

**Karaciğer kanseri kök hücre ksenograft modelinde sitotoksik aktiviteli yeni ilaç adaylarının etkilerinin belirlenmesi**

**Program kodu: 2515**

**Proje No: 113S540**

Proje yürütücüsü:  
**Doç. Dr. Rengül Çetin Atalay**

**Proje Bursiyeri**  
Deniz Cansen Kahraman

ŞUBAT 2017  
ANKARA

## ÖNSÖZ

Karaciğer kanseri, karaciğer hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanan ve heterojen bir yapıya sahip olan karmaşık bir hastalıktır. Karaciğer kanseri hücreleri, ek popülasyon olarak bilinen ve kök hücre özelliği taşıyan hücreler içermektedir. Hastaların kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmesinin veya kanserin nüksetmesinin altında yatan sebeplerden en önemlileri PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının hiperaktif olması ve kanser kök hücrelerinin dokuda varlığını sürdürerek tek başına tümör gelişimini sağlayabilmeleridir.

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu proje kapsamında karaciğer kanserinin kemoterapötik tedavisinin daha etkili olması amacıyla karaciğer kanseri hücre hatlarında kanser kök hücrelerine karşı PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı inhibitörleri yanı sıra klinikte kullanılan Sorafenib, Kamtotesin ve Doksorubisin gibi kemoterapötiklerin etkileri belirlenmiş ve sunulmuştur.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ .....	iv
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>2</b>
<b>3. YÖNTEM .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1</b> NCI-SRB yöntemi kullanılarak inhibitörlerin HSK hücreleri üzerindeki öldürücü etkilerinin belirlenmesi .....	<b>6</b>
<b>3.2</b> Manyetik Hücre Ayırma Tekniği ile kanser kök hücre popülasyonunun heterojen popülasyondan ayrılması .....	<b>6</b>
<b>3.3</b> Heterojen popülasyondan ayrılan hücrelerin fonksiyonel testlerinin gerçekleştirilmesi .....	<b>7</b>
<b>3.3.1</b> Akış sitometrisi ile kök hücrelerde ifade edildiği bilinen proteinlerin seviyelerinin belirlenmesi .....	<b>7</b>
<b>3.3.2</b> Kanser kök hücre tümör topaklanması (hepatosfer) oluşumu deneyleri .....	<b>8</b>
<b>3.4</b> Akış sitometrisi yöntemi kullanılarak inhibitörlerin kanser kök hücre belirteçlerine olan etkisinin belirlenmesi .....	<b>8</b>
<b>3.5</b> Kanser kök hücrelere karşı etkili inhibitörlerin Sorafenib ile kombinasyon veya sıralı halde uygulanması sonucu oluşan etkilerinin belirlenmesi .....	<b>9</b>
<b>3.6</b> Tüysüz farede hollow fibre implantasyon deneyleri ile in vitro olarak etkisi belirlenmiş inhibitörlerin etkilerini in vivo olarak belirlenmesi .....	<b>9</b>
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1</b> PI3K/Akt sinyal yolu inhibitörlerinin, aday kinaz inhibitörlerinin ve klinikte kullanılan kemoterapötiklerin HSK hücreleri üzerindeki etkileri .....	<b>11</b>
<b>4.2</b> Manyetik seri hücre ayırma tekniği (Multisort) ile ayrılan CD133+/EpCAM+ hücrelerin sağlığının belirlenmesi .....	<b>11</b>

<b>4.3</b> CD133-/EpCAM- ve CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının kök hücre fonksiyonel deneyleri ile karşılaştırılması.....	<b>13</b>
<b>4.3.1</b> Bilinen kök hücre proteinlerinin ifadesinin karşılaştırması .....	<b>13</b>
<b>4.3.2</b> Sfer oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi .....	<b>14</b>
<b>4.4</b> Akış sitometrisi analizi ile inhibitörlerin CD133+/EpCAM+ popülasyonlarında etkilerinin belirlenmesi .....	<b>15</b>
<b>4.5</b> Kanser kök hücreler üzerinde etkisi anlamlı bulunan inhibitörlerin mezenkimal özellikli HSK hücre hatlarının CD90 ve CD44 popülasyonlarına olan etkilerinin belirlenmesi .....	<b>20</b>
<b>4.6</b> Aday inhibitörler arasından etkin olduğu belirlenenler ile kombinasyon deneyleri .....	<b>22</b>
<b>4.7</b> Kanser kök hücrelerine karşı etkili olduğu belirlenen inhibitörlerin hücrelerin sfer oluşturma kapasitesine olan etkilerinin belirlenmesi .....	<b>25</b>
<b>4.8</b> Hollow fibre impantasyon deneyleri ile etkinliği in vitro olarak gösterilmiş inhibitörlerin tüysüz farede (in vivo) test edilmesi .....	<b>27</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>32</b>
<b>KAYNAKLAR LİSTESİ</b> .....	<b>35</b>

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

<b>Tablo 1:</b> Güncel, kabul edilen karaciğer kanseri kök hücresi belirteçleri .....	<b>4</b>
<b>Tablo 2:</b> Sfer oluşturma deneyi için kullanılan besi yeri içeriği .....	<b>8</b>
<b>Tablo 3:</b> HSK hücreleri üzerindeki etkileri belirlenen inhibitörler, etki mekanizmaları ve etkili konsantrasyonları .....	<b>11</b>
<b>Tablo 4:</b> Hollow fibre deneylerinde hazırlanan hücre grupları ve implantasyon sonrasında yapılan ilaç muameleleri .....	<b>30</b>
<b>Şekil 1:</b> Hepatokarsinogenez sürecinde kronik inflamasyon ve kanser kök hücre gelişimi .....	<b>3</b>
<b>Şekil 2:</b> Huh7 hücre hattı için seri-manyetik ayırma yönteminin uygulanması sonucu elde edilen akış sitometri analizi sonuçları (yoğunluk grafiği) .....	<b>12</b>
<b>Şekil 3:</b> Huh7 ve Hep3B hücrelerinden izole edilen CD133+/EpCAM+ ve CD133-/EpCAM- popülasyonlarındaki OCT4 ve Nanog proteinleri ifadelerinin akış sitometrisi ile belirlenmesi .....	<b>13</b>
<b>Şekil 4:</b> Huh7 ve Hep3B hücreleri ve bu hücrelerden elde edilen CD133+/EpCAM+ popülasyonları ile yapılan sfer oluşturma deneyi sonuçları .....	<b>14</b>
<b>Şekil 5:</b> Huh7 ve Hep3B hücrelerinden izole edilen ve CD133+/EpCAM+ ve CD133-/EpCAM- popülasyonları ile yapılan sfer oluşturma deneyi sonuçları .....	<b>15</b>
<b>Şekil 6:</b> Huh7 hücrelerinde CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra floresan akış sitometrisi ile yapılan analiz sonuçları .....	<b>16</b>
<b>Şekil 7:</b> Hep3B hücrelerinde CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra floresan akış sitometrisinde yapılan analiz sonuçları .....	<b>17</b>
<b>Şekil 8:</b> Huh7 ve Hep3B hücre hatları üzerinde pozitif kontrol inhibitörü DAPT'ın etkisinin DMSO kontrolü ve Sorafenib'in etkileri ile karşılaştırılması .....	<b>18</b>
<b>Şekil 9:</b> Huh7 ve Hep3B hücrelerinde CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra floresan akış sitometrisi analizi .....	<b>19</b>
<b>Şekil 10:</b> Mahlavu hücre hattının belirlenen inhibitörler ile muamele sonrasında CD90 ifade değişimleri .....	<b>21</b>

<b>Şekil 11:</b> SNU475 hücre hattının belirlenen inhibitörler ile muamele sonrasında CD90 ve CD44 ifade değişimleri .....	<b>22</b>
<b>Şekil 12:</b> Huh7 hücreleri üzerinde kombinasyon deneyleri için belirlenen ilk strateji ile elde edilen akış sitometrisi sonuçları .....	<b>23</b>
<b>Şekil 13:</b> Huh7 ve Hep3B hücreleri üzerinde kombinasyon deneyleri için belirlenen ikinci strateji ile elde edilen akış sitometrisi sonuçları .....	<b>24</b>
<b>Şekil 14:</b> Seçilen inhibitörler ile belirtilen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda muamele edilen Huh7 hücrelerinin sfer oluşturma kapasiteleri (sfer sayıları) .....	<b>26</b>
<b>Şekil 15:</b> Seçilen inhibitörler ile belirtilen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda muamele edilen Huh7 hücrelerinin sfer oluşturma kapasiteleri (sfer boyutları) .....	<b>26</b>
<b>Şekil 16:</b> Seçilen inhibitörler ile belirtilen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda muamele edilen Huh7 hücrelerinin oluşturduğu sferlerin temsili görüntüleri .....	<b>27</b>
<b>Şekil 17:</b> Subkutan Hollow fibre implantasyonu yapılmış tüysüz erkek fare örneği .....	<b>28</b>
<b>Şekil 18:</b> Hollow fibre implantasyon deneyleri için optimizasyon çalışmaları .....	<b>29</b>
<b>Şekil 19:</b> Hollow fibre deneyleri sonucunda hücrelerin kanser kök hücre belirteçleri için pozitivite değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi grafiği .....	<b>30</b>

## ÖZET

Primer karaciğer kanseri (Hepatoselüler kanser, HSK) Dünya sağlık örgütü verilerine göre altıncı en sık görülen ve diğer kanser türleri arasında ölümcül olan ikinci kanser türüdür. Karaciğer kanserinin histolojik yapısı oldukça heterojendir. Sıklıkla siroz zemininde oluşan karaciğer kanseri, hepatik öncü hücre (Hepatic Progenitor Cells HPC) olarak adlandırılan hücrelerden kaynaklanmaktadır. Kök hücre belirteçlerini ve özelliklerini taşıyan bu hücreler, kronik hepatit ve siroz sürecinde uzun süreli hasara uğramış karaciğer hücrelerini yenilemek amacıyla çoğalmaya başlarlar. Ancak bu süreçte hepatik öncü hücreler, viral karaciğer hastalıkları nedeniyle veya diğer genotoksik streslerden (örn. HBV, aflatoksinler) hasarlandıkları için transforme olmuşlardır. Bu nedenle de bir grup hepatik öncü hücrenin kanser kök hücre davranışını gösterdikleri tespit edilmiştir ve bu hücreler “yan hücre popülasyonu” olarak tanımlanmıştır.

Bu projenin amacı, karaciğer kanseri hücre hatlarında kanser kök hücrelerine karşı *in vitro* ve *in vivo* etkili ilaç adaylarını belirlemektir. Seçilen 2 iyi huylu ve 2 kötü huylu karaciğer kanseri hücre hatları, PI3K/Akt kinaz sinyal yolu inhibitörlerini de içeren inhibitör kütüphanesinden sitotoksik aktiviteli ilaç adayları ve yanısıra, Sorafenib, kamptotesin, doksorubisin, ile muamele edilerek, akış sitometrisi ile kanser kök hücre özelliği taşıyan hücreler (CD133+/EpCAM+ veya CD90+, CD44+) üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Sonrasında, Sorafenib gibi hastalarda kanser kök hücre zenginleşmesine bağlı dirence sebep olan ilaçların etkilerini elimine etmek için seçilen inhibitörler ile kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmaların *in vivo* olarak tanımlanması amacıyla, tüsüz farede hollow fibre implantasyon tekniği uygulanmıştır.

Hem kendi çalışmalarımız, hem de literatürdeki diğer çalışmalar dikkate alındığında PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibitörlerinin anti-kanser tedavisindeki potansiyel rolü görülmüş ve doğru kombinasyonlarla Sorafenib`in anti-kanser etkisini arttırdığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kanser kök hücresi, hepatoselüler kanser, Sorafenib, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı

## ABSTRACT

Primary liver cancer, hepatocellular carcinoma (HCC), is the second most common cause of mortality and the fifth most common malignancy in human cancers. The histological structure of liver cancer is very heterogeneous. It is reported that liver cancer cells originates from hepatic progenitor cell (HPC) during long term cirrhosis. These cells carry stem cell markers and they multiply in order to renew the long term damaged liver cells. However, during chronic liver disease due to viral liver diseases or genotoxic stresses (e.g. aflatoxins), HPCs are damaged and transformed. Therefore, some parts of the HPCs acquire cancer stem cell behavior. These cells are defined as the “side population” cells.

In this project, we aimed to identify effective inhibitors (drugs) against liver cancer stem cells in vitro and in vivo. We used 4 different HCC cell lines (2 benign, 2 malignant) and tested the effect of a group of inhibitors composed of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors, Sorafenib, DNA intercalators (Doxorubicin and Camptothecin) on liver cancer stem cells (CD133+/EpCAM+) through fluorescence labeling and flow cytometric analysis. Furthermore, we have explored the potential use of combinatorial treatments against cancer stem cells together with Sorafenib, to which the HCC patients are known to acquire resistance. In order to confirm the in vitro data, in vivo experiments were performed using hollow fibre implantation technique on nude mice.

When both our studies and the literature is considered, it appears that PI3K/AKT/mTOR kinase inhibitors have crucial role in cancer therapy and that efficient combinations of these inhibitors with Sorafenib in clinics would enhance its anti-cancer effect.

**Keywords:** Cancer stem cell, Hepatocellular carcinoma, Sorafenib, PI3K/AKT/mTOR pathway

## 1. GİRİŞ

Karaciğer kanseri (HSK) dünyada en sık görülen 6 kanserden biridir ve oldukça ölümcül bir hastalıktır. HSK'nın oluşumuna sebep olan faktörler arasında hepatit B veya C enfeksiyonları, alkol alımı ve de obezite yer almaktadır. Bu faktörlere bağlı olarak, hastalarda kanser oluşumu öncesinde siroz veya kronik viral hastalıklar gelişmektedir. Bu süreç içerisinde karaciğerde meydana gelen hasarın önlenmesi için normal karaciğer hücreleri farklılaşıp sürekli olarak kendini yenileme ve çoğalma sinyalleri aldıkları için zamanla kanser kök hücrelerine dönüştükleri ortaya konmuştur. Bu sayede kanser kök hücreleri tümör oluşumunu kendi başına sağlayabilir. Bu hücreler hastaların tedaviye direnç kazanmasından ve metastazından sorumlu olduğu için, sadece tümör hücrelerini öldürebilen kemoterapötikler tedavilerde başarıya ulaşamamaktadır. Örneğin, HSK için FDA tarafından onaylanmış tek ilaç olan Sorafenib'e, doksorubisin, 5-FU veya kamtotesin gibi DNA hasarına yol açan kemoterapötiklere karşı, hastaların bir süre sonra direnç gösterdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, karaciğer kanserinde oldukça hiperaktif olarak bilinen PI3K/Akt sinyal yolağının da bu dirençliliğin gelişmesinde rol aldığı bilinmektedir. Dolayısıyla karaciğer kanseri tedavisinde tümör hücreleri yanı sıra kanser kök hücrelerini de hedef alan ilaç adaylarının keşfi oldukça önem taşımaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmamızda karaciğer kanseri hücre hatlarında bulunan kanser kök hücre popülasyonları üzerinde bir grup PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibitörlerinin etkileri *in vitro* ve *in vivo* yöntemler ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, karaciğer kanseri kök hücreleri oranı mTOR inhibitörü olan Rapamisin muamelesi sonucunda önemli ölçüde azalmakta ve bu hücreler kök hücre özelliklerini kaybetmektedir. Ancak bazı PI3K/Akt sinyal yolağı inhibitörlerinin, Sorafenib, Doksorubisin ve kamtotesin gibi klinikte kullanılan inhibitörlerin bu hücrelerin oranını arttırdığı veya değiştirmedığı gösterilmiştir. Yapılan kombinasyon çalışmalarında ise, öncelikle Rapamisin ile muamele edilip sonrasında Sorafenib'e maruz kalan hücrelerin kanser kök hücre oranının tek başına Sorafenib ile muamele edilen hücrelere göre oldukça azaldığı gösterilmiştir. Gerçekleştirilen *vivo* deneyler ile de Rapamisin'in kanser kök hücreler üzerindeki etkilerini destekleyici sonuçlar alınmıştır. Bu çalışma, karaciğer kanseri kök hücrelerine karşı etkili olabilecek ilaç adaylarının bulunması ve geliştirilmesine katkıda bulunması açısından oldukça verimli ve yol gösterici bir çalışma olmuştur. Öyle ki, HSK tedavisinde uygulanacak yöntemlerin veya ilaçların sadece kanser hücrelerini öldürme kapasitesine göre değil, kanser kök hücrelerine karşı etkili olan ilaçlar dahil edilerek belirlenmesi konusunda destekleyici bir prelinik araştırma olduğuna inanılmaktadır.

