

KANSER KÖK HÜCRE PROLİFERASYONUNUN AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA BELİRLENMESİ: BİR PİLOT ÇALIŞMA

Determination of Cancer Stem Cell Proliferation in Lung Cancer Patients: A Pilot Study

Seçil YILMAZ¹, Medine DOĞAN SARIKAYA¹, Burcu Şen BAĞCI¹, Elif Afra BEŞPARMAK¹, Elif YAŞAR¹, Ömer ÖNAL², Özlem CANÖZ³

ÖZET

Amaç: Akciğer kanseri kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Heterojen yapıdaki tümörler içinde nispeten küçük bir popülasyona sahip olan kanser kök hücreler (KKH), tedaviye dirençten ve metastazdan sorumludur. KKH'ler ile ilgili deneysel çalışmaların sınırlı sayıda olmasından dolayı bu çalışmada akciğer kanseri hasta KKH'lerinin proliferasyon profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı almış üç farklı metastazı olan hastalardan primer hücre kültürü yapıldı. KKH'ler flow sitometri ile CD133+, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre izole edildi. İzole edilen kanser kök hücrelerinin in vitro proliferatif potansiyeli 10 gün boyunca değerlendirildi.

Bulgular: 45-52 yaş arası hastalarda, farklı bölgelere metastazı olan iki hasta ile metastazı olmayan bir hastaya ait toplam 3 hastanın KKH profilleri flow sitometride CD133+, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre karşılaştırıldığında bu oranlar %0,4 ve %1,3 arasında bulundu. KKH'lerin ikiye katlanma süreleri 49,24 ve 27,48 saat aralığında değiştiği görüldü.

Sonuç: Tüm hastaların proliferasyon sonuçları karşılaştırıldığında farklı proliferasyon profillerine sahip oldukları görüldü. Hücre döngüsünü hedefleyen, kanser tedavilerinden kaçabilen KKH'lerin proliferasyon profili beklenildiği gibi durağan ve stabil süreçleri içerdiği gözlemlendi. Bununla birlikte bu pilot çalışmada üç hastanın büyüme eğrisindeki farklılıklar hastaların farklı proliferasyon profiline sahip olduğunu ve kanser tedavisinde kişiye özgü terapilerin kaçınılmaz olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri; Kanser Kök Hücre; Kanser Kök Hücre Proliferasyonu

ABSTRACT

Objective: Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths. Cancer stem cells (CSCs), which constitute a relatively small population within heterogeneous tumors, are responsible for treatment resistance and metastasis. Due to the limited experimental research on CSCs, this study aims to investigate the proliferation profile of CSCs in lung cancer patients.

Material and Methods: Primary cell cultures were established from patients with non-small cell lung cancer who had three different metastases. CSCs were isolated using flow cytometry based on CD133+, CD24-/low and CD44+ biomarkers. The in vitro proliferative potential of isolated cancer stem cells was assessed over a period of 10 days.

Results: The CSC profiles of a total of 3 patients, aged between 45-52 years, including two patients with metastases to different regions and one patient without metastasis, were compared using flow cytometry based on CD133+, CD24-/low and CD44+ biomarkers. These rates were found to be between 0.4% and 1.3%. The doubling times of CSCs were observed to vary between 49.24 and 27.48 hours.

Conclusion: The proliferation profile of CSCs, which could escape cancer treatment targeting the cell cycle, was observed to include expectedly steady and stable processes. When comparing the proliferation results of all patients, it was found that they exhibited different proliferation profiles. Moreover, the differences in the growth curves of the three patients in this pilot study indicate that each patient has a distinct proliferation profile, underscoring the necessity of personalized therapies in cancer treatment.

Keywords: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC); Cancer Stem Cell; Cancer Stem Cell Proliferation

¹Erciyes Üniversitesi,
Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK).

²Erciyes Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı.

³Erciyes Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı.

Seçil YILMAZ, Dr. Öğr. Ü.
(0000-0001-9381-828X)

Medine DOĞAN SARIKAYA,
(0000-0003-0435-6066)

Burcu Şen BAĞCI,
(0000-0002-4526-5198)

Elif Afra BEŞPARMAK,
(0000-0001-6200-876X)

Elif YAŞAR,
(0000-0001-5974-4176)

Ömer ÖNAL, Doç. Dr.
(0000-0002-9971-7401)

Özlem CANÖZ, Prof. Dr.
(0000-0002-0200-6970)

İletişim:

Dr. Öğr. Ü. Seçil YILMAZ
Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök
Hücre Merkezi (GENKÖK), Yenidoğan
Fakülte İçi Küme Evleri, 38280
Melikgazi/Kayseri

