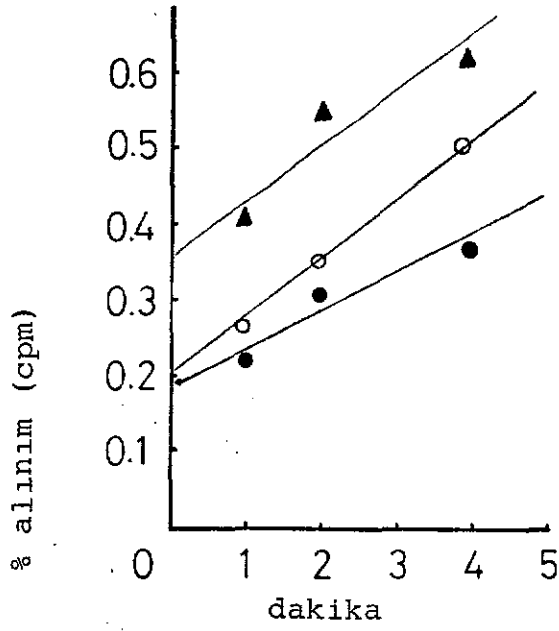
Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-DG

●—● 1 mM 2-DG

○—○ 10 mM 2-DG

▲—▲ 15 mM 2-DG



Şekil 25.

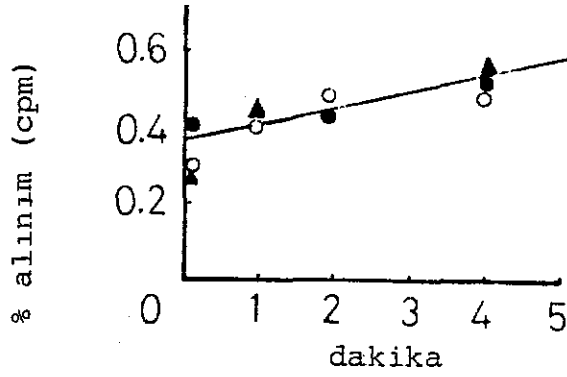
Glukoz transportunun zamana bağımlılığı

Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 22°C

Substrat : 2-DG

- 1 mM 2-DG
- 10 mM 2-DG
- ▲—▲ 15 mM 2-DG



Şekil 26.

Glukoz transportunun zamana bağımlılığı

Hücre tipi : Kobay beyni

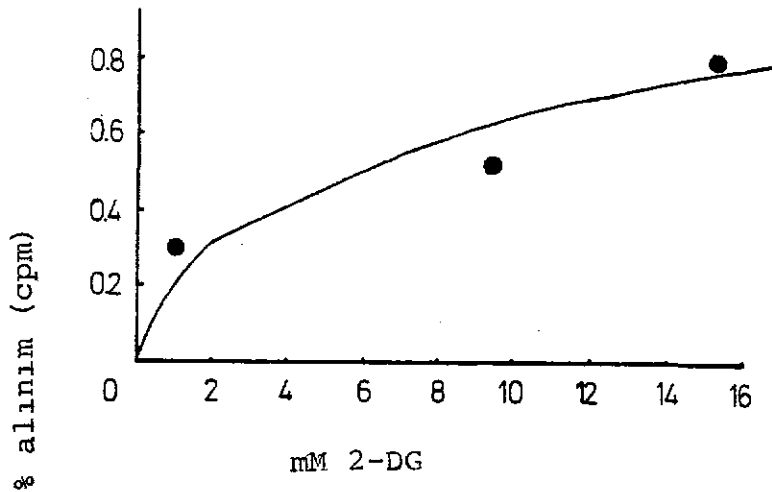
Sıcaklık : 4°C

Substrat : 2-DG

- 1 mM 2-DG
- 10 mM 2-DG
- ▲—▲ 15 mM 2-DG

Glukoz transportunun kobay beyin hücrelerinde zamana bağımlı hızının 5 dakikada hala artmakta olduğu gözlenmektedir. 37°C ve 22°C ta meningiom hücrelerinin aksine yüksek 2-DG konsantrasyonlarında kısa zaman aralıklarında transport hızında yavaşlama söz konusu değildir. 4°C ta ise konsantrasyona bağımlı olarak zamana karşı transport hızı sabit kalmaktadır. Bu derecede 2-DG transportunun ölçülemeyecek kadar düşük olduğunu söylememiz mümkün olabilir. Kobay beyininde 2-DG transportunun konsantrasyona bağlı kinetiği hiperbolik bir karaktere sahiptir.