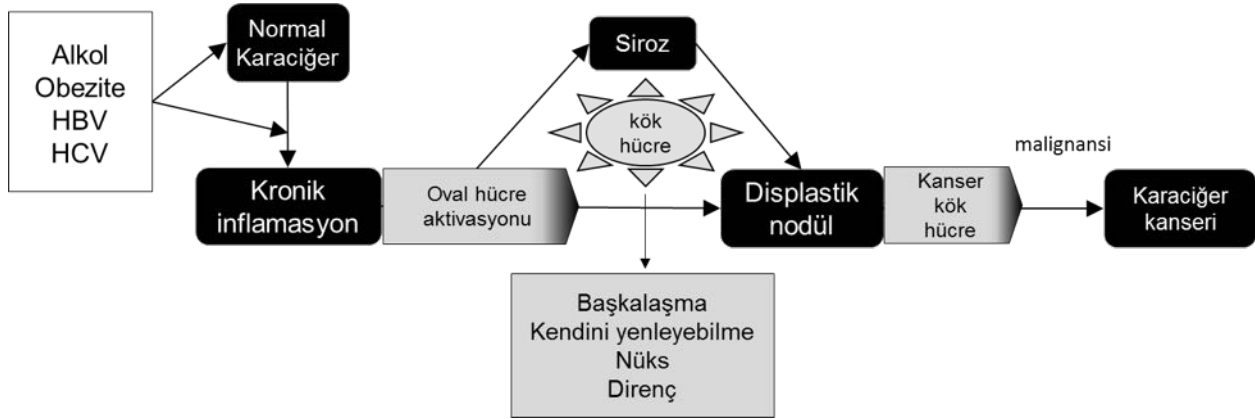
## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Primer Karaciğer kanseri (HSK) dünyada en sık görülen altı kanser arasında yer alır ve ikinci en ölümcül kanserdir (Stewart ve Wild 2014). Her yıl dünyada yaklaşık bir milyon yeni vaka ortaya çıkmaktadır. Bu vakaların önümüzdeki yıllarda HBV ve HCV enfeksiyonları sebebiyle daha da artması beklenmektedir (H B El-Serag ve Mason 1999; Hashem B. El-Serag ve Rudolph 2007). HSK'nin moleküler patogenezi henüz tam olarak tasvir edilmemiştir, fakat vakaların çoğunluğu siroza veya kronik viral enfeksiyonlara veya obeziteye (hepatit B veya C, alkol alımı, ya da genetik/metabolik hastalıklar) bağlı olarak gelişmektedir. HSK'de meydana gelen genetik değişimler, proto-onkogenlerin aktivasyonu, gen delesyonu veya mutasyonu, telomeraz aktivitesinin artması ve epigenetik değişimleri kapsamaktadır (Aravalli, Steer, ve Cressman 2008). Fakat tüm bu onkogen teorileri HSK'in gelişimini ve yayılımı mekanizmasını yeteri kadar açıklayamamıştır. Bu nedenle de klasik kemoteraplere dirençli HSK için hedefe yönelik ilaç geliştirilmesi için amaçlanacak moleküler mekanizmalar kısıtlıdır.

Çoğu kanser çeşidinde bulunduğu rapor edilen, kanser kök hücre olarak tanımlanan hücrelerin varlığının, HSK gelişiminde ve metastazında da rol aldığı gösterilmiştir. Kanser kök hücreleri normal kök hücreleri gibi kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerini taşıırken normal kök hücrelerinin aksine homeostatik kontrolleri olmayan, yani farklılaşma özelliklerini dengeleyip, çevresel sinyallere göre programlama özellikleri olmayan hücrelerdir. Kanser kök hücrelerinin başlıca üç temel özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir: i) Tümör hücrelerinin sadece azınlıkta olan bir kısmı tümörleşme potansiyeline sahiptir ; ii) Tümör oluşturu hücrelerin hücre yüzeylerinde diğer hücrelerden farklı olarak bulunan moleküllerin varlığı ile karakterize edilebilirler; ve iii) tümör oluşturabilen popülasyondan üretilen tümörlerin karışık kanser hücresi popülasyonlarına sebep verdiği dolayısıyla primer tümörün heterojen fenotipine tekrardan yaratmaktadır (Dalerba, Cho, ve Clarke 2007). Tümör hücrelerinin heterojenik yapısı, kanser ilaçlarına olan direncin gelişmesindeki en önemli sebeptir (Zhou vd. 2009). Ayrıca, kanser kök hücrelerinin DNA onarım mekanizmaları tümör hücrelerine oranla çok daha gelişmiş olması, buna ek olarak, hücre membranı üzerinde yer alan ABC transporterların sayısındaki artış sebebiyle kanser ilaçlarını dışarı atma özellikleri olması, onların kemoterapötik ilaçlara karşı dirençliliğine sebep olmaktadır (Maugeri-Sacca, Bartucci, ve De Maria 2012; Dean 2009; Dean, Fojo, ve Bates 2005).

Diğer yandan hepatokarsinogenez kronik HBV ve HCV enfeksiyonu zeminde 30 yıl gibi bir zaman alabilen çok aşamalı bir süreçtir. Hastaların çoğunda kronik hepatit ve ona eşlik eden karaciğer sirozu sonucunda kronik inflamasyon-karaciğer rejenerasyonu nedeniyle kök/hepatik-öncü hücre

aktivasyonu ve daha sonra da kanser gelişimi gözlenmektedir. Normal karaciğer kök hücreleri ya intrahepatik (oval veya hepatosit öncü hücreleri) veya ekstrahepatik (kemik iliği hücreleri) yoluyla gelişir. Bu hücrelerin aşırı ve sürekli kendini yenileme ile genetik değişiklikler geçirmiş normal karaciğer kök/öncü hücreleri özelliğini kaybederek karaciğer kanseri kök hücrelerine dönüştüğü düşünülmektedir. Karaciğer kanseri kök hücreleri hem karaciğer kanseri Hepatoselüler karsinoma (HCC) hem de kolanjiyokarsinoma (CC) kanserine köken olabilirler. Her iki karaciğer dokusu kaynaklı kanser tedaviye dirençli ve metastatik ölümcül kanserlerdir (Lee vd. 2009) (Şekil 1).



**Şekil 1:** Hepatokarsinogenez sürecinde kronik inflamasyon ve kanser kök hücre gelişimi.

Tümör hücrelerinin hem dirençliliğinden hem de metastazından sorumlu olarak görülen kanser kök hücrelerinin, epitelyalmezankimal geçişi (EMT) ve normalde embriyolojik gelişim evresinde farklı dokuların oluşmasında görev alan mekanizmaları, kanser hücrelerinde de çeşitli hücre yolakları (örneğin; TGF- $\beta$ ) üzerinden indükleyerek aktif hale getirerek tümörün yayılmasına neden olduğu savunulmaktadır (Singh ve Settleman 2010). Aktif hale gelen hücre yolaklarının sebep olduğu olaylar, epitel hücrelerde var olan E-cadherin proteininin ifadesinin bastırılmasını sağlayan proteinlerin (Snail, Slug ve Zeb1 gibi) ifadesinin artmasına yol açar (Peinado, Olmeda, ve Cano 2007). Ayrıca, karaciğer kanseri hücre hatlarında EMT'in karakterize edilmesine dayanan çalışmalarda, E-cadherin proteinini ifade eden ve vimentin proteinini ifade etmeyen hücre hatları epitelyal; E-cadherin proteinini ifade etmeyip, vimentin proteini yüksek seviyede ifade edenler ise mezankimal olarak sınıflandırılmıştır (Fuchs vd. 2008) [13] . Bu bağlamda hücrelerin EGF reseptörü inhibitörlerine olan duyarlılığı EMT ile ilişkilendirilebilmiştir. Epitelyal özellikte olan hücrelerin mezankimal olanlara göre daha EGF reseptörü inhibitörlerine duyarlı olduğu saptanmıştır.

Sorafenib (Nexavar), ileri evre HSK teşhisi konulan hastalara uygulanabilen tek ilaçtır. Yapılan son araştırmalarda HSK hastalarının Sorafenib'e karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Sorafenib tümör angiogenezi ve büyümesini engelleyen (Raf ve VEGFR hedefli) bir multikinaz inhibitörüdür. Sorafenibe karşı gelişen direncin birçok sebebi olabilir. Bunlardan birkaçı, EMT mekanizması, kanser kök hücrelerinin varlığı, mikroalemin etkisi, ve PI3K/AKT sinyal yolağının hiperaktif olması olarak sayılabilir (J. Chen vd. 2015).

Sorafenib ile muamele edilen HSK hücrelerinin birçoğu ölürken, tümörün sadece küçük bir kısmını oluşturan kanser kök hücreleri yaşamaya devam etmekte ve bu hücreler tümörü tekrar oluşturmak için çoğalmaya ve başkalaşmaya çalışmaktadır. Bu da kanserin nüksetmesine sebep olmaktadır. Buna ek olarak bu hücrelerin vücutta başka bölgelere göç edip metastaza sebep olma olasılığı da oldukça yüksektir.

Bir diğer önemli mekanizma ise PI3K/AKT yolağının aktivasyonudur. Yapılan araştırmalar, Sorafenibin Raf/(MAPK) yolağını bloke ederken, PI3K/Akt yolağını aktive ettiğini ve Akt proteinin hedef proteinlerinden S6K ve 4EBP1'nin fosforilasyonunu arttırdığını göstermiştir. Bu bulgular ile iki yolağın birbiri ile bağlantılı ("crosstalk") olduğunu ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının, inhibe olan yolağı kompanse ettiği belirlenmiştir (Chen vd. 2011).

Sorafenib'e karşı gelişen direnç mekanizmalarının tanımlanması ile birlikte, HSK tedavisinde için klinik çalışmalara dahil edilen birçok ilaç kombinasyon veya ikincil tedavi yöntemleri geliştirmeye başlanmıştır (Zhai ve Sun 2013) .

Primer karaciğer kanseri kök hücrelerinin tanımlanmasında kullanılan yüzey belirteçleri, kanser ilaçlarına direnç gösteren alt popülasyonların (SP) diğer sıradan karaciğer kanseri hücrelerinden ayırt edilmesinde büyük önem taşırlar. Bunlardan başlıcaları, ilacın hücreden geri atılımında rol oynayan ABCG2 proteini, CD133 (Prominin 1), CD44, EpCAM (Epitelyal hücre adhezyon molekülü), CD13 (Aminopeptidaz N) ve OV6 dir. (Tablo 1). Bu yüzey belirteçlerinin belirli kombinasyonlar halinde bulunması, karaciğer kanserinin gelişimi ile ilgili bilgi verebileceği ve hastanın yaşama süresi için tahmin yürütülmesinde yararlı olabileceği ifade edilmiştir (L.-L. Liu vd. 2011). Yapılan çalışmalar bu belirtecin tek başına kanser kök hücrelerini belirlemede yeterli olmadığını, ancak ikincil bir belirtecin daha kullanılması ile bu tespitin daha doğru yapılabileceğini savunmaktadır (Wu ve Wu 2009; Salnikov vd. 2009). Örneğin CD133+/CD44+ ya da CD90+/CD44+ HSK lerin daha invazif olduğu belirtilmiştir. Bir diğer araştırmada ise HSK hücre hattı Huh7 da CD133+/EpCAM fenotipinin tümör oluşturma kapasitesinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Chen vd. 2012) .

**Tablo 1:** Güncel, kabul edilen karaciğer kanseri kök hücresi belirteçleri. Karaciğer kanser kök hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesi yüzeylerinde ifade ettikleri farklı belirteçlerin varlığı ile belirlenir.

Belirteç	Kaynak	Tümör gelişimi için minimum hücre sayısı
<b>Ek-hücre</b>	Hücre hatları	$1 \times 10^3$
<b>CD133</b>	Hücre hatları	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$
<b>CD133+/CD44+</b>	Hücre hatları	$1 \times 10^2$
<b>CD90+/CD45-</b>	Hücre hatları Tümör dokusu Kan	$5 \times 10^2$ $2.5 \times 10^3$ $1 \times 10^4$
<b>EpCAM+/AFP+</b>	Hücre hatları	$1 \times 10^3$
<b>OV6+ (CD133+)</b>	Hücre hatları	$5 \times 10^3$
<b>ALDH+ (CD133+)</b>	Hücre hatları	$5 \times 10^2$
<b>CD13</b>	Hücre hatları	$1 \times 10^2$

Karaciğer kanseri kök hücrelerinin uygulanan konvansiyonel tedavi yöntemlerine karşı direnç kazanmasının altında bu hücrelerin kolaylıkla mikro çevresinde değişiklikler yaratabilip kendini koruma altına alabilme özelliği taşımaları yatar. Bu nedenle, kanser kök hücrelerini yok etmek için bazı mekanizmaları hedeflenmesinin uygun olacağı önerilmektedir (Oishi ve Wang 2011). Bu mekanizmalardan ilki kanser kök hücresinde aktif olan hücre yolaklarını bloke etmek, yani hücrelerin kendini yenilerken, tümörün gelişimini tetiklerken ve farklılaşırken indüklediği yolları hedeflemektir (Wnt/ $\beta$ -catenin, Hedgehog, PTEN gibi). İkincisi karaciğer kanseri kök hücrelerinin yüzeyinde bulunan belirteçlerin (CD133, CD13, EpCAM, CD44) hedeflenmesi ve bu şekilde alt sinyal yollarının indüklenmesinin engellenmesidir. Üçüncüsü tümör mikro-çevresinin bozuluma uğratılması yöntemidir. Bu yöntemde damarlaşmayı, metastazı ve hipoksiyi tetikleyen faktörlerin inhibe edilmesi hedeflenir. Son olarak kanser kök hücrelerinin kendini koruma mekanizmalarını (bağışıklık sisteminden kurtulma, ilaca karşı direnç veya radyoterapi direnci) bozmak hedeflenebilir.

### 3. YÖNTEM

**3.1 NCI-SRB yöntemi kullanılarak inhibitörlerin HSK hücreleri üzerindeki öldürücü etkilerinin belirlenmesi:** Çalışılan HSK hücre hatları (Huh7, Hep3B, MV, SNU475) üzerinde etkili olabilecek maddeleri ve bunların etkin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla NCI-SRB tarama yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem hücresel proteinlerdeki bazik amino asitlere bağlanan SRB molekülünün spektrofotometrik değişikliğinin ölçülmesine dayanmaktadır. Elde edilen ölçüm değerleri total protein miktarını dolayısıyla da canlı hücre kütlesi hakkında bize bilgi vermektedir. SRB analizi sonucunda elde edilen ve canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olan boya yoğunluğu spektrofotometrede her bir kuyucuk için okunduktan sonra inhibitörlerin etkisini incelemek için elde edilen değerler  $(1 - (\text{inhibitör eklenen kuyucuktaki hücrelerin absorpsansı} \times 100) / (\text{DMSO eklenen kontrol hücrelerinin absorpsansı}))$  formülüne göre hücre ölümü yüzdesine çevrilmiş, doz yanıt eğrileri yardımıyla IC<sub>50</sub> (%50 oranında ölüme neden olan doz) değerleri hesaplanmıştır. **NCI-SRB yöntemi protokolü:** 96 kuyulu hücre kültür plağına her bir hücre belirlenen sayılarda (Huh7 ve Hep3B 2000, Mahlavu ve SNU475 1000) ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelere her bir inhibitör 40µM, 20µM, 10µM, 5µM, 2.5µM konsantrasyonlarında verilmiş ve her inhibitörün her bir farklı dozu 3 kez tekrarlanmıştır. İnkübasyon süresi (72h) tamamlandıktan sonra hücreler 1XPBS ile bir kere yıkanıp fiksasyonu için 10% TCA (trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 1 saat +4°C de bekletildikten sonra ddH<sub>2</sub>O ile 4 kere yıkanan hücreler kurumaları bırakılmış, hücreleri boyamak için gereken miktarda SRB (Sigma-Aldrich) 1% asetik asitte çözüp ve her kuyucuğa 50 µM koyduktan sonra hücre plakları karanlıkta oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. Fazla boyayı hücrelerin üzerinden kaldırmak amacıyla kuyular 1% asetik asit ile yıkanmıştır. Daha sonra plakalar havlu kağıt üzerine bırakılıp kurumaları sağlanmıştır. SRB yoğunluğunun okunması için kuyuların üzerine 100µM 10mM TBS (Trizma baz) eklenmiş ve OD okuyucu (BioTek, ELx800) aletinde 515 nm dalga boyunda okumalar gerçekleştirilmiştir. Sonrasındave yukarıda belirtilen hesaplamalar tamamlanıp maddelerin her bir hücre için IC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir.