Geliş tarihi/Received: 28.06.2024

Kabul tarihi/Accepted: 03.09.2024

DOI: 10.16919/bozoktip.1504469

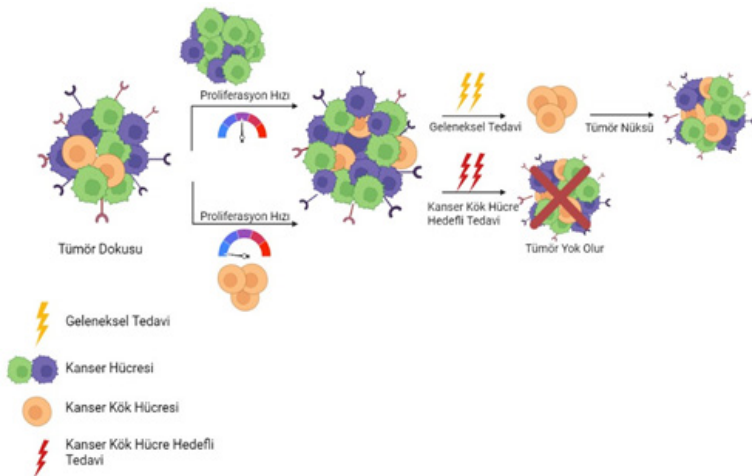
Bozok Tıp Derg 2024;14(3):160-168

Bozok Med J 2024;14(3):160-168

Giriş

Kanser insan hayatını ciddi şekilde tehdit eden bir hastalıktır (1). Her yıl 2 milyondan fazla akciğer kanseri vakası teşhis edilmekte ve yaklaşık 1,8 milyon insan ölmektedir (2). Akciğer kanseri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve yaygın olarak görülen küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak sınıflandırılabilir (3). Tanı ve tedavideki son gelişmeler kanser tedavisinde ilerleme sağlasa da günümüzde birçok hasta tedaviye yanıt vermeyerek hastalığın ilerlemesine veya nüksetmesine yol açmaktadır. Hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler cerrahi rezeksiyon ile tümör dokusunun çıkarılması, radyoterapi ve kemoterapidir. Tedavinin sınırlı etkinliği genellikle mevcut radyo/kemoterapilere dirençli küçük bir hücre popülasyonu olan kanser kök hücrelerini (KKH) etkileyememesinden kaynaklanabilir (4). Hızlı proliferasyona sahip kanser hücreleri mevcut terapötik tedavilere karşı yok olma eğilimindedir, ancak daha yavaş proliferasyona sahip KKH'lerin bu tedavilerden kaçtığı düşünülmekte olup KKH'lerin hücre döngüsünü ya da hızlı bölünen hücreleri hedef alan kemoterapötik ilaçlara karşı dirençli olduğu bilinmektedir (5,6). Bu durum sonucunda KKH'ler tümör başlatan hücreler ve tümörojenik kanser hücreleri olarak da adlandırılır (7). Çoğu solid tümör ve hematolojik malignitede KKH varlığı gösterilmiştir ve bu tümörojenik aktiviteler, akciğer, kolon, baş ve boyun, meme ve melanom

dahil olmak üzere birçok kanser türlerinde bulunmuştur (8, 9). Akciğer kanseri için CD133, CD24 ve CD44 biyobelirteçleri potansiyel kanser kök hücre biyobelirteçleri olarak kabul görmüştür (10). Tümör dokusundaki heterojen hücre popülasyonu içerisinde sadece küçük bir alt popülasyonu oluşturan kanser kök hücreler, tümör büyümesinden sorumludur. Ayrıca KKH'lerin metastaz yapma potansiyelinin olduğu söylenmektedir (11). KKH'ler DNA hasarını onarma noktasında da yüksek kapasiteye sahip olup düşük seviyelerde reaktif oksijen türleri (ROS) sergilerler ve yavaş çoğalırlar (12). Bu tür çeşitli genetik ve hücre adaptasyonlarından dolayı KKH'ler klasik terapötik yaklaşımlara dirençlidir (13). KKH'lerin terapötik olarak ortadan kaldırılması ve malignitelerin yok olması için, KKH mekanizmaların keşfedilmesini ve onları hedefleyecek yenilikçi terapilerin geliştirilmesi gerekmektedir (Şekil1) (14). Erişilebilirlikleri ve kullanılabilirlikleri nedeniyle hücre hatları kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (15). Kanser hücre hatlarının kullanıldığı çalışmalarda artan pasaj sayısı ile genetik anormalliklerin birikmesi klinik önemini sınırlamaktadır (16). Ayrıca hücre hatları, bireysel farklılıkları doğru bir şekilde temsil etmeyebilir veya büyük ölçüde tümör heterojenliğini göstermeyebilir. Hayvanlar ve insanlar arasındaki biyolojik cevaplar farklı olduğu için hayvan modellerinin kullanımı zaman alıcı ve farklılık gösterir. Klinik cevaplardaki bu farklılıklar,



Şekil 1. Kanser hastalarına uygulanan terapilerin kanser hücresi ve kanser kök hücresine olan etkisinin gösterimi. Geleneksel tedaviler proliferasyon hızı yüksek olan kanser hücrelerini yok edebilirken proliferasyon hızı düşük olan kanser kök hücrelerini hedefleyememektedir. Kanser kök hücreleri tümörün nüks etmesine sebep olabilirken, kanser kök hücre hedefli terapiler tümörün tamamen yok olmasını sağlayabilir.

hastalardan primer tümör hücrelerinin üretilmesi ve kültürlenmesi için yöntemlerin geliştirilmesine ivme kazandırmıştır (17).

