

T.C.

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

GLİKOZ VE ASPARTAM METABOLİZMASININ
NÖROBLASTOMA SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysel ŞEN

İstanbul

Ağustos- 2023

T.C.

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

GLİKOZ VE ASPARTAM METABOLİZMASININ
NÖROBLASTOMA SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysel ŞEN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK

İstanbul

Ağustos-2023

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Beslenme ve Diyetetik Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK

Üye Dr. Öğr. Üyesi Serap Andaç ÖZTÜRK

Üye Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Büşra BOLAT

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Doç. Dr. Erhan İÇENER
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Glikoz ve Aspartam Metabolizmasının Nöroblastoma SH-SY5Y Hücrelerinde Karşılaştırmalı Analizi**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Aysel ŞEN

ÖN SÖZ

Öncelikle beni öğrencisi olarak kabul edip bu çalışmayı yapma fırsatı tanıyan, gerek deneyler gerekse hayat konusunda yol gösteren, yoğun temposu arasında değerli vaktini ayırarak bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşan, sabrı, güveni ve desteğiyle hayatımda iz bırakan tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK'e,

Laboratuvardaki deneylerimde yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Ferhat BOSTANCI'ya, laboratuvarda birlikte çalışmaktan keyif aldığım Nurgül Ceren PEKER ve Ayşenur SİNKİL'e,

Yüksek lisans bilgi sınavına bile benimle gelen, bu süreçte en çok cesaret veren Deniz ABDİOĞLU'na, evlerini açan, motive eden, dert ve mutluluklarıma ortak olan biricik dostlarım Büşra BALA, Özlem AYDIN ve Feyzan DOĞAN'a,

Hayatlarını çocuklarının eğitime ve geleceğine adanmış, beni bugünlere getiren annem Ayşe ŞEN ve babam Kenan ŞEN'e, neşe kaynaklarım kardeşlerim Arzu ŞEN ve İrem ŞEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Aysel ŞEN

Ağustos-2023

ÖZET

GLİKOZ VE ASPARTAM METABOLİZMASININ NÖROBLASTOMA SH-SY5Y HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Aysel ŞEN

Yüksek Lisans, Beslenme ve Diyetetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ABDİK

Ağustos, 2023 - 80 Sayfa

Çalışmanın amacı aspartam- kanser ilişkisinin yeni bir bakış açısıyla incelenmesidir. Bu çalışmada SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine beş günlük hücre canlılığı testi için 4,5 g/L Glukoz (kontrol) veya aynı kalori değerine sahip 1 g/L Glukoz + Aspartam uygulanmıştır. Sonuç olarak aspartam eklenmiş grup kontrol grubuna göre 72 saat sonra hücre canlılığında önemli bir azalma göstermiştir. Daha sonra hücreler ekilmiş, aynı işlemler uygulanmış ve hücreler 72 saat sonra RNA izolasyonu için toplanmıştır. Aspartam maruziyeti kontrol grubuna göre AKT, BCL-2, CNCD1 ve NF-kB gen ekspresyonlarında anlamlı azalmaya neden olurken, CASP3 ve CASP7'de herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Her iki koşulda da hücrelerin koloni oluşturma yeteneği değerlendirildiğinde, boyama işleminden sonra hücrelerden tekrar toplanan kristal viyolenin absorbans değerleri arasında fark bulunmazken, aspartam eklenen grupta koloni sayısı daha az olmuştur. Ayrıca, çizik deneyinde kontrol grubu, 24 saat sonra aspartam eklenmiş gruba göre önemli ölçüde daha yüksek yara kapanma yüzdesine sahip bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 1 g/L Glukoz + Aspartam yerine 4,5 g/L Glukoz varlığında daha fazla çoğalabildiği, ilgili genlerde yüksek ekspresyona sahip olduğu, koloni oluşturma ve migrasyon kapasitelerinin de aspartam ilavesine göre sadece yüksek glukoz alımı sırasında arttığı gösterilmiştir. Ancak bunun kanser hücrelerinde aspartam metabolizması nedeniyle ortaya çıkan metabolitlerle ilgili olup olmadığı belirsizdir. Metabolik yolların aydınlatılması için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Glukoz, Aspartam, Kanser, Nöroblastoma, Metabolizma

ABSTRACT

COMPARATIVE ANALYSIS OF GLUCOSE AND ASPARTAM METABOLISM IN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS

Aysel SEN

Master, Nutrition and Dietetics

Thesis Advisor: Asst. Prof. Dr. Hüseyin ABDIK

August, 2023 - 80 Pages

The aim of the study is to examine the aspartame-cancer relationship from a new perspective. In this study, 4,5 g/L Glucose (control) or 1 g/L Glucose + Aspartame with the same calorie value were applied to SH-SY5Y neuroblastoma cells for a five-day cell viability test. As a result, the group with aspartame added showed a significant decrease in cell viability after 72 hours compared to the control group. Then, the cells were planted, the same procedures were performed, and the cells were collected for RNA isolation after 72 hours. Aspartame exposure caused a significant decrease in AKT, BCL-2, CNCD1 and NF-kB gene expressions compared to the control group, while it did not show any changes in CASP3 and CASP7. When the colony-forming ability of the cells was evaluated under both conditions, there was no difference between the absorbance values of the crystal violet collected from the cells again after Decolonization, while the number of colonies was less in the aspartame added group. In addition, the control group in the scratch experiment was found to have a significantly higher percentage of wound closure after 24 hours than the aspartame-added group. According to these results, it has been shown that SH-SY5Y neuroblastoma cells can multiply more in the presence of 4,5 g/L Glucose instead of 1 g/L Glucose + Aspartame, have high expression in related genes, and their colony-forming and migration capacities increase only during high glucose intake compared to the addition of aspartame. However, it is unclear whether this is related to the metabolites that occur due to aspartame metabolism in cancer cells. Detailed studies are needed to elucidate metabolic pathways.

Keywords: Glucose, Aspartame, Cancer, Neuroblastoma, Metabolism

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
İKİNCİ BÖLÜM	
TATLANDIRICILAR VE KANSER.....	4
2.1. Doğal Tatlandırıcılar.....	4
2.1.1. Doğal Tatlandırıcıların Tanımı ve Çeşitleri.....	4
2.1.1.1. Glukoz.....	6
2.1.1.2. Glukoz Metabolizması.....	7
2.2. Yapay Tatlandırıcılar.....	9
2.2.1. Yapay Tatlandırıcıların Tanımı ve Çeşitleri.....	9
2.2.2. Aspartam.....	10
2.2.2.1. Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması.....	11
2.2.2.2. Aspartam Kullanım Alanları.....	11

2.3. Glukoz ve Aspartam Metabolizmasının Hastalıklarla İlişkisi.....	13
2.3.1. Diyabet.....	13
2.3.2. Obezite.....	14
2.3.3. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	15
2.3.4. Kanser.....	16
2.4. Kanser.....	17
2.4.1. Kanserin Tanımı.....	17
2.4.2. Kanser Metabolizması.....	17
2.4.3. Dünyada ve Türkiye’de Kanser Epidemiyolojisi.....	20
2.4.4 Çocukluk Çağı Kanserleri.....	21
2.4.5. Nöroblastoma.....	25
2.4.5.1. Moleküler Patogenez.....	26
2.4.5.2. Tedavi Yöntemleri.....	28

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereç.....	30
3.1.1. Hücre Hattı.....	30
3.1.2. Kimyasal Malzemeler ve Kitler.....	30
3.2. Yöntem(ler).....	31
3.2.1. Hücre Kültürü.....	31
3.2.2 Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	32
3.2.3. Kontrol ve Aspartam Grubu Besiyerleri Hazırlanışı.....	32
3.2.4 Hücre Canlılık Testi.....	33
3.2.5. Koloni Oluşturma.....	34
3.2.6. Scratch Deneyi.....	35

3.2.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	36
3.2.7.1. Total RNA İzolasyon Protokolü.....	37
3.2.7.2. cDNA Sentezi.....	37
3.2.8. Gen Ekspresyonu Analizi – Real-Time PCR (qPCR).....	38
3.2.9 İstatistiksel Hesaplamalar.....	39

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR.....	40
4.1 Hücre Canlılık Testi (MTS) Bulguları.....	40
4.4 Koloni Oluşturma Bulguları.....	41
4.1. Scratch Bulguları.....	42
4.1. Gen Ekspresyon Bulguları.....	42

BEŞİNCİ BÖLÜM

DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA.....	44
---------------------------------------	-----------

ALTINCI BÖLÜM

SONUÇ.....	48
-------------------	-----------

YEDİNCİ BÖLÜM

KAYNAKÇA.....	49
----------------------	-----------

SEKİZİNCİ BÖLÜM

ÖZGEÇMİŞ.....	66
----------------------	-----------

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Doğal Tatlandırıcıların Özellikleri.....	4
Tablo 2.2: Onaylanmış Yapay Tatlandırıcılar.....	9
Tablo 2.3: Aspartamın Genel Tanımı ve Özellikleri.....	10
Tablo 2.4: Aspartam Takviyesi İçin Onaylanmış Gıda Grupları ve Kullanım Sınırları.....	12
Tablo 2.5: Kanslerle İlişkili Metabolik Değişiklikler.....	17
Tablo 2.6: Çocukluk Çağı Kanslerinin Uluslararası Sınıflandırması.....	22
Tablo 2.7: Nöroblastoma Özellikleri, Prognostik Kategorisine Göre Tedavisi ve Sağkalımı.....	29
Tablo 3.1: Tamamlanmış DMEM (%10 FBS, %1 Antibiyotik) Besiyeri	31
Tablo 3.2: RNA Ölçümleri ve cDNA Sentezi.....	38
Tablo 3.3: Real Time PCR Mix Bileşenleri.....	38
Tablo 3.4: Kullanılan Primerler.....	39
Tablo 4.1: SH-SY5Y hücre hattında 24, 48, 72 saat ve 5 gün süreyle kontrol veya aspartam uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Glukozun Kimyasal Yapısı.....	7
Şekil 2.2: Glukoz Metabolizmasına Genel Bakış.....	8
Şekil 2.3: Aspartam Kimyasal Yapısı.....	11
Şekil 2.4: Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu İçin Gerekli Makromolekül Sentez Yolakları.....	18
Şekil 2.5: 2020'de Her İki Cinsiyeti, Her Yaşı ve Her Kanser Türünü Kapsayan Tahmini Kanser Vaka Sayısı ve Dağılımı.....	20
Şekil 2.6: 2020'de Dünya Çapında Tahmini Yaşa Göre Standardize Edilmiş İnsidans ve Ölüm Oranları.....	21
Şekil 2.7: Nöroblastomannın Klinik Gösterimi.....	25
Şekil 2.8: Nöroblastoma Kök Hücresi.....	26
Şekil 2.9: Nöroblastomannın Büyümesi ve İlerlemesinde Rol Alan Sinyal Yolları...27	
Şekil 3.1: Aspartam, DMEM Low Glukoz ve Elde Edilen Steril Besiyeri.....	33
Şekil 3.2: MTS Tahlili.....	34
Şekil 3.3: Kristal Viyole İle Boyanan ve Sayılan Kolonilerin Kamera Görüntüsü...35	
Şekil 3.4: 10 µl'lik Pipet Uçları Kullanılarak Açılan Yaranın Kamera Görüntüsü...36	
Şekil 4.1: SH-SY5Y Hücre Hattı MTS Sonuçları.....	41
Şekil 4.2: Koloni Oluşturma Bulguları.....	41
Şekil 4.3: Çiziklerin Ters Işık Mikroskobu ile Alınan Temsili Görüntüleri ve Uygulamadan Sonra Hücrelerde Yara Kapanma Oranları.....	42
Şekil 4.4: SH-SY5Y Hücre Hattı Kontrol ve Aspartam Gruplarında Apoptoz, Yaşam Sinyal ve Hücre Döngüsü Kontrolü Yolaklarında Rol Alan Genlerin Göreceli Kat Değişimi, qPCR Analiz Sonuçları.....	43

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACLY	: ATP-Sitrat Liyaz
AKT	: Serin/Treonin Protein Kinaz B
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
ASTC2	: Alanin, Serin, Sistein Taşıyıcı 2
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma-2
Bcl-xl	: B Hücreli Lenfoma -Ekstra Large
BMI	: Vücut Kitle İndeksi
CAD	: Karbamoil-Fosfat Sentetaz 2
CCN1	: Siklin Bağımlı Kinaz 1
cDNA	: Komplementer DNA
DMEM	: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
FBS	: Fetal Bovin Serum
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GFPT1	: Glutamin Fruktoz-6-Fosfat Aminotransferaz 1
GRAS	: Genel Olarak Güvenli
GLI1	: Glioma İlişkili Onkogen
GLS1	: Glutaminaz
GLUT1	: Glukoz Taşıyıcı 1
ICD	: Uluslararası Hastalık Sınıflandırması
ICCC	: Çocukluk Çağı Kanserlerinin Uluslararası Sınıflandırması
ICD-O	: Uluslararası Onkoloji Hastalıkları Sınıflandırması

INRGSS	: Uluslararası Nöroblastoma Risk Grubu Evreleme Sistemi
MDD2	: Majör Depresif Bozukluk 2
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	: 3-4,5-Dimetil-Tiyazolil-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
MYCN	: Temel Sarmal Döngü Sarmal Proteini 37
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NFkB	: Nükleer Faktör Kappa B
NICD	: Notch Hücre İçi Bölge
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PPP	: Pentoz- Fosfat Yolu
PKU	: Fenilketonüri
PSA	: Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin
p21	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1
p53	: Tümör Baskılayıcı Protein 53
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRPS2	: Fosforibosil Pirofosfat Sentetaz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
RNA	: Ribonükleik Asit
qPCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Gıda seçimi ve tüketimi insan iştahının ve besin alımının düzenlenmesinde önemli bir yer almaktadır. Genellikle bir gıdanın kabulünü veya reddini belirleyen, tatlı tat tercihidir (Drewnowski vd., 2012). Yüzlerce yıldır insan diyetleri meyveler, sebzeler ve bal gibi çeşitli gıdalardaki doğal şekerleri içermektedir. Bununla birlikte 18. Yüzyıldan itibaren şeker pancarı ve şeker kamışından sükroz (sofra şekeri) elde edilmesi, sükrozu en çok kullanılan tatlandırıcı haline getirmiştir (Saraiva vd, 2020).

Son birkaç yüzyıl içerisinde gıdalardaki şeker içeriğinin artması, şekerin daha çok sıvı halde tüketilmeye başlanması gibi değişiklikler nedeniyle insanların şekere maruz kalması önemli ölçüde değişmiştir (Bray vd., 2004). Değişen maruziyetle birlikte artan obezite oranlarını ve sağlık problemlerini tersine çevirebilmek için hem enerji alımını azaltmaya hem de enerji harcamasını arttırmaya odaklanan stratejiler ortaya çıkmaktadır. İlave olarak, kilonun sağlık sonuçlarıyla ilgisi bireyleri kilo alımını önlemek veya kilo vermek için sağlıklı davranışlar benimsemeye yöneltmektedir (Bish vd., 2007). Kilo vermeye çalışanlar arasında kalori azaltmak yaygın ve etkili bir davranış olarak görüldüğünden günümüzde düşük enerji yoğunluğuna sahip veya şekersiz yiyecekler popüler hale gelmektedir (Kruger vd.,2004; Wharton vd., 2020; de la Hunty vd., 2006). Bu durum gıda endüstrisinin arz taleplerini karşılamak amacıyla ve tatlı tadı korurken diyetin enerji değerini düşürmenin potansiyel bir yöntemi olarak gıda formülasyonlarında alternatif tatlandırıcılara yöneltmektedir (Castro-Muñoz vd., 2022; Wilk vd, 2022). İnsan diyetlerinin önemli bir parçası olan tatlandırıcılar, doğal olarak bulunabilir veya gıdaya sonradan eklenebilir. Kaynaklarına göre doğal veya sentetik (yapay), besin değeri bakımından kalorili veya kalorisiz şekilde sınıflandırılabilir.

Aspartam, yıllık 3000-5000 ton üretimiyle en yaygın kullanılan yapay tatlandırıcıdır (Landrigan & Straif, 2021). Bu kadar popüler kullanımı sükrozdan 200 kat daha tatlı olması ve düşük kalori içeriği sayesinde. Sakızlar, tatlılar, yoğurtlar, vitaminler, ilaçlar ve diyet içecekleri dahil olmak üzere 6000'den fazla gıdada bir bileşen olarak kullanılan aspartamın önerilen günlük alım miktarı ise günde 40-50 mg/kg'dır. (Choudhary vd., 2018; Renwick vd., 2007). Aspartam, bağırsak lümeninde üç ana

metaboliti olan fenilalanin (%50), aspartik asit (%40) ve metanole (%10) tamamen hidrolize edilir (Humphries vd., 2008). Sonrasında metanol metabolize olarak formaldehite indirgenirken aspartik asit ve fenilalanin amino asit havuzuna katılır (Choudhary ve diğeri, 2018). Aspartik asit ve fenilalanin nörotoksik, formaldehit ise sitotoksik olarak değerlendirilmektedir (Humphries vd., 2008). Aspartam tüketiminin kanser riskini arttırdığı, beyni olumsuz etkilediği ve oksidatif stresi arttırdığı yönünde çalışmalar vardır (Griebsch vd., 2023).

Hızla çoğalan kanser hücresi metabolik taleplerini glikoliz, pentoz-fosfat yolu (PPP) ve trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ile karşılar. Tümör hücre proliferasyonu için gerekli birincil metabolik yol olan glikoliz, aerobik glikoliz veya Warburg etkisi olarak anılır ve tümörün oksijen mevcudiyetinden bağımsız olarak glukoz kullanıp laktat üretmesiyle karakterizedir (Vasan vd., 2020). Ancak tümör hücrelerinin büyümesi için solunum ve diğeri mitokondriyal aktiviteler gereklidir (DeBerardinis & Chandel, 2016). Tümör hücrelerinin TCA döngüsüne katılmak için yüksek glutamin arzına ve kullanımına sahip olduğu bilinmektedir (Altman vd., 2016). Ayrıca hücre solunumunun çoğalan hücrelerde önemli bir işlevinin aspartat sentezi olduğu savunulmuştur (Sullivan vd., 2015). Aspartat protein ve amino asit sentezini destekleyerek tümör hücrelerinin çok sayıdaki ihtiyacını karşılar, hücrenin proliferasyonu ve canlılığını sürdürmesinde önemli rol oynar. Tümörlerin metabolik yollarının daha iyi anlaşılması, anti-kanser tedavilerinin daha etkili olabilmesi için önemlidir (Helenius vd.,2021).

Kanser hem yetişkinlerde hem de çocuklarda önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ancak pediatrik kanserler daha nadir görülmektedir (Kattner vd., 2019). Çocukluk çağı kanserleri temelde gelişimsel proteinlerin ekspresyonu ve regülasyonundan kaynaklanan düzensiz gelişim hastalıklarıdır (Scotting vd., 2005). Bunlar arasında nöroblastoma, nöral krest hücrelerinden köken alan sempatik sinir sistemi kanseridir ve pediatrik kanser ölümlerinin yaklaşık %10-15'inden sorumludur (Anderson vd., 2022).

Tümör mikroçevresindeki besin mevcudiyetinin etkilerinin anlaşılması ve büyümeyi teşvik eden sinyal ağlarının aydınlatılması kanser terapisinde önemli yer almaktadır (Muir & Vander Heiden, 2018). Kalori kısıtlamasının ve düşük glukoz seviyelerinin kanserin büyümesini ve ilerlemesini engelleyebileceğine dair artan kanıt vardır (İbrahim vd., 2021). Bununla birlikte günümüzde şeker yerine sıklıkla alternatif olarak

kullanılan aspartamın tümör hücresinde eşit kalori değeri içeren kültür koşullarında glukoz benzeri metabolizmaya ve etkiye sahip olup olmadığını değerlendiren bir çalışma bulunmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, glukoz ve aspartam metabolizmasının nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve etki mekanizmaları karşılaştırmalı olarak analiz etmek ve böylece besin maddelerinin fizyolojik seviyelerinin tümör hücresi metabolik süreçlerini nasıl etkilediği hakkındaki bilgilerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktır.



İKİNCİ BÖLÜM

TATLANDIRICILAR VE KANSER

Bu kısımda tatlandırıcılar sınıflandırılarak tanımlanmış ve çeşitleri belirtilmiştir. Bunlar arasından aspartam ve glukoza odaklanılarak hastalıklarla ilişkisi yapılan çalışmalarla açıklanmış ve kanserin önemine dikkat çekilmiştir. Kanserde değişen hücre metabolizması ve ilerlemesinde glukozun önemi açıklanmaya çalışılmıştır. Ayrıca çalışmamızda kullanılan hücre hattı nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri olduğundan dolayı çocukluk çağı kanserlerinden biri olan nöroblastomanın patogenezi ve tedavi yöntemleri belirtilmiştir.

2.1. Doğal Tatlandırıcılar

2.1.1. Doğal Tatlandırıcıların Tanımı ve Çeşitleri

Bitkilerin çiçek, yaprak, kabuk ve köklerinden elde edilen tatlandırıcılardır. Doğal kaynaklardan şeker ikamelerin aranması yoğun tatlı bir tada sahip maddelerin keşfedilmesine yol açmıştır. Bunun sayesinde yüksek miktarda şeker, polioller veya diğer tatlı bileşenler içeren yaklaşık 150 bitki materyali bulunmuştur (Priya vd, 2011).