**3.2 Manyetik Hücre Ayırma Tekniği ile kanser kök hücre popülasyonunun heterojen popülasyondan ayrılması:** Huh7 ve Hep3B hücrelerinden CD133+ ve EpCAM+ belirteçleri için pozitif olan hücreleri ayırmak için manyetik seri-ayırma (Multisort, sequential sorting) yöntemi kullanılmıştır (Miltenyi Biotec). Bu yöntem hücrelerin önce anti- biotin microbeadleri) daha sonra ise anti-FITC microbeadleri ile sırayla ayrılmasına dayanmaktadır. Dolayısıyla CD133 antikoru biotin ile işaretli, EpCAM antikoru ise FITC ile işaretlidir. Ayırma işleminden sonra hücrelerin akış sitometrisinde analizini yapabilmek için antikolar floresan olarak işaretli

seçilmiştir. Bu yüzden CD33-biotin için ayrıca anti-biotin-PE antikoru kullanılmıştır. Hücreleri ayırma işlemi boyunca soğukta (+4°C) çalışılmasına dikkat edilmiştir.

**Seri-Manyetik Hücre Ayırma Yöntemi.** Ayırmak istenilen hücreler manyetik olarak işaretlenmiş hücre belirteçlerine (CD133) bağlandıktan sonra, çekim kromatografi kolonlarına manyetik alan yardımı ile bağlanır ve belirteçlere bağlanmayan hücreler kolondan akıp pozitif hücrelerden ayrılır. Daha sonra, manyetik olarak işaretlenmiş hücreler manyetik alanın dışına alınır ve yıkama yapılarak ayrı bir tüpte toplanır. İkinci bir belirteç için toplanan CD133+ hücreler üzerinde yapılacak ikinci manyetik ayırma işlemi öncesinde bir önceki microbeadlerden enzimatik olarak ayrılır. CD133+ hücreler ikinci yüzey belirteçi için işaretlenir ve manyetik ayırma işlemi tekrarlanır. Elde edilen popülasyon her iki belirteç için pozitif olmuş olur. Manyetik alan etkisinde kolondan akıp geçen hücreler ise birinci belirteç için pozitif, ikinci belirteç için negatif olan hücrelerdir.

### **3.3 Heterojen popülasyondan ayrılan hücrelerin fonksiyonel testlerinin gerçekleştirilmesi:**

Seri-manyetik hücre ayırma tekniği ile ayrılan hücrelerin ne kadar saf elde edildiğini belirlemek üzere ayırma işleminden hemen sonra akış sitometrisi (FAC Calibur, BD) kullanılmıştır. Hücrelerin CD133+/EpCAM+ yüzde değerleri, hücreler ayrılmadan önce ve ayrıldıktan sonrası için karşılaştırılmıştır. Sonrasında bu popülasyonların kök hücre özellikleri fonksiyonel deneyler ile karşılaştırılmıştır.

**3.3.1 Akış sitometrisi ile kök hücrelerde ifade edildiği bilinen proteinlerin seviyelerinin belirlenmesi:** Huh7 ve Hep3B hücrelerinden elde edilen CD133+/EpCAM+ ve CD133-/EpCAM- popülasyonlarında, normal kök hücrelerde ifadesi yüksek oranda olan transkripsiyon faktörlerinin (SOX2, Nanog, OCT4 vb) ifadesi karşılaştırılmıştır. Her iki popülasyonun floresan antikolar ile boyama işlemi öncesinde 4% para-formaldehit ile 15 dakika oda sıcaklığında fiksasyonu yapılmıştır. Ardından hücre duvarının geçirgenliğini arttırmak amacıyla ("permeabilization") %90 methanol ile 30 dakika boyunca buz üzerinde muamele edilmiştir. Hücreler inkübasyon buffer (0.5g BSA in 100 ml 1X PBS, 4°C) ile yıkandıktan sonra santrifuj yardımı ile çöktürülüp (1500 rpm, 5 dk) primer antikor ile önerilen oranlarda (OCT4: 1:200, kat.no:2750S, Nanog: 1:400, kat.no: 3580S) 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra hücreler için yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlanıp sekonder antikor (anti-rabbit-IgG-Alex647, 1:2000, kat. no: ab150083) ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Yıkama işlemi tekrar edildikten sonra hücreler 0.2 ml PBS içerisinde sulandırılıp akış sitometrisinde analizi gerçekleştirilmiştir.

**3.3.2 Kanser kök hücre tümör topaklanması (hepatosfer) oluşumu deneyleri:** Manyetik separasyon tekniği ile ayrılan CD133+/EpCAM+ hücrelerin kök hücre özellikleri gösterdiğini belirleyen bir yöntem olan sfer oluşumu deneyleri gerçekleştirilmiştir. Besiyeri gerekli büyüme faktörleri ve düşük FBS oranı içerdiğinde, hücrelerin en az bir hafta sonra hepatosfer oluşturmaları beklenmiştir. Bu amaçla, J Liu et al., Cell Death and Disease, 2013 makalesinde uygulanan besiyerinden esinlenerek gerekli malzemeler temin edilmiş (Tablo 2) ve izole edilen hücreler farklı sayılarda (100/200/400/800 hücre/kuyucuk) düşük tutunma özellikli 96-kuyucuklu kültür tabaklarının içerisine her sayı için beşer kuyucuk ekilmiştir. 6 gün sonra sfer oluşumu gözlemlenmiş ve toplam 12 gün inkübasyon sonrasında deney sonlandırılmıştır (H. Liu vd. 2013). Hücrelerin 96 kuyucuklu tabaklara ekilmesi gereken optimum sayılarını belirledikten sonra, bu teknik hücrelerin seçilen inhibitörlerin etkisi altında kaldığında sfer oluşturma kapasitelerinin ne oranda değiştiğini saptamak üzere kullanılmıştır. Kısaca, hücreler toplam 6 gün boyunca farklı inhibitör ve kombinasyonları ile muamele edildikten sonra, canlı kalabilen hücrelerin sfer oluşturma kapasiteleri bu yöntem ile belirlenmiştir. Sfer sayımları ve sferlerin büyüklük ölçümleri 6 gün sonrasında yapılmıştır.

**Tablo 2:** Sfer oluşturma deneyi için kullanılan besi yeri içeriği

DMEM/F12 içerisinde;	Marka	Konsantrasyon
B27 (50X)	Gibco, 10889-038	1X
EGF	Thermo Fisher, PHG0311	20 ng/ml
FGF	Sigma, F0291	10 ng/ml
Heparin	Sigma, H3149	2 µg/ml
Penisilin + Streptomisin	Gibco, 15140-122	100 U/ml
İnsulin	Sigma, I-6634	5 µg/ml
Hydrocortisone	Sigma, H0888	0.5 µg/ml
Ultra-low attachment plate	Corning, 18191	

**3.4 Akış sitometrisi yöntemi kullanılarak inhibitörlerin kanser kök hücre belirteçlerine olan etkisinin belirlenmesi:** IC<sub>50</sub> değerleri saptanan inhibitörlerin HSK hücreleri içerisinde bulunan kanser kök hücre popülasyonunu ne yönde etkilediğini belirlemek üzere, Huh7 ve Hep3B hücreleri 100mm hücre tabaklarına 200.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonrasında inhibitörlerin her biri IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda hücreler üzerinde uygulanmış ve 72 saat boyunca ilaç etkisi altında bekletilmiştir. Sonrasında ilaç etkisi ile ölen (yüzeyden ayrılıp

yüzen) hücreler aspiratör yardımı ile uzaklaştırılmış, canlı hücreler ise trypsin yardımı ile kaldırılıp toplanmıştır. Toplanan hücreler 4% paraformaldehit ile fiks edildikten sonra CD133 ve EpCAM yüzey belirteçleri için floresan olarak boyanmıştır. Daha sonra hücreler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Her iki belirteç için pozitif olan hücre yüzdesi DMSO kontrol grubu ve inhibitörler ile muamele edilmiş gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

**3.5 Kanser kök hücrelere karşı etkili inhibitörlerin Sorafenib ile kombinasyon veya sıralı halde uygulanması sonucu oluşan etkilerinin belirlenmesi:** Akış sitometrisi ile kanser kök hücreler üzerinde etkili olduğu gösterilen inhibitörler Sorafenib ile beraber farklı kombinasyonlarda uygulandığında görülecek etkiyi belirlemek için, hücreler (etkili inhibitör + Sorafenib, önce Sorafenib sonra etkili inhibitör, önce etkili inhibitör sonra Sorafenib) olmak üzere 3 farklı çeşit kombinasyon ile çalışılmıştır. Yukarıda da bahsedildiği gibi hücreler ekilmiş ve ilaçlar ile muamele edilmiştir. Sıralı muameleler için 48h ilk inhibitör, sonrasındaki 48 saat ise ikinci inhibitör uygulanmıştır. Deney sonunda canlı olan hücreler akış sitometrisi ile aynı şekilde analiz edilmiştir.

**3.6 Tüysüz farede hollow fibre implantasyon deneyleri ile *in vitro* olarak etkisi belirlenmiş inhibitörlerin etkilerini *in vivo* olarak belirlenmesi (Şekil 8)** (Sharma, Haber, ve Settleman 2010): Huh7 hücreleri kültürde büyütülüp 15 ml tüpler içerisinde toplandıktan ve sayılmıştır. Steril olarak temin edilen PVDF Hollow FiberKrosFlo İmplant membranlar steril bir yüzey üzerine 10'ar cm parçalar halinde getirilmiştir. Hücreleri membran tüplerin içerisine enjekte etmeden önce membranlar hücre besiyeri ile muamele edilerek, besiyeri ile dengelenmesi (equilibration) olması sağlandı. Hücreler 1,500,000 hücre/10 cm (yani 300,000 hücre/2cm) olacak şekilde enjekte edilmiştir. Ardından tüplerin her iki ucu ısıtılmış cımbız yardımıyla kapatılmıştır. 10 cm boyundaki membran 2 cm aralıklar ile parçalara ayrılmış, her bir parça yine sıcak cımbız yardımı ile kapatılmıştır. Membranlar daha sonra içeriside besiyeri olan hücre tabağına yerleştirilmiş ve 37 °C, %5-CO2 inkübatör içerisinde bir gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün 4-5 aylık erkek tüysüz farelere anestezi altında verilirken boyna yakın dorsal bölgede steril makas yardımı ile küçük bir kesik oluşturduktan sonra hazırlanan implantlar veres trokar iğnesi yardımı ile cilt altına subkutan olarak yerleştirilmiş, açılan yara dikilmiştir. İmplantların yerleştirildiği günün ertesi gününden itibaren 5 gün boyunca günde bir defa farelere ilaçlar (Sorafenib: 30mg/kg, Rapamisin: 2mg/kg) ve kontrol basit şurup belirli dozlarda gavaj ile verilmiştir. Altıncı gün, fareler anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildikten sonra, implantlar çıkartılıp önceden ısıtılmış besiyeri içerisinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra hücreleri membrandan çıkartabilmek için membranların her

iki ucu makasla kesilmiş, içerisinde accutase solüsyonu bulunan hücre kültürü tabaklarına transfer edilmiştir. Membranların her birinin içerisinde accutase solüsyonu birkaç kere şırınga yardımı ile geçirilip 30 dakika boyunca 37°C’de bekletilmiştir. Bu sayede hücrelerin membran duvarından kopup kültür tabağına geçirilmesi sağlanmıştır. Elde edilen hücreler PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra hemositometre yardımı ile sayılmıştır. Hücrelerin canlılık oranlarının karşılaştırılabilmesi için ayrıca 96 kuyucuklu tabaklara ekilip SRB boyaması öncesinde fikse edilmiştir (10%TCA). Hücrelerin kanser kök hücre belirteçleri pozitiflerinin karşılaştırılması için ise akış sitometrisinde daha önce belirtildiği gibi boyanıp analiz edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

**4.1 PI3K/Akt sinyal yolu inhibitörlerinin, aday kinaz inhibitörlerinin ve klinikte kullanılan kemoterapötiklerin HSK hücreleri üzerindeki etkileri:** HSK hücreleri üzerinde 3 farklı grup inhibitörlerin sitotoksik etkisini belirlemek üzere NCI-SRB deneyleri gerçekleştirilmiştir.

- PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerinde rol alan kinazlar üzerinde etkili olan inhibitörler
- Multikinaz inhibitörler (Sorafenib)
- Klinikte kullanılan antikanser ajanlar (DNA enterkalatörleri)
- Kanser kök hücre inhibitörü

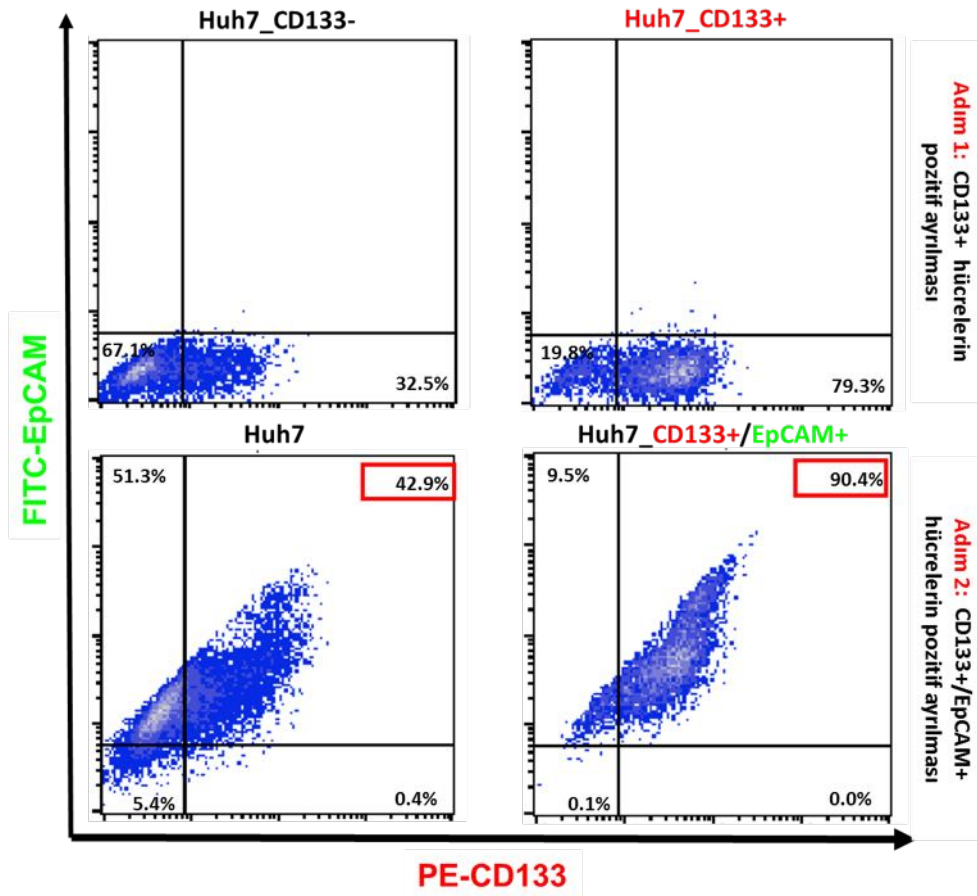
Elde edilen sonuçlara göre inhibitörlerin IC<sub>50</sub> değerleri 0.01 µM ile 40 µM arasında değişiklik göstermiştir (Tablo 3).

**Tablo 3:** HSK hücreleri üzerindeki etkileri belirlenen inhibitörler, etki mekanizmaları ve etkili konsantrasyonları. IC<sub>50</sub> değerleri Huh7 ve Hep3B hücrelerinde test edilmiştir.