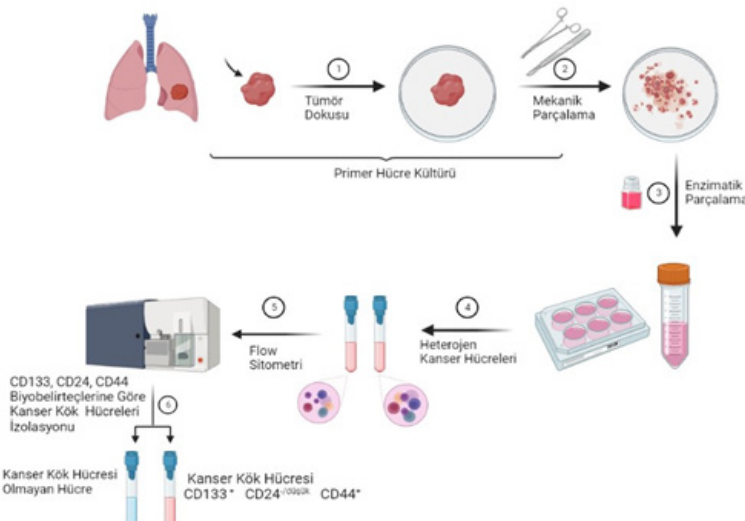
Kanser kök hücreleri üzerine klinik bilgi sağlayan hasta kaynaklı deneysel çalışmaların sınırlı olması sebebiyle, bu çalışmada primer hücrelerin üretimi için farklı metastaz durumlarına sahip iki akciğer kanseri hastası ile metastaz bulunmayan bir akciğer kanseri hastasından örnekler alınmıştır. Akciğer kanseri için potansiyel kanser kök hücre biyobelirteci olarak CD133 +, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre flow sitometri yöntemi ile izole edilen kanser kök hücrelerinin zamanla proliferasyonu belirlenmiş ve geleneksel kemoterapilerin hızlı çoğalan hücreleri hedeflediği hipotezi test edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma kapsamında yapılan deneyler kısaca Şekil 2'de şematize edilmiştir. Erciyes Üniversitesi Cerrahi Tıp Bilimleri Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda yapılan cerrahi rezeksiyon sonrasında patolojik incelemelerle kesin KHDAK tanısı konan hastalar bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalayarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan hücreler, "Akciğer Kanseri Hastalarında Kanser Kök Hücresinin Genomik Profillendirilmesi" başlıklı 215S849 numaralı TÜBİTAK 1001 projesinden elde edilmiştir. Bu çalışma Helsinki

Bildirgesi'ne uygun olacak şekilde 26.08. 2015 tarihli 2015/372 sayılı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

Primer kültürü için hasta kaynaklı akciğer kanser hücrelerinin, 30-60 dakika içerisinde %1 penisilinstreptomisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA, Cat. No. 15070063) bulunan Dulbecco's Modified Eagle besiyeri (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA, Cat. No. 41966029) içerisinde soğuk bir taşıma ortamı (%5 FBS, %1 Penisilinstreptomisin, Amfoterisin, L-Glutamin içeren DMEM) ile Erciyes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan çalışmanın yapılacağı birim olan Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne kanser dokuları getirildi. Tümör dokusu dışında kabindeki tüm yapılar bistüri ve pens yardımıyla uzaklaştırıldı. Mekanik ve enzimatik olarak parçalanmış hücreler %1 penisilinstreptomisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 15070063), %1 amfoterisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 15290026) ve %1 L-glutamin (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada, Kat. No. 7100) içeren DMEM'de (Gibco, Grand Island, NY, ABD, Kat. No. 41966029) %5 CO² ile nemli bir ortamda 37 °C sıcaklığındaki inkübatöre konuldu. Kanser kök hücreleri, heterojen kanser popülasyonundan ayırmak için BD FACSAria III Cell Sorter cihazı kullanıldı. Kanser hücreleri CD133 APC



Şekil 2. Çalışma kapsamında yapılan deneylerin şematik gösterimi. Hastadan alınan tümör dokusu mekanik ve enzimatik parçalama ile tek hücre haline getirilmiştir. Tek hücre haline gelen heterojen kanser hücreleri flow sitometri cihazı ile CD133+, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre izole edilerek kanser kök hücresi elde edilmiştir.

(372806, BioLegend, ABD), CD24 PE (311106, BioLegend, ABD) ve CD44 FITC (336604, BioLegend, ABD) biyobelirteçlerine göre izole edildi. Bu deney için hücreler T25 flasksı %80-90 kapladığında hücrelere %0,05'lik Trypsin-EDTA eklendi. Bu işlemden sonra flasktan kalkan ve resüspanse halde olan hücreler Cell Staining Buffer (420201, BioLegend, ABD) ile yıkandı. Human TruStain FcX (422302, BioLegend, ABD) ile 10 dakika ve karanlık bir ortamda bloklama işlemi yapılan hücrelere 1 µl olacak şekilde üç antikordan CD133 APC (372806, BioLegend, ABD), CD24 PE (311106, BioLegend, ABD) ve CD44 FITC (336604, BioLegend, ABD) eklendi. Hücreler 20-30 dakika boyunca karanlık ortamda bekletildi. Fazla boya kalıntısını ortamdaki uzaklaştırmak için Cell Staining Buffer (420201, BioLegend, ABD) ile iki kez yıkandı. Son hacim 500 µl olacak şekilde Cell Staining Buffer (420201, BioLegend, ABD) eklenerek hücreler flow sitometri cihazına yüklenerek ölçümleri yapıldı.