Doğal tatlandırıcılar, karbonhidratlar, şeker alkolleri (polioller), amino asitler, proteinler, terpenoid glikozitler ve bazı polifenoller gibi geniş kapsamlı bileşikler kapsar (Saraiva, vd., 2020). Tablo 2.1’de doğal tatlandırıcıların genel özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Doğal Tatlandırıcıların Genel Özellikleri

Tatlandırıcı	Kimyasal Formülü	EFSA Kodu	Tatlandırma Gücü	Kalori Değeri (kcal/g)	Glisemik İndeksi
ŞEKERLER					
Glukoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	-	0.75	4	100
Fruktoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	-	1.7		23
Sükroz	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	1.0		65
Maltoz	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	0.3		105
Laktöz	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	0.15		45
ŞEKER ALKOLLERİ					
Eritritol	C ₄ H ₁₀ O ₄	E968	0.6-0.8	2,4	0

Sorbitol	C6 H14O6	E420	0.5-0.7		9
Mannitol	C6 H14O6	E421	0.5-0.7		0
Ksilitol	C5 H12O5	E967	1.0		13
İzomalt	C12H24O11	E953	0.45-0.65		9
Maltitol	C12H24O11	E965	0.9		35
Laktitol	C12H24O11	E966	0.3-0.4		6
DİĞER DOĞAL TATLANDIRICILAR					
Stevia Glikozitleri	C38H60O18	E960	200	0	0
Taumatın	Polipeptit (207amino asit)	E957	2000	4	0

Kaynak: Grembecka, 2015

Karbonhidratlar enerji sağladıklarından dolayı besleyici ve en yaygın doğal tatlandırıcılardır. Karbonhidratları basit (monosakkaritler; glukoz, galaktoz, fruktoz – disakkaritler; sükroz, laktoz, maltoz) ve kompleks karbonhidratlar (nişasta, glikojen) olarak sınıflamak mümkündür. Gıdalarda doğal halde buldukları gibi gıdaların işlenmesi ve hazırlanması sırasında ilave şeker olarak da eklenebilirler. Hem mono- hem de disakkaritler (sükroz, fruktoz, glukoz, nişasta hidrolizatları, glukoz şurubu ve yüksek fruktoz şurubu) ilave şeker olarak kullanılabilirler (Grembecka vd., 2015). Glukoz ve Fruktoz, gıda endüstrisi tarafından doğal tatlandırıcılar olarak yaygın şekilde benimsenen iki monosakkarittir. Özellikle yüksek fruktozlu şuruplar yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Chéron vd., 2019). Tüm şekerler aynı bağırsak bölgelerinden emilirler ve yaklaşık olarak 4 kcal/g enerji verirler.

Doğada ender bulunan monosakkaritler ve bunların türevleri olarak adlandırılan nadir şekerler, son zamanlarda alternatif tatlandırıcı kategorisinde değerlendirilmektedir (Li ve diğerleri, 2013). Bunlar arasında D -alüloz (D -psikoz), D -tagatoz , D -sorboz ve D -alloz şeker ikamesi olarak kullanılmaktadır (Li ve diğerleri, 2013). D- allüloz sakkaroza kıyasla %70, D-tagatoz %92, D-sorboz %70 ve D- alloz %80 tatlılığa sahiptir. Bu tatlandırıcılar vücutta metabolize edilmediklerinden veya çok az metabolize olduklarından dolayı önemli kalorileri yoktur (Mooradian vd., 2017)

Şeker alkollerini (polioller), hidrojene karbonhidratlardır (Livesey, 2003). Meyve, sebze, mantar ve yulafta doğal olarak düşük miktarlarda bulunurlar. Şekerlerin aksine gıda katkı maddeleri olarak kabul edilmektedir. Gıdalarda en yaygın kullanılan polioller sorbitol, ksilitol, maltitol, mannitol, eritritol, izomalt ve laktitol'dür

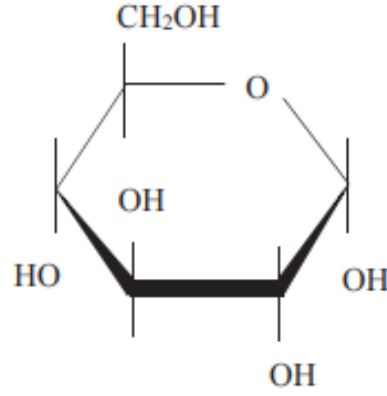
(Grembecka, 2015). Katı kristal formda ya da şuruplar halinde temin edilebilirler. Sükroza karşı daha az enerji sağlamalarını yanı sıra, düşük glisemik indekslere sahiptir. Avrupa Komisyonu 2,4 kcal/g'lik bir kalori değeri önerirken, Amerikan Deneysel Biyoloji Dernekleri Federasyonu ise 1,6 ila 3,0 kcal/g arasında değişen kalorifik değerler bildirmiştir (Ghosh & Sudha, 2012).

Stevia Rebaudiana bitkisi yapraklarından elde edilen 30'dan fazla steviol glikozit vardır. Bunlar arasında Steviosid ve Rebaudioside A en yaygın bilinen glikozitlerdir (Gasmalla ve diğerleri, 2014). Yüksek sıcaklıklarda kararlı olduklarından dolayı (200 °C'ye kadar) fırıncılık ürünlerinde, çaylarda, ilaçlarda, yiyecek ve içeceklerde yoğun tatlandırıcı olarak kullanılırlar. Günde 4 mg/kg tüketimi insan sağlığı için güvenli bulunmuştur (Grembecka, 2015).

Miraculin, monellin, taumatin, mabinlinler, pentadin, curculin ve brazzein gibi tatlı proteinler doğal şeker ikameleri olarak ilgi çekmektedir. Bunlar arasında en iyi karakterize edilen ise taumatindir. Taumatin, *Thaumatococcus daniellii* meyvesinden ekstrakte edilen beş proteinin (taumatin I, I, III, a, b) karışımıdır (Fry, 2012). Bu tatlandırıcının metabolizması, diğer diyet proteinlerine eşdeğer olarak, 4 kcal/g enerji sağlar. Ancak yoğun tatlılığa sahiptirler ve gıdalarda çok az miktarlarda kullanıldıkları için enerji değerleri ihmal edilebilir düzeydedir (Świader vd., 2019).

2.1.1.1. Glukoz

Glukoz bir aldo-heksozdur. Son karbon atomu üzerinde bir aldehit grubu bulunurken monosakkarit içindeki diğer karbon atomları hidroksil grubu içerir (Qi ve Tester, 2019). Nişasta, maltodekstrinler ve mısır şurubunun bileşenleri arasında olan glukoz doğal bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Tatlandırma gücü sükrozun %70'i kadar ve kalori değeri ise 3,8 kcal/g'dır (İşgören ve Sungur, 2019). Şekil 2.1'de glukozun kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Glukozun Kimyasal Yapısı

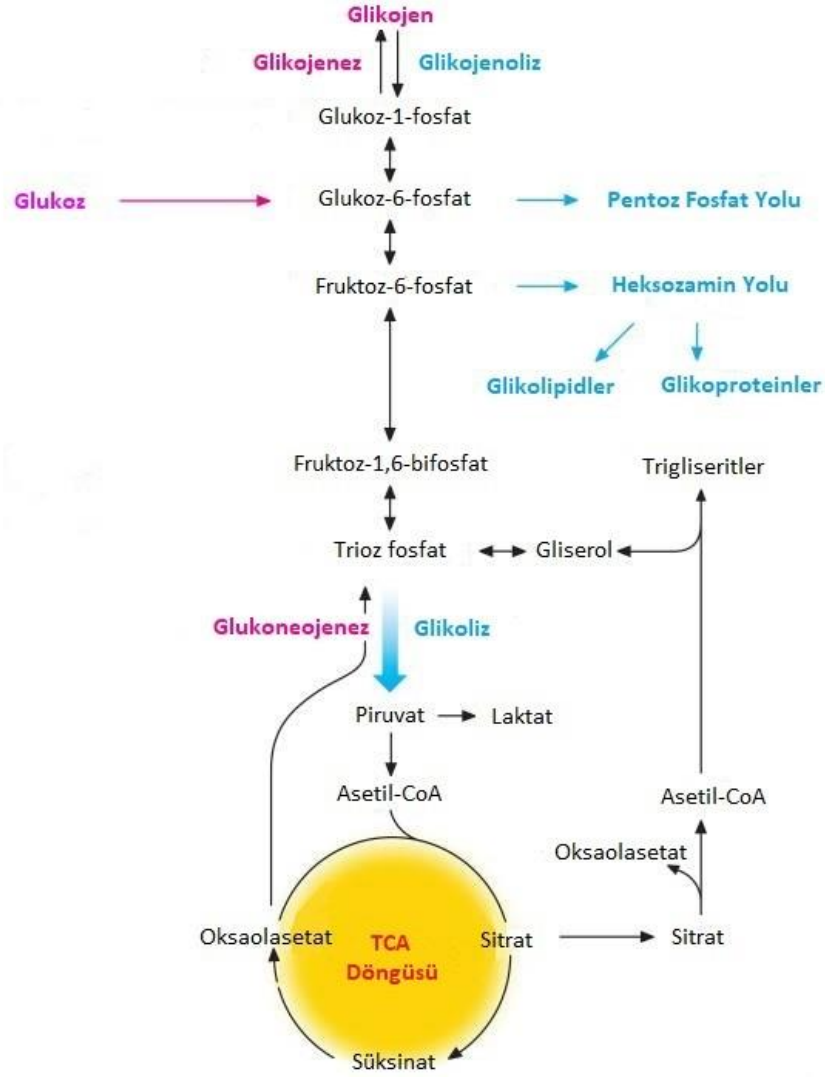
Kaynak: Qi ve Tester, 2019

2.1.1.2. Glukoz Metabolizması

Glukoz en önemli enerji kaynağı olarak kabul edilir. İnsan metabolizmasındaki glukozun çoğu, glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon aracılığıyla enerji sağlar (Chandel, 2021). Glikoliz bulunan ilk metabolik yoldur ve glukozun iki adet piruvat molekülüne indirgenmesini ifade eder. Sonrasında piruvat oksijen mevcudiyetine göre Asetil-CoA'ya oksitlenir veya laktata dönüşür (Chandel, 2021).

Glikolize alternatif olan pentoz fosfat yoluyla nükleotit, yağ asitleri ve amino asit biyosentezi için öncüler sağlanır (Stincone vd., 2015). Ayrıca heksozamin yolu ile hücre zarlarının bileşeni olan glikolipid ve glikoprotein üretilir.

Kandaki glukoz seviyesi en önemli homeostatik parametrelerden biri olarak glukoneojenez ve glikojenolizle korunur. İnsan metabolizması glukoz bolluğunda bunu glikojen olarak biriktirebilirken (glikojenez), açlık veya aşırı metabolik ihtiyaç durumlarında depolanmış glikojeni glukozla çevirebilir (glikojenoliz) veya glukoz sentezi (glukoneojenez) yapabilir (Cherkas vd, 2020; Chandel, 2021).



Şekil 2.2: Glukoz Metabolizmasına Genel Bakış

Kaynak: Chandel, 2021

Ayrıca insülin, glukagon, leptin, adiponektin başta olmak üzere hormonların karmaşık bir etkileşimi, organizmada gerekli glukoz seviyelerini ve enerjiyi sağlamak amacıyla metabolik ayarlarda rol oynar (Perry vd., 2018). Endokrin sistemin glukoz gibi besin maddelerini eşik değerler içinde tutamamasıyla birlikte bağışıklık sisteminin işlevselliği bozulur (Wensveen vd., 2021). Birçok hastalıkta glukoz metabolizmasında ciddi değişiklikler meydana gelir. Hareketsiz yaşam tarzına ek olarak besinlerin karbonhidrat içeriğinden kaynaklanan aşırı glukoz yükü, obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, ateroskleroz, hipertansiyon ve kanser gibi bulaşıcı olmayan hastalıkların artışına neden olmuştur (Williams vd., 2016)

2.2. Yapay Tatlandırıcılar

2.2.1. Yapay Tatlandırıcıların Tanımı, Çeşitleri ve Kullanımları

Şeker ikameleri veya şekerless tatlandırıcı olarak da bilinen yapay tatlandırıcılar, gıdadaki şekerin tat üzerindeki etkisini taklit eden katkı maddeleridir (Castro-Muñoz vd., 2022). Ayrıca, besleyici olmayan tatlandırıcı, kalorisiz/düşük kalorili tatlandırıcı veya yoğun tatlandırıcı olarak da anılmaktadırlar (Sharma vd., 2016). Çok az veya sıfır kalori sağlarken tatlı tat arzusunu tatmin etmenin bir yolu olarak, giderek daha fazla tüketilmektedirler (Yunker vd., 2021).

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (US-FDA) tarafından, insanlarda kullanıma uygun altı adet yapay tatlandırıcı (sakarın, aspartam, sukraloz, neotam, asesülfam-K ve stevia) onaylanmış ve bunlar genellikle güvenli olarak (GRAS) kabul edilmişlerdir. Yaygın olarak kullanılan diğer iki ajan, Güney Amerika, Çin ve Avustralya'da kullanım için onaylanmış alitame ve ABD hariç 50 ülkede kullanılan siklamattır. Tümü farklı kimyasal sınıflardan maddeler içerir ve sakarozdan 300–13000 kat daha tatlıdır (Lange vd., 2012). Bu sayede tatlılar, konserveler, süt ürünleri ve içecekler gibi çok çeşitli işlenmiş gıdalarda kalorili tatlandırıcılardan çok daha düşük konsantrasyonlarda kullanılarak 'şekerless' veya 'diyet' olarak pazarlanmaktadır. Tablo 2.2'de onaylanmış yapay tatlandırıcılar ve kullanım alanları belirtilmiştir.

Tablo 2.2: Onaylanmış Yapay Tatlandırıcılar

Genel Kimyasal Adı	Ticari Unvan	Bilinen Metabolitler	Moleküler Ağırlığı (g/mol)	Tatlılık	ADI (mg/kg)	Yaygın Kullanım Alanları
Asesülfam K	Sunett, Sweet One	Yok (metabolize değil)	163.15	200 kez	9	Dondurulmuş tatlılar, şekerler, içecekler, unlu mamuller
Aspartam	Equal, NutraSweet	Metanol, aspartik asit, fenilalanin	294.31	200 kez	40-50	Masa üstü tatlandırıcı, sakız, kahvaltılık tahıllar
Advantam	-	-	476.52	20000 kez	32.8	Genel amaçlı tatlandırıcı, lezzet artırıcı, unlu mamuller
Neotam	Newtame	Metanol	387.47	7000–13 000 kez	0.3	Pişmiş ürünler

Sakarın	Sweet'N Low, Sweet Twin, Necta Sweet	o-sülfamoil benzoik asit	183.19	200–700 kez	15	İçecekler, meyve suyu içecekleri, yemek pişirme, masa üstü kullanım
Sükraloz	Splenda	Yok (metabolize değil)	397.63	≈600 kez	15	Unlu mamuller, içecekler, sakız, jelatinler, dondurulmuş sütlü tatlılar

Kaynak: Lange vd., 2012; Ahmad vd., 2020

2.2.2. Aspartam

Aspartam, tat arttırıcı ve genel amaçlı tatlandırıcı olarak FDA tarafından onaylanmış E951 numaralı gıda katkı maddesidir. James M. Schlatter tarafından antiülser ilaç araştırması yaparken parmağını yalamasıyla tesadüfen keşfedilmiştir (Czarnecka, 2021). Sükrozdan yaklaşık 200 kat daha tatlıdır. Beyaz, kristal toz halindedir ve kokusuzdur. Genel özellikleri Tablo 2.3'te belirtilmiştir.

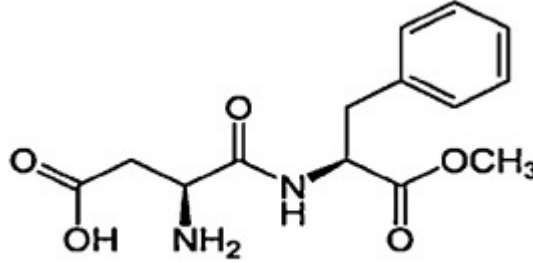
Tablo 2.3: Aspartamın Genel Tanımı ve Özellikleri

Dış Görünüş	Beyaz, kristal toz
CAS Numarası	22839-47-0
Kimyasal Formül	$C_{14}H_{18}N_2O_5$
EINECS Numarası	245-261-3
Gıdada İşlevi	Tatlandırıcı; şeker ikamesi
INS Numarası	951
Moleküler Ağırlık	294.31
NAS Numarası	1013
Kokusu	Kokusuz
Kısıtlamalar	Fenilketonüri hastaları için fenilalanin içerdiğine dair etiket kısıtlamaları vardır.
Eş Anlamlıları	3-Amino- <i>N</i> - (a-karboksifenetil) süksinamik asit <i>N</i> -metil ester, stereoizomer; APM; Aspartilfenilalanin metil ester; <i>N</i> - <i>L</i> -a-Aspartil- <i>L</i> - fenilalanin 1-metil ester; Nutrasweet®; Equal®; Canderel®; Sanecta™; Tri-Sweet™; E951; Dipeptit tatlandırıcı; Metil aspartilfenilalanat; 1-Metil <i>N</i> - <i>L</i> -a-aspartil- <i>L</i> -fenilalanin; <i>L</i> -Fenilalanin, <i>N</i> - <i>L</i> -a-aspartil-, 1-metil ester (9CI); Süksinamik asit, 3-amino- <i>N</i> - (a-karboksifeniletıl)-, <i>N</i> -metil ester, stereoizomer; tatlı dipeptit; aspartam; Аспартам

Kaynak: Burdock vd, 1996

2.2.2.1. Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması

Aspartamın kimyasal adı N-L-a-Aspartyl-L-phenylalanine 1-methyl esterdir. Ampirik formülü $C_{14}H_{18}N_2O_5$ ve molekül ağırlığı 294,31 g/mol'dür (Rowe vd., 2013). Kimyasal yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Aspartam Kimyasal Yapısı

Kaynak: Chattopadhyay vd., 2014

Diğer yapay tatlandırıcıların aksine aspartam gastrointestinal sistemin başlangıcında hızla emilir (Wilk vd., 2020) ve vücutta metabolize olur. Bu sayede 1 gramı yaklaşık 4 kcal enerji sağlar. Aspartam, ince bağırsakta amino asitlere (fenilalanin, aspartik asit) ve metanole hidrolize edilir (Burgert vd., 1991). Metanol daha sonra karaciğerde metabolize olarak formaldehit ve formik asite indirgenir. Aspartik asit, alanin ve oksaloasetata; fenilalanin ise esas olarak tirozine, daha az miktarda feniletilamin ve fenilpiruvata metabolize edilir (Choudhary vd., 2018). Periferik dokudan alınan bileşenler protein sentezi ve metabolizması için kullanılır ve kolona ulaşmadan vücuttan atılır (Magnuson vd., 2016).

2.2.2.2. Aspartamın Mevcut Kullanımları

Aspartam ilk olarak 1981'de kuru gıdalarda, ardından 1983'te gazlı içeceklerde kullanımı için FDA tarafından onaylanmıştır (Garriga& Metcalfe, 1988). Şu anda Dünya çapında 90'dan fazla ülkede ve 6000'den fazla üründe tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Magnuson vd., 2006). Gıdalarda yaygın kullanımına ek olarak bazı ilaçlarda tatlandırıcı olarak da bulunan aspartam, Equal® markası altında masa üstü tatlandırıcı olarak ve NutraSweet®, Canderel®, Sanecta™, Tri-Sweet™ gibi gıda ürünlerinde bileşen olarak satılmaktadır (Shankar vd., 2013).

Aspartam metabolizması sonrası fenilalanin metaboliti olduğundan dolayı, kalıtsal bir hastalık olan fenilketonüriden (PKU) muzdarip kişilerin aspartam tüketmemesi gerekir (Chattopatyay vd., 2014). Bununla birlikte fenilketonurili bebeği emziren annelerin aspartamla tatlandırılmış yiyecek ve içeceklerden aldığı tipik miktarların bebekler için herhangi bir ek risk oluşturmadığı, ancak kusma riskini arttırabileceği bildirilmiştir (Aspartame, 2021; Huang vd., 2021). FDA tarafından aspartam kullanımı onaylanan gıda grupları ve kullanım limitleri Tablo 2.4'te belirtilmiştir.

Tablo 2.4: Aspartam Takviyesi İçin Onaylanmış Gıda Grupları ve Kullanım Sınırları

Gıda kategorisi	Kullanım limiti
Tüm yemeye hazır ve fırınlanmaya hazır ürünler, unlar ve servis yapmadan önce hazırlanması gereken karışımlar dahil unlu mamuller ve fırıncılık karışımları	Aspartam unlu mamullerde ve unlu mamul karışımlarında kullanıldığında, katkı maddesinin miktarı, pişirmeye hazır ürünlerin veya pişirme öncesi bitmiş formülasyonların ağırlıkça %0,5'ini geçmeyecektir. Genel olarak güvenli (GRAS) olarak kabul edilen bileşenler veya unlu mamullerde kullanımı onaylanan gıda katkı maddeleri, nihai unlu mamulde bir tatlandırıcı olarak işlevselliğini sağlamak için aspartam ile kombinasyon halinde kullanılmalıdır.
Kahvaltılık gevrekler, yemeye hazır gıdalar ve tahıllar	NR
Sert ve yumuşak şeker, sakız	NR
Çiğnenebilir multivitamin gıda takviyeleri	NR
Şunlar için kuru bazlar: içecekler, hazır kahve ve çay içecekleri; jelatinler, pudingler ve dolgular; süt ürünü analog soslar	NR
Dondurulmuş süt ürünleri, tatlılar, ve şekerlemeler, süt ürünü olmayan şekerlemeler, soslar ve dolgular	NR
Dondurulmuş, çözülmeye ve yemeye hazır cheesecake'ler, meyve ve meyve sosları	NR
Etanol içeriği hacim başına %7'nin altında olan meyve (üzüm dahil) şarap içecekleri	NR
Meyve suyu bazlı içecekler (gıda standartlarının bu tür kullanımı engellemediği durumlarda); meyve aromalı içecekler; taklit meyve aromalı içecekler, meyve sosları	NR
Hacimce %7'den az etanol içeren ve meyve suyu içeren malt içecekleri	NR
Besleyici olmayan tatlandırıcılar	Sofra kullanımı için şeker yerine kullanıldığında, etikette pişirme veya fırınlamada kullanılmaması talimatı bulunmalıdır. Kuru, serbest akışlı katkı maddesi paketleri, çay kaşığı şekerdeki tatlandırma eşdeğerliğini belirgin bir şekilde göstermelidir. Kahve ve çay dahil olmak üzere sıcak içecekleri tatlandırmak için şeker yerine geçen tabletler olarak kullanıldığında, L-lösin bu tür tabletlerin imalatında tablet ağırlığının %3,5'ini aşmayacak bir seviyede kullanılabilir.