<b>İnhibitör</b>	<b>Etki mekanizması</b>	<b>Ortalama IC<sub>50</sub> (µM)</b>
<b>Sorafenib</b>	B-Raf, VEGFR	8
<b>ZSTK 474</b>	PI3K	6.6
<b>PI-103</b>	PI3K, mTOR	4
<b>PI3K-α</b>	PI3K-α	0.1
<b>PI3K-β</b>	PI3K-β	40
<b>AKTi-2</b>	Akt2	22.7
<b>AKTi-1,2</b>	Akt1, Akt2	5.3
<b>LY 294002</b>	PI3K	3.8
<b>Wortmannin</b>	PI3K	17.8
<b>Rapamisin</b>	PI3K, mTOR	0.1
<b>BEZ-235</b>	PI3K, mTOR	1
<b>5CI-ATM</b>	SAPK/JNK	2
<b>Camptotesin</b>	DNA enterkalatörü	0.1
<b>Doksorubisin</b>	DNA enterkalatörü	0.1
<b>DAPT</b>	Notch	5

**4.2 Manyetik seri hücre ayırma tekniği (Multisort) ile ayrılan CD133+/EpCAM+ hücrelerin saflığının belirlenmesi:** Huh7 ve Hep3B hücrelerinden ayrılan CD133+/EpCAM+ popülasyonu üzerinde ileri deneyler yapılabilmesi amacıyla manyetik seri hücre ayırma tekniği uygulanmıştır. Bu teknik ile her ne kadar hücre kayıpları söz konusu olsa da elde edilen CD133+/EpCAM+ popülasyonu saflık derecesi oldukça yüksek bulunmuştur. Öyle ki, Huh7 hücrelerinin her iki belirteç için pozitif olduğu hücre yüzdesi ~%40 seviyesinden, uygulanan

ayırma yöntemi sonrasında %90'a yükselmiştir (Şekil 2). Hücrelerin CD133 belirteçi için ayrılması aşamasında CD133 negatif popülasyon olarak toplanan hücrelerin %70 negatif olduğu ancak bir miktar pozitif hücrenin kolondan ayrılıp negatif tüpe geçtiği tespit edilmiştir. Ancak pozitif hücrelerin toplandığı tüpte oldukça az oranda negatif hücre saptanmıştır. CD133+ popülasyon ile ikinci bir pozitif ayırma yöntemi uygulandığında hücrelerin %90 oranında saflığa ulaştığı gözlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, manyetik hücre ayırma yönteminin ileriki aşamalarda gerçekleştirilecek deneyler için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

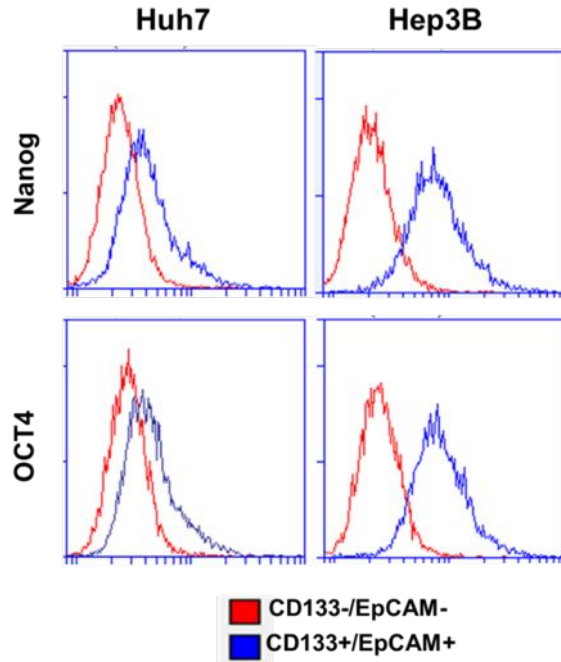


**Şekil 2:** Huh7 hücre hattı için seri-manyetik ayırma yönteminin uygulanması sonucu elde edilen akış sitometri analizi sonuçları (yoğunluk grafiği). Herbir grafikte sol-üst kuadrant; yalnız-EpCAM ile, sağ-alt kuadrant; yalnız CD133 ile, sağ-üst kuadrant ise her iki belirteç için boyalı hücrelerin görüldüğü bölgeleri temsil etmektedir. Boyalı olmayan hücreler sol-alt kuadrantda görünmektedir. Sırasıyla CD133- popülasyon için, CD133+ popülasyon için,

manyetik olarak ayrılmamış hücreler için, ve son olarak her iki belirteç için pozitif olan hücreler için alınan sonuçlar gösterilmiştir.

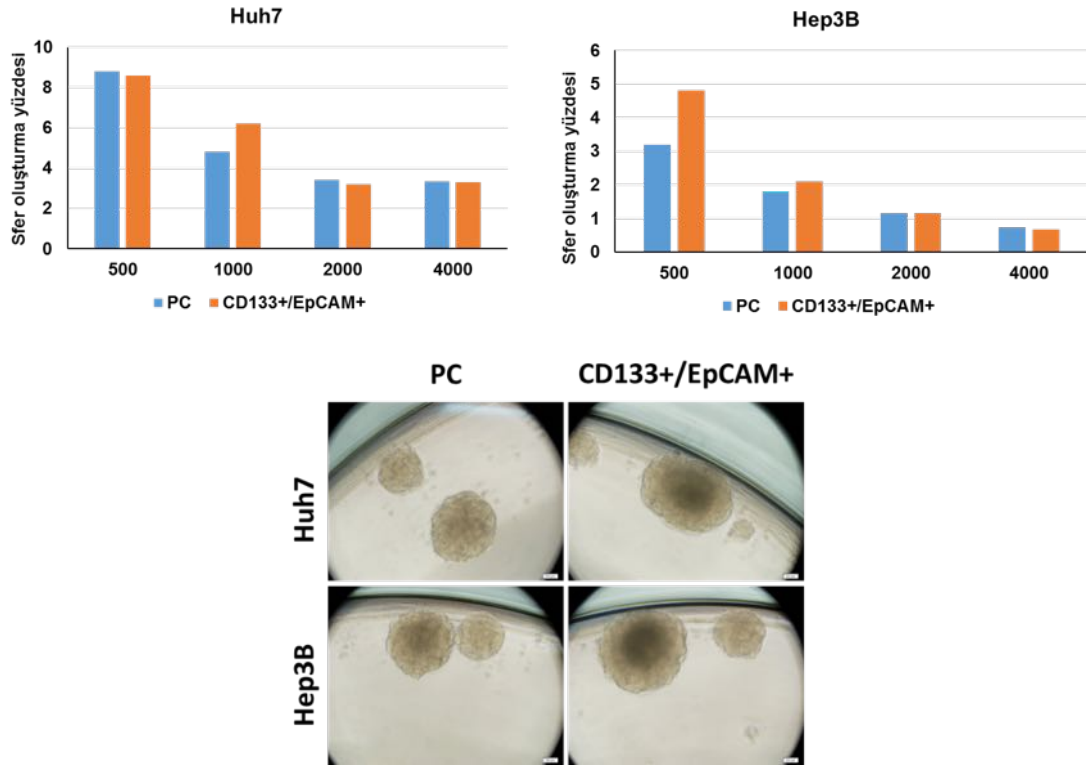
**4.3 CD133-/EpCAM- ve CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının kök hücre fonksiyonel deneyleri ile karşılaştırılması:** Manyetik seri ayırma tekniği ile birbirinden ayrılan iki farklı popülasyonun kanser kök hücre özelliği taşıma potansiyelleri farklı deneyler ile karşılaştırılmıştır.

**4.3.1 Bilinen kök hücre proteinlerinin ifadesinin karşılaştırması:** Normal kök hücrelerde ifade oranının yüksek olduğu bilinen SOX2, Nanog ve OCT4 gibi transkripsiyon faktörlerinin (Yamanaka faktörleri) her iki popülasyondaki ifadelerini karşılaştırılmak üzere hücreler immunofloresan boyama yöntemi ile boyanmış ve akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki hücre hattından izole edilen CD133+/EpCAM+ hücrelerde CD133-/EpCAM- hücelere göre bu faktörlerin yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir (Şekil 3). Böylece üzerinde çalışılan ve inhibitörlerin etkilerini belirlenirken kullanılan yüzey belirteçlerinin (CD133, EpCAM) seviyesinin o hücrelerin kendini yenileme kapasitesi (kanser kök hücre olması) ile ilintili olduğu bir kez daha doğrulanmıştır.



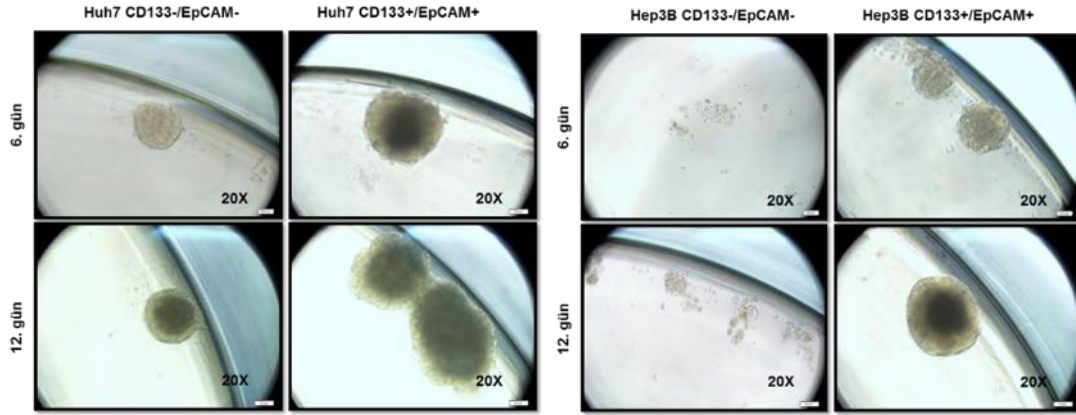
**Şekil 3:** Huh7 ve Hep3B hücrelerinden izole edilen CD133+/EpCAM+ ve CD133-/EpCAM- popülasyonlarındaki OCT4 ve Nanog proteinleri ifadelerinin akış sitometrisi ile belirlenmesi.

**4.3.2 Sfer oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi:** Kanser kök hücre özelliği taşıma belirteçi olan sfer oluşturma deneyinin her iki hücre popülasyonunda karşılaştırılmalı olarak gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Öncelikle sfer oluşumu parental hücre (heterojen) ile CD133+/EpCAM+ hücreler arasında karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, sfer oluşumunun 6. Günden itibaren takip edilebilir seviyeye geldiğini göstermiştir. Buna göre, Huh7 için parental hücre ile CD133+/EpCAM+ popülasyonu arasında sfer sayısı bakımından fark görülen hücre sayısı 200 hücre/kuyucuk, Hep3B için ise 500 hücre/kuyucuk olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Ancak, her iki hücrede de CD133 ve EpCAM pozitivitesi yüksek olduğundan dolayı (%20-40) bu farkı daha belirgin görebilmek için iki belirteç için pozitif olan hücreleri her iki belirteç için de negatif olan popülasyon ile karşılaştırılmasının daha güvenilir olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 4:** Huh7 ve Hep3B hücreleri ve bu hücrelerden elde edilen CD133+/EpCAM+ popülasyonları ile yapılan sfer oluşturma deneyi sonuçları. Çubuk grafiği hücrelerin sfer oluşturma yüzdelerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Herbir grubun temsili sfer görüntüleri ışık mikroskopi ile (40X) çekilmiştir. PC: parental hücre.

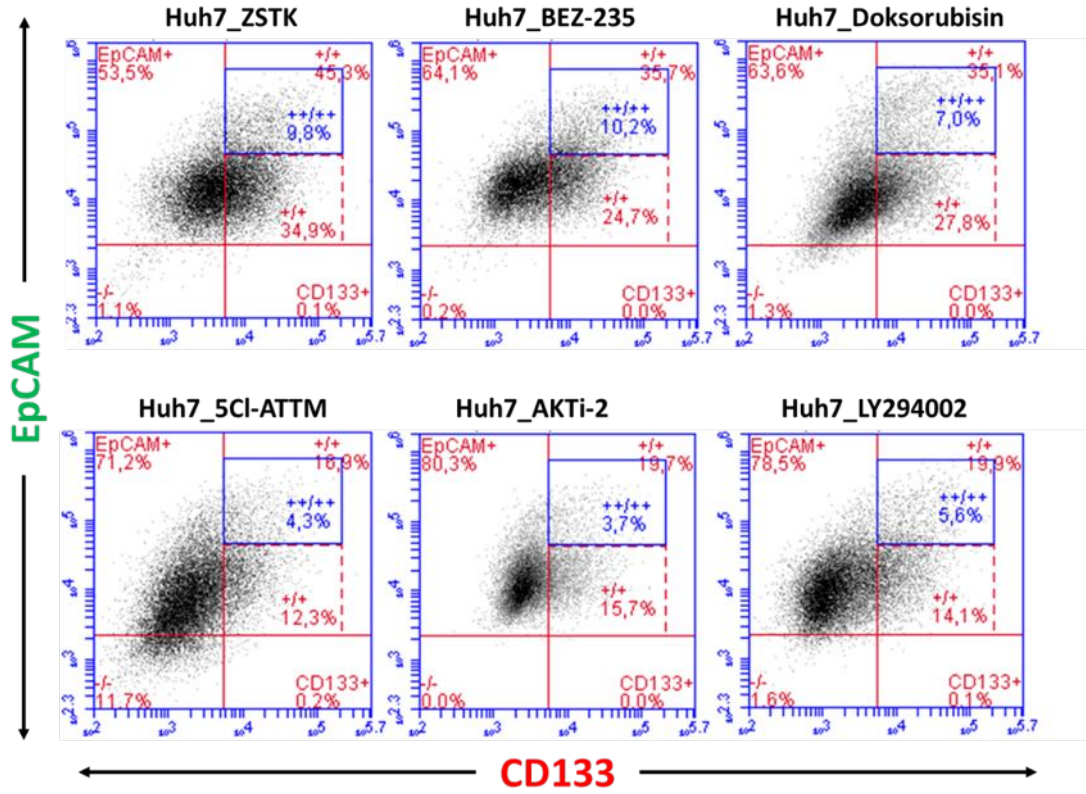
Buna göre sfer sayısı ve büyüklükleri deney başlangıcından 6 gün ve 12 gün sonra ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; Huh7 ve Hep3B hücrelerinden ayrılan iki popülasyon arasında sfer oluşturma kapasitesi açısından farklılıklar gözlemlenmiştir. Öyle ki, CD133-/EpCAM- popülasyon neredeyse hiç sfer oluşumuna sebep vermezken, CD133+/EpCAM+ popülasyon büyük ve sayısal olarak daha fazla sfer oluşumuna neden olmuştur (Şekil 5). Literatür incelendiğinde, Huh7 hücrelerinde aynı yüzey molekülleri kullanılarak ayrılan popülasyonların sfer oluşturma kapasitelerinin en yüksek CD133+/EpCAM+ hücrelerde olduğu gösterilmiştir [20]. Buna göre CD133-/EpCAM- popülasyonun hiç sfer oluşturmaması değil, daha az sayıda ve daha küçük sferler oluşturması beklenmiştir.



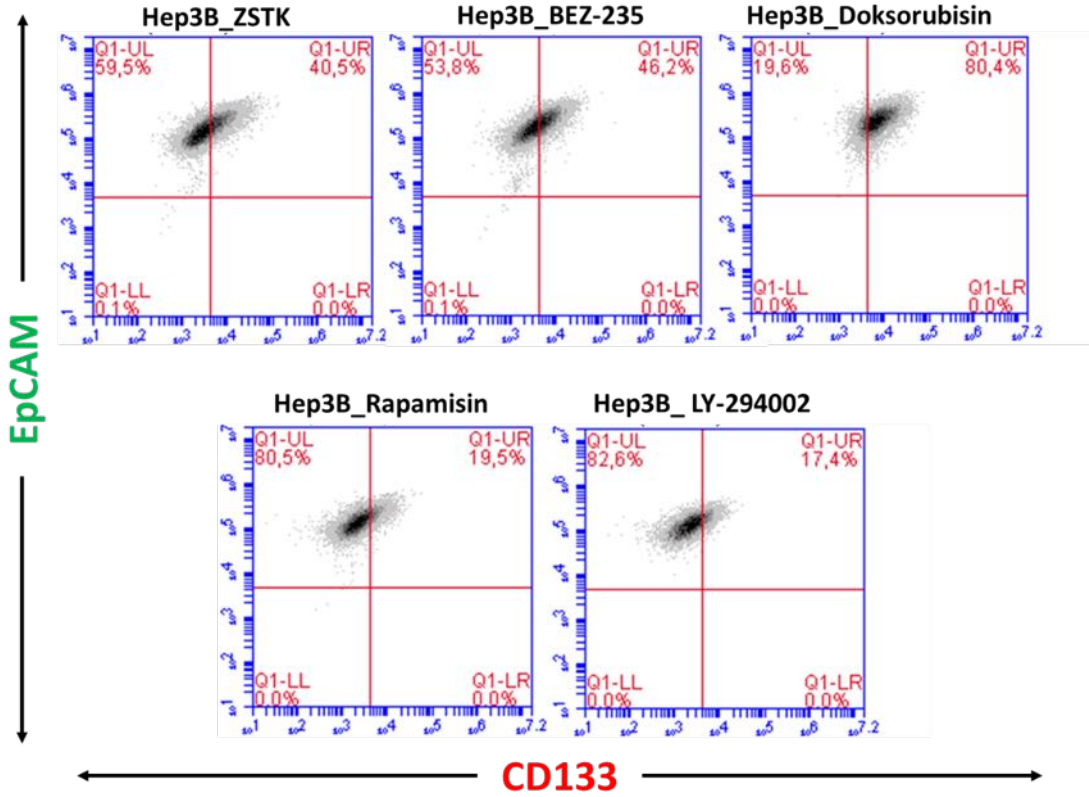
**Şekil 5:** Huh7 ve Hep3B hücrelerinden izole edilen ve CD133+/EpCAM+ ve CD133-/EpCAM- popülasyonları ile yapılan sfer oluşturma deneyi sonuçları. Herbir grubun temsili sfer görüntüleri ışık mikroskobu ile (20X) çekilmiştir.