Pasajlanacak hücrenin bulunduğu kültür kabındaki besiyeri yavaşça çekildi ve atıldı. 6 kuyucuklu kültür kabında yapışık halde kalan hücreler üzerine %0,05 Tripsin-EDTA eklendi. Hücrenin tipine bağlı olarak 37°C'lik %5 CO₂ içeren inkübatörde 1-5 dk. tutuldu. Hücreler invert mikroskop ile kontrol edildi. Tripsin inhibisyonu %10 FBS, (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 16000044) %1 penisilin-streptomisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 15070063), %1 amfoterisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 15290026) ve %1 L-glutamin (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada, Kat. No. 7100) içeren DMEM ile yapıldı. Hücre süspansiyonu temiz bir falkon tüpe alındı ve 400 g'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant, pellete dokunmadan uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1 ml FBS içermeyen besiyeri ile resüspanse edildi ve hücre sayısı hesaplandı. Steril bir kültür kabına hücreler pasajlanarak kültür kabı etiketlendi. Hücrelere invert mikroskop altında bakıldı

ve %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre konuldu.

İzole edilen kanser kök hücreleri ekmek için 96 kuyucuklu hücre kültür kapları kullanıldı. Kuyucuk başına 1000 hücre olacak şekilde kanser kök hücreleri %1 penisilin-streptomisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 15070063), %1 amfoterisin (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No. 15290026) ve %1 L-glutamin (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada, Kat. No. 7100) içeren serumsuz DMEM (Gibco, Grand Island, NY, ABD, Kat. No. 41966029) ile ekildi. 10 gün boyunca hücrelerin takibi yapılarak her 24 saatte bir tripan mavisi boyası ile hücrelerin sayımı gerçekleştirildi.

Büyüme eğrisini çizmek için Microsoft Excel programı kullanılarak elde edilen verilerle iki katna çıkma süresi grafiği oluşturulmuştur. Bu grafik (T2-T1) / 3,32* (logn₂-logn₁) formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Formülde T süreyi, n₂ son hücre konsantrasyonunu n₁ ise ilk hücre konsantrasyonunu göstermektedir.