Servise hazır alkolsüz aromalı içecekler, çay içecekleri, meyve suyu bazlı içecekler ve bunların konsantreleri veya şurupları	NR
Soğutulmuş aromalı sütü içecekler	NR
Soğutulmuş, servise hazır jelatinler, pudingler ve dolgular	NR
Pastörizasyon ve kültür işleminden sonra aspartamın eklendiği yoğurt tipi ürünler	NR
Hacimce %3'ten az alkol içeren sakız, sert şeker ve malt içeceklerde aroma arttırıcı	NR

(NR = bildirilmedi.)

Kaynak: Magnuson vd., 2006

2.3. Glukoz ve Aspartam Metabolizması ile İlişkili Hastalıklar

Yapay tatlandırıcılar, doğal şekerlerle aynı tadı koruyabilse bile metabolik yolları birbirinden farklıdır. Bu nedenle insülin salgılama kapasitesi, bağırsak glukoz emilimi, bağırsak mikrobiyotası ve insülin direnci gibi fizyolojik süreçlerle glukoz homeostazını farklı şekilde etkileyebilir (Pang vd., 2021). Ayrıca yapay tatlandırıcıların birbirinden farklı kimyasal yapısı; iştahı, beyin ödül aktivasyonunu, bağırsak mikrobiyota popülasyonlarını, metabolizmayı ve vücut ağırlığını farklı şekilde etkileyebilecek duyuşsal, fizyolojik ve davranışsal tepkileri ortaya çıkarabilir (Moriconi vd., 2020). Bu başlık altında glukoz ve aspartam tüketimi veya metabolizması ile ilişkili olabilecek hastalıklar değerlendirilmiştir.

2.3.1. Diyabet

Christofides (2021) tarafından yapay tatlandırıcı kullanımının diyabet, hipertansiyon, dislipidemi gibi adipozite ile ilişkili hastalıklarla mücadelede sonuçları kötüleştirdiği bildirilmiştir. Bu durum aspartamın bağırsak mikrobiyotasını değiştirmesinden kaynaklanabileceğine dair çalışmalar vardır (Suez vd., 2014; Palmnas vd., 2014). Palmnas ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada Spragua- Dawley fareleri standart veya yüksek yağlı diyetlerine ek olarak su veya aspartam ilaveli su (5-7 mg/kg/gün) tüketmişlerdir. Çalışma sonucunda yüksek yağlı diyet ve aspartam alan hayvanlar normal su tüketimine kıyasla daha az kalori tüketmiş ve daha az kilo almışlardır. Buna rağmen aspartamın açlık glukoz seviyelerini yükselttiği ve her iki diyetle de insülinle atılan glukoz atılımını bozduğunu göstermiştir. Serum metabolomik analizi, bu durumun bakteriyel kısa zincirli yağ asidi olan propiyonat ve

insülin toleransı üzerindeki olumsuz etkiyi açıklayan glukoneojenik substratının artışından kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır. Suez ve arkadaşları ise (2014) zayıf ve obez farelere ayrı ayrı aspartam, sukraloz, sakarin, sükroz ve glukoz verdiği üç yapay tatlandırıcının da glukoz ve sükroza göre bağırsak mikrobiyotasından kaynaklanan glukoz intolerans belirteçlerini arttırdığını bulmuştur. Hayvan çalışmalarının aksine, sağlıklı bireylerin 14 gün boyunca 136 mg/gün sukraloz veya 425 mg/gün aspartam ile tatlandırılmış içecek tüketiminin bağırsak mikrobiyotasını ölçülebilir düzeyde etkilemediği bulunmuştur (Ahmad vd., 2020). İlave olarak, 2 hafta boyunca günde 0.6 L aspartam ve asesülfam K ile tatlandırılmış içecek veya 0.6 L maden suyu tüketen sağlıklı bireylerin açlık glukoz ve insülin konsantrasyonlarını değiştirmemiştir (Kim vd., 2021). Kan şekeri regülasyonu için diyet ve egzersiz tavsiyeleri birlikte tavsiye edilirken çoğu sporcu içeceğinin aspartam içerdiği göz önüne alınmalıdır.

Bu konuda Siegler ve arkadaşları (2012) dinlenme esnasında karbonhidratlı aspartam alımının (%2 maltodekstrin, %5 sükroz ve %0.04 aspartam) sadece karbonhidrat (%2 maltodekstrin ve %5 sukroz) alımına göre insülin seviyelerini düşürdüğünü gözlemlemiştir.

2.3.2. Obezite

Sükroz yerine aspartam kullanımı teorik olarak enerji alımını azaltırken yiyecek ve içeceklerin tüketicilerin damak zevkine hitap etmeye devam etmesine de yardımcı olacaktır (Bellisle vd., 2007). Ancak Christofides (2021) tarafından yapılan çalışmada obezite veya pre-diyabet riskleri olan hastaların yapay tatlandırıcı kullanmalarının fayda sağlamadığı veya minimum fayda sağladığı yönünde bir sonuç bulunmuştur. Buna ek olarak tokluğun nörohormonal kontrolüne hasar verdiği kanıtlanmıştır. Son araştırmalar aspartam gibi yapay tatlandırıcıların obezite gibi metabolik hastalıkların gelişmesine veya kötüleşmesine yol açabileceğini öne sürmektedir (Walbolt & Koh, 2020). Ancak aspartam tüketimi ve BMI arasında pozitif doz- yanıt ilişkisi gözlenen çalışmalarda bu durumun bireylerin tokluk hissi veren şeker tüketimi eksikliğinde protein ve yağ alımının artmasından, kalori tasarrufu sağladığı düşüncesiyle abartılı porsiyon tüketiminden veya tatlandırıcılardaki tatlı tadın iştahı arttırabileceğinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı sorgulanmalıdır (Benton, 2005). Sükrozla tatlandırılmış

alkolsüz içecekler (normal kola), izokalorik yarım yağlı süt, kalorisiz meşrubat (diyet kola) veya su içeceklerinden herhangi birini tüketen bireyler arasında normal kola tüketenlerin ektopik yağ birikimi ve kan lipidleri artmış ancak bireylerin toplam yağ kütlelerinde veya ağırlık artışlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca bu bireylerin diyet anketleri sonucunda toplam enerji alımlarının benzer olduğu, normal kola veya süt tüketiminden sonra diğer kaynaklardan enerji alımının azaltıldığı gösterilmiştir. Bu durum besinini kalori içeriğinden çok besin bileşiminin önemli olabileceğini düşündürmüştür. (Maersk vd., 2012) Yapay tatlandırıcı ve vücut ağırlığı ilişkisinde randomize kontrol çalışmalarına atıfta bulunan incelemelerin olumlu; gözlemsel çalışmalara atıfta bulunan incelemelerin ise olumsuz bir ilişki sonucuna vardığı bulunmuştur (Normand vd, 2021).

2.3.3. Nörodejeneratif Hastalıklar

Fenilalanin kan beyin bariyerini geçerek önemli nörotransmitter maddelerin üretimini bozabilir. Aspartik asit merkezi sinir sistemini uyarıcı bir nörotransmitter olarak rol oynamaktadır. Metanol ise yüksek derecede toksik türevlere yol açabilen formata dönüşür. Bu sebeple aspartam metabolitlerinin nörotransmitterler, nöronlar ve astrositler üzerinde olumsuz etkileri olabilir (Humphries vd., 2007).

Serotonin ve dopamin seviyeleri aspartam kullanımıyla azalabilir. Serotonin, dopamin, norepinefrin gibi biyolojik aminlerin etkileşimiyle artan kortizol ve bağırsak disbiyozu dikkat, hafıza ve algı sistemlerinde bozulmaya ek olarak depresyona yol açabilir (Choudhary vd., 2018). Sünram-Lea ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada, katılımcılara 25 mg glukoz içeren veya aspartam ile eşit derecede tatlandırılmış içecek verilerek hafıza ve öğrenme üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucuna göre glukozlu içecek tüketen katılımcıların daha iyi hafıza, kelime hatırlama ve tepki süresine sahip olduğu bulunmuştur. Buna kıyasla Gendle ve arkadaşları (2009) katılımcıların 250 ml Redbull veya 250 ml şekerli Redbull (aspartam içeren) tüketiminin ardından bireylerin dikkat ve tepki süreleri üzerinde fark bulamamıştır. Ek olarak 8 gün yüksek aspartam (25 mg/kg/gün), 8 gün düşük aspartam (10 mg/kg/gün) diyeti tüketen sağlıklı bireyler arasında bellek farklılığı bulunmamasına rağmen; bireylerin aspartam tüketirken daha sinirli ve depresif ruh halinde oldukları gözlenmiştir. Ancak aspartamın günlük alımı 40-50

mg/kg/gün olduğu göz önüne alındığında 25 mg/kg günlük alımın çok altındadır. Nörodavranışsal sağlığı etkileyebilecek aspartam içeren gıdalar tüketilirken dikkatli değerlendirme yapılmalıdır (Lindseth vd., 2014).

2.3.4. Kanser

Aspartamın kanserojen etkisi, aspartam metabolizması sonucu üretilen metanolün formaldehite indirgenmesine atfedilmektedir (Magnuson vd., 2007). Yapılan çalışmalarda Sprague-Dawley fare yemlerine eklenen aspartamın maling tümör insidansında artışa sebep olduğu bulunurken aynı zamanda gebelik döneminde maruziyetle birlikte rahimde karsinogenezi başlatabileceği de gözlenmiştir (Soffritte vd., 2006;2007; Bepoggi vd, 2006). 2009-2021 yılları arasında Fransız nüfusa dayalı yapılan Nutrinet-Santé kohort çalışması sonuçları daha yüksek yapay tatlandırıcı alımını genel kanser riskiyle pozitif ilişkili bulmuş, aspartamı spesifik olarak meme ve obezite ile ilişkili kanser riskiyle ilişkilendirmiştir (Debras vd., 2022). Bununla birlikte yapılan NutriNet-Santé kohort çalışmasının popülasyonu ile yapılan başka bir çalışmada şekerli içecek tüketimi ve %100 meyve suyu tüketimi genel kanser riskinde artışla ilişkili bulunurken yapay olarak tatlandırılmış içecekler kanser riskiyle ilişkili bulunmamıştır (Chazelas vd., 2019). Benzer şekilde, aspartam tüketiminin beyin tümörüyle ilişkili olduğu desteklenmemiştir (Gurney ve diğerleri, 1997). Moleküler düzeyde incelendiğinde ise aspartamın PANC-1 pankreas adenokarsinom hücrelerinde p21, NICD ve GLI1 yoluyla kanser kök hücre zenginleşmesini indüklediği bulunmuştur (Gezginci-Oktayoglu vd., 2021).

Günümüz yiyecek ve içeceklerinde yapay tatlandırıcılar bir arada kullanıldığından dolayı yalnızca aspartamın kanserojen riskini değerlendirmenin zor olabileceği unutulmamalıdır (Weihrauch & Diehl, 2004). Ayrıca metanolün doğal olarak meyvelerde, sebzelerde ve fermente gıdalarda bulunmasından dolayı meyve suyu veya turunçgil tüketimiyle maruz kaldığımız metanol miktarının aspartamla tatlandırılmış içeceklerden daha fazla olabileceği de tartışma konusudur (Magnuson vd., 2007).

2.4. Kanser

2.4.1. Kanserin Tanımı

Kanser şaşırtıcı ve korkucutu bir hastalık veya hastalıklar dizisidir. Önemli çabalara rağmen tüm dünyada ölüm nedenleri arasında başlarda yer almaktadır (Bray ve diğerleri, 2021). Bu sebeple önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya çapında hızla artan kanser insidansı ve mortalite yükü hem nüfusun yaşlanması ve artışı hem de sosyoekonomik gelişme ile ilişkili olan ana risk faktörlerinin prevalanslarındaki değişiklikleri içeren karmaşık nedenlerden kaynaklanmaktadır (Sung vd., 2021; Cao vd., 2021). Kanser, insan hücrelerinin çok aşamalı bir süreçte kontrolden çıkmış, patolojik organizmalara veya tümörlerin yapıtaşlarına dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Hausman, 2019). Onkogenlerde veya tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar tümör oluşumuna sebep olur. Böylece kanser bu hücrelerin kontrolsüz ve sonsuz çoğalması, bağışıklık sisteminin anormal şekilde tanınması ile karakterize edilir (Yin vd., 2021). Sonuç olarak anormal metabolizma kanserin önemli bir özelliğidir (Park vd., 2020).

2.4.2. Kanser ve Metabolizma

Kanser hücreleri artan kontrolsüz proliferasyon taleplerini karşılamak için düzensiz metabolizmaya sahiptir (Schmidt vd., 2021). Kanser hücre metabolizması anormal şekilde aktifleştirilmiş büyüme ve hayatta kalma sinyallerine karşılık artan besin alımı ve biyosentezini sağlamak için yeniden programlanır (Pavlova vd., 2016)(Tablo 2.5). Hücreler kısa vadede metabolik yeniden programlama, uzun vadede ise genetik yeniden programlama ile hayatta kalır (Hayes vd., 2020)

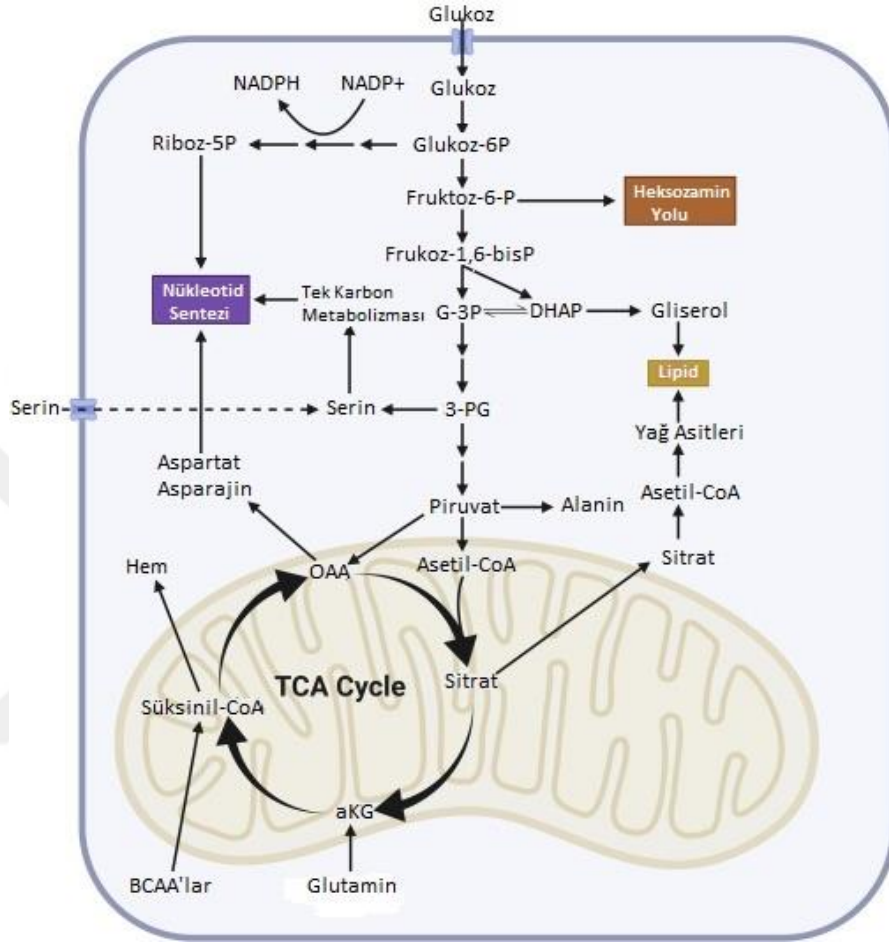
Tablo 2.5: Kanserle İlişkili Metabolik Değişiklikler

Besin Alımındaki Adaptasyonlar	Düzensiz glukoz ve amino asit alımı	Fırsatçı besin edinme modlarının kullanılması
Hücre İçi Metabolik Yollardaki Değişiklikler	Biyosentez ve NADPH üretimi için glikoliz ve/veya TCA döngüsü ara maddelerinin kullanımı	Artan azot talebi
Hücre Davranışında Metabolik Değişiklikler	Metabolit güdümlü gen düzenlemesindeki değişiklikler	Mikroçevre ile metabolik etkileşimler

Kaynak: Pavlova vd., 2016

Kanser hücrelerinin değiştirilmiş metabolizması ilk olarak tümör hücrelerinin glukoz alımını artırdığına ve oksijen varlığında bile yüksek miktarda laktat ürettiğine dair gözlemleriyle Otto Warburg ve arkadaşları (1927) tarafından tanımlanmıştır.

1950'lerde ise Amerikalı fizyolog Harry Eagle tarafından çoğalan tümör hücrelerinin diğer amino asitlere kıyasla yüksek glutamin talebi ilk defa bildirilmiştir (Eagle, 1955). Kanser hücrelerinin proliferasyonunu için gerekli makromoleküllerin sentez yolları Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu İçin Makromolekül Sentez Yolakları (BCAA: Dalli Zincirli Amino Asitler; CoA: Koenzim A; P: Fosfat; aKG: Alfa Ketoglutarat; OAA: Okzaloasetat; DHAP: Dihidroksiaseton Fosfat)

Kaynak: Vasan vd., 2020

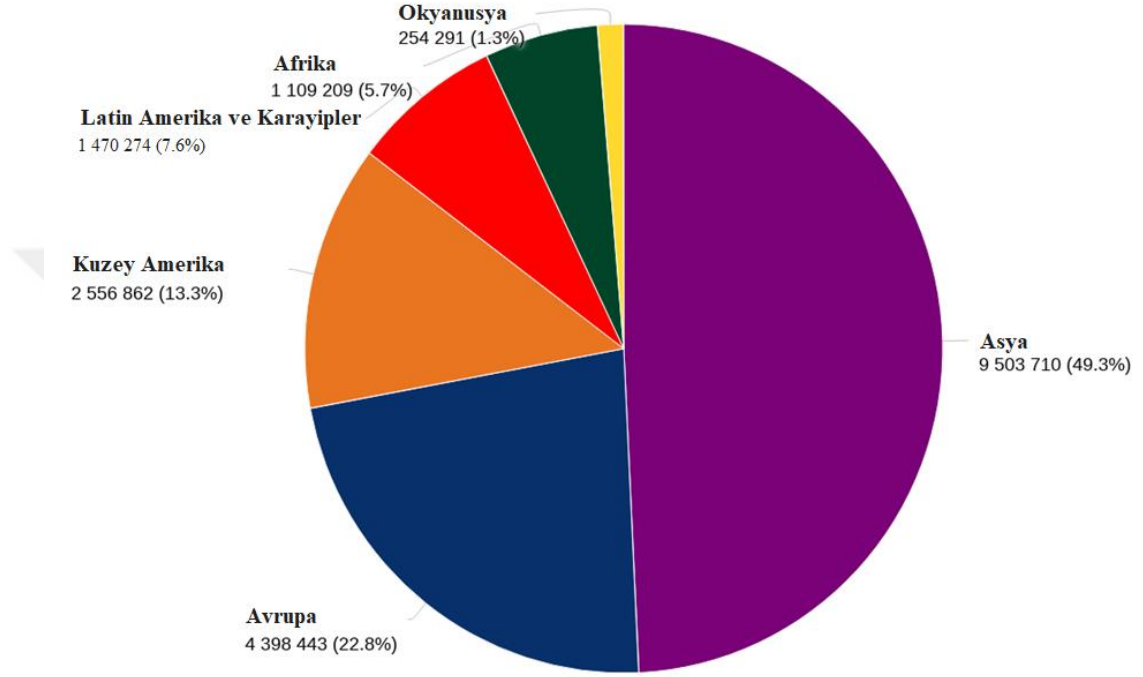
Reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) insülin veya diğer büyüme faktörleri tarafından indüklenir ve PI3K/AKT sinyal yolunu aktive eder. PI3K/AKT sinyali glukoz alımının ana düzenleyicisi olarak hem GLUT1'in mRNA ekspresyonunu artırır hem de iç zardan hücre yüzeyine translokasyonunu destekler (Wieman vd., 2007). Ek olarak AKT aktivitesi kanser hücrelerini aerobik glikolize bağımlı hale getirmektedir (Elstrom ve diğerleri, 2004). Glikolitik ara ürünler, çeşitli biyosentetik öncülerin üretimine katkı sağlayacak dallanma yollarına yönlendirebilir. Bunlardan ilki

tümörjenezde sıklıkla yükselen glikoz-6-fosfatın riboz-5-fosfat (NADPH ve nükleotidlerin yapısal bileşeni) oluşturmak için kısmen oksitlendiği pentoz fosfat yoludur (Ying vd., 2012). Glikoz-6-fosfatın ardından fruktoz-6-fosfat da heksozamin biyosentezi için glikolizden ayrılabilir. Glutamin fruktoz-6-fosfat aminotransferaz 1 (GFPT1) ile katalizlenen fruktoz-6-fosfat ve glutaminden glukozamin-6-fosfat üretimi heksozamin biyosentezinin ilk kararlı adımındır. Bu yol ile heparan sülfat ve hyaluronik asit biyosentezinin yanı sıra hücrel glikosilasyon reaksiyonları için substratlar sağlanır (Wellen vd, 2010). Glutamin büyümeyi destekleyen ikinci temel substrattır. Glukoz gibi lipojenez için karbon sağlayabilirken aynı zamanda amino asit sentezi için nitrojen de sağlar. Bununla birlikte glutaminolitik fenotipi ve biyoenerjik bir substrat olarak glutamine bağımlılığı korumak için yüksek düzeyde c-Myc ekspresyonu gerekli bulunmuştur (Wise vd, 2008). c-Myc, ASCT2 ve SN2 gibi glutamin taşıyıcılarının transkripsiyonunu indükler. İlave olarak glutamini, ATP üretimi için TCA döngüsü yoluyla daha fazla katabolize edilen veya glutatyon sentezi için substrat görevi gören glutamata dönüştüren enzimlerin (glutaminaz (GLS1), fosforibosil pirofosfat sentetaz (PRPS2) ve karbamoil-fosfat sentetaz 2'nin (CAD)) ekspresyonunu artırır (Gao vd., 2009; Pavlova vd., 2016). Glutamat a-ketoglutarat'a dönüştürülebildiğinden dolayı anormal bir şekilde çoğalan hücrelerin çoğu, TCA döngüsü ara maddelerinin bütünlüğünü korumak için sürekli bir glutamin kaynağına ihtiyaç duyar (DeBerardinis vd., 2007). Glikolitik ara ürünler ek olarak aktive edilen PI3K/AKT yolu, yağ asitlerinin de novo biyosentezi için TCA döngüsünden elde edilen sitratı asetil-CoA ve oksaloasetata katalize eden ATP-sitrat liyaz (ACLY) enziminin aktive edilmesinde rol oynar. TCA döngüsü, sitrata ek olarak aspartat ve asparajin gibi esansiyel olmayan amino asitlerin biyosentezi için öncüler sağlar. Bununla birlikte, aspartat biyosentezinin hücrelerin oksidatif fosforilasyon yapma yeteneğine bağlı olduğu gösterilmiştir (Sullivan vd., 2015). Hücre dışı glukoz ve glutaminin hücre dışı laktat birikimine neden olarak tümör mikroçevresini değiştirir ve tümör hücresi migrasyonunu destekler (Goetze vd., 2011).