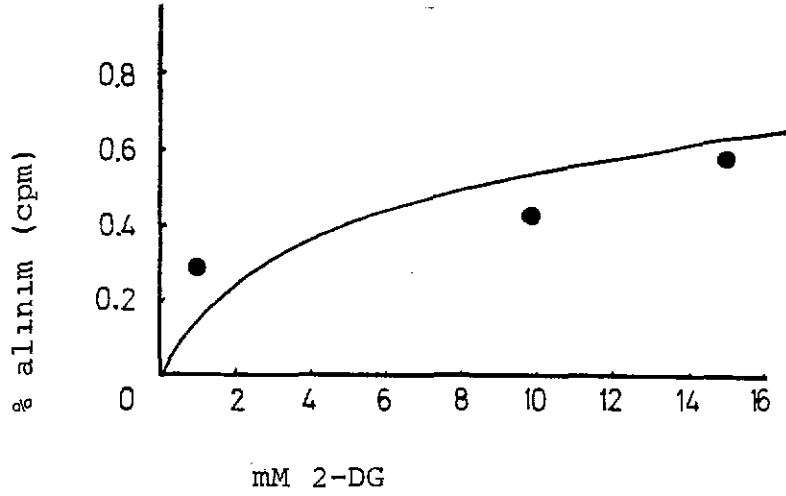
Kobay beyin hücrelerinde de meningiom hücrelerinde olduğu gibi 2-DG transportu glukoz varlığında inhibe olmaktadır. Her iki molekül de ortak bir transport proteinine bağlanarak transporte olmaktadır.(Şekil 29)



Şekil 27.

Glukoz transportunun konsantrasyon bağımlılığı

Hücre tipi : Kobay beyni, Sıcaklık: 37°C; Transport : 4 d.



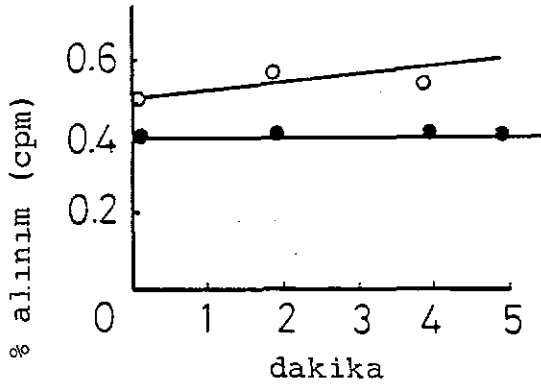
Şekil 28.

Glukoz transportunun konsantrasyon bağımlılığı

Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 22°C

Transport süresi: 4 dakika



Şekil 29.

Glukoz ve 2-DG transport rekabeti

Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-DG

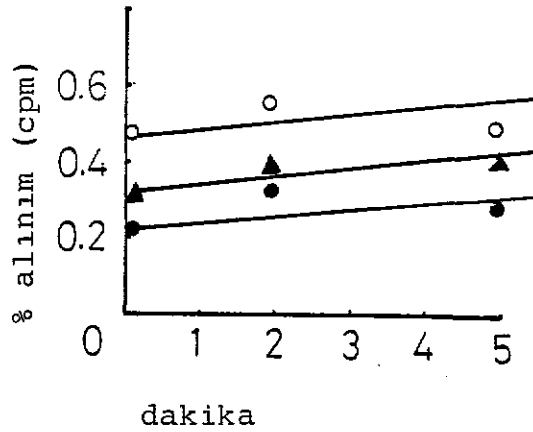
○—○ 5 mM

●—● 5 mM 2-DG (+) 40 mM glukoz

Transport deneyi 40 mM glukoz varlığında gerçekleştirildi.

Kobay beyin hücrelerinde 2-DG transport mekanizmasının Phloretin ile nasıl etkilendiğini gözlemek amacı ile hücre süspansiyonu meningiom hücrelerinde olduğu gibi 1.0 mM phloretin varlığında inkübe edildi. Bunun sonucu olarak kobay beyin hücrelerinde de 2-DG transportunun Phloretin ile inhibe olduğu gözlemlendi. Bu bulguda kobay beyinde glukoz transportunun taşıyıcı protein varlığında kolaylaştırılmış difüzyon ile gerçekleştiğine destek teşkil etmektedir.

(Şekil 30)



Şekil 30.

Glukoz traansportunun Phloretin ile inhibisyonu

Hücre tipi : Kobay beyni

Sıcaklık : 37°C

Substrat : 2-DG ○—○ 5 mM

●—● 5 mM 2-DG (+) 1.0 mM phloretin

▲—▲ 10 mM 2-DG (+) 1.0 mM phloretin

TARTIŞMA

Memeli hücrelerinde bulunan transport sistemlerini aktif transport ve kolaylaştırılmış difüzyon adı altında geniş iki grupta toplamamız mümkündür. (69)

Birçok memeli hücrelerinde aktif transport sistemleri direkt olarak ATP (Adenosin trifosfat) hidrolizine ve/veya sodyum iyonunun simportuna bağlıdır. Değişik sistemler çalışıldıkça daha çeşitli mekanizmaların ortaya çıkabileceği göz önünde tutulmalıdır.