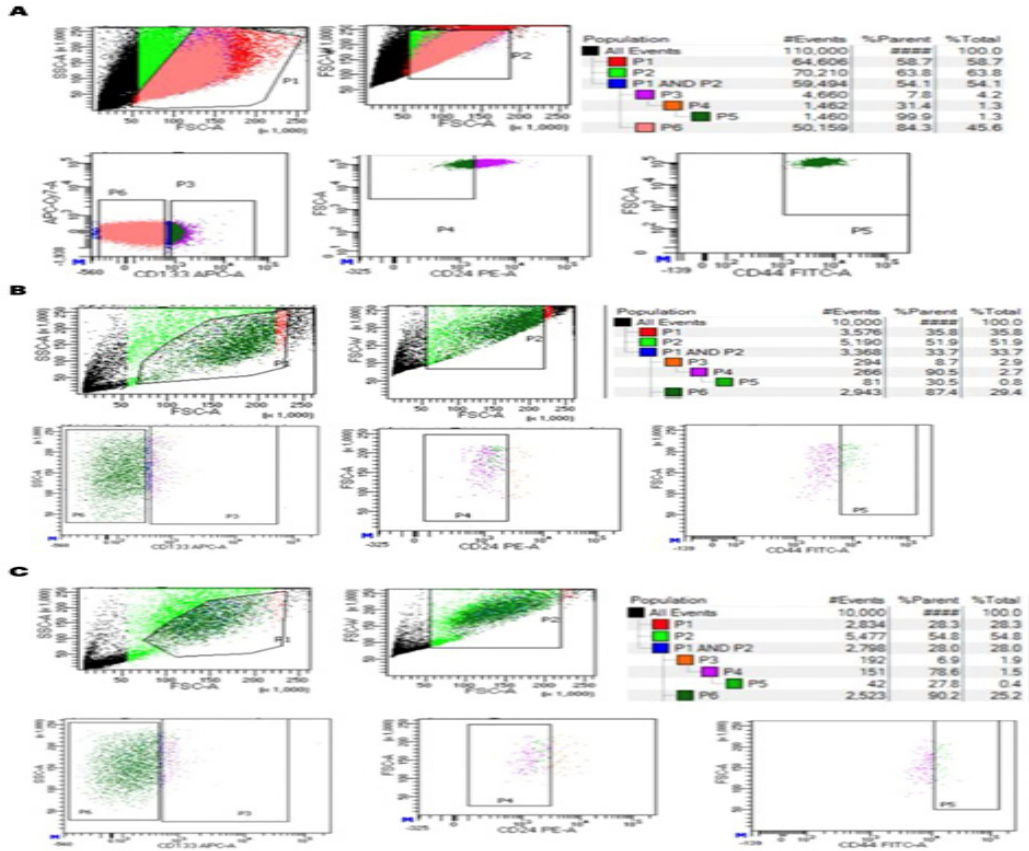
BULGULAR

Bu çalışma kapsamında kullanılan hastaların isim, cinsiyet, yaş, kanser tipi ve metastaz durumları Tablo 1'de verilmiştir. Bu pilot çalışmada kliniği yansıtmak amacıyla metastaz durumları farklı hasta profili örnek olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada metastaz durumları farklı KHDAK tanısı almış üç hasta profilinin KKH'leri CD133 +, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre flow sitometri yöntemi ile seçilerek KKH oranları belirlenmiştir. Heterojen hücre popülasyonu içerisinde KKH oranları hasta 1 (H1) için %1,3, hasta 2 (H2) için %0,8 ve Hasta 3 (H3) için %0,4 olduğu Şekil 3(A-C)'de gösterilmiştir. Kullanılan üç farklı hasta profilinin 0 ile 10. gün arasında hücre sayılarındaki değişim takip edilmiştir. Ortaya çıkan sonuç Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 2'de belirtilen hastaların 10 günlük hücre sayıları ile hastalara ait kanser kök hücrelerinin büyüme eğrileri

Tablo 1. Hastalara Ait Klinik Verilerin Gösterimi

Örnek Numarası	Cinsiyet	Yaş	Kanser Tipi	Metastaz
Hasta 1	E	45	Adenokarsinom	-
Hasta 2	E	64	Adenokarsinom	Karaciğer
Hasta 3	E	52	Adenokarsinom	Beyin



Şekil 3. Hastalara ait flow sitometri ile hücre seçimi sonuçlarının gösterimi. A) Hasta 1'e ait popülasyon 3 (P3)'te CD133+; P4'te CD133+ CD24-/düşük; P5'te ise CD133+ CD24-/düşük CD44+ hücre popülasyonu, B) Hasta 2'ye ait P3'te CD133+; P4'te CD133+ CD24-/düşük; P5'te ise CD133 + CD24-/düşük CD44+ hücre popülasyonu, C) Hasta 3'e ait P3'te CD133 +; P4'te CD133 + CD24-/düşük; P5'te ise CD133+ CD24-/düşük CD44+ hücre popülasyonu seçilmiştir. (P: Popülasyon)

Tablo 2. Hastalara Ait Hücre Proliferasyonunun 0-10.Gün Arasındaki Değişiminin Gösterimi

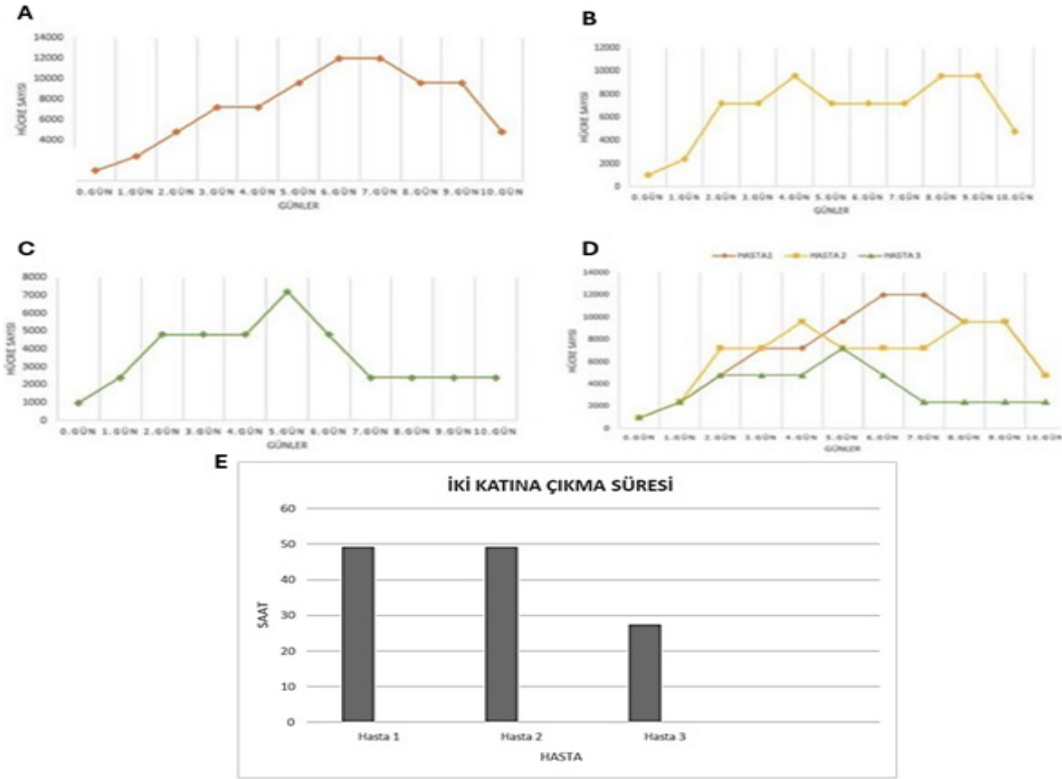
Örnek Numarası	0.Gün	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	7.Gün	8.Gün	9.Gün	10.Gün
Hasta 1	1000	2400	4800	7200	7200	9600	12000	12000	9600	9600	4800
Hasta 2	1000	2400	7200	7200	9600	7200	7200	7200	9600	9600	4800
Hasta 3	1000	2400	4800	4800	4800	7200	4800	2400	2400	2400	2400

