

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

H460 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDEN
KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MURADIYE ACAR

MERVE GÜNEŞ

İSTANBUL 2022

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**H460 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDEN
KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

MERVE GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MURADIYE ACAR

**BU TEZ ÇALIŞMASI İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ TARAFINDAN BAP
(PROJE NUMARASI: 2020/B9) KAPSAMINDA DESTEKLENMİŞTİR.**

İSTANBUL-2022
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Abdullah OLGUN

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Muradiye Acar
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Muradiye Acar

İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT

İstinye Üniversitesi

Prof. Dr. Ercan ARICAN

İstanbul Üniversitesi

Bu tez çalışması İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 2020/B9 Proje numarası ile desteklenmiştir.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “H460 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDEN KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Merve Güneş

ÖZET

H460 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDEN KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Merve GÜNEŞ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muradiye ACAR

Kanser, vücudun herhangi bir yerinde oluşabilen, kontrolsüz çoğalan ve mutasyona uğramış hücrelerin oluşturduğu bir hastalıktır. Tüm dünyada ve ülkemizde en sık görülen ve ölüme en çok sebep olan kanserlerden biri akciğer kanseridir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında Türkiye genelinde en sık görülen kanserler sıralamasında ikinci sırada, erkeklerde görülen en sık kanserler sıralamasında ise ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin çok çabuk metastaz yapması ve erken evrede teşhisinin zor olmasından dolayı beş yıllık sağ kalım oranı %20,5'tir. Akciğer kanseri küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olarak iki ana gruptan oluşmaktadır. Büyük bir kısmını ise KHDAK oluşturmaktadır ve üç alt tipe ayrılmaktadır. Bunlar; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur.

Kök hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme özelliği olan farklılaşmamış ama özelleşebilen hücrelerdir. Kanser biyolojisine göre kök hücreler ve kanser hücreleri arasındaki ilişki 3 seçenek ile ilişkilendirilmektedir. Bunlardan biri de tümörlerin kanser kök hücreleri içermesidir. Kanser kök hücreler, ilk kez küçük bir alt kümeye sahip olan fakat geniş çapta çoğalma yeteneğine sahip olan lösemi ve çoklu miyelom için gösterilmiştir ama zamanla diğer solid kanser çeşitlerinde de gözlemlenmiştir. Kanser kök hücreleri, tümörün başlangıcından sorumlu hücrelerdir. Metastaz yetenekleri ve ilaç direncine olumsuz etkileri bulunduğu kanserlerin insidans ve mortalitesini artırmaktadırlar. Akciğer kanserinde, kanser kök hücrelerinin birden fazla kaynaktan türediği varsayılmaktadır. Akciğer kanseri kök hücreleri de aynı metastaz ve ilaç direnci özelliklerine sahip olduğundan tedavi için araştırılmaları gerekmektedir. Bu araştırmaların temelini kanser kök hücre izolasyonu ve karakterizasyonu oluşturmaktadır.

Kanser kök hücre izolasyonu için evrensel bir belirteç tanımlanmamış olsa da beyin, hematopoietik, prostat ve kolon kanseri kök hücreleri, normal kök hücreler tarafından paylaşılan membran antijeni CD133 ekspresyonunu sergiler. CD133 pozitif hücreler, akciğer kanseri kök hücrelerinin özelliklerini göstermektedir ve dolayısıyla CD133, akciğer kanseri kök hücrelerinin önemli bir belirteçidir.

Bu sebeple, bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserinin alt üyesi ve büyük hücreli karsinom modeli olan H460 hücre hattından MACS yöntemi ile CD133 (+) akciğer kanseri kök hücresi izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Anahtar Kelime: Akciğer Kanseri, Kanser Kök Hücresi, CD133

ABSTRACT

CANCER STEM CELL ISOLATION AND CHARACTERISATION OF H460 NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELL LINE

GUNEŞ Merve

Department of Medical Biology and Genetics

Advisor: Asst. Prof. ACAR Muradiye

Cancer is a disease of mutated and uncontrollably cells that can occur anywhere in human body. Lung cancer is one of the most common cancer and the leading cause of death in the world and our country. According to the 2020's data of the World Health Organization, lung cancer is the second one of the most common cancers in Turkey. At the same time, it is the first one of the most common cancer in men in Turkey. The five year survival rate is 20.5% because lung cancer metastasis very quickly and early diagnosis is difficult. Lung cancer consists two main groups as small cells lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC more common than the SCLC. NSCLC is divided tree subtypes. These are adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma.

Stem cells are undifferentiated cells with unlimited division and self-renewal ability. According to the cancer biology, there are 3 options between stem cells and cancer cells relationship. One of them is that, tumors contain cancer stem cells (CSC). CSC were first documented for leukemia and multiple myeloma. After than it also observed in solid tumors. Cancer stem cells are responsible for the initiation of the tumor. CSC have negative effects on metastasis and drug resistance and its increase cancer's incidence and mortality rate. In lung cancer, cancer stem cells are assumed to derive from more than one source. So, they should be investigated for treatment. These studies are carried out with cancer stem cells isolation and characterization.