Su ve polar olmayan moleküllerin hücre içine geçişi basit difüzyon mekanizması aracılığı ile gerçekleşir. Fakat hücre zarı polar olan iyonlar, şeker ve amino asit gibi moleküllere de geçirgendir. Zarda yerleşmiş transport proteinleri bu gibi moleküllerin hücre içine taşınmasından sorumludurlar. (70) Transport proteinleri son derece özgüdürler. İnsanlarda görülen bazı kalıtsal hastalıkların, böbrek veya bağırsakta bulunan taşıyıcı protein mutasyonuna bağlı olduğu gözlemi bu proteinlerin önemine ve aynı zamanda özgüllüğüne ışık tutmaktadır. (71)

Pasif transport mekanizması ile transport gerçekleştiren proteinler zarın çift tabakasında meydana getirdikleri kanallar aracılığı ile fonksiyon gördükleri için bunlara "Kanal proteinleri" adı verilir. "Taşıyıcı protein" adı verilen proteinler ise substratı zarın diğer cephesine kolaylaş-

tırılmış difüzyon yöntemi ile transfer ederler. Aktif transport mekanizmasında ise bazı taşıyıcı proteinler substratları elektrokimyasal gradiente karşı taşıyıp birer pompa fonksiyonu görürler. (72)

Sözü edilen değişik tip transpot mekanizmalarını açıklığa kavuşturmada kullanılabilecek yöntemlerden en özgül olanı radyoaktif işaretli türevlerin kullanılmasıdır. Bu çalışmada kullanılan yöntem minimum seviyede endositozu uyardığı, patlamış hücreleri hesaba katmadığı, kısa sürelerde tayin yapma olasılığı gibi üstünlüklerinden dolayı seçilmiştir. Ayrıca bu yöntem değişik fraksiyonlardaki radyoaktivite toplamları aracılığı ile verim hesabı ve kontrol imkanları da getirmektedir.

Çalışmamızda meningiom hücrelerinde 2-AIB asit transportunun doyumluğa ulaşan kolaylaştırılmış difüzyon yöntemi ile gerçekleştiği gözlemlendi. (Şekil 6) Doygunluk bulgusu zarda yerleşmiş bir taşıyıcı proteinin varlığını göstermektedir.

Taşıyıcı protein mekanizması enzim-substrat reaksiyonuna benzer bir yöntemle çalışır. Her taşıyıcı proteinin özgül substratı bağladığı bir bölge mevcuttur. Bu bölge tamamen dolduğu zaman, transport hızı maksimuma ulaşır ve doyumluk söz konusudur. (73)

Meningiom hücrelerinde transport hızının zamana bağımlılığını incelediğimizde (Şekil 4,5) 10 ve 20 mM gibi yüksek

2-AIB asit konsantrasyonlarında iki dakika gibi çok kısa bir sürede transportun durmuş olduğu gözlenmektedir. Kobay beyin dokusunda ise aynı zaman aralıklarında transport hale devam etmektedir. (Şekil 7). Bu bulguya dayanarak tümör hücre örneğimizde normale kıyasla yüksek sustrat konsantrasyonlarında transportun çok hızla gerçekleştiğini söylememiz mümkün olmaktadır.

Ayrıca meningiom dokusunda yapılan 2-AIB asit transport deneyleri, sigmoidal karaktere sahip bir kinetik eğri ortaya koymaktadır. (Şekil 6).

Kobay beyninde ise bu eğri hiperbolik bir karaktere sahiptir (Şekil 8). Sigmoidal bulgu taşıyıcı proteinin substratı kooperatif bir şekilde bağlandığını ve her bağlanan substrat molekülünün proteinin konformasyonunda substrata afinitesini artıracak şekilde olumlu bir değişikliğe yol açtığını gösterir. (74)

Burada diğer bir olasılık da birden fazla taşıyıcı mekanizmasının varlığıdır, ancak deneysel verilerde bunu destekleyecek bir bulgu mevcut değildir.

Yapısal olarak birbirlerine benzeyen substratlar aynı taşıyıcı proteini kullanarak hücre içine transfer olabilirler. Substratların aynı proteinin bağlanma bölgesi için rekabet etmeleri ve birbirlerinin transportunu inhibe edebilmeleri taşıyıcı bir zar proteinin varlığına işaret ettiği gibi değişik transport sistemlerinin karakterizasyonu açısından da önemlidir.

Çalışmamızda 2-AIB asit transportunun inhibisyon mekanizması L-Lösin kullanılarak gözlemlendi. Meningiom hücrelerinde L-Lösin varlığında 2-AIB asit transportu inhibe edildiği halde, kobay beyin hücrelerinde kısmi bir inhibisyon gözlenebilmiştir (Şekil 9,10).