2.4.3. Dünya'da ve Türkiye'de Kanser

Kanser, tüm dünyada erken ölümlerin başlıca nedenlerinden ve ortalama yaşam süresinin daha da artmasının önündeki engellerden biridir. Ancak demografik değişiklikler ve sosyoekonomik faktörlerle bağlantılı olarak Dünya nüfusunu aynı

şekilde etkilememektedir (Soerjomataram & Bray, 2021). Bununla birlikte tütün kullanımı (Cao vd, 2018), fazla kilo ve obezite (Lauby-Secretan vd., 2016), enfeksiyöz patojenler (de Martel vd., 2020) küresel ve bölgesel kanser yükünü arttırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020’de yeni vaka sayısı 19.292.789’dur (Şekil 2.5). En yüksek vaka sayısı Çin’de (4.568.754 vaka). Türkiye, 233.834 vaka ile 14. Sırada yer almakta ve vaka sayısının %1.3’ünü oluşturmaktadır.

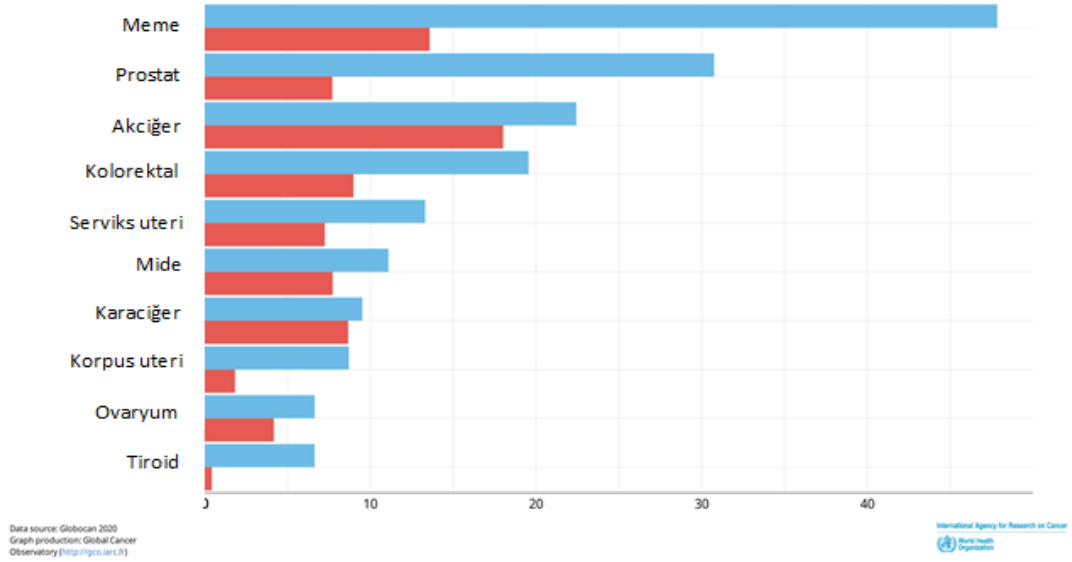


Total : 19 292 789

Şekil 2.5: 2020’de Her İki Cinsiyeti, Her Yaşı ve Her Kanser Türünü Kapsayan Tahmini Kanser Vaka Sayısı ve Dağılımı

Kaynak: GLOBOCAN, 2020’de küresel kanser yükünü keşfetmek için veri görselleştirme araçlarından alınmıştır; <https://gco.iarc.fr/>

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre meme kanseri en yüksek insidans oranına, akciğer kanseri ise en yüksek mortalite oranına sahiptir (Şekil 2.6). 2020 yılında yaklaşık 10 milyon insan kanserden dolayı hayatını kaybetmiştir.



Şekil 2.6: 2020'de Dünya Çapında Tahmini Yaşa Göre Standardize Edilmiş İnsidans (mavi) ve Ölüm (kırmızı) Oranları

Kaynak: GLOBOCAN, 2020'de küresel kanser yükünü keşfetmek için veri görselleştirme araçlarından alınmıştır; <https://gco.iarc.fr/>

2.4.4. Çocukluk Çağı Kanserleri

Yetişkinlere kıyasla çocukluk çağı kanserleri nadirdir ve tüm kanserlerin sadece %0,5'ini oluştururlar. Buna rağmen ABD'de 1-14 yaş arası çocukların ikinci, ülkemizde ise dördüncü ölüm nedenidir (Çeçen, 2013). Çocukluk çağı kanserleri hastalığın seyri, histopatolojik özellikleri ve farklı tümör yerleşim yerleri nedeniyle yetişkinlerde görülen kanserlerden farklıdır ve bu sebeple "Uluslararası Hastalık Sınıflandırması" (ICD)'ye göre sınıflandırılmamaktadır (Küçükkeleş, 2010). Çocukluk çağı kanserleri "Çocukluk Çağı Kanserlerinin Uluslararası Sınıflandırması" (ICCC) tarafından "Uluslararası Onkoloji Hastalıkları Sınıflandırması" (ICD-O)'ye dayanarak sınıflandırılmıştır ve 12 ana tanı, 47 tanı alt grubunu içermektedir (Tablo 2.6). 12 ana tanı grubu lösemileri, lenfomaları, merkezi sinir sistemi (CNS) tümörlerini, kemik ve yumuşak doku sarkomlarını, nöroblastoma, retinoblastoma, rabdoid tümörleri, karaciğer tümörlerini, renal tümörleri, germ hücreli tümörleri ve diğer nadir kanserleri içerir (Filbin & Monje, 2019). Lösemiler, CNS tümörleri ve lenfomalar en yüksek insidans oranına sahip tanı gruplarıdır (Kaatsch, 2010).

Tablo 2.6: Çocukluk Çağı Kanserlerinin Uluslararası Sınıflandırması

ICCC-3 teşhis grubu	Vaka sayısı			Erkeklerin kızlara cinsiyet oranı	Medyan yaş (yıl, ay)
	N	Bağlı (%)	Grup (%)		
Toplam	18.217	100.0	100.0	1.2	5, 10
<i>Lösemiler, miyeloproliferatif ve miyelodisplastik hastalıklar</i>	6206	34.1	100.0	1.2	5, 0
Lenfoid lösemiler	4875	26.8	78.6	1.3	4, 9
Akut miyeloid lösemiler	853	4.7	13.7	1.1	6, 1
Kronik miyeloproliferatif hastalıklar	78	0.4	1.3	0.7	11, 5
Miyelodisplastik sendrom ve diğer miyeloproliferatif hastalıklar	340	1.9	5.5	1.5	6, 5
Belirtilmemiş ve diğer tanımlanmış lösemiler	60	0.3	1.0	1.6	6, 0
<i>Lenfomalar ve retiküloendoteliyal neoplazmalar</i>	2101	11.5	100.0	2.0	10, 8
Hodgkin lenfomalar	883	4.8	42.0	1.4	12, 6
Hodgkin olmayan lenfomalar	966	5.3	46.0	2.4	9, 3
Burkitt lenfoma	234	1.3	11.1	3.8	8, 3
Çeşitli lenforetiküler neoplazmalar	13	0.1	0.6	1.2	0, 11
Tanımlanmamış lenfomalar	5	0.0	0.2	4.0	13, 3
<i>CNS ve çeşitli intrakranial ve intraspinal neoplazmalar</i>	4110	22.6	100.0	1.2	7, 0
Ependimomlar ve koroid pleksus tümörü	409	2.2	10.0	1.3	3, 11
Astrositomlar	1912	10.5	46.5	1.1	7, 4
Kafa içi ve intraspinal embriyonal tümörler	904	5.0	22.0	1.6	6, 0
Diğer gliomalar	319	1.8	7.8	1.1	7, 8
Diğer tanımlanmış intrakraniyal ve intraspinal neoplazmalar	508	2.8	12.4	1.1	9, 3

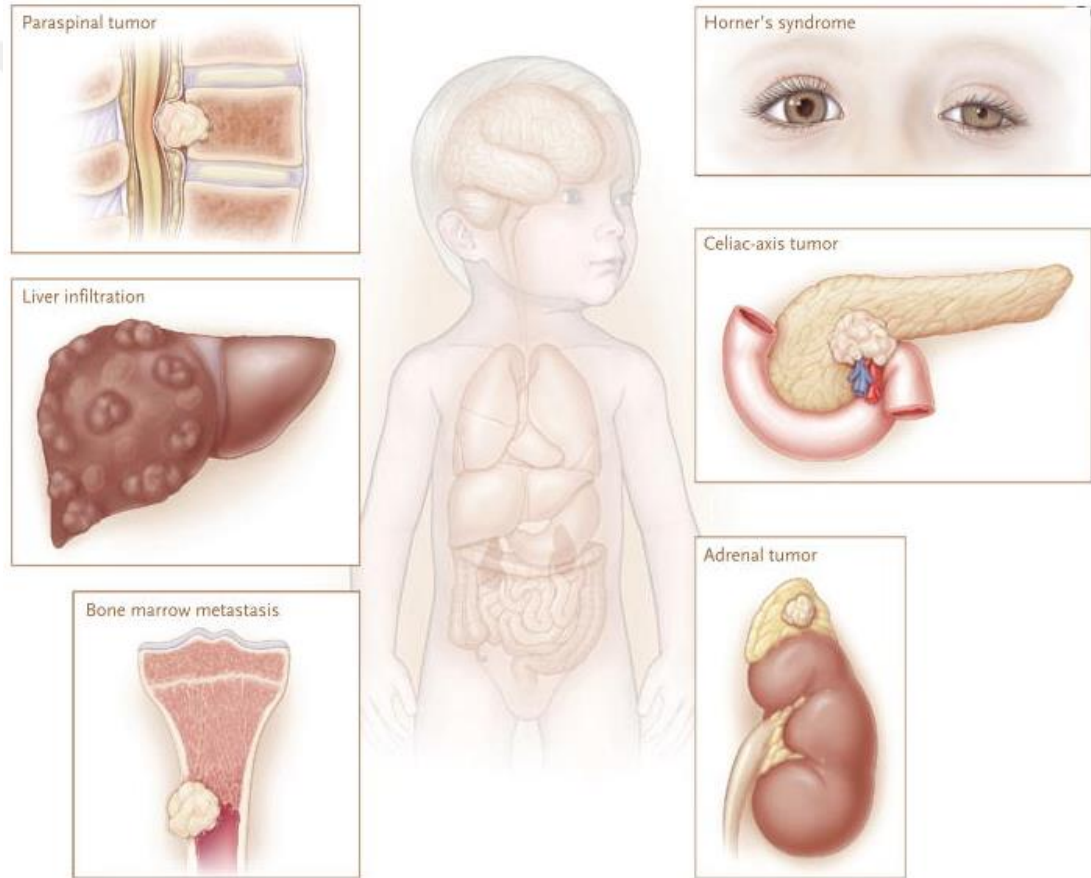
Tanımlanmamış intrakraniyal ve intraspinal neoplazmalar	58	0.3	1.4	1.5	6, 6
<i>Nöroblastom ve diğer periferik sinir hücresi tümörleri</i>	1392	7.6	100.0	1.2	1, 3
Nöroblastom ve ganglionöroblastom	1385	7.6	99.5	1.2	1, 3
Diğer periferik sinir hücresi tümörleri	7	0.0	0,5	1.3	10, 10
<i>Retinoblastom</i>	387	2.1	100.0	1.2	1, 2
<i>Böbrek tümörleri</i>	1029	5.6	100.0	0.9	3, 3
Nefroblastom ve diğer epitelyal olmayan böbrek tümörleri	1005	5.5	97.7	0.9	3, 2
Böbrek karsinomları	24	0.1	2.3	0.8	11, 8
Belirtilmemiş kötü huylu böbrek tümörleri	0	0.0	0.0	–	–
<i>Karaciğer tümörleri</i>	200	1.1	100.0	1.8	1, 10
Hepatoblastom	157	0.9	78.5	1.7	1, 4
Karaciğer karsinomları	41	0.2	20.5	2.4	9, 9
Belirtilmemiş malign hepatik tümörler	2	0.0	1.0	1.0	7, 9
<i>Kötü huylu kemik tümörleri</i>	831	4.6	100.0	1.1	11, 6
Osteosarkomlar	422	2.3	50.8	1.0	12, 0
Kondrosarkomlar	12	0.1	1.4	0.7	13, 9
Ewing tümörü ve ilişkili kemik sarkomları	382	2.1	46.0	1.3	10, 10
Diğer tanımlanmış malign kemik tümörleri	12	0.1	1.4	0.3	9, 7
Belirtilmemiş malign kemik tümörleri	3	0.0	0.4	2.0	13, 10
<i>Yumuşak doku ve diğer kemik dışı sarkomlar</i>	1103	6.1	100.0	1.2	6, 5
Rabdomiyosarkomlar	612	3.4	55.5	1.3	4, 9
Fibrosarkomlar. periferik sinir kılıfı tümörleri ve diğer fibromatöz neoplazmalar	98	0,5	8.9	0.8	8, 1

Kaposi sarkomu	0	0.0	0.0	–	–
Diğer tanımlanmış yumuşak doku sarkomları	311	1.7	28.2	1.1	10, 3
Tanımlanmamış yumuşak doku sarkomları	82	0,5	7.4	1.2	8, 10
<i>Germ hücreli tümörler. gonadların trofoblastik tümörleri ve neoplazmaları</i>	557	3.1	100.0	0.8	8, 7
İntrakraniyal ve intraspinal germ hücreli tümörler	160	0.9	28.7	1.8	11, 1
Malign ekstrakraniyal ve ekstraponadal germ hücreli tümörler	152	0.8	27.3	0,5	0, 9
Malign gonadal germ hücreli tümörler	236	1.3	42.4	0.7	9, 5
Gonadal karsinomlar	8	0.0	1.4	–	12, 3
Diğer ve tanımlanmamış malign gonadal tümörler	1	0.0	0.2	–	2, 8
<i>Diğer malign epitel neoplazmaları ve malign melanomlar</i>	282	1.5	100.0	0.7	11, 10
Adrenokortikal karsinomlar	33	0.2	11.7	0.4	3, 11
Tiroid karsinomları	137	0.8	48.6	0.6	12, 5
Nazofarengeal karsinomlar	23	0.1	8.2	1.9	13, 0
Malign melanomlar	25	0.1	8.9	0.9	9, 1
Cilt karsinomları	6	0.0	2.1	1.0	11, 0
Diğer ve tanımlanmamış karsinomlar	58	0.3	20.6	1.1	12, 8
<i>Diğerleri ve tanımlanmamış malign neoplazmalar</i>	19	0.1	100.0	1.4	5, 9
Diğer tanımlanmış kötü huylu tümörler	16	0.1	84.2	1.7	5, 8
Diğer tanımlanmamış malign tümörler	3	0.0	15.8	0,5	11, 4

Kaynak: Kaatsch, 2010

2.4.5. Nöroblastoma

Nöroblastoma, embriyo veya fetüsün gelişim aşamasındaki sempatik sinir sisteminin herhangi bir nöral krest hücrelerinde ortaya çıkan nöroendokrin tümörlerdir. Çocukluk çağı kanserlerine bağlı ölümlerin %15'ini oluşturur. Bebeklik çağında görülen en yaygın solid tümörü, çocukluk çağının ise ikinci en yaygın ekstrakraniyal malign tümürüdür (Park vd., 2010). Sempatik sinir sisteminin herhangi bir yerinde, adrenal bezlerde ve/veya sempatik ganglionlarda, tümör oluşumuna neden olabilir. Boyun veya üst göğüsteki tümörler Horner sendromuna, omurga boyunca uzanan tümörler felce neden olabilir. Ayrıca nöroblastoma kemik iliği ve karaciğere metastaz yapabilir. (Şekil 2.7) En yüksek vaka perinatal dönemde görülür ve sonraki 10 yıl içerisinde sürekli olarak azalır.

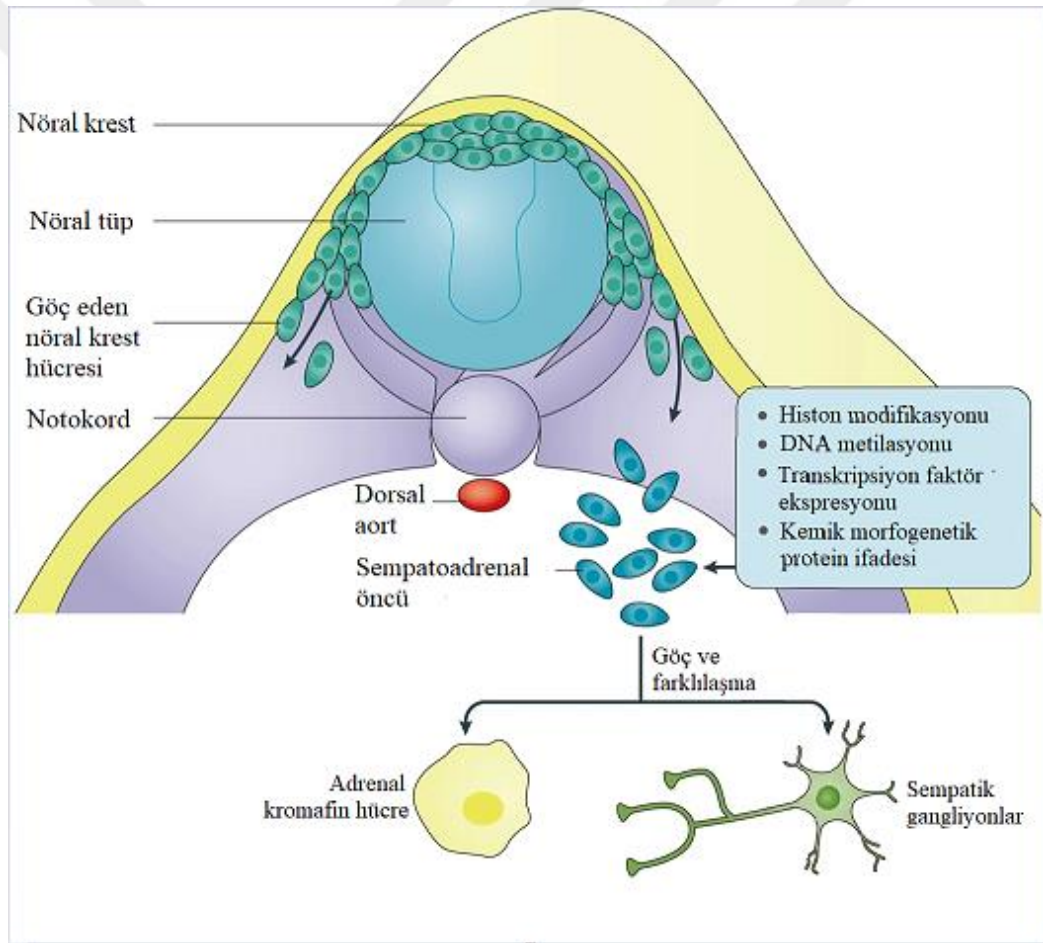


Şekil 2.7: Nöroblastomanın Klinik Gösterimi

Kaynak: Maris, 2010

2.4.5.1. Moleküler Patogenezi

Nöroblastoma sinir sisteminin gelişimi sırasında farklılaşma ve apoptoz eksikliğinin neden olduğu gelişimsel bir hastalık olarak karakterize edilebilir (Lundberg vd., 2022). Nöral krest hücreleri omurgalı embriyolarına özgüdür ve çok potansiyelli öncülerden belirli hücre tiplerine hızla geçiş yapan geçici bir hücre tipidir. Nöral tüpün içerisinde bulunan nöral krest hücreleri embriyonal gelişim sırasında epitelyal-mezenkimal geçiş yoluyla hareketlilik kazanarak göç eder ve çeşitli hücre türleri dizilerine farklılaşırlar (Bronner vd., 2016). Gövde nöral krest hücreleri dorsal aorta göç ederek büyük olasılıkla nöroblastomaya neden olan sempatoadrenal progenitör hücrelere, daha sonra sempatik ganglionlar ve adrenal bez dahil olmak üzere periferik sinir sistemi hücrelerine farklılaşırlar. Bu farklılaşma bir dizi epigenetik ve transkripsiyonel etki tarafından düzenlenir (Tomolonis vd., 2018; Matthay vd., 2016) (Şekil 2.8).