#### **4.4 Akış sitometrisi analizi ile inhibitörlerin CD133+/EpCAM+ popülasyonlarında etkilerinin belirlenmesi:**

HSK hücre hatları (Huh7 ve Hep3B) daha önce sitotoksik etkisi belirlenen inhibitörler ile muamele edildikten 72 saat sonra, canlı kalabilen hücrelerin ne kadarının kanser kök hücre belirteçleri için pozitif olduğu kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre LY294002, Rapamycin, 5CI-ATTM ve DAPT hücrelerdeki CD133+/EpCAM+ popülasyon yüzdesini düşürürken, diğer inhibitörlerin (özellikle Sorafenib, ZSTK, PI-103, BEZ-235, Camptotesin ve Doksorubisin) bu yüzdeyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 6 ve 7).

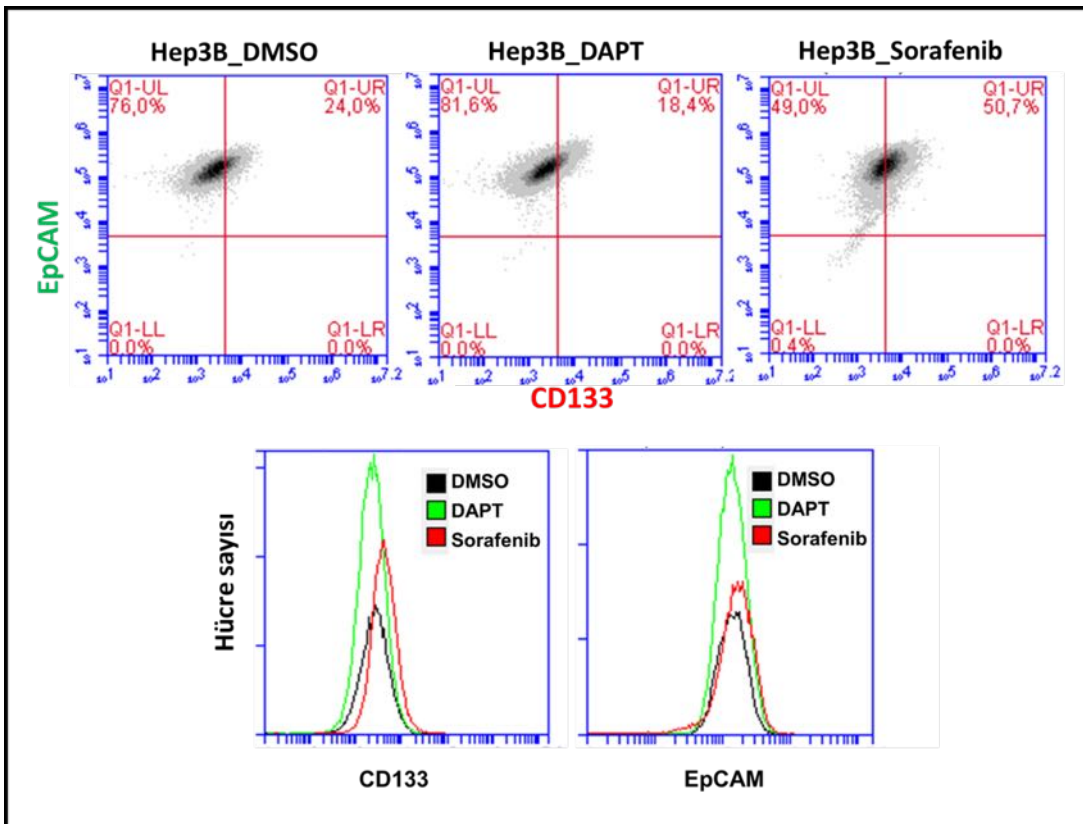
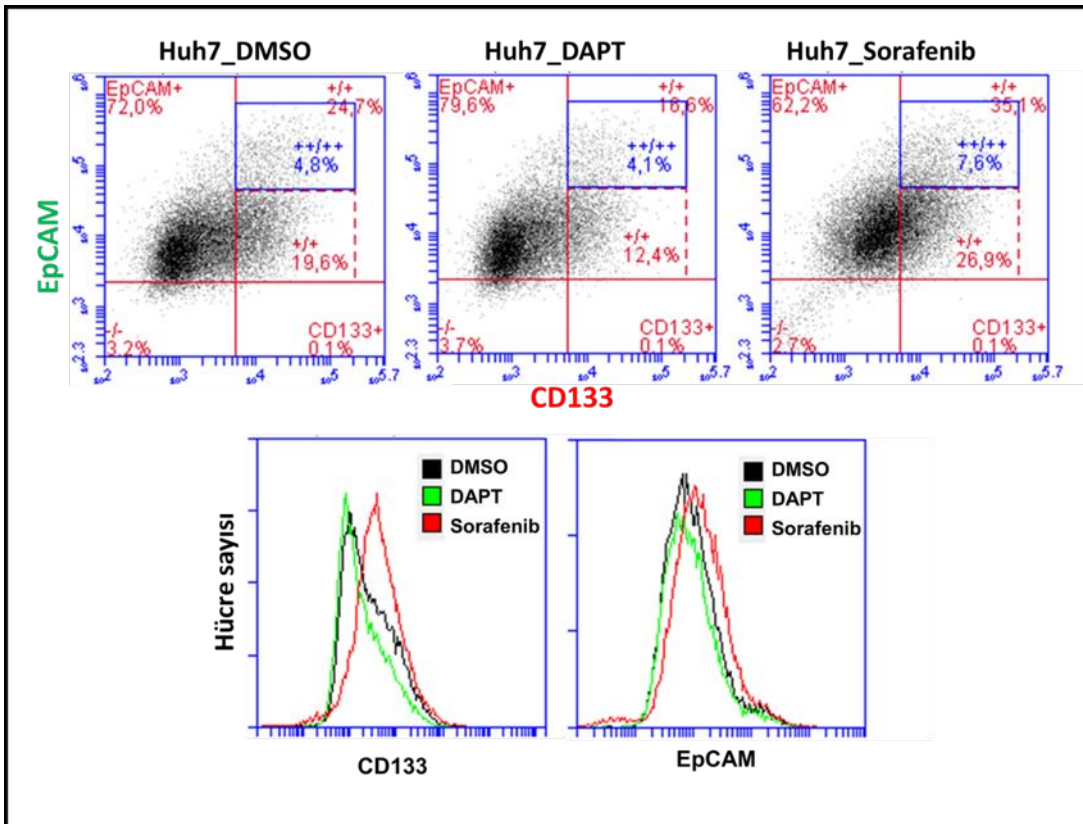


**Şekil 6:** Huh7 hücrelerinde CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra floresan akış sitometrisi ile yapılan analiz sonuçları. Sonuçlar DMSO ve DAPT ile yapılan deneyler ile karşılaştırılmıştır. DMSO kontrole oranla CD133+/EpCAM+ popülasyonundaki değişimler dikkate alınmıştır.



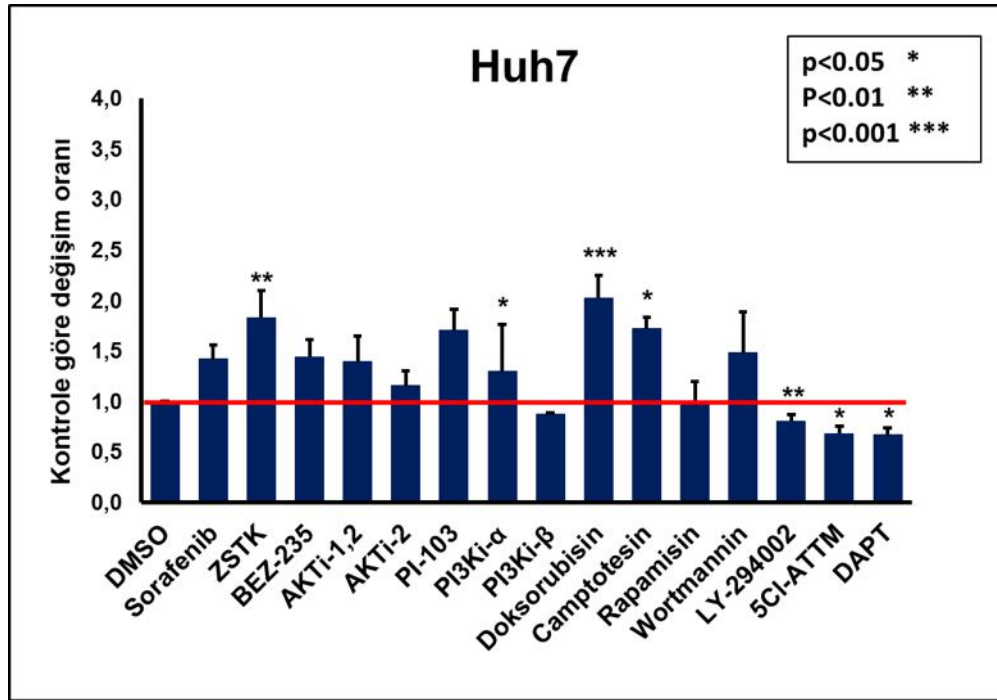
**Şekil 7:** Hep3B hücrelerinde CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra floresan akış sitometrisinde yapılan analiz sonuçları. Sonuçlar DMSO ve DAPT ile yapılan deneyler ile karşılaştırılmıştır. DMSO kontrolle oranla CD133+/EpCAM+ popülasyonundaki değişimler dikkate alınmıştır.

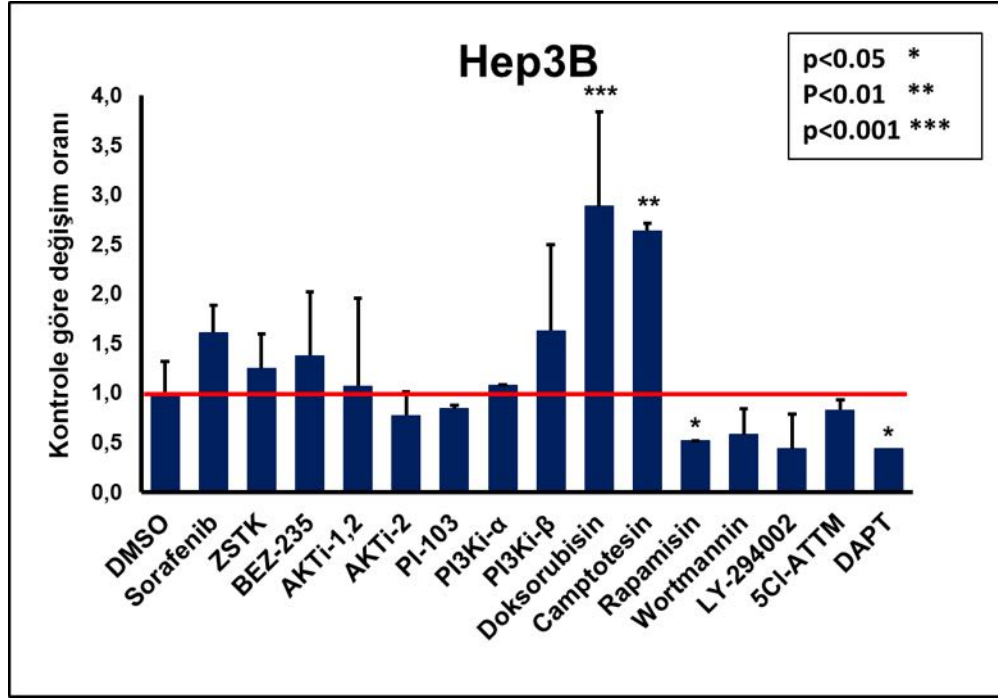
Kanser kök hücre inhibitörü DAPT'ın etkisinin beklendiği gibi CD133+/EpCAM+ popülasyonlarını azaltıcı yönde etki ettiği, buna karşılık, Sorafenib (karaciğer kanseri tedavisi için FDA tarafından onaylanmış tek ilaç) ile muamele edilen hücrelerde bu popülasyonun zenginleştiği gösterilmiştir (Şekil 8).



**Şekil 8:** Huh7 ve Hep3B hücre hatları üzerinde pozitif kontrol inhibitörü DAPT'ın etkisinin DMSO kontrolü ve Sorafenib'in etkileri ile karşılaştırılması. Sonuçlar hücrelerin iki belirteci hangi oranda taşıdığını göstermek üzere pencerenin 4 farklı alana bölünmüştür. Sırasıyla, sol üst pencere: EpCAM+ hücreleri, sağ alt pencere: CD133+ hücreleri, sağ üst pencere ise her iki belirteç için pozitif olan hücreleri göstermektedir. Her bir pencere için o bölgede bulunan hücrelerin yüzdeleri verilmiştir. Huh7 için CD133+/EpCAM+ ayrılan bölge kendi içinde 2 bölgeye ayrılmıştır. Bu ayırım ile EpCAM belirtecini yüksek seviyede ifade edenler ile orta seviyede ifade edenler birbirinden ayrılmıştır.

Sonuçların kontrol grupları ile karşılaştırılması amacıyla elde edilen yüzde değerleri, DMSO kontrol grubuna göre normalize edilerek grafiğe yansıtılmıştır. Böylece, etkin olan ve olmayan inhibitörlerin hangi oranda kanser kök hücre popülasyonunu etkilediği daha açık bir şekilde gösterilebilmiştir (Şekil 9).