Bu bulguya dayanarak, meningiom hücrelerinde 2-AIB asit ve lösin amino asidinin aynı taşıyıcı sistemi kullandıklarını söylememiz mümkün olabilir.

Kobay beyninde ise bu iki amino asit farklı transport sistemlerini kullanarak hücre içine alınmaktadırlar.

Meningiom doku örneği bulma güçlüğünden dolayı tek bir amino asit ile gerçekleştirilen inhibisyon deneyleri, diğer grup amino asitlerle de gerçekleştirilebilirse transport sistemlerinin karakterizasyonu ve transformasyon ile hücre yüzeyi ilişkisi açısından önemli olabilir.

2-AIB asit transportunun enerji bağımlılığı metabolik enerji zehirleri, Sodyum Azid ve 2,4 Dinitrofenol kullanılarak denenmiştir. (75)

Meningiom hücrelerinde metabolik enerji bloke edildiği zaman 2-AIB asit transportunun inhibe edildiği gözlenmiştir. (Şekil 11). Buna bağlı olarak bu amino asidin meningiom hücrelerinde ATP gerektiren aktif bir transport mekanizması kullandığı ileri sürülebilir.

Kobay beyninde ise Sodyum Azid ve 2,4 Dinitrofenol transport aktivitesine herhangi bir etki yapmamıştır. (Şekil 12). Bu da bu dokuda 2-AIB asit transportunun ATP gerektirmediğini göstermektedir.

Transport mekanizmaları için metabolik enerji kullanıldığı gibi, sodyum iyonunun elektrokimyasal gradienti de bir güç kaynağı olabilmektedir. Temelde bu iki kaynak bazı yerlerde indirekt olarak birbirlerini destekler niteliktedir. (76)

Bu hipoteze göre sodyum iyonu ve substrat hücre zarından "ko-transporte" olmaktadır. Sodyum gradienti ise ATP hidrolizi gerçekleştiren ATP ase aracılığı ile korunabilmektedir.

Kullandığımız hücrelerde 2-AIB asit transportunun sodyum iyonuna bağımlılığı sodyum yerine stokiometrik ölçülerde kolin kullanılarak incelenmiştir.

Sodyum iyonundan arı transport ortamında meningiom ve kobay beyin hücrelerinde inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 13,14).

Kobay beyin hücreleri 2-AIB asit transportu için metabolik enerji kullanmadıkları halde, sodyum iyonu, 2-AIB asit ile birlikte bir simport transport modeli için gerekli olmaktadır. Meningiom hücrelerinde ise transport mekanizmasının hem sodyum iyonuna hem de enerji (ATP) ye bağımlı olması iki ayrı transport sisteminin varlığını düşündürmektedir. Bu

iki sistem ya aynı protein aracılığı ile veya farklı prote-
inler aracılığı ile birbirine bağlı olmalıdır.

Beyin hücrelerinin enerji dengesi glukoz metabolizması
ile yakından ilgilidir. Yararlanma iskemi gibi durumlarda
ise glukoz temini daha da önem kazanır. (5)

Çalışmamızda yavaş büyüyen iyi huylu bir beyin tümörü
olan meningiom hücrelerinde ve kobay beyin hücrelerinde
glukoz transportu glukoz yerine beyin heksokinaz enzimi tara-
fından fosforile edilen fakat daha ileri metabolik safhalara
katılmayan 2-DG kullanılarak çalışılmıştır. 2-DG un glukoz
ile aynı taşıyıcı sistemi kullandığını test etmek amacı ile,
transport deneyleri glukoz varlığında gerçekleştirilmiştir.
Meningiom ve kobay beyin hücrelerinde glukozun 2-DG ile reka-
bet ettiği ve transportu inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil
22,29).

Bu bulguya dayanarak glukoz ve 2-DG un aynı taşıyıcı
sistemi kullandıklarını kuvvetle ileri sürülebilir. Aynı bul-
guya dayanarak, transport deneylerinde glukoz yerine bu analog
kolaylıkla kullanılabilir.

Meningiom hücrelerinde, 37°C ta 2-DG transportu ölçül-
mesi çok zor bir hızda gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu nedenle
transport deneyleri daha düşük sıcaklıkta tekrarlandı. Trans-
portun sıcaklık bağımlılığı 37°C, 22°C ve 4°C ta gerçekleştii-
rilen transport çalışmaları ile araştırıldı.

37°C ta Km değeri, kullanılan yöntemlerle ölçülmeyecek kadar düşük olan transport kinetiği, 22°C de daha yüksek Vmax ve daha büyük bir Km değeri göstermiştir (Şekil 15,16).