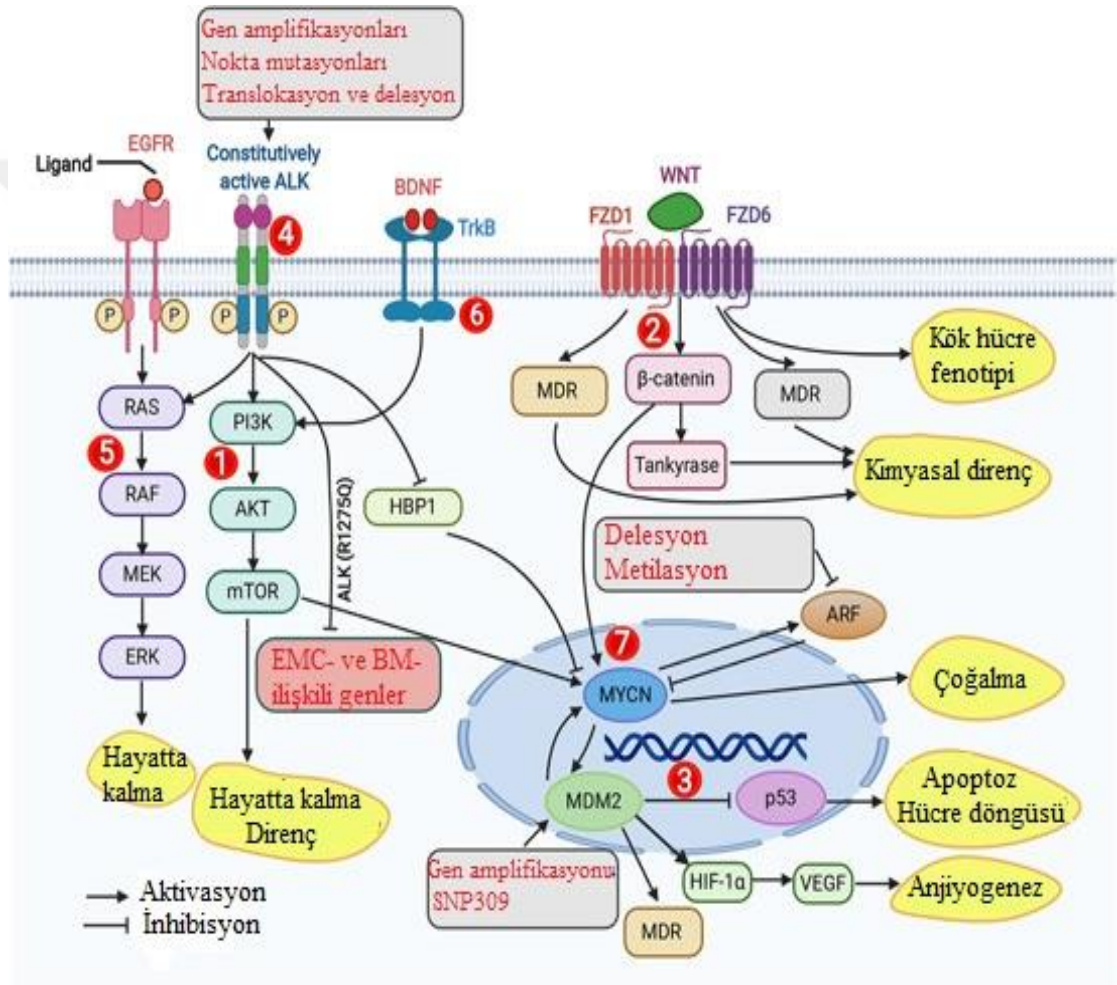


Şekil 2.8: Nöroblastoma Kök Hücresi

Kaynak: Matthay vd., 2016

MYCN genetik amplifikasyonu, hastalığın ve tümör evresinin ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur (Seeger vd., 1985). *LIN28B* polimorfizmleri de yüksek seviyelerde N-

MYC ekspresyonuna yol açtığından dolayı nöroblastoma gelişimi ile ilişkilidir (Molenaar vd., 2012) Ayrıca segmentel kromozal değişiklikler; birinci kromozom (1q) kaybı ve on yedinci kromozom (17q) kazancı, MYCN amplifikasyonu ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Kumps vd., 2013). İlave olarak nöroblastoma hücrelerinde karşılaştırmalı genom çapından yapılan karşılaştırmalı analiz sonucu Anaplastik lenfoma kinazın (ALK) yüksek seviyeli bir gen amplifikasyonu gözlenmiştir (Janoueix-Lerosey vd., 2008). Nöroblastomanın patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmalar aşağıda belirtilmiştir. (Şekil 2.9)



Şekil 2.9: Nöroblastomanın Büyümesi ve İlerlemesinde Rol Alan Sinyal Yolları (1- PI3K/AKT/mTOR yolu, 2-Wnt sinyali, 3-p53- MDM2 yolu, 4- ALK sinyali, 5-RAS-MAPK sinyali, 6- TrkB sinyali, 7-MYCN sinyali)

Kaynak: Zafar vd., 2021

PI3K/AKT/mTOR yolu nöroblastoma hücrelerinin hayatta kalmasını ve kemorezistansını (kemoterapiye direncini) destekler. Wnt sinyali ilaç direncini, köklenmeyi ve MYCN seviyelerini artırır. p53- MDM2 yolu MDM2 p53 aktivitesini

inhibe eder, anjiyogenezi destekler, MYCN translasyonunu ve ilaç direncini arttırır. Gen amplifikasyonu ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNP309) MDM2 ekspresyonunu arttırır. p53-MDM2 yolunda, aktive edilmiş p53, apoptoz ve büyümenin durmasında rol oynar. ALK sinyali PI3K/AKT/mTOR, RAS-MAPK ve MYCN ekspresyonunu aktive eder, ALK(R1275Q) mutanti, BM- ve ECM-ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe eder. RAS-MAPK sinyali EGFR sinyali ile aktive edilir, nöroblastoma hücrelerinin hayatta kalmasını destekler. TrkB sinyali PIK/AKT/mTOR sinyalini etkinleştirir. MYCN sinyali Nöroblastoma hücrelerinin çoğalmasını destekler ve MDM2 ifadesini etkinleştirir.

2.4.5.2. Teşhis ve Tedavi Yöntemleri

Nöroblastoma teşhisinde medyan yaş 18 aydır ve <18 ay hastaların sağkalımı >18 ay olan hastalardan daha iyi olduğu için teşhis yaşı oldukça prognostiktir (Cohn vd., 2009). Nöroblastoma tanısı için laboratuvar testleri (idrarda dopamin, homovanillik asit ve/veya vanilmandelik asit dahil katekolaminler veya katekolamin metabolitlerinin seviyeleri artar), radyografik görüntüleme, tümörün histolojik değerlendirilmesi gibi testler yapılmaktadır. Şu anda dünya çapında kullanılan evreleme sistemi tanımlanmış risk faktörlerinin varlığına veya yokluğuna dayanan Uluslararası Nöroblastoma Risk Grubu Evreleme Sistemidir (INRGSS). Buna göre nöroblastoma L1 (lokalize hastalık, görüntüleme ile tanımlanmış risk faktörleri yok), L2 (lokalize hastalık, görüntüleme ile tanımlanmış risk faktörlerine sahip) , M (metastatik hastalık ve MS (spesifik bölgelerle sınırlı metastatik hastalık) olmak üzere 4 aşamaya ayrılmıştır (Chung vd., 2021)

Bununla birlikte nöroblastoma hücrelerini sınıflandırmak için yaş (< 12 ay, 12-18 ay, ≥ 18 ay), evre, histoloji ve moleküler özellikler (MYCN amplifikasyon durumu, kromozom 11q durumu, tümör hücresi ploidi) dahil olmak üzere bilinen prognostik faktörler kullanılmakta ve bu sayede hastaların risk durumu tedavi için değerlendirilmektedir (Cohn vd., 2009). Tablo 2.7'de risk sınıflandırması ve tedavi yöntemleri genel şekilde belirtilmiştir.

Tablo 2.7: Nöroblastoma Prognostik Kategorisine Göre Tedavi ve Sağkalım

Değişken	Prognostik Kategori
----------	---------------------

	Düşük risk	Orta Risk	Yüksek risk	Tümör Aşaması 4S
Hastalık paterni	Lokalize tümör	Lenf nodu uzantısına sahip lokalize tümör; Bebeklerde kemik iliği ve kemiğe metastazlar	Kemik iliği ve kemiğe metastazlar (bebekler hariç)	Bebeklerde karaciğer ve deriye metastazlar (minimum kemik iliği tutulumu ile)
Tümör genomu	Tam kromozom kazanımları	Tam kromozom kazanımları	Segmental kromozomal anormallikler	Tam kromozom kazanımları
Tedavi	Cerrahi	Orta yoğunluklu kemoterapi; ameliyat	Primer tümöre ve dirençli metastatik bölgelere doz-yoğun kemoterapi; cerrahi ve harici ışın radyoterapisi; otolog hematopoietik kök hücre kurtarma ile miyeloablative kemoterapi; anti-GD2 immünoterapili izotretinoin	Destekleyici bakım
Hayatta kalma oranı (%)	>98	90 - 95	40 ila 50	>90

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde çalışmada kullanılan gereç ve yöntemler ele alınmaktadır. Çalışmanın amacına ulaşmak için yapılan deneylerle ilgili ayrıntılar bu bölümde yer almaktadır.

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hattı

Çalışmada insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattı İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı hücre hattı koleksiyonundan temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar, Ticari Kitler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve ticari kitler:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (Gibco™ 11965092, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), DMEM Low Glukoz, Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco™ 10500, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin (PSA) (Capricorn Scientific AAS-B, Almanya), Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (HyClone, Cytiva, ABD), Tripsin/EDTA (Multicell 325-043-EL, Kanada), Aspartam (Çağdaş Kimya, Artisan Gıda), RNA İzolasyon Kiti (PureLink 12183020, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), cDNA Kiti (Appliedbiosystems 01019730, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), SYBR qPCR Kit (GeneMark QPSY01-25, Atlanta, ABD), Kristal Viole (Sigma-Aldrich 1003248082, St. Louis, MO, ABD)

Çalışmada kullanılan deney malzemeleri:

T75 hücre kültürü flaskları, Eppendorf Ayarlanabilir Pipet seti, Serolojik pipetler (5, 10 ve 25 ml), Filtreli steril pipet uçları (10, 200 ve 1000 µl), Eppendorf tüp (2 ml), Falcon tüpler (15 ve 50 ml), Steril filtre (0,2 µm), Pleyt (6 ve 96 kuyucuklu), Buzdolabı, cDNA cihazı (SimpliAmp Thermal Cycler, Massachusetts, ABD), Santrifüj cihazı (NUVE NF 800, Ankara, Türkiye), Biyogüvenlik Kabini (Mikrotest MGKK-120A2, İstanbul, Türkiye), İnkübatör Cihazı (NUVE EC 160, Ankara, Türkiye), Ters ışık mikroskobu (LEICA DMi1, Weltzar, Almanya), Real-Time PCR

cihazı (BİO-RAD, Kaliforniya, ABD), Elisa Micropleyt okuyucu (BioTek 800 TS, Santa Clara, ABD), Hemositometre (Marien Feld, Lauda- Königshofen, Almanya), Nanodrop spektrofotometri (BioSpec-nano, SHIMADZU, Japonya), Su banyosu (JEIOTECH BW-10H, Kore), Vorteks, Mini santrifüj (ISOLAB Laboragerate GmbH), Tartı (RADWAG AS 220.R2, Radom, Polonya)

3.2. Yöntem(ler)

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmamız için Sabahattin Zaim Üniversitesi laboratuvarında -80 °C'de kriyotüp (2 ml) içinde dondurulmuş halde bulunan 1 ml'lik SH-SY5Y hücre hattı kullanıldı. Hücreler, tabloda belirtilen besiyeri içerisine alındı ve 1.300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı ve pellet 1 ml taze medya ile çözdürüldü. Hücre süspansiyonu 15 ml medya içeren T75 hücre kültürü flaskına alındı. Hücre dağılımı mikroskop ile kontrol edilerek 37 °C'de %5 CO₂ ve nem içeren inkübatöre kaldırıldı.

Tablo 3.1: Tamamlanmış DMEM (%10 FBS, %1 Antibiyotik) besiyeri

Bileşen	Miktar (ml)
DMEM High Glucose	445
FBS	50
Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin (PSA)	5

Hücreler flask yüzeyinin yaklaşık %80'ini kapladığında, kültürü sürdürmek amacıyla pasajlama işlemi aşağıda belirtilen yöntemle yapıldı.

İlk olarak T75 flaskında bulunan medya serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Flask, FBS kalıntılarında kurtulmak için 3 ml PBS ile yıkandı ve yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra PBS çekildi. Ardından hücreleri yüzeyden kaldırmak için 3 ml Tripsin/EDTA çözeltisi eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde yaklaşık 2 dk inkübe edildi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla kontrol edildi. Hücreler süspansiyon hale geldikten sonra Tripsin/EDTA aktivitesini inhibe etmek için DMEM besiyeri eklendi ve süspansiyon 15 ml'lik falkona alındı. 1.300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından falkon içerisindeki süpernatant kısmı atılarak pellet 1 ml besiyeri ile çözdürüldü ve içerisinden pipet yardımıyla gerekli

miktarda (100 µl- 1/10) 15 ml medya içeren T75 flaskına transfer edildi. 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.2.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi

SH-SY5Y hücrelerinin kültürlendiği flasktan besiyeri uzaklaştırıldı ve 3 ml PBS ile yıkandıktan sonra 3 ml Tripsin-EDTA eklenip inkübe edildi. Hücrelerin süspansiyon haline geldiği mikroskopla kontrol edildikten sonra tripsin aktivitesinin engellenmesi için 3 ml besiyeri eklenerek 15 ml'lik falkona alındı.

Hücre sayımı için 10 µl hücre süspansiyonu hemositometreye konularak mikroskop ile sayımı yapıldı. Hemositometre lamının her biri 16 kare içeren 4 farklı alanı dışta kalmış ve çizgi üzerindeki hücreleri dahil etmeden sayıldı ve ortalaması alındı. Hücre sayısı/ml = Ortalama sayım değeri * seyretme faktörü* 10⁴ formülü ile hesaplandı. Bu çalışmada 3 ml Tripsin/EDTA ve 3 ml medya içeren hücre süspansiyonu kullanıldığı için seyreltme faktörü 6 olarak hesaba katıldı. İşlem, hücre sayısının doğruluğu için 2 kere tekrarlandı. Falkonda olan hücre süspansiyonu 1.300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi.

3.2.3. Kontrol ve Aspartam Grubu Besiyerleri Hazırlanışı

Kontrol grubu için %10 FBS ve %1 PSA eklenmiş DMEM High Glukoz (4,5 g/L) besiyeri hazırlandı ve 50 ml'lik falkona alıktotlandı. Aspartam grubunda kullanılacak besiyeri için %10 FBS ve %1 PSA eklenmiş DMEM Low Glukoz (1 g/L) besiyeri hazırlandı ve 50 ml'lik falkona alıktotlandı. Kontrol grubu besiyeri ile aynı kalori içeriğine sahip olması için gerekli aspartam miktarı aşağıda belirtildiği gibi hesaplanarak üzerine eklendi. Vorteks yardımıyla homojen hale getirildi. Hazırlanan besiyeri steril filtreden (gözenek boyutu 0,2 µm) geçirildi.

50 ml DMEM High Glukoz besiyeri 0,225 g glukoz; 50 ml DMEM Low Glukoz ise 0,05 g glukoz içerir. Glukoz gram başına 3,8 kcal, aspartam ise gram başına 4 kcal enerji sağlar. Bu sebeple aradaki 0,175 g glukoz farkından kaynaklanan enerji açığını kapatacak aspartam miktarı $0,175 \times 3,8 / 4$ ile hesaplanarak 0,166 g (166 mg) bulundu.

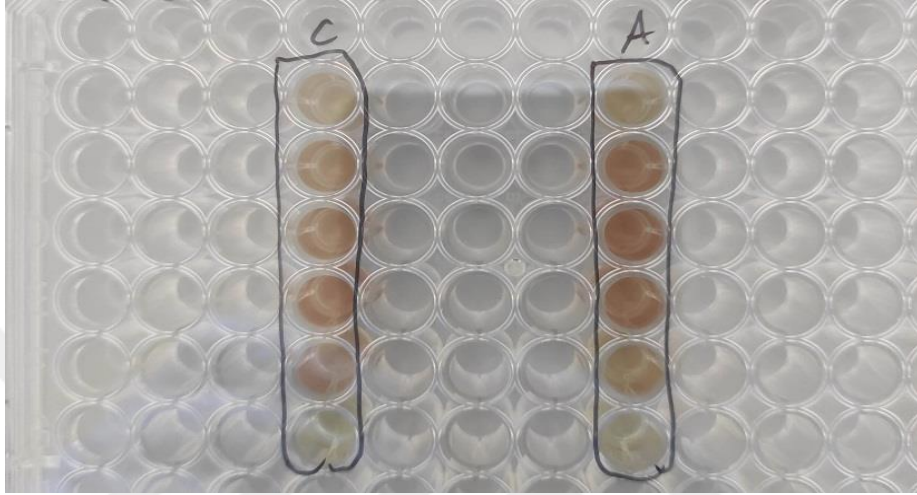


Şekil 3.1: Aspartam, DMEM Low Glukoz ve Elde Edilen Steril Besiyeri

3.2.4 Hücre Canlılık Testi

Aspartamın nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde glukozla kıyasla sitotoksik etkilerini belirlemek için MTS tahlili (3-(4,5-di-methyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium) 24., 48., 72. saatte ve 5. gün uygulandı (Abdik, 2022). T75 flasksında kültürlenmiş SH-SY5Y hücreleri yeterli büyüme gösterdikten sonra daha önce belirtildiği şekilde tripsin yardımıyla kaldırılabildi ve santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen pellet hücre sayımının ardından belirlenen ve 1000 hücre/ μ l olacak miktarda medya ile çözdürüldü. Hücrenin gelecek günlerde ne kadar çoğalacağı düşünülerek senesens kaynaklı hücre ölümü olmaması amacıyla her kuyucuğa 100 μ l medya ve 2.000 hücre ekimi yapıldı. Bu işlem 24., 48., 72. saat ve 5. gün MTS tahlilleri için 4 ayrı 96 kuyucuklu pleyte uygulandı. Pleytler hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübatörde bekletildi. 24 saatin ardından kuyucuklardaki medya vakum yardımıyla çekildi. Kontrol grubu hücrelerine DMEM high glukoz (4.5 g/L glukoz) besiyeri ve aspartam grubu hücrelerine DMEM low glukoz (1 g/L glukoz) + Aspartam ile hazırlanan besiyeri çoklu pipet ile 100 μ l/kuyucuk olacak şekilde eklendi. Bu işlem 0. saat olarak alındı. Pleytler MTS tahlili uygulanana kadar inkübatörde bekletildi. MTS tahlili için ilk önce -20°C' de alikotlanmış olarak bulunan MTS çözdürüldü. Her bir kuyucuğa 10 μ l MTS ve 100 μ l PBS + 4.5 g/L glukoz eklenecek şekilde MTS solüsyonu hazırlandı. İnkübatörden alınan pleytin kuyucuklarındaki medya vakum yardımıyla çekilerek

çoklu pipet yardımıyla her kuyucuğa 110 µl MTS solüsyonu eklendi. Pleyt alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta 1 saat 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda optik yoğunluk 490 nm dalga boyunda Elisa mikropate okuyucusu ile ölçüldü. Sonuçlar Excel programına aktarılarak her bir grup için ortalama, standart sapma, normalize ortalama ve normalize standart sapma değerleri hesaplandı.

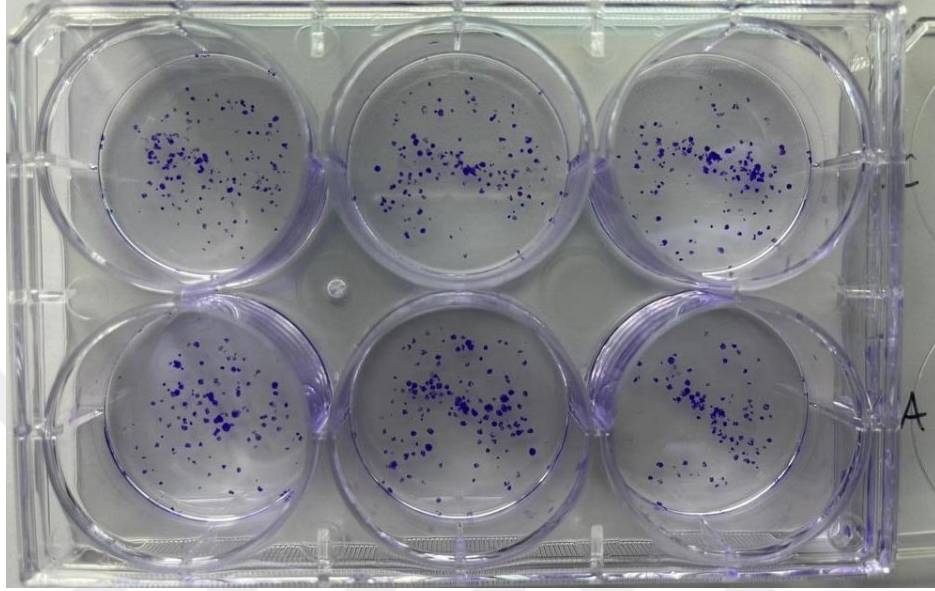


Şekil 3.2: MTS Tahlili

3.2.5. Koloni Oluşturma

T75 flaskında kültürlenmiş SH-SY5Y hücreleri yeterli büyüme gösterdikten sonra daha önce belirtildiği şekilde tripsin yardımıyla kaldırılarak sayıldı ve santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen pellet hücre sayımının ardından 1000 hücre/µl olacak miktarda medya ile çözdürüldü. Aynı bir falkon tüpünde her kuyucukta 2 ml besiyeri ve 300 hücre olacak şekilde besiyeri + hücre süspansiyonu hazırlanarak 6 kuyucuğa dağıtıldı. Ekimi yapılan hücreler yüzeye tutunması için 24 saat 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. 24 saat sonrasında kontrol grubu hücrelerine DMEM high glukoz (4.5 g/L glukoz) ve deney grubu hücrelerine DMEM low glukoz (1 g/L glukoz) + Aspartam ile hazırlanan besiyeri eklendi. 7 gün boyunca inkübatörde bekletildi. Koloni formasyon deneyi için kuyucuklardaki medya vakumlandı. Her kuyucuğa -20 °C 5 dakika bekletilen 600 µl %100 metanol eklendi ve +4 °C'de 15 dakika bekletildi. Ardından kuyucuklardaki metanol çekilerek her kuyucuk 600 µl kristal viyole ile boyandı. 5 dakika bekletildikten sonra kristal viyole çekildi ve kuyucuklar distile su ile yıkandı. Ters ışık mikroskopunda Leixa X programı ile

görüntü alındı ve koloniler sayıldı. Daha sonrasında kuyucuklara tekrar 600 µl %100 methanol eklendi ve boya çözdürüldü. Pleyt Elisa mikroplate okuyucuya yerleştirilerek absorbans değerleri okundu. Okuma sonuçları Excel programına aktarılarak her bir grup için ortalama, standart sapma, normalize ortalama ve normalize standart sapma değerleri hesaplandı.