çizilip tek bir grafik üzerinde karşılaştırılmış olup (Şekil 4A-D) gösterilmiştir. Primer akciğer kanser kök hücrelerinin iki katına çıkma süresi, hücrelerin sayı olarak ikiye katlanması için geçen zamandır. KHDAK tanısı alan üç hastanın kanser kök hücrelerinin iki katına çıkma süresi grafik ile Şekil 4E'de gösterilmiştir. İki katına çıkma süresi, hücrelerin sayı olarak ikiye katlanması

için geçen zamandır. KHDAK tanısı alan üç hastanın kanser kök hücrelerinin iki katına çıkma süresi grafik ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Dünyada her yıl teşhis edilen bir milyondan fazla akciğer kanseri vakası vardır ve kanser ölümlerinin en yaygın nedenidir. Akciğer kanseri teşhisi konan hastaların %70'i



Şekil 4. Hastaların 10 günlük büyüme eğrilerinin gösterimi. A) Hasta 1'e ait büyüme eğrisi, B) Hasta 2'ye ait büyüme eğrisi, C) Hasta 3'e ait büyüme eğrisi, D) 3 hastanın büyüme eğrisinin tek bir grafikte karşılaştırılması gösterilmiştir. Hasta 1'e ait grafikte büyüme eğrisinde ilk üç günde ve 5., 6. günler boyunca artış gözlenirken 7. ve 10. günde azalışa geçtiği diğer günlerde ise sabit kalmıştır. Hasta 2'ye ait grafiğe bakıldığında ilk 2 gün ve 4., 7. günler boyunca büyüme eğrisinde artış gözlenirken, 5., 10. günlerde azalışa geçtiği ve diğer günlerde ise durağanlığını korumuştur. Hasta 3'ün grafiğine bakıldığında da 0., 2., 4. günlerde büyüme eğrisinde artış gözlenirken 5. günde azalışa geçtiği ve diğer günlerde ise stabil kalmıştır. E) 3 hasta için grafik $(T2-T1) / 3,32 * (\log n_2 - \log n_1)$ formülü kullanılarak Hasta 1 ve Hasta 2 için 49,24 hesaplanırken hasta 3 için 27,48 saat hesaplanmıştır.

hastalığın ileri evresindedir ve bu nedenle prognozu kötüdür (18). Kanser kök hücrelerinin (KKH'ler), kemoterapi direnci ve kanser nüksü ile ilişkili olduğu solid tümörlerde ve hematopoetik kökenli malignitelere tanımlanmıştır (7, 19). Tümör heterojenliği, tümör biyobelirteçlerini tanımlayarak çözülebilir. CD44 ve CD133 biyobelirteçleri akciğer kanseri kök hücrelerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılırken CD24 biyobelirtecinin de kullanılabileceğini araştırmalar ortaya koymaktadır (20-22).

Hastaya özel tedavilerin araştırılması ve geleneksel tedavilerin etkinliğinin artırılması kanser çalışmalarında primer hücre kültürlerinin başarılı bir şekilde oluşturulmasına bağlıdır. Hasta kaynaklı örnekler

hücre hatlarına ve hayvan çalışmalarına göre önem arz etmektedir. Primer hücrelerin kanser çalışmaları için dokudan izole edilmeleri ve model olarak kullanılmaları in vivo koşulları mimik etmesi nedeniyle son derece yararlıdır. Yapılan çalışmalarda KKH ile ilgili çok fazla çalışma olmasına rağmen hasta kaynaklı dokulardan elde edilmiş KKH'lere dair çalışmalar nispeten az olduğu için bu çalışma kapsamında akciğer kanseri hastalarından elde edilen tümör hücreleri kullanılmıştır. Elde edilen hücrelerin primer kültürü sonrası flow sitometri yöntemi ile CD133, CD24 ve CD44 biyobelirteçlerine göre KKH'lerin izolasyonu yapılarak in vitro ortamda zamana bağlı proliferasyonu belirlenmiştir. Bu pilot çalışmada kliniğe başvuran