Her iki sıcaklık derecesinde de transport kinetiği hiperbolik bir eğriye sahiptir (Şekil 15,16). Bu bulgu zar da yerleşik bir taşıyıcı proteinin varlığına işaret etmektedir.

4°C ta ise meningiom hücrelerinde doygunluk söz konusu değildir (Şekil 17). Kullanılan konsantrasyonlarda substrat transportunun pasif difüzyon yöntemi ile gerçekleştiğini söylememiz mümkün olmaktadır.

Kobay beyin hücrelerinde de transport, sıcaklığa bağımlı olarak gerçekleşmekte ve 37°C ve 22°C'da meningiom hücrelerinden daha yavaş doygunluğa ulaşmakta olan bir kinetik eğrisi göstermektedir (Şekil 27,28). Bu eğriler hiperbolik özellikte olduğundan bu derecelerde 2-DG transportunun taşıyıcı protein aracılığı ile gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Ancak 4°C 'da elde edilen sonuçlar transportun konsantrasyondan bağımsız olarak meydana geldiğini göstermektedir (Şekil 26) Bu bulguya dayanılarak 4°C'da transportun gerçekleşmediğini düşünebiliriz.

Sıcaklılığa bağımlı olarak zar akışkanlığında meydana gelebilecek olan değişiklikler, zarın diğer fonksiyonlarını etkiledikleri gibi transport proteinlerinin de fonksiyonlarını

etkileyebilirler. Phloretin, glukozun kolaylaştırılmış difüzyon yolu ile transpotunu inhibe eden bir kimyasal ajandır. (77)

Transport deneylerimizin sonucunda hem meningiom hem de kobay beyin hücrelerinde phloretin varlığında 2-DG transportunun inhibe olduğu gözlenmiştir (Şekil 29,30).

Doygunluk ve glukoz ile rekabet bulgularının yanı sıra phloretin ile inhibisyonun gözlenmesi 2-DG un meningiom ve kobay beyin hücrelerinde kolaylaştırılmış difüzyon mekanizması ve taşıyıcı protein varlığında gerçekleştiğini destekler niteliktedir. Glukoz kinetik çalışmaları 4°C de haricinde meningiom ve kobay beyin hücrelerinde benzerlikler taşımaktadır. Elde edilen bulgularımıza dayanarak, iki tip hücre arasındaki farklı sonuçların taşıyıcı proteinlerinden daha çok zar fosfolipid yapısındaki farklılıklara bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülebilir. Bu sistemin daha yeterli bir biçimde karakterizasyonu için sodyum ve metabolik enerji bağımlılığını çalışmamız gerekmektedir.

Amino asit transport kinetiklerine gelince, iki hücre tipinde hem taşıyıcı sistemler hem de enerjiye bağımlı mekanizmalar açısından farklılıklar mevcuttur.

Literatürde meningiom hücrelerinde yapılmış transport çalışmaları, glutamat transportu ile ilgilidir. Daha kapsamlı çalışmalara rastlanmadığından çalışmamızda elde ettiğimiz

sonuçlar n bulgu niteliğindedir.

Meningom hücre zarında yapısal özellikleri incelemek üzere elektron mikroskopi çalışmaları değerli olabilir.

Ayrıca meningiom hücre zarındaki çeşitli grup amino asitlerin transport sistemlerinin karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar planlanmaktadır. Sıcaklılık farkı ile meydana gelen glukoz taransportu kinetiğindeki farklılıklar zarın yapısı ve fonksiyonu arasında önemli bir ilişkiye ışık tutmaktadır. Bu nedenle, taşıyıcı proteinin izolasyonu ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar neoplastik hücrelerin zarlarında meydana gelen değişiklikleri inceleme açısından yararlı bilgiler verebilir.

ÖZET

Hücre zarı hücrenin canlılığını koruması açısından çok önemli bir organeldir. Kanserleşme olgusuyla birlikte diğer organellerde olduğu gibi hücre zarında da yapısal ve fonksiyonel bir takım değişiklikler ortaya çıkar.

Çalışmamızda iyi huylu bir santral sinir sistemi tümörü olan meningioma da glukoz ve amino asit transport hız ve kinetiğini çalışarak transformasyona uğramış hücre zarı hakkında bilgi edinmeye çalıştık. Normal meninks zarı temini güçlüğü karşısında kontrol doku olarak kobay beyni kullanıldı.

Çalışmamızı radyoaktif işaretli türevler (2-Deoksi-D-(1^3H) glukoz), 2-Amino (1^{14}C) Isobutirik Asit) kullanarak gerçekleştirdik.