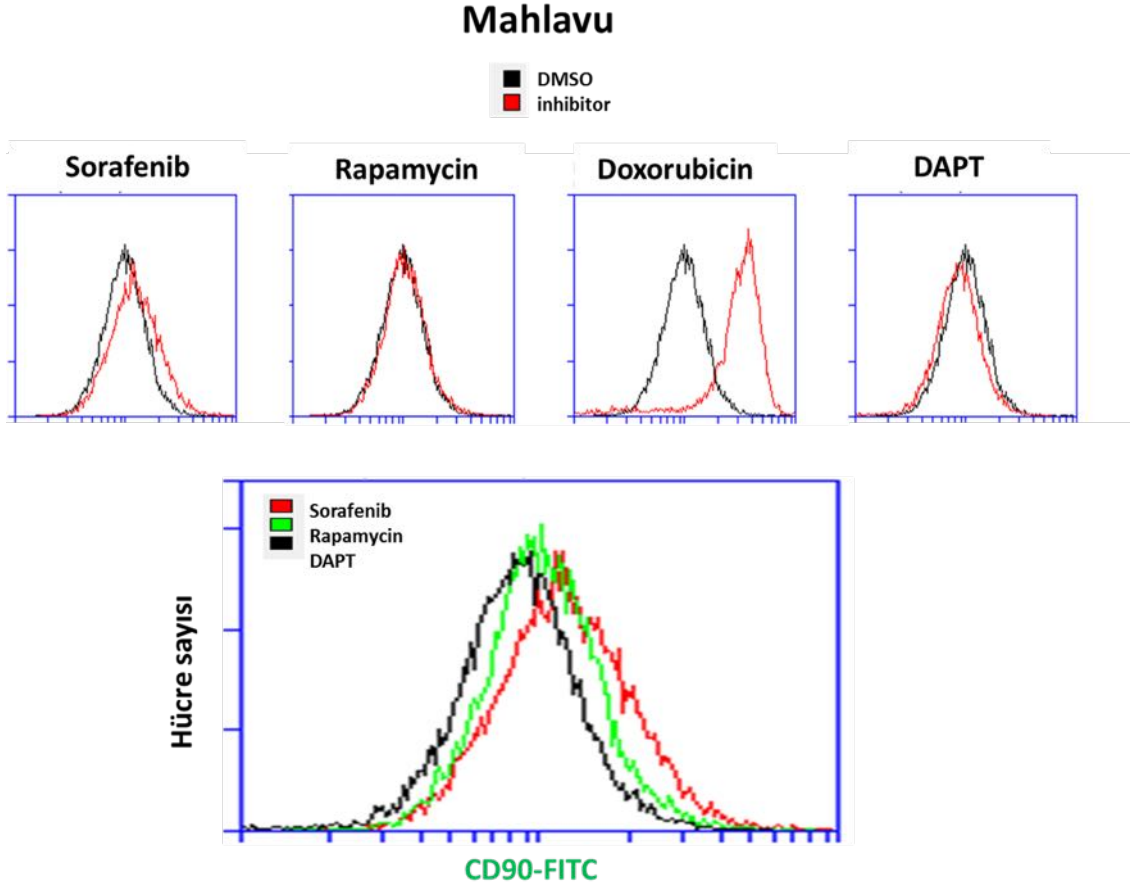


**Şekil 9:** Huh7 ve Hep3B hücrelerinde CD133+/EpCAM+ popülasyonlarının belirtilen inhibitörler ile muamele edildikten sonra floresan akış sitometrisi analizi. Kırmızı çizgi (kontrol yüzde seviyesi) altında veya üzerinde kalan ve istatistiksel (one-way ANOVA testi) olarak anlamlı olan inhibitörler belirlenmiştir. (p<0.05: \*, p<0.01: \*\*, p<0.001: \*\*\*)

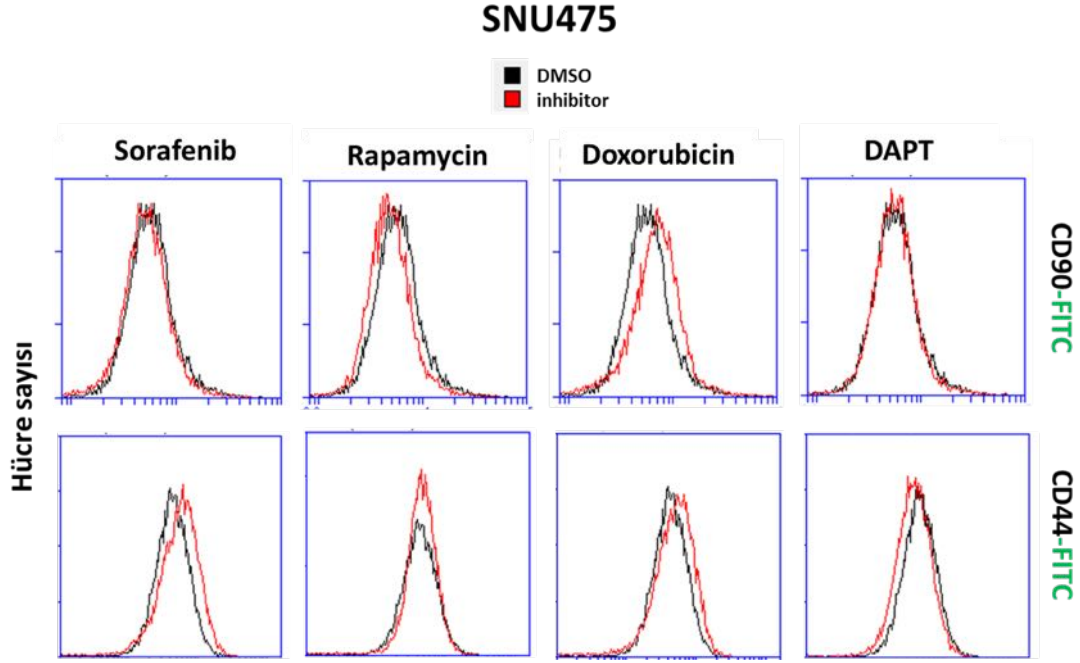
#### 4.5 Kanser kök hücreler üzerinde etkisi anlamlı bulunan inhibitörlerin mezenkimal özellikli HSK hücre hatlarının CD90 ve CD44 popülasyonlarına olan etkilerinin belirlenmesi:

Daha önce epitelyal özellikte olan hücrelerde etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunan inhibitörlerin (Sorafenib, Rapamisin Doksorubisin ve DAPT) etkilerini mezenkimal özellikli hücrelerde de belirlemek üzere Mahlavu ve SNU475 hücreleri ile çalışılmıştır. Mezenkimal özellikli HSK hücreleri CD90 ve CD44 gibi kanser kök hücre belirteçlerini ifade ettikleri için (Yamashita ve Kaneko 2014; Yang vd. 2008), akış sitometrisinde bu belirteçlerin değişimleri gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Mahlavu hücrelerindeki CD90 ifadesi Sorafenib ve Doksorubisin ile muamele sonrasında artış gösterirken, Rapamycin ve DAPT ile muamele sonrasında azalma göstermiştir (Şekil 17). SNU475 hücresinde ise CD90 ve CD44 belirteçlerinin sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Sorafenib ile muamele sonrası CD90 ifadesi değişmezken, CD44 ifadesi artış göstermiştir. Rapamisin ile muamele edilen hücreler CD90 ifadesi azalırken, doksorubisin ile muamele edilen hücrelerin hem CD90 hem de CD44 ifadeleri artmıştır. DAPT ise CD44 ifadesinde azaltıcı bir etki göstermiştir (Şekil

10, 11). Bu sonuçlar ile, epitelyal özellikli hücrelerin kanser kök hücrelerinde etkili olan inhibitörlerin, mezenkimal özellikli hücrelerde de benzer etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.



**Şekil 10:** Mahlavu hücre hattının belirlenen inhibitörler ile muamele sonrasında CD90 ifade değişimleri. Grafikler DMSO ile karşılaştırmalı olarak inhibitörlerin CD90 belirteçi ifadesinin yoğunluğunu göstermektedir.



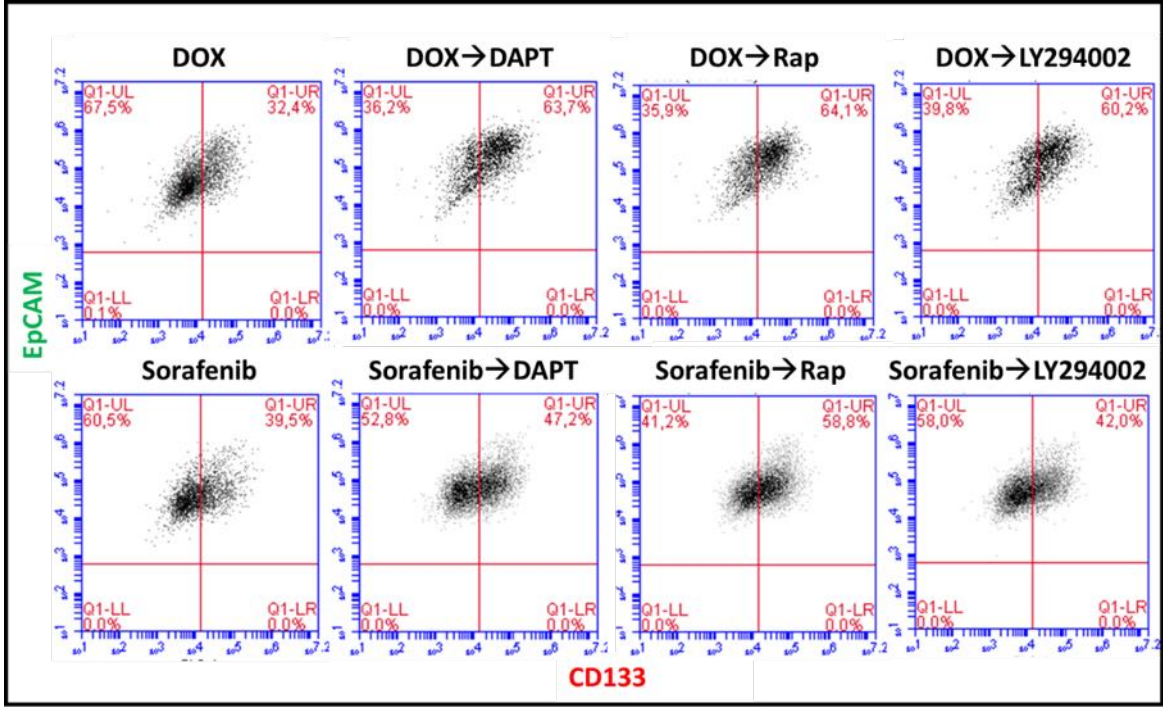
**Şekil 11:** SNU475 hücre hattının belirlenen inhibitörler ile muamele sonrasında CD90 ve CD44 ifade değişimleri. Grafikler DMSO ile karşılaştırmalı olarak inhibitörlerin CD90 ve CD44 belirteçlerinin ifadesinin değişimini göstermektedir.

#### 4.6 Aday inhibitörler arasında etkin olduğu belirlenenler ile kombinasyon deneyleri:

İstatistiksel olarak anlamlı bulunan etkili ve etkisiz ilaç adaylarının etkilerinin artırılmasına yönelik tasarlanan kombinasyon deneyleri için iki farklı strateji belirlenmiştir. Bunlardan ilki; etkisiz (kansere hücreleri üzerinde zenginleştirici etkisi olan) inhibitör ile muamele edilmesi (3 gün) ardından etkili inhibitör ile muamele edilmesi (3 gün), ikincisi ise; etkili inhibitör ile muamele sonrasında etkisiz inhibitör ile devam edilmesidir. Bu iki stratejiden ilkinde etkili ilacın etkisiz ilacın ardından verilmesi sonucu kanser kök hücre popülasyonu üzerinde azaltıcı etkisinin görülmesi, ikincisinde ise etkili ilacın hücrelerdeki kanser kök hücrelerini azaltıcı/başkalaştırıcı etkisinin ardından kemoterapide sıkça kullanılan ilaçların etkisini artırıcı etkisinin görülmesi amaçlanmıştır.

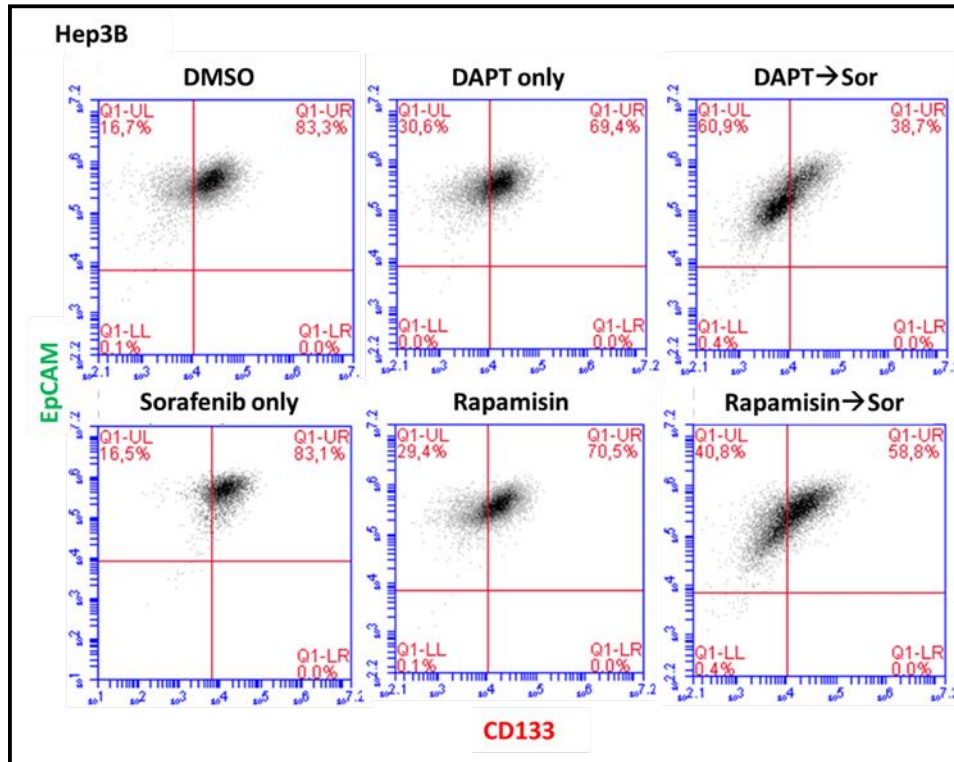
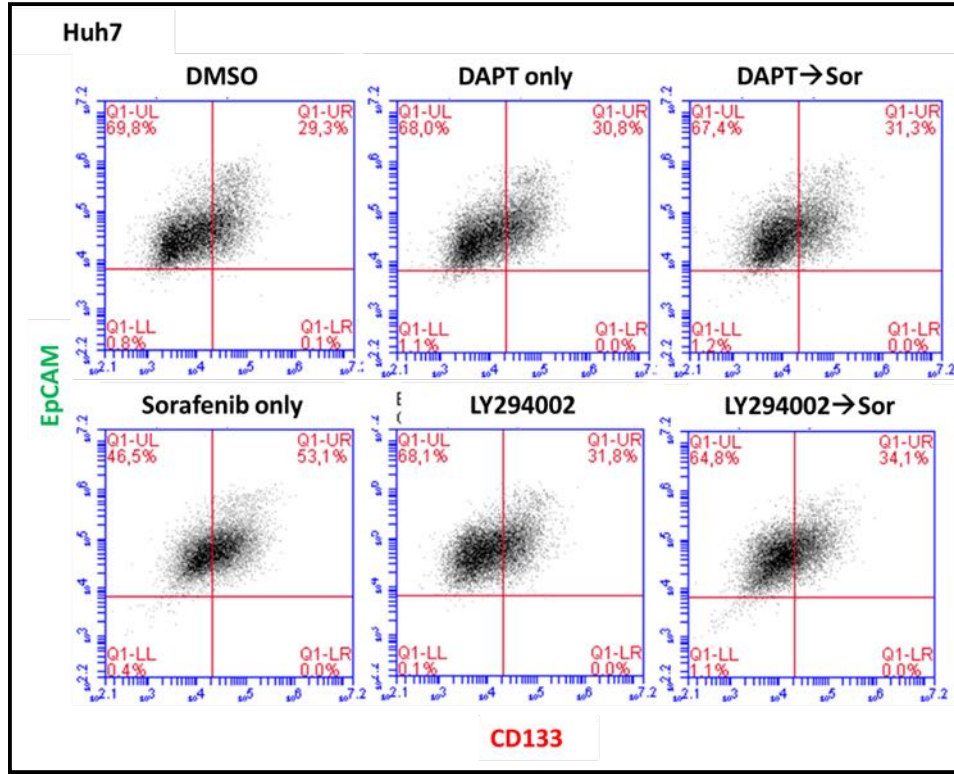
İlk stratejinin öncelikle Huh7 hücre hattında denenmesi ve başarısız olunması (beklenen etkinin görülmemesi) sonucunda, ikinci strateji ile devam edilmiştir. Sonuçlar akış sitometrisi yöntemi ile elde edilmiştir. Doksorubisin veya Sorafenib gibi kanser kök hücrelerine etkisi olmayan inhibitörler ile muamele edilen hücrelerin daha sonra LY294002, Rapamisin veya DAPT ile muamele edilmesi sonucunda CD133+/EpCAM+ popülasyonlarında azalma tespit edilememiş, aksine bu popülasyonda ciddi bir artış (dirençli hücre sayısında artış)

gözlemlenmiştir (Şekil 12). Ancak ikinci strateji uygulandığında Huh7 hücrelerinde gözle görülür bir fark elde edilemezken, Hep3B hücreleri üzerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, DAPT veya Rapamisin önceden kullanılır, ardından Sorafenib verirse, canlı kalan hücrelerdeki kanser kök hücre oranlarının daha etkili bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şeki 13).



**Şekil 12:** Huh7 hücreleri üzerinde kombinasyon deneyleri için belirlenen ilk strateji ile elde edilen akış sitometrisi sonuçları. X-ekseni CD133 pozitiviteyi, Y-ekseni ise EpCAM positivitiesini göstermektedir. Her iki yüzey belirteçi için pozitif olan popülasyon sağ üst pencerede yüzdeler ile belirtilmiştir. Her bir inhibitör IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda verilmiştir. DOX: Doksorubisin, Rap: Rapamisin.