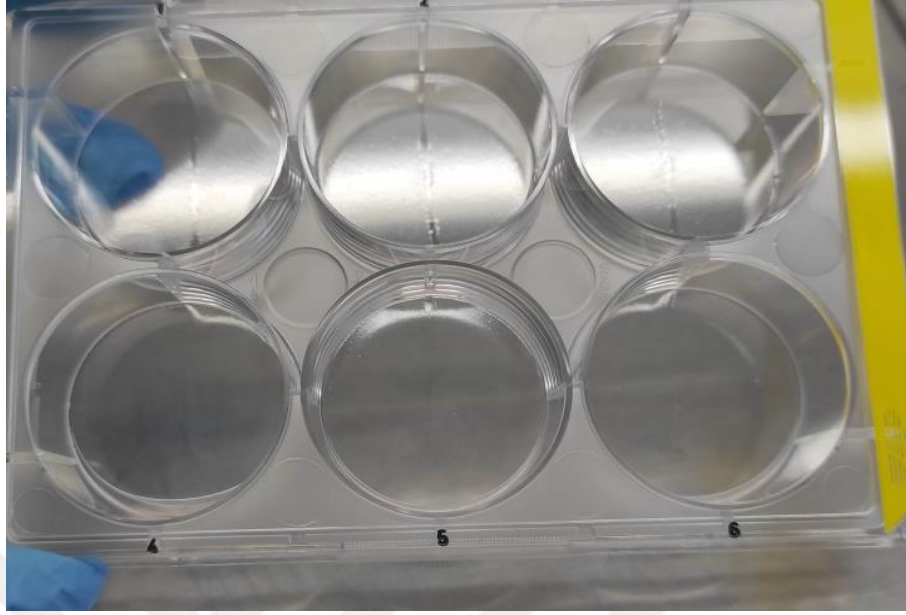


Şekil 3.3: Kristal Viyole ile Boyanan ve Sayılan Kolonilerin Görüntüsü

3.2.6. Çizilme Testi (Scratch/ Wound Healing Assay)

Glukoz veya aspartam uygulaması altında SH-SY5Y hücrelerinin migrasyon kapasitelerini belirlemek için bir model deneyi olarak çizik testi yapıldı (Abdik, 2022). Altı kuyucuklu pleyte her kuyucukta 300.000 hücre + 2 ml besiyeri olacak şekilde hücre ekimi yapılarak inkübatöre kaldırıldı. SH-SY5Y hücreleri flask yüzeyinin %90-100' ünü kapladığında 10 µl'lik pipet uçları kullanılarak hücre tabakasının orta kısmında baştan aşağıya lineer bir çizgi çekildi. Daha sonra kontrol grubu hücrelerine DMEM high glukoz (4.5 g/L glukoz) ve deney grubu hücrelerine DMEM low glukoz (1 g/L glukoz) + Aspartam ile hazırlanan medya eklendi. Kamera bağlantılı ışık mikroskobu altında görüntüleri alınarak 0. saat yara genişliği olarak kaydedildi. Kapanma yüzdesini doğru değerlendirebilmek ve aynı yerden görüntü alabilmek için görüntüleri alınan yer işaretlendi. Pleyt 24 saat inkübatörde bekletildi, süre sonunda tekrar görüntüleri alındı. Adobe Photoshop programı ile yara kenarları arasındaki mesafeler ölçüldü ve yara açıklıklarındaki değişimler analiz edildi.

Yara iyileşme oranı= 0. saat yara genişliği - 24. saat yara genişliği/ 0.saat yara genişliği
× %100 olarak hesaplandı.



Şekil 3.4: 10 µl'lik Pipet Uçları Kullanılarak Açılan Yaranın Görüntüsü

3.2.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Glukoz ve aspartam uygulamasının nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde gen ifade seviyelerine olan etkisini değerlendirmek üzere SH-SY5Y hücreleri 6 kuyucuklu pleytlere her kuyucuğa 50.000 hücre gelecek şekilde ekildi ve 24 saat boyunca 37 °C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde hücrelerin kuyucuklara tutunması için bekletildi. 24 saat sonrasında kuyucuklardaki besiyeri vakumlanarak kontrol grubu hücrelerine DMEM high glukoz (4,5 g/L glukoz) ve aspartam grubu hücrelerine DMEM low glukoz (1 g/L glukoz) + Aspartam ile hazırlanan besiyeri eklendi. Pleyt 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde Gerçek Zamanlı kantitatif PCR (qPCR) analizi için pellet toplandı. Pellet toplamak için kuyucuklardaki besiyeri vakumlandı ve her kuyucuk 500 µl PBS ile yıkandı. PBS vakumla çekilerek hücrelerin kuyucuk yüzeyinden kalkması için 500 µl Tripsin/EDTA eklendi. Yaklaşık 2-3 dakika inkübe edildikten sonra Leica ters ışık mikroskobu ile kontrol edildi. Tripsin inhibisyonu için her kuyucuğa 500 µl besiyeri koyuldu. Kontrol grubu ve aspartam grubu süspansiyonları 15 ml'lik iki ayrı falkon tüpüne toplandı. Falkonlar 1.300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonlardaki süpernatant atıldı ve falkonlar RNA izolasyonu yapılanaya kadara -80°C'ye kaldırıldı. Total RNA izolasyonu

PureLink™ RNA Mini Kiti kullanılarak, aşağıda detaylıca belirtilen kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Sonrasında Wonder RT cDNA Sentez Kiti kullanılarak, prosedüre uygun cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentez protokolü aşağıda detaylıca belirtildi.

3.2.7.1. Total RNA İzolasyon Protokolü

Hücrelerin RNA izolasyonu PureLink™ RNA Mini Kiti kullanılarak, üretici firma tarafından tavsiye edilen protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

İlk olarak –80 °C'den alınan falkonlardaki pelletler üzerine 600 µ Lysis Buffer eklendi. Falkonlar vortekslendikten sonra 12,000 xg'de 3dk santrifüj edildi. Her falkona 600 µ %70 etanol eklenerek vortekslendi. Hücre homojenizatından 700 µl 1,5 ml'lik DNA/RNA spin filtre ve toplama tüpüne transfer edildi. 12,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi, santrifüj sonrası tüpün altında kalan sıvı atıldı. Falkonda kalan 500 µl' lik hücre homojenizatı eklendi ve tekrar 12,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Tüplere 700 µl wash buffer I eklendi ve tekrar 12,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün altındaki süpernatant atıldı. Tüpe 500 µl wash buffer II eklendi ve 12,000 xg/ 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün altındaki süpernatant atıldı. Tekrar 500 µl wash buffer II eklenerek 12,000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Tüp kuru şekilde 12,000 xg'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Spin kısmı 1,5 ml'lik tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNase-free water eklendi. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 12,000 xg'de 3 dk boyunca santrifüj edildi. Örneklerin BioSpec-nano spektrofotometri ile saflıkları ölçüldü ve RNA'ları içeren tüpler -80 °C'de saklandı.

3.2.7.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan Wonder RT cDNA Sentez Kiti kullanılarak, prosedüre uygun cDNA sentezi gerçekleştirildi (Tablo 3.2). Kontrol ve aspartam grubu olmak üzere iki ayrı 0,5 ml mikrosantrifüj eppendorf tüpüne RNA, Reaction Buffer Mix, RT Enzyme Mix, RNase free water içeren 20 µl'lik mix hazırlandı. Mix içerisine eklenecek RNA miktarı, RNA izolasyonunda elde edilen okuma değerlerine göre gerekli hesaplamalar yapılarak, grupların RNA miktarları eşit miktarda (3000 ng) olacak şekilde alındı. Aynı bir 0,5 ml mikrosantrifüj eppendorf tüpüne her bir grup için 4 µl Reaction Buffer ve 1

μ l RT Enzyme olacak şekilde 10 μ l mix hazırlandı. Mini santrifüj yardımıyla homojen hale getirildi ve RNA örnekleri üzerine 5 μ l/grup eklendi. RNase free water ile 20 μ 'ye tamamlandı. Tamamlanan mix minisantrifüj yardımıyla homojen hale getirilerek SimpliAmp Thermal Cycler cihazına konuldu. Elde edilen cDNA'lar qPCR testi için kullanılana kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Tablo 3.2: RNA Ölçümleri ve cDNA Sentezi

Grup	RNA miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	cDNA Sentezi Hazırlanan Mix (20 μl) Bileşenleri			
Kontrol	471.80	6.35 μl RNA	4 μl Reaciton Buffer	1 μl RT Enzym	8.65 μl RNase water
Aspartam	408.45	7.35 μl RNA	4 μl Reaciton Buffer	1 μl RT Enzym	7.65 μl RNase water

3.2.8. Gen Ekspresyonu Analizi – Real-Time PCR (qPCR)

Kontrol ve aspartam grubu arasındaki gen farklılıklarını analiz etmek amacıyla Bio-Rad real-time PCR cihazı kullanılarak qPCR analizi yapıldı. Analiz edilecek gen primerlerine göre 96 kuyucuklu qPCR plakasının dizaynı yapıldı. Hücre ekilecek olan her kuyucuğa primere özel 8 μl miks ve 2 μl cDNA örneği (kontrol/aspartam) eklendi. Primere özgü hazırlanan mix bileşenleri Tablo 3.3'te gösterildiği şekilde ayrı ependorf tüplerde hazırlandı. Ekim gerçekleştikten sonra plakanın üzerine naylon kaplama çekilerek Bio-Rad real-time PCR cihazında analiz edildi. Veriler, housekeeping gen olarak seçilen GAPDH'e göre normalize edildi.

Tablo 3.3: Gerçek Zamanlı kantitatif PCR Reaksiyon Bileşenleri

qPCR Reaksiyon Bileşenleri	1 Kuyucuk İçin Gerekli Miktar
Forvard primer	0.5 μl
Reverse primer	0.5 μl
SYBER Green PCR Master Mix	5 μl
RNase free water	2 μl
cDNA	2 μl
Toplam	10 μl

Bu tez çalışmasında;

NFκB sinyal yolağı için; NFκB, AKT

Apoptotik yolak için; Bcl-2, Bcl-x1, Kaspaz 3, Kaspaz 7

Hücre döngüsü için; p53 ve CNCD1 proteinleri kodlayan genlerinin mRNA ekspresyonları test edildi. qPCR reaksiyonunda kullanılan primerler tabloda gösterildi.

Tablo 3.4: Kullanılan Primerler

Gen	Gen Adı	Baz Dizisi	
AKT	AKT Serin/Treonin Kinaz 1	Forward	5' AGCGACGTGGCTATTGTGAA 3'
		Reverse	5' CACGTTGGTCCACATCCTG 3'
BCL2	B Hücreli Lenfoma Gen-2	Forward	5' AGAGCAACCCAATGCCCGC 3'
		Reverse	5' CAACGAGGGGCCTGAGAGG 3'
BCLXL	B Hücreli Lenfoma Ekstra Large	Forward	5' GAACTCTTTCGGGATGGGGTA 3'
		Reverse	5' CAGAACTACACCAGCCACAGTC 3'
CCND1	Siklin D1	Forward	5' GCGGAGGAGAACAAACAGAT 3'
		Reverse	5' GAGGGCGGATTGGAAATGA 3'
CASP3	Kaspaz 3	Forward	5' GGGAGCAAGTCAGTGGACTC 3'
		Reverse	5' CCGTACCAGAGCGAGATGAC 3'
CASP7	Kaspaz 7	Forward	5' ATGGCTGGAGAACCCACT 3'
		Reverse	5' TCAGTTAAAGTACAGTTCTTTTGTC 3'
NFκB	Nuclear Factor kappa B	Forward	5' AGCACAGATACCACCAAGAC 3'
		Reverse	5' TGGTCCCGTGAAATACACCT 3'
p53	Tumor Suppressor Protein P53	Forward	5' ACGCTTCCCTGGATTGGCAGCC 3'
		Reverse	5' CCATTGCTTGGGACGGCAAGGG 3'
GAPDH	Gliseraldehid-3- Fosfat Dehidrogenaz	Forward	5' TGGTATCGTGGAAGGACTCA 3'
		Reverse	5' GCAGGGATGATGTTCTGGA 3'

3.2.9 İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel farklılıkları hesaplamak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testleri yapıldı. * $p < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler için GraphPad Prism (sürüm 7.00; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, ABD) kullanıldı.

4. BÖLÜM

BULGULAR

Bu bölümde çalışmanın sonucunda elde edilen bulguların analizine yer verilecektir. Öncelikle hücre canlılık testine ilişkin veriler analiz edilecek, ardından diğer deneylerin istatistiksel olarak analizleri üzerinde durulacaktır.

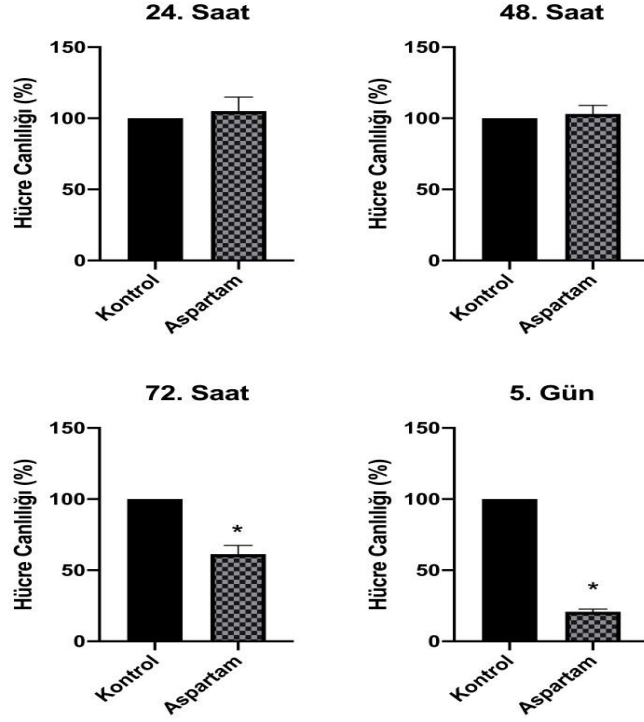
4.1. Hücre Canlılık Testi (MTS) Bulguları

Glukoz ve aspartamın SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde zamana bağlı sitotoksik etkisi MTS testi ile değerlendirildi ve sonuçlar tablo 4.1 ve şekil 4.1’de sunuldu. Metod kısmında belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirilen hücelere eşit kalori içeren 4.5 g/L glukoz veya 1 g/L glukoz + aspartam içeren medya uygulandı. 24, 48, 72 saat ve 5 gün süresince inkübatörde kültüre alınarak süre sonunca hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTS ile değerlendirildi.

Tablo 4.1: SH-SY5Y hücre hattında 24, 48, 72 saat ve 5 gün süreyle kontrol veya aspartam uygulamasının hücre canlılığına etkisi. Veriler; % Canlılık ortalama \pm standart sapma

	Kontrol		Aspartam	
	Hücre canlılığı (%)	Standart Sapma	Hücre canlılığı (%)	Standart Sapma
MTS 24h	100	-	105	9.95
MTS 48h	100	-	103.1	6.02
MTS 72h	100	-	61.36	6.04
MTS 5.Gün	100	-	20.77	1.95

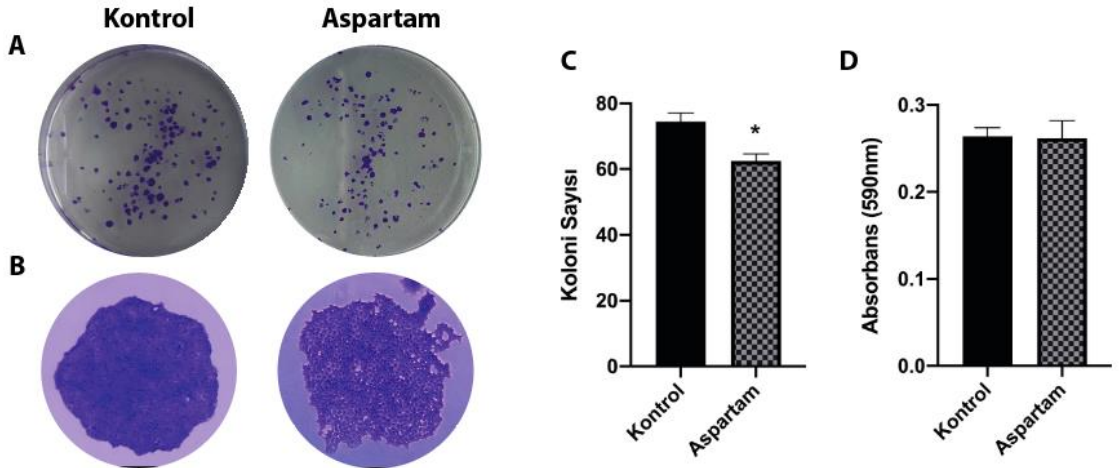
24 ve 48 saat inkübe edilen SH-SY5Y hücrelerinin hücre canlılıkları arasında anlamlı bir farklılık yoktu. MTS verilerinde istatistiksel olarak önemli bir fark ilk olarak 72. saatte aspartam grubunun $61,36 \pm 6,04$ hücre canlılığına sahip bulunmasıyla belirlendi. Aspartam grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli olarak azalan hücre canlılığı 5. gün MTS sonuçlarında $20,77 \pm 1,95$ ‘e kadar düştü.



Şekil 4.1: SH-SY5Y Hücre hattı MTS sonuçları. Tek yönlü ANOVA, Tukey Post Hoc Testi Kontrol ve Aspartam Deney Grubu, gruplar arası karşılaştırma, * $p < 0,05$

4.4 Koloni Oluşturma Bulguları

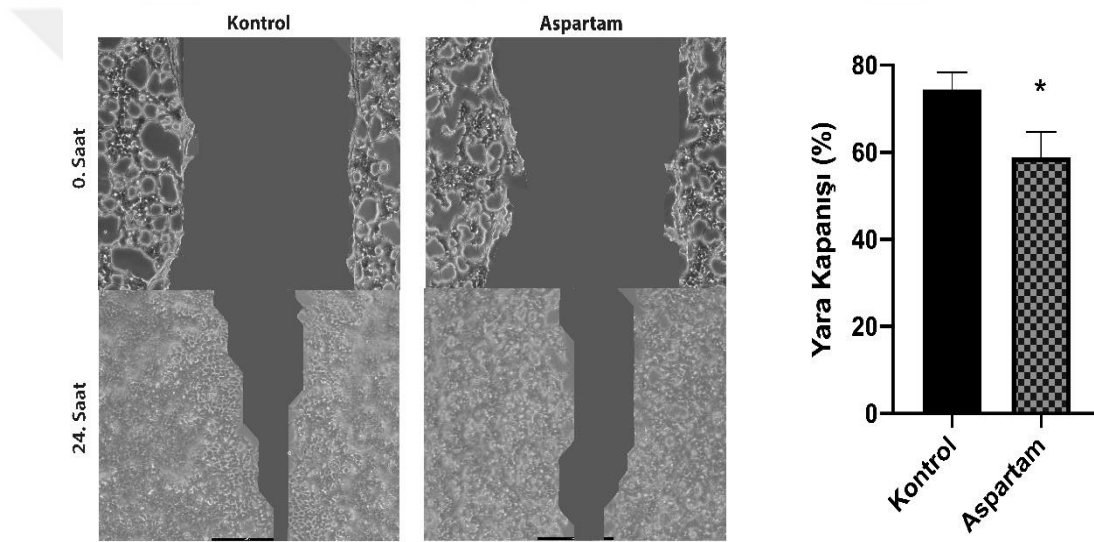
Koloni oluşturma deneyi kontrol grubunda ortalama $74,43 \pm 2,64$, aspartam grubunda ise ortalama $62,5 \pm 2,12$ koloni gözlenerek koloni sayısında anlamlı bir fark gözlemlendi. Ancak boyama işleminden sonra hücrelerden tekrar toplanan kristal viyolenin absorbans değerleri kontrol grubunda $0,264 \pm 0,01$ ve aspartam grubunda $0,262 \pm 0,02$ bulunarak arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmedi.



Şekil 4.2: Koloni oluşturma bulguları. A) Kristal viyole ile boyanan kolonilerin toplu görüntüsü B) Ters ışık mikroskobu altında tek koloni görüntüsü C) Kontrol ve aspartam grubu koloni sayıları D) Boyama işleminden sonra hücrelerden tekrar toplanan kristal viyoleden elde edilen absorbans değerleri, * $p < 0,05$

4.1. Scratch Bulguları

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin migrasyonu, kontrol ve aspartam uygulamasıyla değerlendirildi. Kontrol grubunda çizik kapanma oranı $74,43 \pm 3,9$ iken bu oran aspartam grubunda $58,9 \pm 5,73$ tı. Böylece glukozun SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre migrasyonunu aspartama göre daha çok desteklediği gözlemlendi.