Amino asit transportunun meningiom hücrelerinde taşıyıcı bir protein varlığında gerçekleştiğini ve substratın bu proteine kooperatif bir biçimde bağlandığını gözledik. Bu transport sistemi Na iyonuna ve metabolik enerjiye bağımlı olduğu ve L-Lösin ile aynı taşıyıcı sistem olduğu da kinetik çalışmalardan elde edilen bulgular arasında.

Kobay beyin hücrelerinde ise amino asit transportunun meningiom hücrelerinde olduğu gibi taşıyıcı protein varlığında gerçekleştiğini fakat substratın kooperatif bağlanma özel-

liği olmadığını gözledik. Ayrıca yüksek substrat seviyelerinde, meningiom hücrelerinin aksine transport kinetiğinde doygunluk gözlenmedi. Kobay beyinde amino asit transportu Na^+ iyonuna bağlı olduğu halde, metabolik enerji gerektirmedi; ve L-Lösin ile kısm inhibisyona uğradı.

Glukoz transportu ise hem meningiom hücrelerinde hem de kobay beyinde sıcaklık bağımlı olarak gerçekleşti. Her iki sistemde de 2-Deoksi-D-glukoz transportu D-glukoz ile inhibe edildi. Bu bulgu taşıyıcı bir protein varlığını ortaya koyduğu gibi, bu anoloğun glukoz yerine kullanılabileceğini de ispatlamış oldu. Bu taşıyıcı protein varlığında gerçekleşen glukoz transport sistemi, hem meningiom hücrelerinde hem de kobay beyinde phloretin varlığında inhibe edildi, bu bulgu da transport mekanizmasının taşıyıcı protein varlığında kolaşlaştırılmaz difüzyon aracılığı ile gerçekleştiğini göstermede yardımcı oldu.

KI SALT MALAR

2-DG-	2-Deoksi-D-glukoz
2-AIB asit-	2-Amino Isobutirik asit
2-DG*	2-Deoksi-D- (1^3H) glukoz
2-AIB asit*	2-Amino (1^{14}) Isobutirik Asit
cpm	Counts per minute
Km	Michaelis Menten Sabitesi
Vmax	Maksimum hız

KAYNAKLAR

- 1- Hynes, R.O. Cell surface proteins and malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* 458:73- 07.1976.
- 2- Holley, W.R. Hypothesis concerning the nature of malignant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2840-41, 1972.
- 3- Weber, W.J. Hale, A.H., Yau, T.M. Transport changes associated with growth control and malignant transformation. *J. Cell. Physiol.* 89: 723-728, 1976.
- 4- Passoneau, V.J. Glucose transport and metabolism in cultured cells of nervous tissue. *J. Cell. Physiol.* 89:693-696, 1976.
- 5- Lust, W.D., Schwartz, J.D., Passoneau, V.J. Glycolytic metabolism in cultured cells of nervous system: Glucose transport and metabolism in the C-6 glioma cell line. *Mol. Cell. Biochemistry.* 8: 169-176, 1975.
- 6- Reivich, M., Alavi, A. Positron emission studies of local cerebral metabolism in humans in physiological and local pathophysiological conditions. s.155-176. *Advances in Metabolic Disorders.* vol.10. Ed. Szabo, A.J. Academic Press, 1983.
- 7- Snodgrass, R.S., Iversen, L.L. Amino acid uptake into human brain tumors. *Brain Research.* 76: 95-107, 1974.
- 8- Haglid, K.G., Hamberger, A., Carlsson, C.A., Lindgen, S., Stavrou D., Sourander, P. Glial cell characteristics in bulk prepared cell fractions from human brain tumors. *Acta Neuropathol.* 40: 243-247, 1977.
- 9- Stewart, R.M., Martya, R.L., Baldessarini, R.J., Kornblith, P. Glutamate accumulation by human gliomas and meningiomas in tissue culture. *Brain Research.* 118:441-452, 1976.
- 10- Singer, S.J., Nicholson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-731, 1972.
- 11- Kornberg, R.D., McConnell, H.M. Lateral diffusion of phospholipids in vesicle membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2564-2568, 1971.
- 12- Kornberg, R.D., McConnell, H.M. Inside-Outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry.* 10:1111-1120, 1971.
- 13- Pasternak, C.A. *An Introduction to Human Biochemistry.* s.129, Oxford Press, 1979.