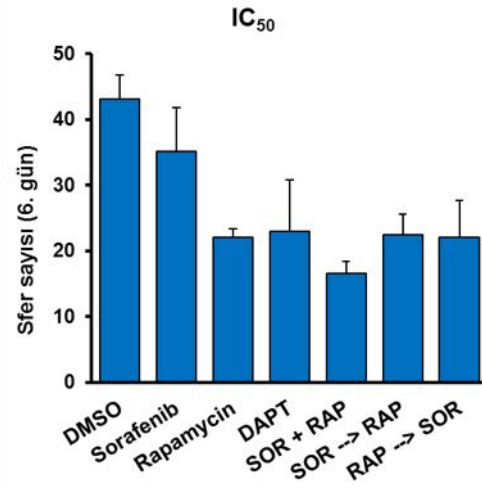
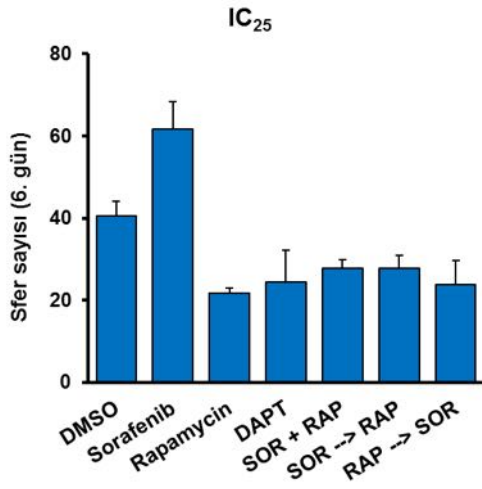
Kombinasyon deneyleri sonucunda ikinci strateji ile etkili ilacın ikinci ilaç verilmeden önce kanser kök hücrelerini daha etkili bir şekilde azaltıp, ikinci ilaca daha duyarlı hale gelmesini sağladığı düşünülmektedir.



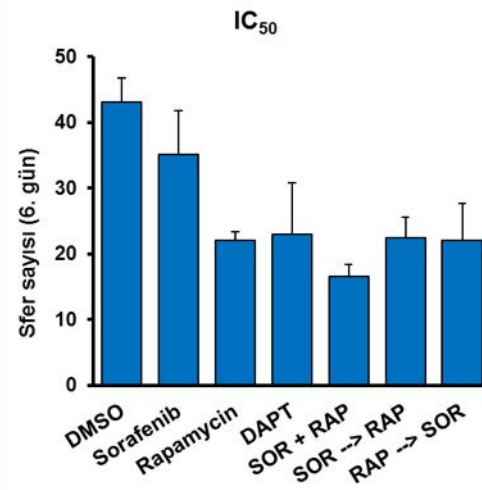
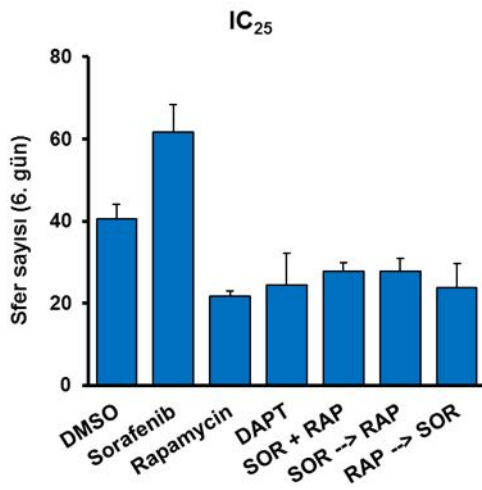
**Şekil 13:** Huh7 ve Hep3B hücreleri üzerinde kombinasyon deneyleri için belirlenen ikinci strateji ile elde edilen akış sitometrisi sonuçları. X-ekseni CD133 pozitiviteyi, Y-ekseni ise

EpCAM positivitesini göstermektedir. Her iki yüzey belirteçi için pozitif olan popülasyon sağ üst pencerede yüzdeler ile belirtilmiştir. Her bir inhibitör IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda verilmiştir. Sor: Sorafenib.

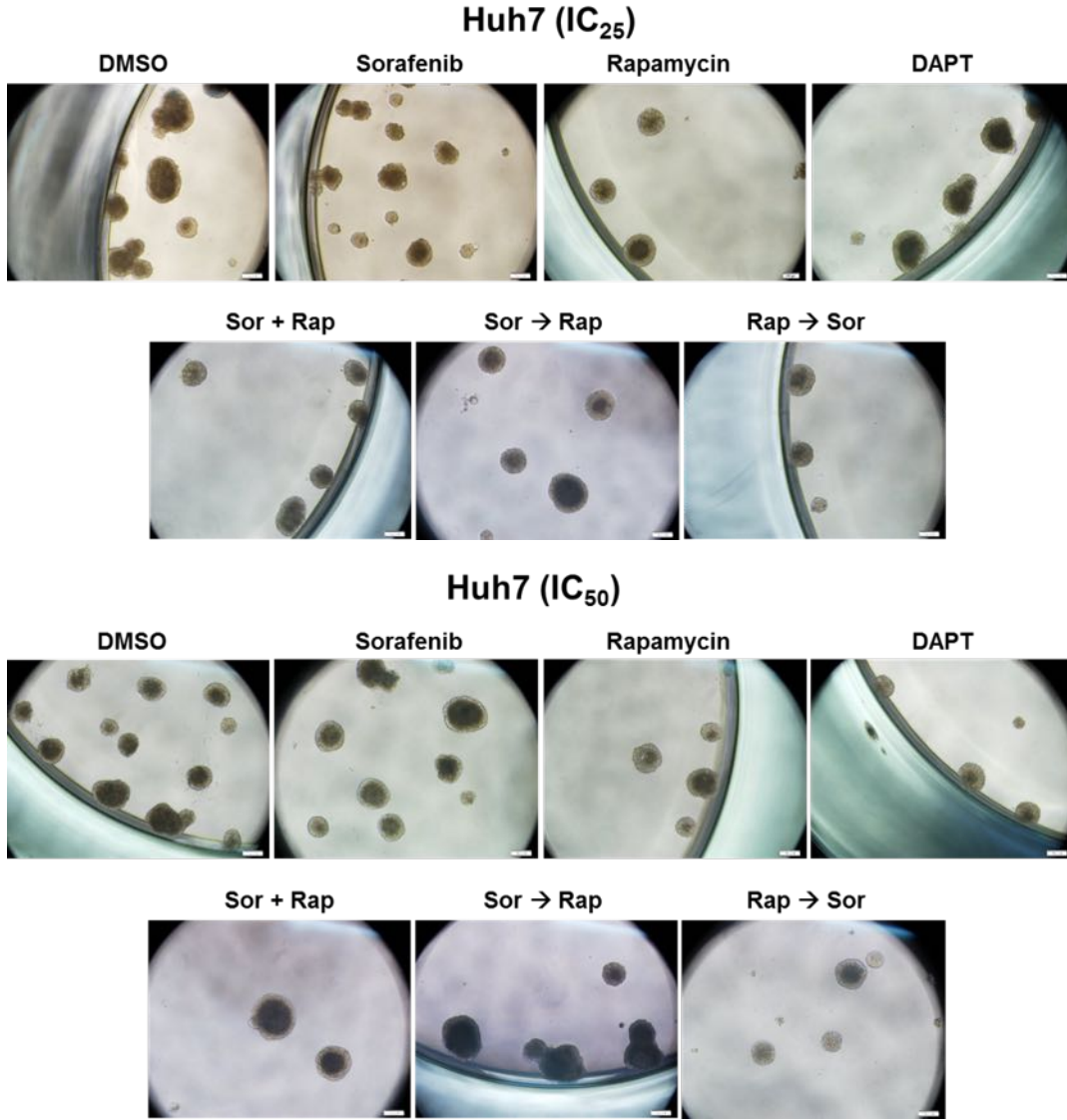
**4.7 Kanser kök hücrelerine karşı etkili olduğu belirlenen inhibitörlerin hücrelerin sfer oluşturma kapasitesine olan etkilerinin belirlenmesi:** Daha önce de belirtildiği üzere, hücrelerin sfer oluşturabilmesi kanser kök hücre özelliklerini taşımakta olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Öncesinde akış sitometrisi ile kanser kök hücre belirteçlerinin pozitivite oranları ile etkinliği belirlenen moleküllerden Sorafenib, Rapamisin, DAPT ve bu inhibitörlerden Rapamisin ve Sorafenib ile olan kombinasyon olarak muamele sonucunda hücrelerin sfer oluşturma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Hücreler 6 gün boyunca inhibitörlerin IC<sub>25</sub> veya IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmiş (sıralı kombinasyonlar için 3 gün bir inhibitör, diğer 3 gün ikinci inhibitör) sonrasında canlı kalan hücreler toplanıp sfer oluşturma besi yeri içerisinde low-attachment 96 kuyucuklu tabaklara ekilmiştir. 6 gün sonrasında oluşan sferler sayılmış ve boyutları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, Sorafenib ile muamele edilen (IC<sub>25</sub>) hücrelerin sfer oluşturma kapasiteleri DMSO kontrol) ile muamele edilen hücrelere göre artarken, sadece Rapamisin ile muamele edilen hücreler Sorafenibe göre 3 kat daha az, kontrol grubuna göre ise 2 kat daha az sfer oluşumuna sebep olmuştur. DAPT ile muamele edilen hücreler benzer etkiye sebep olurken, kombinasyon deneyleri (beraber veya sıralı) sfer oluşumunu negatif yönde etkilemiştir (Şekil 14). Sfer boyutları karşılaştırıldığında ise, sfer boyutunun Rapamisin ile muamele edilen hücrelerde daha küçük olduğu, ancak Sorafenib ile muamele edilen hücrelerin daha büyük sfer oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Sfer boyutunu etkileyen en etkili kombinasyon ise Rap ardından Sorafenib sıralı kombinasyon muamelesi olarak tespit edilmiştir (Şekil 15 ve Şekil 16). Böylece daha önce yapılan deneylerde kanser kök hücrelerine karşı etkililiği gösterilmiş inhibitörlerin etkinliği birkez daha farklı bir yaklaşım ile doğrulanmıştır.



**Şekil 14:** Seçilen inhibitörler ile belirtilen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda muamele edilen Huh7 hücrelerinin sfer oluşturma kapasiteleri (sfer sayıları).



**Şekil 15:** Seçilen inhibitörler ile belirtilen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda muamele edilen Huh7 hücrelerinin sfer oluşturma kapasiteleri (sfer boyutları).



**Şekil 16:** Seçilen inhibitörler ile belirtilen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda muamele edilen Huh7 hücrelerinin oluşturduğu sferlerin temsili görüntüleri (10x büyütme oranı).

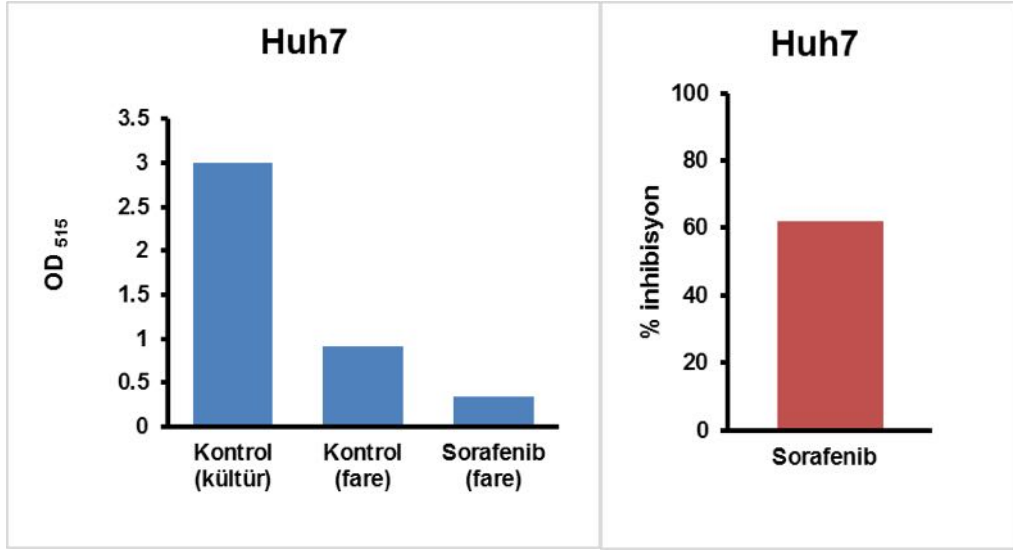
**4.8 Hollow fibre implantasyon deneyleri ile etkinliği in vitro olarak gösterilmiş inhibitörlerin tüysüz farede (in vivo) test edilmesi:** Hücrelerin hollow fibre membran içerisinde canlılık oranlarının belirlenmesi için implantasyon deneyleri öncesinde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna göre Huh7 hücreleri membranlar içerisine enjekte edildikten sonra, 3 gün boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> kabin içerisinde bekletilmiş, sonrasında hücreler membranlar içerisinden çıkartılıp mikroskop altında incelenmiştir. Hücreleri trypan blue boyaması ile canlılık oranlarının %70 ile 75 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler ile implantasyon

deneilerine devam edilmesi uygun görülmüştür. İmplantasyon ve sonrasında farelerde herhangi bir komplikasyon gözlemlenmemiştir. Fareler deneyler boyunca sağlıklı kalmıştır (örnek fare: Şekil 17). İmplantasyon amacıyla açılan küçük kesikler sonraki 1-2 gün içerisinde iyileşmiştir.



**Şekil 17:** Subkutan Hollow fibre implantasyonu yapılmış tüysüz erkek fare örneği. Okların her biri birer implantı göstermektedir.

Hücreler optimizasyon deneyleri için öncelikle 4 gün boyunca basit şurup (kontrol grubu) veya Sorafenib (30mg/kg) (deney grubu) ile gavaj yoluyla muamele edilmiştir. 5. gün implantlar protokolde de belirtildiği gibi geri alınmış ve 96 kuyucuklu hücre tabaklarına ekildikten sonra SRB yöntemi ile canlılık oranları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, içerisine Huh7 enjekte edilmiş ama kültür ortamında bekletilmiş membranlardaki hücreler (kültür kontrol), farelere implant olup kontrol grubunda yer alan hücrelere göre daha hızlı büyümüştür. Bunun sebebi, hücrelerin kültür ortamında besi yerinden gerekli büyüme faktörlerine daha rahat ulaşabilmesi olarak değerlendirilmiştir. Buna karşılık olarak, deney grubundan elde edilen hücrelerin ise kontrol grubuna göre daha az sayıda olduğu gösterilmiştir (Şekil 18).



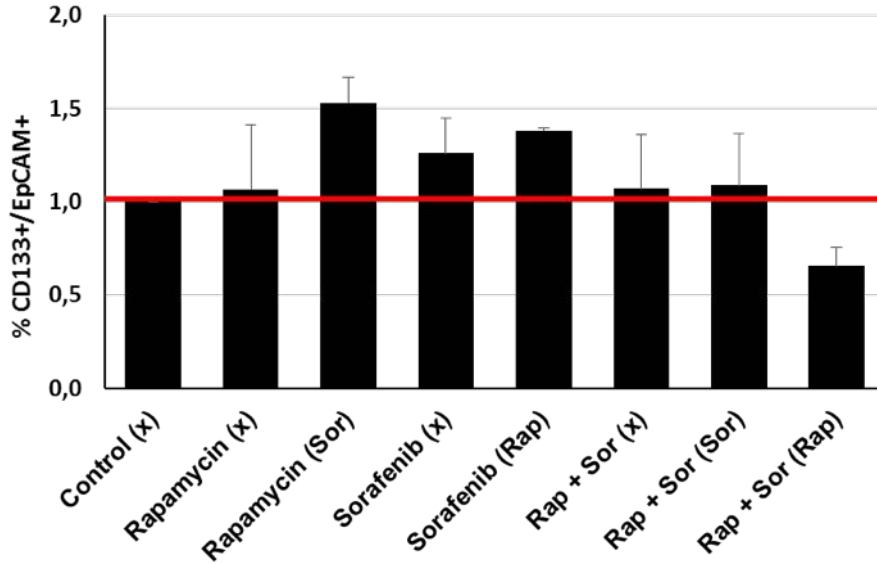
**Şekil 18:** Hollow fibre implantasyon deneyleri için optimizasyon çalışmaları. Huh7 hücreleri ile enjekte edilen membranların tüsüz farelere implant edildikten ve 4 gün boyunca basit şurup veya Sorafenib ile muamele edildikten sonra elde edilen hücrelerin canlılık oranları gösterilmiştir. Hücre kültüründe bekletilen kontrol grubu faredeki kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (solda). Ayrıca deney grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında elde edilen yüzde inhibisyon değeri (sağda) gösterilmiştir.

Huh7 hücrelerindeki kanser kök hücre popülasyonuna olan etkilerini in vivo olarak belirlemek üzere hollow fibre membranlar implantasyonları yapılmış ve fareler Tablo 4'da belirtilen 8 farklı gruba ayrılmıştır. Buna göre hücreler kültür ortamında önceden Sorafenib veya Rapamisin ile 48 boyunca IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında muamele edilmiştir. Toplanan hücreler ve ön muamele görmemiş hücreler hollow fibre membranlar içerisine enjekte edilip implant edildikten sonra, fareler basit şurup, Rapamisin (2mg/kg) veya Sorafenib (30mg/kg) ile tek başına, ya da Rapamisin ve Sorafenib beraber olmak üzere 4 farklı şekilde muamele edilmiştir.