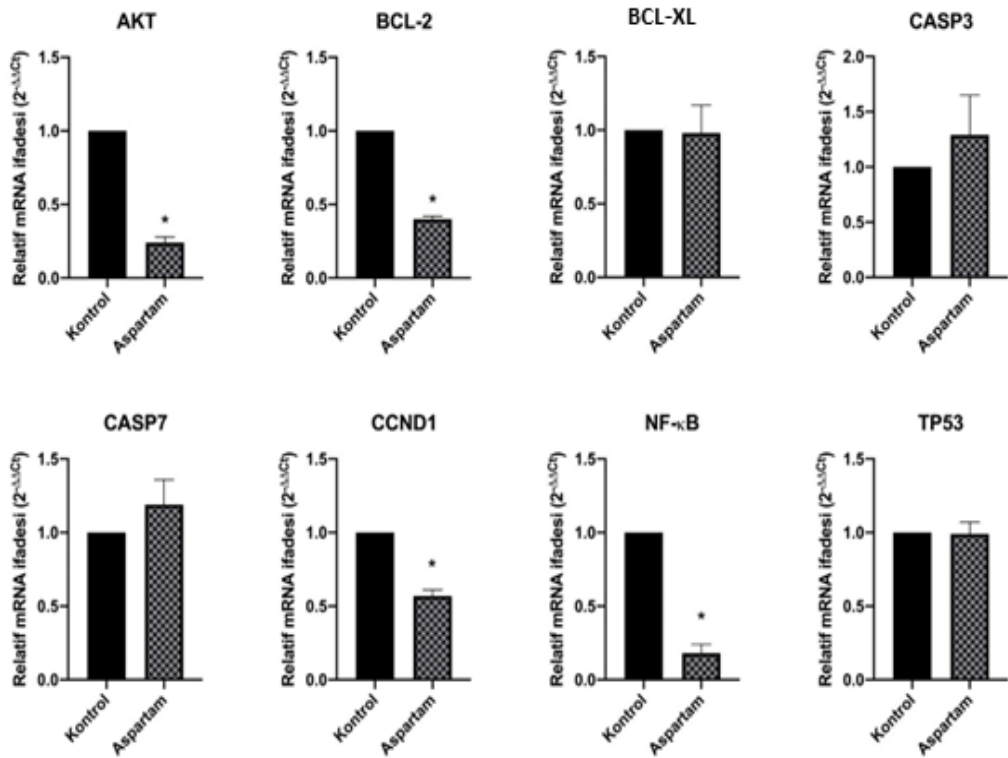
Şekil 4.3: Çiziklerin ters ışık mikroskobu ile alınan temsili görüntüleri ve uygulamadan sonra hücrelerde yara kapanma oranları. Veriler; % ortalama kapanma \pm standart sapma olarak sunulmuştur, * $p < 0,05$

4.1. Gen Ekspresyon Bulguları

Yetmiş iki saat boyunca glukoz veya aspartam içeren besiyerine maruz bırakılan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde ilgili genlerin seviyelerini değerlendirmek için qPCR testi yapıldı. AKT ve NFkB yaşam sinyal yolağında; CCND1 ve TP53 hücre döngüsü kontrolünde, BCL-2, BCL-XL, CASP3 ve CASP7 apoptozla ilişkili genler olarak belirlendi.

Yapılan çalışmada AKT gen ifadesi aspartam grubunda $0,24 \pm 0,04$, NFkB gen ifadesi ise aspartam grubunda $0,18 \pm 0,06$ idi ve ikisi de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

önemli bir azalma gösterdi. BCL-2 gen ifadesi, aspartam grubunda $0,4 \pm 0,02$ olarak kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalırken BCL-XL gen ifadesi, aspartam grubunda $0,98 \pm 0,12$ idi ve kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermedi. Aspartam grubunda CASP3 $1,29 \pm 0,36$ ve CASP7 $1,19 \pm 0,17$ mRNA ifadesine sahip olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artış gösterdi. Bu artış 72. Saat MTS sonucuna göre aspartam grubunda azalan hücre canlılığıyla tutarlı olarak değerlendirildi. CCND1 gen ifadesi, aspartam grubunda $0,57 \pm 0,14$ olarak kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterirken, TP53 gen ifadesi aspartam grubunda $0,99 \pm 0,08$ idi ve kontrol seviyesinde kaldı.



Şekil 4.4: SH-SY5Y hücre hattı kontrol ve aspartam gruplarında Apoptoz, Yaşam Sinyal ve Hücre Döngüsü Kontrolü yollarında rol alan genlerin göreceli kat değişimi, qPCR analiz sonuçları. Tüm veriler GAPDH ifadesine göre normalize edilerek tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile analiz edildi, * $p < 0,05$ (AKT: AKT Serin- Treonin Kinaz 1, BCL-2: B-hücreli Lenfoma Gen-2 , BCL-XL: B-hücreli Lenfoma Ekstra Large, CASP3: Kaspaz 3, CASP7: Kaspaz 7, CCND1: Siklin D1, NFκB: Nuclear Factor kappa B, TP53: Tümör Suppressor Protein P53)

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA

Kanser, başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak dünya çapında bir halk sağlığı sorunudur ve sürekli büyüyen ve çoğalan hücreler ile karakterize edilmektedir (Alidadi vd., 2021). Nöroblastoma, yüksek mortaliteye sahip agresif bir çocukluk çağı kanser türüdür (de Moura Escobar vd., 2019). Tümör hücreleri Warburg etkisi olarak adlandırılan oksijen mevcudiyetinden bağımsız olarak glikoliz kullanma yeteneğine ve artan glukoz arzına sahiptir (DeBardinis vd., 2020). Tümör mikroçevresinde bulunan besin seviyeleri, hücrenin metabolizmasını ve ilaç tepkilerinin değiştiren önemli bir etmendir ve diyet gibi ek faktörlerden etkilenebilir (Muir & Vander Heiden, 2018). Düşük glukoz seviyelerinin ve kalori kısıtlamasının antikanser stratejileri olarak hedeflendiği bilinmektedir (DePeaux & Delgoffe, 2021).

Aspartam, şeker tüketiminin azaltılması amacıyla gıdalarda sıklıkla şekere alternatif olarak kullanılan bir yapay tatlandırıcıdır. Tüketimi güvenli kabul edilmesine rağmen farklı çalışmalarda bilişsel davranışlardaki değişiklikler, artan kanser riski, değişen bağırsak mikrobiyotası gibi olumsuz etkiler gösterdiğinden tüketimi tartışmalıdır (Czarnecka vd., 2021). Bununla birlikte aspartamın kanser hücrelerinde temel besin maddesi olan glukoz gibi rol alıp almadığı belirsizdir. Bu sebeple bu tez çalışması insan nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) eşit kalori içeriğine sahip glukoz ve aspartam maruziyetinin hücrenin proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkilerini altta yatan moleküler metabolizmalarla ilişkilendirilerek karşılaştırılmalı olarak analiz eden ilk çalışmadır.

Tez kapsamında ilk olarak hücre canlılık testi (MTS) gerçekleştirilmiş ve aspartam maruziyetinin 72. Saatte hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Daha önce glukoz ve oksijenden yoksun bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin oksijen ve glukoz yoksunluğuna maruz kaldığı sürenin uzunluğuyla doğru orantılı olarak apoptotik hücre sayısının arttığı, tersine hayatta kalan SH-SY5Y hücrelerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Yin vd., 2022). MTS sonuçlarını destekleyebilecek üç alternatif hipotez değerlendirilmiştir. Aspartam uygulanan grupta SH-SY5Y hücreleri ilk 48 saat var olan 1 g/L glukozu kullanılıp daha sonrasında ortamdaki aspartamı glukozu göre daha iyi kullanamayabilir, aspartam hücre proliferasyonunu daha çok artırarak senesens kaynaklı hücre canlılığını azaltabilir veya aspartam metabolitlerinin hücrelerde sitotoksik etkileri olabilir. Daha önce farklı dozlarda glukoz ve aspartam maruziyetinin etkileri insan pankreas adenokarinom (PANC-1) hücrelerinde değerlendirilmiştir

(Gezginci-Oktayoglu vd., 2021). Bunun için glukoz ve aspartamın öldürücü olmayan (5mM glukoz ve 1 ng/mL) ve öldürücü (25mM glukoz ve 100 mg/mL aspartam) dozları MTT testi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı 1ng/mL aspartam ve 15 mM glukozdan daha yüksek konsantrasyonlarda azalmıştır. Bununla birlikte 7 gün boyunca 1 ng/mL aspartam maruziyeti hücre proliferasyonunu arttırırken, 14 gün boyunca aspartam ve glukoz maruziyeti (100 mg/mL aspartam maruziyeti hariç) kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir. Çalışmamızda eşdeğer kalori için eklenen 3,24 mg/L aspartam ($3,24 * 10^9$ ng/mL) bu çalışmayla tutarlı olarak hücre canlılığını azaltabilir.

Aspartamın hücre proliferasyonunu arttırarak senensens kaynaklı hücre canlılığını azaltabileceğine dair olan hipotezimizi değerlendirmek için koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Eğer hipotezimiz doğruysa aspartam grubunda daha fazla koloni gözlemlenmemiz gerekiyordu. Elde edilen sonuçlarda kontrol grubu aspartam grubuna göre daha fazla koloni sayısına sahipti. Aynı zamanda elde edilen bu sonuç Chen ve arkadaşlarının (2018) yüksek glukoz altında kültürlenmiş pankreas kanseri hücrelerinde gözlemledikleri artan koloni sayısını desteklemektedir. Yapılan çizik (scratch) testi sonucunda kontrol grubunun daha fazla yara kapanma yüzdesine sahip olması nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinin artan migrasyonu için glukoz arzına sahip olduğunu gösterilmiştir. Koloni oluşum deneyi ve scratch testi bulguları göz önüne alındığında bulgularımız, aspartamın karsinojenik potansiyel eksikliğini vurgulayan kapsamlı çalışmayı desteklemektedir (Wikoff vd., 2020).

AKT, glikolizin ilk adımını katalize eden heksokinazın ve glukoz taşıyıcıların (GLUT1 ve GLUT4) plazma zarına geçişini düzenleyen substratların fosforilasyonu ile glikolitik aktiviteyi artırabilen bir serin-treonin kinazdır (Waldart vd.,2017). Ayrıca PI3K/AKT yolu nöronlarda oksidatif hasara ve apoptoza karşı hayatta kalma yanlısı bir rol oynayabilir (Kim vd., 2020). Hücreler oksidatif stres ve inflamasyon nöral hasarın patolojik sürecinde hayati olduğundan nöroinflamasyon ve oksidasyon mekanizmaları hedeflenmektedir (Xian vd., 2021). Daha önce AKT/Nrf2/HO-1'in aktive edilmesi ve NF-κB yollarını inhibe edilmesinin mikroglia polarizasyonu fenotipini değiştirdiği, SH-SY5Y hücrelerinde nöroprotektif etkiler gösterdiği belirtilmiştir (He vd., 2021). Benzer şekilde aloe-emodin'in oksijen ve glukoz yoksunluğu ile uyarılan SH-SY5Y hücrelerini zarardan koruduğu ve koruyucu etkisinin AKT'ye özgü inhibitör kullanıldığında bloke edilebileceği bildirilmiştir

(Xian vd., 2021). NF- κ B hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi kanserle ilgili süreçlerde kritik rollere sahiptir. Ek olarak hücresel iltihaplanma ve birçok sinir sistemi hastalığında yer aldığından inflamatuvar hastalıklar için hedef olarak kabul edilmektedir (Li ve Verma, 2002). Nöroprotektif etki mekanizmalarının AKT aktivasyonu, NF- κ B inhibisyonu ile ilişkilendirildiği göz önüne alındığında çalışmamız sonucunda elde edilen hem AKT hem de NF- κ B ekspresyon artışı, artan glikolitik aktiviteye ve proliferasyona atfedilebilir. Artan glikolitik aktivite nedeniyle oluşan yüksek laktat konsantrasyonu NF- κ B/IL8 sinyal yoluyla anjiyogenez ve tümör büyümesini destekler (Végran vd., 2011)

Antiapoptotik genler (BCL-2 ve BCL-XL) apoptozu baskılama yeteneği göstererek nöroblastoma hücrelerinin çoğalmasına katkı sağlar (Sanati vd., 2020; Hanafy vd., 2020). BCL-2 tümör hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediğinden dolayı antikanser ilaçlarında inhibisyonu hedeflenmektedir. Bu ilaçlardan biri olan BH3 mimetikleri pro-apoptotik BAX aktivasyonunu sağlamak için BCL-2 proteinini inhibe ederek apoptozu tetikler (Roberts vd., 2021). Ayrıca CO₂ ile indüklenen hipoksi ortamına maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde BAX/BCL-2 oranının ve CASP3 aktivitesinin önemli ölçüde arttığı bulunarak CO₂ maruziyetinin SH-SY5Y hücre ölümünü teşvik ettiği bildirilmiştir (Currò vd., 2022).

CCND1 fonksiyonu hücre döngüsünün G1'den S fazına ilerlemesini düzenlemektir (Liu vd., 2022). Hücre döngüsü ilerlemesini değiştiren CCND1'in amplifikasyonu çeşitli kanser patogenezinde gözlenir. Nie ve arkadaşları (2020) mide kanseri hücrelerinde CCND1 ekspresyonunun baskılanmasıyla hücre proliferasyonunun inhibe edildiğini, aynı zamanda CCND1'in epigenetik olarak aktive edilmesinin gastrik tümörjenezini desteklediğini göstermiştir. Bununla birlikte CCND1'in negatif düzenlemesi meme kanseri ilerlemesini de engellemiştir (Liu vd., 2021). Ayrıca CO₂ ile indüklenen hipoksi ortamına maruz kalan ve kalmayan SH-SY5Y hücreleri arasında CCND1 transkript seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Currò vd., 2022). Rol oynayan moleküler mekanizmalar değerlendirildiğinde SH-SY5Y hücrelerinde glukoz maruziyetinde gözlenen artan proliferasyon, migrasyon ve azalan apoptoz AKT, NF- κ B, BCL-2 ve CCND1 mRNA ekspresyonlarındaki artış sebebiyle literatürle tutarlı olarak açıklamaktadır.

Aspartam ve üç metabolitinin etkileri daha önce nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde değerlendirilmiştir (Griebsch vd., 2023). Bu çalışmada kontrol grubu 1 g/L D-glukoz,

%2,5 FBS ve %1 NEAA içeren DMEM ile inkübe edilirken aspartam grubu için bu besiyerinde 271,7 µM aspartam çözdürülerek besiyeri hazırlanmıştır. Metabolitlere maruz kalacak hücreler ise aspartamla aynı molariteye sahip olacak şekilde L-aspartik asit, L-fenilalanin ve metanol kombinasyonu içeren DMEM ile inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda aspartam ve metabolitlerinin mitokondriyal hasarla ilişkili olarak oksidatif strese ve oksidatif stresin de nöronal hücrelerde lipid damlacıklarının birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple aspartam ve metabolitlerinin bozulmuş bağırsak bariyerine sebep olan hastalıkların (çölyak hastalığı, irritabl barsak sendromu tip I diyabet ve multipl skleroz) patogenezine katkıda bulunabileceği, kan-beyin bariyerini geçerek nörodejeneratif hastalıkların hızlanmasına sebep olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışma aspartam ve metabolitlerinin etkisini değerlendirmesine rağmen kontrol grubu olarak 1 g/L D-glukoz içeren DMEM kullanıldığı için glukozun etkilerini karşılaştırma fırsatı sağlamamaktadır. Bu sebeple son hipotezimiz olan aspartam metabolitlerinin sitotoksik etkiler gösterip gösteremeyeceğinin doğruluğu için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Aspartam şekere alternatif olarak üretilen bir yapay tatlandırıcı olsa bile nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri için bu durum böyle gözükmemektedir. Bu çalışmada glukozun aspartama göre kanser hücresi proliferasyonuna ve migrasyonuna daha çok katkı sağladığı gösterilmiştir. Ancak literatür taraması sayesinde aspartam güvenliğinin halâ tartışmalı olduğu saptanmıştır. Aspartam ve özellikle metabolitlerinin kanser dahil olmak üzere diğer hastalıklarda nasıl rol aldığını anlayabilmek için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ALTINCI BÖLÜM

SONUÇ

Bu çalışmada gıdalarda şeker yerine alternatif olarak kullanılan aspartamın kanser hücresinde temel besin kaynağı olan glukoz benzeri etki gösterip göstermediğini eşit kalori içeren kültür koşullarında araştırdık. 72. saat ve 5. gün MTS sonuçları aspartamın hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığını gösterdi. Bu sonuçlara göre azalan hücre sayısının SH-SY5Y hücrelerinin glukozu aspartama göre daha iyi kullanabilmesinden mi yoksa aspartam ve metabolitlerinin sitotoksik etkilerinden mi kaynaklandığını değerlendirmek için koloni oluşum deneyi ve çizik testi yaptık. Kontrol grubunda daha fazla koloni sayısı ve daha fazla yara kapanması gözleyerek SH-SY5Y hücrelerinin glukoz varlığında artan hücre proliferasyonu ve migrasyonuna sahip olduğu sonucuna vardık. Sonuçlarımızı tutarlı şekilde açıklayabilmek için apoptoz, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkili AKT, NF- κ B Bcl-2, Bcl-xl, Kaspaz 3, Kaspaz 7; hücre döngüsü ile ilişkili p53 ve CCND1 mRNA ekspresyonlarındaki değişimleri değerlendirdik. Kontrol grubundaki hücrelerin aspartam grubundaki hücrelere kıyasla daha fazla hücre canlılığına, proliferasyona ve migrasyona sahip olmasını kontrol grubundaki daha yüksek AKT, NF- κ B, BCL-2 ve CCND1 ekspresyon seviyeleri ile ilişkilendirdik. Hücre ölümünden sorumlu CASP3 ve CASP7 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark bulunmaması, hücreyi öldürücü herhangi bir etken sağlamadığımızdan mantıklı ve tutarlı bulunurken aspartamın sitotoksik veya kanserojen etkilerinin olduğuna dair artan endişelere katkı sağlamamıştır. Bununla birlikte aspartam ve metabolitlerinin kanser sürecinde etkilerini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

YEDİNCİ BÖLÜM

KAYNAKÇA

- Abdik, H. (2022). Antineoplastic effects of erufosine on small cell and non-small cell lung cancer cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Molecular biology reports*, 49(4), 2963–2971.
- Ahmad, S. Y., Friel, J. K., & Mackay, D. S. (2020). Effect of sucralose and aspartame on glucose metabolism and gut hormones. *Nutrition reviews*, 78(9), 725–746.
- Ahmad, S. Y., Friel, J., & Mackay, D. (2020). The Effects of Non-Nutritive Artificial Sweeteners, Aspartame and Sucralose, on the Gut Microbiome in Healthy Adults: Secondary Outcomes of a Randomized Double-Blinded Crossover Clinical Trial. *Nutrients*, 12(11), 3408.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619-634.
- Anderson, J., Majzner, R. G., & Sondel, P. M. (2022). Immunotherapy of Neuroblastoma: Facts and Hopes. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 28(15), 3196–3206.
- Aspartame. (2021). In *Drugs and Lactation Database (LactMed®)*. National Institute of Child Health and Human Development.
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029-3030.
- Bellisle, F., Drewnowski, A., 2007. Intense sweeteners, energy intake, and the control of body weight. *European journal of clinical nutrition*, 61(6), 691–700.
- Benton, D. (2005). Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity? *Nutrition research reviews*, 18(1), 63–76.
- Bish, C. L., Blanck, H. M., Maynard, L. M., Serdula, M. K., Thompson, N. J., & Khan, L. K. (2007). Health-related quality of life and weight loss practices among overweight and obese US adults, 2003 behavioral risk factor surveillance system. *MedGenMed: Medscape general medicine*, 9(2), 35.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 79(4), 537–543.

- Bronner, M. E., & Simões-Costa, M. (2016). The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Current topics in developmental biology*, 116, 115–134.
- Burdock, G. A. (1996). *Encyclopedia of food & color additives*. CRC press.
- Burgert, S. L., Andersen, D. W., Stegink, L. D., Takeuchi, H., & Schedl, H. P. (1991). Metabolism of aspartame and its L-phenylalanine methyl ester decomposition product by the porcine gut. *Metabolism: clinical and experimental*, 40(6), 612–618.
- Cao, B., Hill, C., Bonaldi, C., León, M. E., Menvielle, G., Arwidson, P., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2018). Cancers attributable to tobacco smoking in France in 2015. *European journal of public health*, 28(4), 707–712.
- Castro-Muñoz, R., Correa-Delgado, M., Córdova-Almeida, R., Lara-Nava, D., Chávez-Muñoz, M., Velásquez-Chávez, V. F., Hernández-Torres, C. E., Gontarek-Castro, E., & Ahmad, M. Z. (2022). Natural sweeteners: Sources, extraction and current uses in foods and food industries. *Food chemistry*, 370, 130991.
- Cao, W., Chen, H. D., Yu, Y. W., Li, N., & Chen, W. Q. (2021). Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chinese medical journal*, 134(7), 783–791.
- Chandel N. S. (2021). Carbohydrate Metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 13(1), a040568.
- Chandel N. S. (2021). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040535.
- Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2014). Artificial sweeteners - a review. *Journal of food science and technology*, 51(4), 611–621.
- Cherkas, A., Holota, S., Mdzinarashvili, T., Gabbianelli, R., & Zarkovic, N. (2020). Glucose as a major antioxidant: when, what for and why it fails?. *Antioxidants*, 9(2), 140.
- Chen, X., Jiang, Z., Zhou, C., Chen, K., Li, X., Wang, Z., ... & Duan, W. (2018). Activation of Nrf2 by sulforaphane inhibits high glucose-induced progression

- of pancreatic cancer via AMPK dependent signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(3), 1201-1215.
- Chéron, J. B., Marchal, A., & Fiorucci, S. (2019). Natural sweeteners. *Encyclopedia of Food Chemistry*.
- Choudhary, A. K., & Lee, Y. Y. (2018). Neurophysiological symptoms and aspartame: What is the connection?. *Nutritional neuroscience*, 21(5), 306–316.
- Choudhary, A. K., & Lee, Y. Y. (2018). The debate over neurotransmitter interaction in aspartame usage. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 56, 7–15.
- Chung, C., Boterberg, T., Lucas, J., Panoff, J., Valteau-Couanet, D., Hero, B., Bagatell, R., & Hill-Kayser, C. E. (2021). Neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer*, 68 Suppl 2(Suppl 2), e28473.
- Cohn, S. L., Pearson, A. D., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., Matthay, K. K., & INRG Task Force (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 289–297.
- Currò, M., Arena, S., Montalto, A. S., Perrone, P., Di Fabrizio, D., Bertuccio, M. P., Mazzeo, C., Caccamo, D., Ientile, R., Romeo, C., & Impellizzeri, P. (2022). CO₂ pneumoperitoneum effects on proliferation and apoptosis in two different neuroblastoma cell lines. *Pediatric surgery international*, 38(3), 457–464.
- Çeçen, R. E. (2013). Çocukluk Çağı Lenfoma ve Malign Solid Tümörlerinde Tanı Süreleri (Yandal Uzmanlık Tezi), Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), e1600200.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and

nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19345–19350.