- 14- Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Colley, C.M. Localization of red cell membrane constituents. *Biochim. Biophys. Acta.* 300: 159-182, 1973.
- 15- Michell, B. Hormone action at membranes. *Trend. Biochem. Sci.* s.3-4, Ocak, 1984.
- 16- Stryer, L. *Biochemistry.* s.226. W.H. Freeman and Co. San Francisco, 1981.
- 17- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. *Principles of Biochemistry.* s.554, McGraw-Hill, 1983.
- 18- Singer, S.J. The molecular organization of membranes. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 805-833, 1974.
- 19- Frye, L.D., Edidin, M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell. Sci.* 7: 319-355, 1970.
- 20- Unwin, N., Henderson, R. The structure of proteins in biological membranes *Scientific American.* s. 78-94. Şubat, 1984.
- 21- Luft, J.H., The structure and properties of the cell surface coat. *Int. Rev. Cytol.* 45: 291-392, 1976.
- 22- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. *Principles of Biochemistry.* s.302, McGraw-Hill, 1983.
- 23- Guidotti, G.G., Borghetti, A.F., Gazzola, G.C. The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 515: 329-366, 1978.
- 24- Pearse, B.M.F. Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 1255-1259, 1976.
- 25- Pearse, B.M.F., Bretscher, M.S. Membrane recycling by coated vesicles. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 85-101, 1981.
- 26- Pastan, I., Willingham, M.C. Receptor mediated endocytosis. *Trends. Biochem. Sci.* s.250-254, Temmuz, 1983.
- 27- Foster, D.O., Pardee, A.B. Transport of amino acids by confluent and nonconfluent 3T3 and polyoma virus-transformed 3T3 cells growing on glass cover slips. *J. Mol. Biol.* 244: 2675-2681, 1969.
- 28- Oxender, D.L., Lee, M., Cecchini, G. Regulation of amino acid transport activity and growth rate of animal cells in culture. *J. Biol. Chem.* 252: 2680-2683, 1977.

- 29- Oxender, D.L., Christensen, H.N. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cells. *J. Biol. Chem.* 238: 3686-3699, 1963.
- 30- Shotwell, M.A., Oxender, D.L., The regulation of neutral amino acid transport by amino acid availability in animal cells. *Trends. Biochem. Sci.* 314-316, Eylül, 1983.
- 31- Christensen, H.N., Liang, M., Archer, E.G. A distinct Na⁺ requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids. *J. Biol. Chem.* 242: 5237-5246, 1967.
- 32- Eavenson, E., Christensen, H.W. Transport systems for neutral amino acids in the pigeon erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 242: 5386-5387, 1967.
- 33- Morgan, N.E., Regen, D.M., Park, C.R. Identification of a mobile carrier-mediated sugar transport system in muscle. *J. Biol. Chem.* 239: 369-380, 1984.
- 34- Crafford, O.B., Renold, A.E. Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 240: 3237-3244, 1967.
- 35- Siegel, G.J., Albers, R.A., Katzman, R., Agranoff, B.W. *Basic Neurochemistry*. Bölüm 20, Little, Brown and com. Boston, 1976.
- 36- Rapin, A.M.C., Burger, M. Tumor cell surfaces: General alterations detected by agglutinins. *Adv. Cancer, Res.* 20: 1-89, 1974.
- 37- Levine, A.J. Transformation associated tumor antigens. *Adv. Cancer, Res.* 37: 75-105, 1982.
- 38- Stites, D.D., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V. *Basic and Clinical Immunology*. s. 245. Lang Medical Pub. 1982.
- 39- Keski, O., Valeri, A., Rouslahti, E. Fibroblast surface antigen, the external glycoprotein lost in proteolytic stimulation and malignant transformation. *J. Cancer, Res.* 17: 261-269, 1976.
- 40- Aberchrombie, M., Ambrose, E.J. The surface properties of cancer cells. *Cancer Res.* 22: 525-548, 1962.
- 41- Nicolson, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Res. Cytol.* 39: 89-190, 1974.
- 42- Warburg, O. On the origin of cancer cell. *Science*, 123: 309-314, 1956.
- 43- Racker, E. Why do tumor cells have high aerobic glycolysis? *J. Cell. Physiol.* 89: 697-700, 1976.