hastaları daha iyi yansıtmak amacıyla KHDAK tanısı alan 3 hasta profili seçilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan hastaların profillerine bakıldığında; Hasta 2 (H2) ve Hasta 3 (H3)'ün sırasıyla karaciğer ve beyin metastazına sahip olduğu, Hasta 1 (H1)'in ise metastaza sahip olmadığı görülmektedir (Tablo 1). Hastadan alınan doku mekanik ve enzimatik parçalama ile hücre süspansiyonu haline getirilerek kanser hücreleri flow sitometri yöntemiyle CD133+, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre izole edilip kanser kök hücreleri elde edilmiştir (Şekil 2). Kanser kök hücreler kendi kendini yenileme, farklılaşma ve tümör oluşturma yetenekleri olan tümörler içindeki hücrelerin küçük bir alt popülasyonudur (23). Bu çalışmamızda beklenildiği gibi KKH oranları %1,3- %0,4 arasında bulunmuştur (Şekil 3A-C). Elde edilen akciğer kanseri kök hücrelerinin proliferasyonu Tablo 2'de gösterilmiştir. Hücre canlılıklarının ölçümü için hücreler tripan mavisi ile boyanarak 0-10 gün arasında hücrelerin sayımı yapılmıştır. Aynı hücre sayısı ile başlanmasına ve üç hastanında KHDAK tanısı almış olmasına rağmen kanser kök hücrelerinin in vitro proliferasyon profilleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu sonuçta kanserdeki kişiselleştirilmiş tedavilerin önemini ortaya koymaktadır. Klinik çalışmalardan elde edilen veriler mevcut tedavilerin tümörün büyük kısmını oluşturan kanser hücrelerini hedeflediğini göstermiştir. Klinik çalışmalardan edinilen bilgilere göre geleneksel tedaviler kanser hücrelerini hedeflerken, tümör kitlesinde sayıca daha az olan KKH popülasyonunu hedefleyememesi KKH'lerin çoğalmasına ve tümör nüksüne sebep olmaktadır. Bu nedenle KKH'leri hedefleyen yeni tedavilerin geliştirilmesi geleneksel tedavilere karşı direnç gösteren KKH'lerin yok olmasını sağlayabilir (24). Bu bilgiler ışığında KKH'lerin geleneksel ve KKH hedefli terapilere karşı verebileceği yanıtlar Şekil 1'de şematize edilmiştir. Bu çalışma kapsamında yapılan proliferasyon deney sonuçları Şekil 4'de gösterilmiştir. Hasta 1'e ait olan büyüme eğrisi incelendiğinde 10 günlük süreç içerisinde ilk üç günde ve 5., 6. günler boyunca büyüme eğrisinde artış gözlenirken, 7.,10. günde azalışa geçtiği ve diğer günlerde ise stabilliğini koruduğu gözlenmektedir (Şekil 4A). Hasta 2'ye ait büyüme eğrisinde 10 günlük süreç içerisinde ilk 2 gün ve 4.,7. günler boyunca büyüme eğrisinde artış gözlenirken, 5.,10. günlerde azalışa

geçtiği ve diğer günlerde ise stabilliğini koruduğu gözlenmektedir (Şekil 4B). Hasta 3'e ait büyüme eğrisinde ise 10 günlük süreçte 0.,2.,4. günlerde büyüme eğrisinde artış gözlenirken 5. günde azalışa geçtiği ve diğer günlerde ise stabilliğini koruduğu gözlenmektedir (Şekil 4C). Tüm hastalara ait olan proliferasyon sonuçları karşılaştırıldığında her birinin farklı bir profile sahip olduğu gözlenmektedir (Şekil 4D). Hasta 1'in proliferasyon eğrisindeki stabilitenin devamlı olmaması klinik bulgularında metastaz bulunmaması ile ilişkilendirebilir. KKH oranına bakıldığında ise en yüksek orana sahip olması hasta profilinde beklenildiği gibi metastaz durumunu ortaya çıkarmamıştır. Hasta 2 ve Hasta 3'e bakıldığında KKH miktarlarındaki değişkenlik ile KKH oranlarındaki benzerlik hasta profilinde metastaz ile bağdaştırılabilirken belirli günlerde hücre proliferasyonunun yavaş şekilde seyretmesi agresiflik göstergesi olabilir. Bu çalışma kapsamında 3 hastada pilot olarak gösterdiğimiz bu korelasyonun daha çok sayıda hasta ile ilişkilendirilmesi gerekebilir. Kliniğe göre KKH'lerin iki katına çıkma sürelerinin belirlenmesi, hastaların optimal aralıklarla taranmasına olanak tanır ve bu da daha hızlı büyüyen tümörlerin geleneksel kemoterapiye daha iyi yanıt verdiğini gösterir (25). Bu çalışmada ikiye katlanma süresi (T_2-T_1) / $3,32$ ($\log_2 - \log_n$) formülü kullanılarak H1 ve H2 için 49,24 saat H3 için 27,48 saat olarak hesaplanmıştır (Şekil 4E). Formülde T süreyi, n_2 son hücre konsantrasyonunu n_1 ise ilk hücre konsantrasyonunu göstermektedir. H1 ile H2 arasındaki ikiye katlanma sürelerinin benzerliği metastazlı olup olmama durumuna göre değişmezken bu benzerlik her hastanın kendine özgü profile sahip olma özelliği ile ilişkilendirilebilir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yapılan çalışmaların beyin metastazı riskini diğer alt tiplere göre arttırdığı gösterilirken KHDAK hastalarının %20-56'sının beyne metastaz yaptığı bilinmektedir (26, 27). Beyin metastazı olan H3'ün kanser kök hücrelerinin daha erken süre içinde ikiye katlanması beklenildiğinin aksine KKH oranları ile metastaz yapma durumu arasında bir korelasyon göstermemektedir. Farklı bölgelere metastazın olması tümör biyolojisinde hastalar arasındaki farklılıkları göstermektedir. Yapılan çalışma sonucunda kliniği yansıtmak amacıyla KHDAK tanısı alan farklı bölgelere metastazı olan ve metastazı olmayan hastalardan KKH proliferasyonu gerçekleştirilmiştir. Hastalardaki kanser kök hücrelerinin