Debras, C., Chazelas, E., Srour, B., Druésne-Pecollo, N., Esseddik, Y., Szabo de Edelenyi, F., Agaësse, C., De Sa, A., Lutchia, R., Gigandet, S., Huybrechts, I., Julia, C., Kesse-Guyot, E., Allès, B., Andreeva, V. A., Galan, P., Hercberg, S., Deschasaux-Tanguy, M., & Touvier, M. (2022). Artificial sweeteners and cancer risk: Results from the NutriNet-Santé population-based cohort study. *PLoS medicine*, 19(3), e1003950.

De la Hunty, A., Gibson, S., & Ashwell, M. (2006). A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control. *Nutrition Bulletin*, 31(2), 115-128.

de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet. Global health*, 8(2), e180–e190.

de Moura Escobar, S. J., Simone, M., Martin, N., de Oliveira Ribeiro, C. A., Martinez, G. R., Winnischofer, S. M. B., Witting, P. K., & Rocha, M. E. M. (2019). Cytotoxic effects of 4'-hydroxychalcone on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 61, 104640.

DePeaux, K., & Delgoffe, G. M. (2021). Metabolic barriers to cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 21(12), 785–797.

de Ruyter, J. C., Olthof, M. R., Seidell, J. C., & Katan, M. B. (2012). A trial of sugar-free or sugar-sweetened beverages and body weight in children. *The New England journal of medicine*, 367(15), 1397–1406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203034>

Drewnowski A. (1999). Intense sweeteners and energy density of foods: implications for weight control. *European journal of clinical nutrition*, 53(10), 757–763.

Drewnowski, A., Mennella, J. A., Johnson, S. L., & Bellisle, F. (2012). Sweetness and food preference. *The Journal of nutrition*, 142(6), 1142S-1148S.

EAGLE H. (1955). The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *The Journal of experimental medicine*, 102(5), 595–600.

- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research*, 64(11), 3892–3899.
- Fry, J. C. (2012). Natural low-calorie sweeteners. In *Natural food additives, ingredients and flavourings* (pp. 41-75). Woodhead Publishing.
- Filbin, M., & Monje, M. (2019). Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. *Nature medicine*, 25(3), 367–376.
- Garriga, M. M. & Metcalfe, D. D. (1988). Aspartame intolerance. *Annals of allergy*, 61(6 Pt 2), 63–69.
- Gasmalla, M. A. A., Yang, R., & Hua, X. (2014). Stevia rebaudiana Bertoni: An alternative sugar replacer and its application in food industry. *Food Engineering Reviews*, 6, 150-162.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., & Dang, C. V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762–765.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Ercin, M., Sancar, S., Celik, E., Koyuturk, M., Bolkent, S., & Bolkent, S. (2021). Aspartame induces cancer stem cell enrichment through p21, NICD and GLI1 in human PANC-1 pancreas adenocarcinoma cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 153, 112264.
- Ghosh, S., & Sudha, M. L. (2012). A review on polyols: new frontiers for health-based bakery products. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(3), 372-379.
- Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *International journal of oncology*, 39(2), 453–463.
- Grembecka, M. (2015). Natural sweeteners in a human diet. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 66(3).

- Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, 241, 1-14.
- Griebsch, L. V., Theiss, E. L., Janitschke, D., Erhardt, V. K. J., Erhardt, T., Haas, E. C., Kuppler, K. N., Radermacher, J., Walzer, O., Lauer, A. A., Matschke, V., Hartmann, T., Grimm, M. O. W., & Grimm, H. S. (2023). Aspartame and Its Metabolites Cause Oxidative Stress and Mitochondrial and Lipid Alterations in SH-SY5Y Cells. *Nutrients*, 15(6), 1467.
- Grotz, V. L., Henry, R. R., McGill, J. B., Prince, M. J., Shamoan, H., Trout, J. R., & Pi-Sunyer, F. X. (2003). Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(12), 1607–1612.
- Gurney, J. G., Pogoda, J. M., Holly, E. A., Hecht, S. S., & Preston-Martin, S. (1997). Aspartame consumption in relation to childhood brain tumor risk: results from a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(14), 1072-1074.
- Hanafy, D. M., Prenzler, P. D., Burrows, G. E., Gurusinghe, S., Thejer, B. M., Obied, H. K., & Hill, R. A. (2020). Neuroprotective Activity of Mentha Species on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Nutrients*, 12(5), 1366.
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer cell*, 38(2), 167–197.
- Hausman D. M. (2019). What Is Cancer?. *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778–784.
- He, D., Fu, S., Zhou, A., Su, Y., Gao, X., Zhang, Y., Huang, B., Du, J., & Liu, D. (2021). Camptothecin Regulates Microglia Polarization and Exerts Neuroprotective Effects via Activating AKT/Nrf2/HO-1 and Inhibiting NF- κ B Pathways In Vivo and In Vitro. *Frontiers in immunology*, 12, 619761.
- Helenius, I. T., Madala, H. R., & Yeh, J. J. (2021). An Asp to Strike Out Cancer? Therapeutic Possibilities Arising from Aspartate's Emerging Roles in Cell Proliferation and Survival. *Biomolecules*, 11(11), 1666.

- Higgins, K. A., & Mattes, R. D. (2019). A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 109(5), 1288–1301.
- Huang, Q., Murphy, J., Smith, E. R., & Sylvetsky, A. C. (2021). Diet Beverage Intake during Lactation and Associations with Infant Outcomes in the Infant Feeding Practices Study II. *Nutrients*, 13(9), 3154.
- Humphries, P., Pretorius, E., & Naude, H. (2008). Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European journal of clinical nutrition*, 62(4), 451-462.
- Ibrahim, E. M., Al-Foheidi, M. H., & Al-Mansour, M. M. (2021). Energy and caloric restriction, and fasting and cancer: a narrative review. *Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 29(5), 2299–2304.
- İşgören, A., & Sungur, S. (2019). Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific*, 3(1), 19-33.
- Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., & Delattre, O. (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 967–970.
- Kaatsch, P. (2010). Epidemiology of childhood cancer. *Cancer treatment reviews*, 36(4), 277-285.
- Kattner, P., Strobel, H., Khoshnevis, N., Grunert, M., Bartholomae, S., Pruss, M., Fitzel, R., Halatsch, M. E., Schilberg, K., Siegelin, M. D., Peraud, A., Karpel-Massler, G., Westhoff, M. A., & Debatin, K. M. (2019). Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer metastasis reviews*, 38(4), 673–682.
- Kim, J. E., Park, H., & Kang, T. C. (2020). CDDO-Me Distinctly Regulates Regional Specific Astroglial Responses to Status Epilepticus via ERK1/2-Nrf2, PTEN-PI3K-AKT and NFκB Signaling Pathways. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1026.

- Kim, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2020). Consumption of a Beverage Containing Aspartame and Acesulfame K for Two Weeks Does Not Adversely Influence Glucose Metabolism in Adult Males and Females: A Randomized Crossover Study. *International journal of environmental research and public health*, 17(23), 9049.
- Kruger, J., Galuska, D. A., Serdula, M. K., & Jones, D. A. (2004). Attempting to lose weight: specific practices among U.S. adults. *American journal of preventive medicine*, 26(5), 402–406.
- Kumps, C., Fieuw, A., Mestdagh, P., Menten, B., Lefever, S., Pattyn, F., De Brouwer, S., Sante, T., Schulte, J. H., Schramm, A., Van Roy, N., Van Maerken, T., Noguera, R., Combaret, V., Devalck, C., Westermann, F., Laureys, G., Eggert, A., Vandesompele, J., De Preter, K., ... Speleman, F. (2013). Focal DNA copy number changes in neuroblastoma target MYCN regulated genes. *PloS one*, 8(1), e52321.
- Küçükkeleş, H. (2010) Çocukluk Çağı Lenfoma ve Solid Tümörlü Hastalarımızın Epidemiyolojik Özellikleri (Uzmanlık Tezi) Selçuk Üniversitesi, Konya
- Landrigan, P. J., & Straif, K. (2021). Aspartame and cancer - new evidence for causation. *Environmental health: a global access science source*, 20(1), 42.
- Lange, F. T., Scheurer, M., & Brauch, H. J. (2012). Artificial sweeteners--a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(9), 2503–2518.
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group (2016). Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *The New England journal of medicine*, 375(8), 794–798.
- He, D., Fu, S., Zhou, A., Su, Y., Gao, X., Zhang, Y., Huang, B., Du, J., & Liu, D. (2021). Camptothecin Regulates Microglia Polarization and Exerts Neuroprotective Effects via Activating AKT/Nrf2/HO-1 and Inhibiting NF- κ B Pathways In Vivo and In Vitro. *Frontiers in immunology*, 12, 619761.

- Li, Z., Gao, Y., Nakanishi, H., Gao, X., & Cai, L. (2013). Biosynthesis of rare hexoses using microorganisms and related enzymes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9(1), 2434-2445.
- Liu, Y., Shang, G., Zhang, X., Liu, F., Zhang, C., Li, Z., Jia, J., Xu, Y., Zhang, Z., Yang, S., Zhou, B., Luan, Y., Huang, Y., Peng, Y., Han, T., He, Y., & Zheng, H. (2022). CAMTA1 gene affects the ischemia-reperfusion injury by regulating CCND1. *Frontiers in cellular neuroscience*, 16, 868291.
- Liu, Y., Zhang, A., Bao, P. P., Lin, L., Wang, Y., Wu, H., Shu, X. O., Liu, A., & Cai, Q. (2021). MicroRNA-374b inhibits breast cancer progression through regulating CCND1 and TGFA genes. *Carcinogenesis*, 42(4), 528–536.
- Lindseth, G. N., Coolahan, S. E., Petros, T. V., & Lindseth, P. D. (2014). Neurobehavioral effects of aspartame consumption. *Research in nursing & health*, 37(3), 185-193.
- Livesey, G. (2003). Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition research reviews*, 16(2), 163–191.
- Lundberg, K. I., Treis, D., & Johnsen, J. I. (2022). Neuroblastoma Heterogeneity, Plasticity, and Emerging Therapies. *Current oncology reports*, 24(8), 1053–1062.
- Maersk, M., Belza, A., Stødkilde-Jørgensen, H., Ringgaard, S., Chabanova, E., Thomsen, H., Pedersen, S. B., Astrup, A., & Richelsen, B. (2012). Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *The American journal of clinical nutrition*, 95(2), 283–289.
- Magnuson, B. A., Burdock, G. A., Doull, J., Kroes, R. M., Marsh, G. M., Pariza, M. W., Spencer, P. S., Waddell, W. J., Walker, R., & Williams, G. M. (2007). Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Critical reviews in toxicology*, 37(8), 629–727.
- Magnuson, B. A., Carakostas, M. C., Moore, N. H., Poulos, S. P., & Renwick, A. G. (2016). Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition reviews*, 74(11), 670–689.

- Maris, J. M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*, 362(23), 2202–2211.
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16078.
- Mathew H, G., Darren M, S., Jason A, S., Melanie C, H., & Kimberly S, G. (2009). Attention and reaction time in university students following the consumption of red bull®. *The Open Nutrition Journal*, 3(1).
- Mooradian, A. D., Smith, M., & Tokuda, M. (2017). The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical nutrition ESPEN*, 18, 1–8.
- Mora, M. R., & Dando, R. (2021). The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(2), 1554–1583.
- Moran, A. W., Al-Rammahi, M. A., Arora, D. K., Batchelor, D. J., Coulter, E. A., Daly, K., ... & Shirazi-Beechey, S. P. (2010). Expression of Na⁺/glucose co-transporter 1 (SGLT1) is enhanced by supplementation of the diet of weaning piglets with artificial sweeteners. *British Journal of Nutrition*, 104(5), 637-646.
- Moriconi, E., Feraco, A., Marzolla, V., Infante, M., Lombardo, M., Fabbri, A., & Caprio, M. (2020). Neuroendocrine and Metabolic Effects of Low-Calorie and Non-Calorie Sweeteners. *Frontiers in endocrinology*, 11, 444.
- Molenaar, J. J., Domingo-Fernández, R., Ebus, M. E., Lindner, S., Koster, J., Drabek, K., Mestdagh, P., van Sluis, P., Valentijn, L. J., van Nes, J., Broekmans, M., Haneveld, F., Volckmann, R., Bray, I., Heukamp, L., Sprüssel, A., Thor, T., Kieckbusch, K., Klein-Hitpass, L., Fischer, M., ... Schulte, J. H. (2012). LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nature genetics*, 44(11), 1199–1206.
- Muir, A., & Vander Heiden, M. G. (2018). The nutrient environment affects therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6392), 962–963.

- Nie, M., Wang, Y., Yu, Z., Li, X., Deng, Y., Wang, Y., Yang, D., Li, Q., Zeng, X., Ju, J., Liu, M., & Zhao, Q. (2020). AURKB promotes gastric cancer progression via activation of CCND1 expression. *Aging*, 12(2), 1304–1321.
- Normand, M., Ritz, C., Mela, D., & Raben, A. (2021). Low-energy sweeteners and body weight: a citation network analysis. *BMJ nutrition, prevention & health*, 4(1), 319–332.
- Pang, M. D., Goossens, G. H., & Blaak, E. E. (2021). The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Frontiers in nutrition*, 7, 598340.
- Palmnäs, M. S., Cowan, T. E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R. A., Vogel, H. J., ... & Shearer, J. (2014). Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PloS one*, 9(10), e109841.
- Park, J. H., Pyun, W. Y., & Park, H. W. (2020). Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*, 9(10), 2308.
- Park, J. R., Eggert, A., & Caron, H. (2010). Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematology/oncology clinics of North America*, 24(1), 65–86.
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*, 23(1), 27–47.
- Perry, R. J., Wang, Y., Cline, G. W., Rabin-Court, A., Song, J. D., Dufour, S., ... & Shulman, G. I. (2018). Leptin mediates a glucose-fatty acid cycle to maintain glucose homeostasis in starvation. *Cell*, 172(1-2), 234-248.
- Priya, K., Gupta, V. R. M., & Srikanth, K. (2011). Natural sweeteners: A complete review. *Journal of Pharmacy Research*, 4(7), 2034-2039.
- Qi, X., & Tester, R. F. (2019). Fructose, galactose and glucose - In health and disease. *Clinical nutrition ESPEN*, 33, 18–28.
- Renwick, A. G., & Nordmann, H. (2007). First European conference on aspartame: putting safety and benefits into perspective. Synopsis of presentations and conclusions. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(7), 1308–1313.

- Roberts, A. W., Wei, A. H., & Huang, D. C. S. (2021). BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies. *Blood*, 138(13), 1120–1136.
- Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C. A., Brito-Córdova, G. X., Gómez Díaz, R. A., Vilchis Valentín, D., & Almeda-Valdes, P. (2016). Effects of the non-nutritive sweeteners on glucose metabolism and appetite regulating hormones: systematic review of observational prospective studies and clinical trials. *PloS one*, 11(8), e0161264.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M. (2013). Handbook of pharmaceutical excipients – 7th edition. *Pharm Dev Technol.* 18:544.
- Sanati, P., Chua, L. S., Nasiri, R., & Hashemi, S. S. (2020). Nanoencapsulation of Andrographolide Rich Extract for the Inhibition of Cervical and Neuroblastoma Cancer Cells. *Journal of biomedical nanotechnology*, 16(9), 1370–1380.
- Saraiva, A., Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., & Raposo, A. (2020). Natural Sweeteners: The Relevance of Food Naturalness for Consumers, Food Security Aspects, Sustainability and Health Impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6285.
- Scotting, P. J., Walker, D. A., & Perilongo, G. (2005). Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nature reviews. Cancer*, 5(6), 481–488.
- Schmidt, D. R., Patel, R., Kirsch, D. G., Lewis, C. A., Vander Heiden, M. G., & Locasale, J. W. (2021). Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(4), 333–358.
- Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., & Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine*, 313(18), 1111–1116.
- Sharma, A., Amarnath, S., Thulasimani, M., & Ramaswamy, S. (2016). Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe?. *Indian journal of pharmacology*, 48(3), 237–240.

- Shankar, P., Ahuja, S., & Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 29(11-12), 1293–1299.
- Siegler, J., Howell, K., Vince, R., Bray, J., Towlson, C., Peart, D., Mellor, D., & Atkin, S. (2012). Aspartame in conjunction with carbohydrate reduces insulin levels during endurance exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), 36.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90(3), 927–963.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., ... & Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521), 181-186.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Sullivan, L. B., Gui, D. Y., Hosios, A. M., Bush, L. N., Freinkman, E., & Vander Heiden, M. G. (2015). Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*, 162(3), 552–563.
- Sünram-Lea, S. I., Foster, J. K., Durlach, P., & Perez, C. (2002). Investigation into the significance of task difficulty and divided allocation of resources on the glucose memory facilitation effect. *Psychopharmacology*, 160(4), 387–397.
- Soerjomataram, I., & Bray, F. (2021). Planning for tomorrow: Global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(10), 663-672.

- Świąder, K., Wegner, K., Piotrowska, A., Tan, F. J., & Sadowska, A. (2019). Plants as a source of natural high-intensity sweeteners: A review. *J Appl Bot Food Qual*, 92, 160-171.
- Temizkan, S., Deyneli, O., Yasar, M., Arpa, M., Gunes, M., Yazici, D., Sirikci, O., Haklar, G., Imeryuz, N., & Yavuz, D. G. (2015). Sucralose enhances GLP-1 release and lowers blood glucose in the presence of carbohydrate in healthy subjects but not in patients with type 2 diabetes. *European journal of clinical nutrition*, 69(2), 162–166.
- Tomolonis, J. A., Agarwal, S., & Shoheit, J. M. (2018). Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell and tissue research*, 372(2), 245–262.
- Uebanso, T., Ohnishi, A., Kitayama, R., Yoshimoto, A., Nakahashi, M., Shimohata, T., Mawatari, K., & Takahashi, A. (2017). Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice. *Nutrients*, 9(6), 560.
- Vasan, K., Werner, M., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial metabolism as a target for cancer therapy. *Cell metabolism*, 32(3), 341-352.
- Végran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., & Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer research*, 71(7), 2550–2560.
- Walbolt, J., & Koh, Y. (2020). Non-nutritive Sweeteners and Their Associations with Obesity and Type 2 Diabetes. *Journal of obesity & metabolic syndrome*, 29(2), 114–123.
- Waldhart, A. N., Dykstra, H., Peck, A. S., Boguslawski, E. A., Madaj, Z. B., Wen, J., Veldkamp, K., Hollowell, M., Zheng, B., Cantley, L. C., McGraw, T. E., & Wu, N. (2017). Phosphorylation of TXNIP by AKT Mediates Acute Influx of Glucose in Response to Insulin. *Cell reports*, 19(10), 2005–2013.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology*, 8(6), 519–530.
- Wellen, K. E., Lu, C., Mancuso, A., Lemons, J. M., Ryczko, M., Dennis, J. W., Rabinowitz, J. D., Collier, H. A., & Thompson, C. B. (2010). The hexosamine

biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes & development*, 24(24), 2784–2799.

Wensveen, F. M., Šestan, M., Turk Wensveen, T., & Polić, B. (2021). Blood glucose regulation in context of infection. *Vitamins and hormones*, 117, 253–318.

Weihrauch, M. R., & Diehl, V. (2004). Artificial sweeteners--do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 15(10), 1460–1465.

Wharton, S., Lau, D. C. W., Vallis, M., Sharma, A. M., Biertho, L., Campbell-Scherer, D., Adamo, K., Alberga, A., Bell, R., Boulé, N., Boyling, E., Brown, J., Calam, B., Clarke, C., Crowshoe, L., Divalentino, D., Forhan, M., Freedhoff, Y., Gagner, M., Glazer, S., ... Wicklum, S. (2020). Obesity in adults: a clinical practice guideline. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 192(31), E875–E891.

Wieman, H. L., Wofford, J. A., & Rathmell, J. C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Molecular biology of the cell*, 18(4), 1437–1446.

Wikoff, D. S., Chappell, G. A., Fitch, S., Doepker, C. L., & Borghoff, S. J. (2020). Lack of potential carcinogenicity for aspartame—systematic evaluation and integration of mechanistic data into the totality of the evidence. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110866.

Williams, K. J., & Wu, X. (2016). Imbalanced insulin action in chronic over nutrition: clinical harm, molecular mechanisms, and a way forward. *Atherosclerosis*, 247, 225-282

Wilk, K., Korytek, W., Pelczyńska, M., Moszak, M., & Bogdański, P. (2022). The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review. *Nutrients*, 14(6), 1261.

Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S. B., & Thompson, C. B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(48), 18782–18787.

- Xian, M., , Cai, J., , Zheng, K., , Liu, Q., , Liu, Y., , Lin, H., , Liang, S., , & Wang, S., (2021). Aloe-emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathway. *Food & function*, 12(17), 8056–8067.
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J. H., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., Chang, J., ... DePinho, R. A. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656–670.
- Yin, R., Qiu, C., Shen, Q., & Wang, Z. (2022). Corin is regulated by circ-0012397/miR-200a-3p and inhibits the oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis of SHSY5Y neuroblastoma cells. *Annals of translational medicine*, 10(22), 1242.
- Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 246(16), 1791–1801.
- Yunker, A. G., Alves, J. M., Luo, S., Angelo, B., DeFendis, A., Pickering, T. A., Monterosso, J. R., & Page, K. A. (2021). Obesity and Sex-Related Associations With Differential Effects of Sucralose vs Sucrose on Appetite and Reward Processing: A Randomized Crossover Trial. *JAMA network open*, 4(9), e2126313.
- Zafar, A., Wang, W., Liu, G., Wang, X., Xian, W., McKeon, F., Foster, J., Zhou, J., & Zhang, R. (2021). Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Medicinal research reviews*, 41(2), 961–1021.
- Zhong, Z. G., Dong, C. P., Guo, X. H., Chen, J., Zhu, L. P., & Zhang, M. (2022). Long noncoding RNA ANRIL up-regulates CCND1 via sponging miR-98-5p to promote TGF- β 1-induced human airway smooth muscle cell proliferation, migration, and extracellular matrix deposition. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 38(7), 633–642.



SEKİZİNCİ BÖLÜM ÖZGEÇMİŞ

Aysel ŞEN

EĞİTİM BİLGİLERİ

- **Yüksek Lisans:** Sabahattin Zaim Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, 2021-2023, İstanbul.
- **Lisans:** Sağlık Bilimleri Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 2017-2021, İstanbul.