- 44- Hume, O.A., Weidemann, M.J. Role and regulation of glucose metabolism in proliferating cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 62: 3-8, 1979.
- 45- Bissell, M.J. Transport as a rate limiting step. *J. Cell. Physiol.* 89: 701-709, 1976.
- 46- Singh, V.N., Singh, M., Augst, J.T., Horcker, B.L. Alterations in glucose metabolism in chick embryo cells transformed by Rous Sarcoma virus. Intracellular levels of glycolytic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 4129-4132, 1974.
- 47- Lang, D.R., Weber, M.J. Increased membrane transport of 2-Deoxy glucose and 3-O methyl glucose is an early event in the transformation of chick embryo fibroblasts by Rous sarcoma virus. *J. Cell. Physiol.* 84: 315-320, 1978.
- 48- Parnes, J.R., Isselbacher, K.J. Transport alterations in virus transformed cells. *Prog. exp. Tumor Res.* 22: 79-122, 1978.
- 49- Hatanaka, M. Effect of oncogenic transformation in transport and uptake of nutrients. *J. Cell. Physiol.* 89: 745-750, 1976.
- 50- Weber, M.J. Hexose transport in normal and in Rous sarcoma virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.* 248: 2978-2983, 1973.
- 51- Isselbacher, K.J. Increased uptake of amino acids and 2-Deoxy-D-Glucose by virus transformed cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 585-589, 1972.
- 52- Kinbelgerg, H.K., Mayhew, E. Increased ouabain sensitive Rb uptake and sodium and potassium activated adenosine triphosphatase activity in transformed cell lines. *J. Biol. Chem.* 250: 100-104, 1975.
- 53- Cunningham, D.D., Pardee, A.B. Transport changes rapidly initiated by serum addition to contact inhibited 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64: 1049-1056, 1969.
- 54- Russell, D.S., Rubinstein, L.J. *Pathology of Tumors of the Nervous System*, Arnold, London, 1963.
- 55- Rubins temir, L.J. *Tumors of the necvous System*. s. 160-190. *Armed Forces Fustidate of Pathology*, Bethesda, 1972.
- 56- Navos, S., Lajtha, A. The uptake of amino acids by particulate fractions from brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 173: 518-531, 1969.
- 57- Wofsey, A.R., Kuhar, M.J., Synyder, S.J. a unique synapsomal fraction which accumulates glutamic acid and aspartic acid in brain tissue. *Proc. Natl. Acd.* 68: 1102-1106, 1971.

- 58- Baldessarini, R.J., Kornblith, M. Biochemical physiology of central synapses. *Ann. Rev. Physiol.* 35: 273-304, 1973.
- 59- Henn, F.A., Goldstein, M.N., Hanberger, A. Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glia. *Nature* 249: 663-664, 1974.
- 60- Stewart, R.M., Madtzuza, R.L., Baldessarini, R.J., Kornblith, P.L. Glutamate accumulation by human gliomas and meningiomas in tissue culture. *Brain Research.* 118: 441-452, 1976.
- 61- Bachelard, H.S.J., Specificity and kinetic properties of monosaccharide uptake into guinea pig cerebral cortex in vitro. *Neurochem.* 18: 213-222, 1971.
- 62- Diamond, I., Fishman, R.A. Preferential phosphorylation of recently transported 2-Deoxy-D-Glucose in isolated nerve endings. *Brain Research.* 57: 239-243, 1973.
- 63- Walum, E., Edström, A. Kinetics of 2-Deoxy-D-Glucose transport into cultured mouse neuroblastoma cells. *Exp. Cell. Res.* 97: 15-22, 1976.
- 64- Chan, W.S., Jackson, A., Turner, G.A. Differences in surface expression of WGA binding proteins of cells from lymphosarcoma and its liver metastases. *Br. J. Cancer.* 49: 181-191, 1984.
- 65- Pasternak, C.A., Micklem, K.J. Permeability changes during cell fusion. *J. Membrane Biol.* 14: 293-303, 1973.
- 66- Pasternak, C.A., Micklem, K.J. The biochemistry of virus induced cell fusion. *Biochem. J.* 140: 405-411, 1974.
- 67- Impraim, C.C., Foster, K.A., Micklem, K.J., Pasternak, C.A. Nature of virally mediated changes in membrane permeability to small molecules. *Biochem. J.* 186: 847-860, 1980.
- 68- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 69- Wilson, D.B., Cellular transport mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 933-965, 1978.
- 70- Singer, S.J. Thermodynamics, the structure of integral membrane proteins and transport. *J. Supramol. Struct.* 6: 313-323, 1977.
- 71- Gray, M.G. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* ed. John B. Stanbury. bölüm 78., 1983.

- 72- Hobbs,A.S.,Albers,R.W. The structure of proteins involved in active membrane transport. *Annu.Rev.Biophys. Bioeng.* 9: 259-291,1980.
- 73- Finean,J.B.,Coleman,R.,Michell,R.H. *Membranes and Their Cellular Functions.* s. 42-67. London,Blackwell,1978.
- 74- Smith,E.L.,Hill,R.L.,Lehman,I.R.,Lefkowitz,R.J.,Handler,P.,White, A. *Principles of Biochemistry,* s. 202. Mc Graw-Hill, 1983.
- 75- Becker,R.F.,Potters,V.R.,Butcher,F.R. Induction of amino acid transport in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells by insulin. *J.Biol.Chem.*251: 3014-3020,1976.
- 76- Kristensen,L.O. Energization of alanine transport in isolated rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 255: 5236-5243,1980.
- 77- Illiano,G.,Cuatrecasas,P. Glucose transport in fat cell membranes. *J.Biol.Chem.* 246: 2472-2479,1971.

BASKI ve DİZGİ :

bürorez

Tunus Cad. 19/3 Tel : 184343 Ankara