büyüme eğrisindeki ve ikiye katlanma süresindeki değişiklikler hasta profilinin farklılığından kaynaklanmaktadır. Akciğer kanser kök hücrelerinin genel olarak proliferasyonunun durağan seyri olmakla birlikte aynı hücre sayısı ile başlanmasına rağmen kanser kök hücrelerinin proliferasyonları farklılık göstermiştir. Arnold ve meslektaşlarının yaptığı kanser kök hücrelerinin daha yavaş çoğaldığını söyleyen bu hipotezi çalışmalarımız doğrulamış olmakla birlikte çalışmamızın sınırlayıcı kısımları pilot bir çalışma olması ve KKH'lerin in vitro ortamda kültüre edilmesi zor olduğundan dolayı sadece üç hastanın örnekleri üzerinden yapılmış olmasıdır (12). Kanser arkasındaki itici güç olarak bilinen KKH'ler ile ilgili yapılan çalışmaların önemine bakıldığında, deneysel çalışmamızın kanser tedavilerine yeni bir bakış açısıyla yaklaşması ve geliştirilebilir tedavi stratejilerine zemin hazırlaması ile KKH'lerin sebep olduğu tümörün ortadan kaldırılmasında büyük bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. KKH'lerin hedeflenmesi, hekimin karar destek mekanizmasında in vitro araç olarak kullanılabilmesi ile umut vaat etmektedir (28). Bu pilot çalışma kapsamında üç hastanın KKH proliferasyonu incelendi ancak KKH proliferasyonunun daha iyi anlaşılması ve kanserin tedavisinde KKH'lerin hedeflenmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Bu çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanısı almış üç hastadan elde edilen tümör hücreleri kullanılarak, kanser kök hücrelerinin (KKH) proliferasyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, her hastanın KKH proliferasyon profillerinin farklı olduğunu göstermiştir. Çalışma kapsamında, CD133+, CD24-/düşük ve CD44+ biyobelirteçlerine göre izole edilen KKH'lerin, metastaz durumlarına göre farklı proliferasyon eğrileri sergilediği gözlemlenmiştir. Hasta 1'in metastazı olmaması ve KKH oranının en yüksek olması, metastaz durumu ile KKH oranları arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermektedir. Ayrıca, beyin metastazı olan Hasta 3'ün KKH'lerinin ikiye katlanma süresi, metastazın proliferasyon hızını doğrudan etkilemediğini ortaya koymaktadır. Çalışmanın sınırlayıcı yönleri arasında, yalnızca üç hasta örneği üzerinden yapılan pilot bir çalışma olması

ve KKH'lerin in vitro ortamda kültüre edilmesinin zorlukları bulunmaktadır. Sonuçlar, KKH'lerin kanser tedavilerinde hedeflenmesinin önemini vurgulamakta ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır. KKH'lerin hedeflenmesi, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir ve kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlar için umut vaat etmektedir.

Tasdik ve Teşekkür

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Yang L, Shi P, Zhao G, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):8.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.
3. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021; 157:103194.
4. Ruiu R, Tarone L, Rolih V, Barutello G, Bolli E, Riccardo F, et al. Cancer stem cell immunology and immunotherapy: Harnessing the immune system against cancer's source. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019; 164: 119-88.
5. Shankar S, Nall D, Tang SN, Meeker D, Passarini J, Sharma J, et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2011; 6(1):e16530.
6. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(4): 275-84.
7. Soltanian S, Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol.* 2011; 32(3): 425-40.
8. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol.* 2019; 234(6):8381-95.
9. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8(2): 97-106.
10. Sterlacci W, Savic S, Fiegl M, Obermann E, Tzankov A. Putative stem cell markers in non-small-cell lung cancer: a clinicopathologic characterization. *J Thorac Oncol.* 2014; 9(1): 41-9.
11. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells. *Cell Stem*

Cell. 2015 ;16(3): 225-38.

12. Arnold CR, Mangesius J, Skvortsova II, Ganswindt U. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Front Oncol.* 2020; 10:164.

13. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol.* 2011; 2011:941876.

14. Yoshida GJ, Saya H. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Sci.* 2016; 107(1): 5-11.

15. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012; 9(6): 38-50.

16. Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(46): 18708-13.

17. Schilsky RL. Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(5): 363-6.

18. Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki Ł, Śliwińska-Mossoń M. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(13):4569.

19. Sun JH, Luo Q, Liu LL, Song GB. Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(13): 3547-57.

20. Mäbert K, Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Souchelnytskyi S, Dubrovskaya A. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol.* 2014; 90(8): 659-77.

21. Hardavella G, George R, Sethi T. Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 ;5(3): 272-9.

22. Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 2003 ;88(2): 231-6.

23. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 ;44(12): 2144-51.

24. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res.* 2015 ;335(1): 135-47.

25. Kay K, Dolcy K, Bies R, Shah DK. Estimation of Solid Tumor Doubling Times from Progression-Free Survival Plots Using a Novel Statistical Approach. *AAPS J.* 2019;21(2):27.

26. Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffietti R, Ahluwalia MS, Nayak L, et al. Brain metastases. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 ;5(1):5.

27. Hsiung CY, Leung SW, Wang CJ, Lo SK, Chen HC, Sun LM, et al. The prognostic factors of lung cancer patients with brain metastases

treated with radiotherapy. *J Neurooncol.* 1998 ;36(1): 71-7.

28. Yılmaz S, Doğan Sarıkaya M, Yaşar E, Şen Bağcı B, Canöz Ö, Önal Ö. Determination Of Metastatic Capacity in Primary Lung Cancer Cells: Reflection of Patient Profile In The Clinic Using in vitro Methods. *Journal of Advanced Research in Health Sciences,* 2023;6(3), 302-11.