**Tablo 4:** Hollow fibre deneylerinde hazırlanan hücre grupları ve implantasyon sonrasında yapılan ilaç muameleleri.

Ön muamele (kültür)	Muamele (gavaj)
x	Basit şurup
x	Rapamisin
x	Sorafenib
Sorafenib	Rapamisin
Rapamisin	Sorafenib
x	Rap + Sor
Sorafenib	Rap + Sor
Rapamisin	Rap + Sor

Deney sonunda elde edilen hücreler kanser kök hücre belirteçleri (CD133 ve EpCAM) antikorları ile boyanmış ve akış sitometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 19).



**Şekil 19:** Hollow fibre deneyleri sonucunda hücrelerin kanser kök hücre belirteçleri için pozitivite değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi grafiği. Elde edilen değerler, en az 2 farklı deneyden elde edilen sonuçları yansıtmaktadır. Kırmızı çizgi kontrol grubuna göre CD133+/EpCAM+ pozitiflerinin değişimini göstermektedir.

Buna göre, Rapamisin tek başına kanser kök hücre belirteçlerinde belirgin bir değişikliğe sebep olmazken, Sorafenib ile muamele edilen farelerde bu belirteçlerin ifadesinin arttığı

gösterilmiştir. Ayrıca Sorafenib ile ön muamele edilmiş Huh7 hücreleri farelere implant edildikten sonra yapılan hiçbir muamele (Rapamisin veya Rap+Sor), kanser kök hücre popülasyonunun artmasına engel olamamıştır. Fakat önceden Rapamisin ile muamele edilmiş hücreler sonrasında farede Rapamisin ve Sorafenib ile muamele edildiğinde kanser kök hücrelerine karşı etkili bir sonuç elde edilebilmiştir.

## 5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Projemizin ilk döneminde karaciğer kanseri kök hücrelerini zenginleştirmek amaçlı tercih edilen kimyasal yaklaşım yeteri kadar verimli bulunmadığı ve bu popülasyonun saf olarak elde edilmesinin oldukça uzun zaman (birkaç ay) sürmesi sebebiyle manyetik hücre ayırma yönteminin (MACS, Miltenyi) kullanılması daha uygun bulunmuştur. Bu yöntem ile kanser kök hücre belirteçlerini işaretleyip manyetik alanda pozitif olanların tutunmasını sağlayarak, negatif olanlardan ayrılması sağlanmıştır. Bu yöntem ile kanser kök hücreleri heterojen popülasyondan saf olarak (%80-90) çok daha kısa bir sürede (birkaç saat) ayrılabilmiştir. Ayrıca manyetik separasyon tekniğine alternatif olarak bilinen FACS yöntemine göre maliyet açısından çok daha uygun bulunmuştur.

Karaciğer kanseri hücrelerinden kanser kök hücrelerinin ayrılması için kanser kök hücre belirteçleri CD133 ve EpCAM diğer tercih edilmiştir. Literatürde yalnızca bir belirteç ifadesine dayanarak hücrelerin kök hücre özelliği taşıdığını iddia etmenin doğru olmadığı belirtildiği için iki belirtecin ifadesinin pozitifitesi dikkate alınmıştır. Yapılan fonksiyonel deneyler ile de bu hücrelerin her iki belirteç için negatif olan hücrelere göre kök hücre özelliği gösterdiği doğrulanmıştır (sferleşme ve kök hücre transkripsiyon faktör ifadeleri). Dolayısıyla CD133+/EpCAM+ popülasyonunda tespit edilen değişimler, dolaylı olarak kanser kök hücrelerinde meydana gelen değişimleri işaret etmektedir. Mezenkimal özellikli karaciğer kanseri hücrelerinde ise, CD90 veya CD44 belirteçleri dikkate alınarak kök hücre popülasyonlarındaki değişimler gözlemlenmiştir. İnhibitörlerin hem epitelyal hem de mezenkimal özellikli hücrelerde benzer etkiler göstermesi, bu inhibitörlerin kök hücre mekanizmalarına karşı bir etkisi olduğunu göstermektedir.

mTOR inhibitörü olan Rapamisin için literatürde diğer kanser türlerinde kanser kök hücrelere karşı etkili olduğuna dair çalışmalar dikkat çekmektedir (Yang vd. 2008; Matsubara vd. 2013; Xie vd. 2016; Carrasco-Garcia vd. 2016; Su vd. 2016). Pankriyatik kanserde kanser kök hücrelerinin regülasyonunda mTOR'un öneminden bahseden bir çalışmada, bu yolağın kök hücreleşme özelliklerini koruduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise Rapamisin'in akciğer kanseri kök hücrelerinin fonksiyonunu SOX2 proteinine etki ederek engellediğini göstermiştir. Benzer çalışmalar Rapamisin'in meme kanseri, kolorektal kanser gibi diğer kanser çeşitlerinde olan etkilerinden bahsetmektedir.

Yapılan sitotoksosite deneylerinden sonra etkinliği belirlenen inhibitörlerin, kanser kök hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak üzere, muamele sonrasında canlı kalan hücrelerin CD133+/EpCAM+ ifade oranları dikkate alınmıştır. Bunun en önemli sebebi, kansere karşı

uygulanan ilaçların tümör hücrelerini (başkalaşmış hücreler) öldürebilmesi, ancak kanser kök hücrelerinin (başkalaşmamış) canlı kalabilmesidir. Dolayısıyla ilaçların öldürebildikleri popülasyon değil, öldüremediği hücrelerin ne oranda kök hücre barındırdığı büyük önem taşımaktadır. Nihayetinde bu hücreler kanserin nüksetmesine veya metastazına sebep olmaktadır. Çalışılan inhibitörler arasından CD133+/EpCAM+ popülasyonunu kontrol grubuna göre azaltabilenler bu çalışmada önem arz etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda dikkat çeken bulgulardan biri de karaciğer kanseri için klinikte FDA onaylı tek ilaç olan Sorafenib'in ve kanser tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan DNA interkalatörlerin (Doksorubisin veya Kamptotesin) kanser kök hücre popülasyonunun zenginleşmesini sağlamaları veya var olan oranı korumalarını sağlamış olmalarıdır. Buna karşılık, Rapamisin, LY294002 ve DAPT gibi inhibitörlerin hücrelerdeki yan popülasyona etki ettiği ve kök hücre özelliklerini baskıladığı gösterilmiştir. Yapılan kombinasyon çalışmaları ile de, Sorafenib'in kök hücre zenginleştirici etkisini baskılaması için hücreler öncelikle Rapamisin ile muamele edildiğinde, muamele sonrasında canlı kalan hücrelerin kök hücre özelliklerini kaybetmeye başladıkları tespit edilmiştir.

Hem yüzey belirteçleri bakımından hem de fonksiyonel deneyler ile doğrulanan deneylere ek olarak, in vivo deneyler de gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, xenograft deneylerine oranla oldukça kısa sürece sonuç verebilen ve daha az sayıda fare ile birden çok kondisyonun çalışılmasına olanak sağlayan hollow fibre implantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda in vitro olarak etkisi doğrulanan Rapamisin'in, ön muamele aşamasında kullanılması ardından Sorafenib ve Rapamisinin devamında birlikte kullanılmasının tüysüz farede en etkili seçenek olduğu gösterilmiştir.

Hücre kültüründe yapılan deneylerin in vivo deneyler ile benzerlik göstermesi çalışmanın bir sistem üzerinde etkinliğinin olma potansiyeli açısından önem taşımaktadır. Öyleki yapılan klinik testlerde dikkate alınması gereken noktalardan biri de yalnızca ilaçların kanser hücrelerine karşı olan öldürücü etkileri değil, bu inhibitörlerin yan popülasyona karşı olan etkilerinin de belirlenmesidir. Dolayısıyla yapılan bu çalışma, karaciğer kanseri tedavi sürecinde karşılaşılan ilaca dirençlilik sorunsalının kaynaklarından biri olan kanser kök hücrelerine karşı etkili ilaç aday keşfi amacı bakımından yenilikçi bir yaklaşım sergilemiştir.

Karaciğer kanseri hücreleri üzerinde hücre ölümünden çok hücre büyümesini engelleyici etkisi olan Rapamisin'in, hangi mekanizma üzerinden kök hücre özelliklerini baskıladığı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle, Rapamisin gibi inhibitörlerin karaciğer kanseri kök hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları ile ilgili yapılacak çalışmalar oldukça önemli olacaktır. Bunun için

geniş platformlarda gerçekleştirilebilecek gen ifade analizleri (microarray gibi) karşılaştırılarak Rapamisin etkisi altında kalan hücrelerde ne gibi değişikliklerin meydana geldiğini saptamak, bu konu hakkında bilinmeyenleri keşfetmek adına etkili bir çalışma olacaktır.

## KAYNAKLAR LİSTESİ

- Aravalli, Rajagopal N, Clifford J Steer, ve Erik N K Cressman. 2008. "Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (6): 2047–63.
- Carrasco-Garcia, Estefania, Lidia Lopez, Paula Aldaz, Sara Arevalo, Juncal Aldaregia, Larraitz Egaña, Luis Bujanda, vd. 2016. "SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin". *Scientific Reports* 6 (1): 32350.
- Chen, Jiang, Renan Jin, Jie Zhao, Jinghua Liu, Hanning Ying, Han Yan, Senjun Zhou, vd. 2015. "Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma". *Cancer Letters*.
- Chen, Kuen-Feng, Hui-Ling Chen, Wei-Tien Tai, Wen-Chi Feng, Chih-Hung Hsu, Pei-Jer Chen, ve Ann-Lii Cheng. 2011. "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337 (1): 155–61.
- Chen, Yi, Dongke Yu, Hao Zhang, Hongwei He, Caixia Zhang, Wuli Zhao, ve Rong guang Shao. 2012. "CD133+EpCAM+ phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 Cells". *International Journal of Biological Sciences* 8 (7): 992–1004.
- Dalerba, Piero, Robert W Cho, ve Michael F Clarke. 2007. "Cancer stem cells: models and concepts." *Annual review of medicine* 58: 267–84.
- Dean, Michael. 2009. "ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells". *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14 (1): 3–9.
- Dean, Michael, Tito Fojo, ve Susan Bates. 2005. "Tumour stem cells and drug resistance". *Nature Reviews Cancer* 5 (4): 275–84.
- El-Serag, H B, ve A C Mason. 1999. "Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States." *The New England journal of medicine* 340 (10): 745–50.
- El-Serag, Hashem B., ve K. Lenhard Rudolph. 2007. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis". *Gastroenterology*.
- Fuchs, Bryan C., Tsutomu Fujii, Jon D. Dorfman, Jonathan M. Goodwin, Andrew X. Zhu, Michael Lanuti, ve Kenneth K. Tanabe. 2008. "Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells". *Cancer Research* 68 (7): 2391–99.
- Lee, T K, A Castilho, S Ma, ve I O Ng. 2009. "Liver cancer stem cells: implications for a new therapeutic target". *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 29 (7): 955–65.
- Liu, H, W Zhang, Y Jia, Q Yu, G E Grau, L Peng, Y Ran, Z Yang, H Deng, ve J Lou. 2013. "Single-cell clones of liver cancer stem cells have the potential of differentiating into different types of tumor cells". *Cell Death Dis* 4: e857.

Liu, Li-Li, Da Fu, Yushui Ma, ve Xi-Zhong Shen. 2011. "The power and the promise of liver cancer stem cell markers." *Stem cells and development* 20 (12): 2023–30.

Matsubara, Shyuichiro, Qiang Ding, Yumi Miyazaki, Taisaku Kuwahata, Koichiro Tsukasa, ve Sonshin Takao. 2013. "mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions". *Scientific Reports* 3.

Maugeri-Sacca, M., M. Bartucci, ve R. De Maria. 2012. "DNA Damage Repair Pathways in Cancer Stem Cells". *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (8): 1627–36.

Oishi, Naoki, ve Xin Wei Wang. 2011. "Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells." *International journal of biological sciences* 7 (5): 517–35.

Peinado, Héctor, David Olmeda, ve Amparo Cano. 2007. "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nature reviews. Cancer* 7 (6): 415–28.

Salnikov, A V, G Kusumawidjaja, V Rausch, H Bruns, W Gross, A Khamidjanov, E Ryschich, vd. 2009. "Cancer stem cell marker expression in hepatocellular carcinoma and liver metastases is not sufficient as single prognostic parameter". *Cancer Lett* 275 (2): 185–93.

Sharma, Sreenath V., Daniel A. Haber, ve Jeff Settleman. 2010. "Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents". *Nature Reviews Cancer* 10 (4): 241–53.

Singh, A, ve J Settleman. 2010. "EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer". *Oncogene* 29 (34): 4741–51.

Stewart, B W, ve C P Wild. 2014. *World Cancer Report 2014. World Health Organization: Geneva.*

Su, Rujuan, Haocheng Nan, Hui Guo, Zhiping Ruan, Lili Jiang, Yuanyuan Song, ve Kejun Nan. 2016. "Associations of components of PTEN/AKT/mTOR pathway with cancer stem cell markers and prognostic value of these biomarkers in hepatocellular carcinoma". *Hepatology Research* 46 (13): 1380–91.

Wu, Yaojiong, ve Philip Yuguang Wu. 2009. "CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns". *Stem Cells and Development* 18 (8): 1127–34.

Xie, Li Xia, Feng Feng Sun, Bin Feng He, Xiao Feng Zhan, Juan Song, Sheng Song Chen, Shi Cang Yu, ve Xiao Qun Ye. 2016. "Rapamycin inhibited the function of lung CSCs via SOX2". *Tumor Biology* 37 (4): 4929–37.

Yamashita, Taro, ve Shuichi Kaneko. 2014. "Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells." *Journal of gastroenterology* 49 (7): 1105–10.

Yang, Zhen Fan, David W Ho, Michael N Ng, Chi Keung Lau, Wan Ching Yu, Patricia Ngai, Patrick W K Chu, Chi Tat Lam, Ronnie T P Poon, ve Sheung Tat Fan. 2008. "Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer." *Cancer cell* 13 (2): 153–66.

Zhai, Bo, ve Xue Ying Sun. 2013. "Mechanisms of resistance to sorafenib and the corresponding strategies in hepatocellular carcinoma". *World Journal of Hepatology* 5 (7): 345–52.

Zhou, Bin-Bing S, Haiying Zhang, Marc Damelin, Kenneth G Geles, Justin C Grindley, ve Peter B Dirks. 2009. "Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery." *Nature reviews. Drug discovery* 8 (10): 806–23.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. RENGÜL ATALAY
Proje No:	113S540
Proje Başlığı:	Karaciğer Kanseri Kök Hücre Ksenograft Modelinde Sitotoksik Aktiviteli Yeni İlaç Adaylarının Etkilerinin Belirlenmesi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/01/2014 - 01/01/2017
Onaylanan Bütçe:	408530.0
Harcanan Bütçe:	386699.05
Öz:	<p>Karaciğer kanseri, karaciğer hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanan ve heterojen bir yapıya sahip olan karmaşık bir hastalıktır. Karaciğer kanseri hücreleri, ek popülasyon olarak bilinen ve kök hücre özelliği taşıyan hücreler içermektedir. Hastaların kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmesinin veya kanserin nüksetmesinin altında yatan sebeplerden en önemlileri PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının hiperaktif olması ve kanser kök hücrelerinin dokuda varlığını sürdürerek tek başına tümör gelişimini sağlayabilmeleridir.</p> <p>TÜBİTAK tarafından desteklenen bu proje kapsamında karaciğer kanserinin kemoterapötik tedavisinin daha etkili olması amacıyla karaciğer kanseri hücre hatlarında kanser kök hücrelerine karşı PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı inhibitörleri yanı sıra klinikte kullanılan Sorafenib, Kamtotesin ve Doksorubisin gibi kemoterapötiklerin etkileri belirlenmiş ve sunulmuştur.</p>
Anahtar Kelimeler:	Kanser kök hücresi, hepatoselüler kanser, Sorafenib, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- Ynamide Click chemistry in development of triazole VEGFR2 TK modulators (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>2- Application of the Ugi reaction with multiple amino acid-derived components: synthesis and conformational evaluation of piperazine-based minimalist peptidomimetics (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>3- Bioactivities of small molecule kinase inhibitors in liver cancer stem cells (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p>