Although a universal marker for cancer stem cell isolation has not been identified, brain, hematopoietic, prostate, and colon cancer stem cells display expression of the membrane antigen CD133, which is shared by normal stem cells. CD133 positive cells show characteristics of lung cancer stem cells and thus CD133 is an important marker of lung cancer stem cells.

For this reason, in this study, CD133 (+) lung cancer stem cell isolation and characterization was performed by MACS method from the H460 cell line, which is a sub-member of non-small cell lung cancer and a large cell carcinoma model.

Key Words: Lung Cancer, Cancer Stem Cells, CD133

TEŞEKKÜR

Başlangıçta beni teşvik eden ve projeme maddi destek veren İstinye Üniversitesi'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Abdullah OLGUN'a, Sayın Rektörümüz Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e ve dersini aldığım tüm hocalarıma,

Tüm yüksek lisans hayatım boyunca benden desteğini hiç esirgemeyen, tez dönemim boyunca danışmanlığımı yapan, tez araştırmalarım ve deneylerimde her zaman yardımcı olan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve örnek aldığım tecrübeli, yardımsever, çalışkan, iyi kalpli ve çok değerli Dr. Öğr. Üyesi Muradiye ACAR'a

Deneylerimin yürütülmesi için gerekli olan cihazların ve ortamların bulunduğu İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi (İSÜMKAM) laboratuvarında deneylerimi tamamlamama yardım eden Sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e, Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya, deneylerimi yürütürken yardımını esirgemeyen İSÜMKAM çalışanı Sayın Öğr. Görevlisi Melda SARIMAN'a, Sayın Öğr. Görevlisi Merve ERKISA'ya ve tüm İSÜMKAM çalışanlarına,

İstinye Üniversitesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Sorumlusu Sayın Prof. Dr. Zeynep OCAK'a ve tüm İSÜGEN çalışanlarına,

Yüksek lisansım süresince yaşanan tüm aksaklıklarda bana yardımcı olan, desteğini esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın İbrahim AVCI'ya,

Tüm hayatım boyunca beni destekleyen ve yanımda olan, maddi manevi her konuda yardımlarını esirgemeyen benim bugünlere gelmemi sağlayan annem Süheyla ve babam Hakan GÜNEŞ'e, anneannem Semiha GÜNEŞ'e ve sevdiğim herkese,

Her zaman yanımda olmasını istediğim fakat artık göremeyeceğim rahmetli nişanlım Ümit DÖRTKÖŞE'ye ve ailesine en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK

İÇ KAPAK

KABUL ONAY

ETİK BEYANI

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
GİRİŞ	

1. GENEL BİLGİLER

1.1. KANSER.....	3
1.2. AKCİĞER KANSERİ	6
1.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi	6
1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi	7
1.2.3. Akciğer Kanseri Histopatolojisi	9
1.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)	10
1.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)	11
1.2.4. Akciğer Kanseri ile İlişkili Genler ve Mutasyonları	11
1.2.5. Akciğer Kanseri Evrelemesi.....	13
1.2.6. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavisi	16
1.3. KÖK HÜCRE	16
1.3.1. Kök Hücre Özellikleri	17
1.3.2. Kök Hücre Çeşitleri.....	17
1.3.2.1. Bulundukları yerlere göre	18
1.3.2.2. Farklılaştıkları yerlere göre	18
1.4. KANSER KÖK HÜCRE	20
1.4.1. Kanser Kök Hücre Özellikleri	22
1.4.2. Kanser Kök Hücre Sinyal İletim Yolakları	23
1.4.3. Kanser Kök Hücreye Spesifik Genler	28

1.4.4.	Kanser Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	29
1.4.5.	Akciğer Kanseri Kök Hücresi	33
1.4.5.1.	Akciğer kanseri kök hücre özellikleri	33
1.4.5.2.	Akciğer kanseri kök hücre yüzey markırları	34
2.	MATERYAL VE METOD	36
2.1.	MATERYAL	36
2.2.	METOD	39
2.2.1.	Hücre Kültürü	39
2.2.1.1.	Medyum hazırlanışı	39
2.2.1.2.	Stoktan hücre ekimi	39
2.2.1.3.	Hücrelerin pasajlanması	39
2.2.1.4.	Hücrelerin stoklanması	40
2.2.2.	Kanser Kök Hücre İzolasyonu.....	41
2.2.2.1.	MACS analizi	41
2.2.2.1.1.	MACS buffer hazırlanışı	42
2.2.2.1.2.	Manyetik işaretleme ve ayırma	42
2.2.3.	Kanser Kök Hücre Karakterizasyonu	44
2.2.3.1.	Küre oluşumu deneyi	44
2.2.3.1.1.	%2'lik agarlı plate hazırlanması	45
2.2.3.2.	Kanser kök hücre medyum hazırlanması.....	45
2.2.3.3.	Hanging Drop (asılı damla) metodu	45
2.2.3.4.	Kanser kök hücre spesifik genlerin ekspresyon profili.....	46
2.2.3.4.1.	Primer tasarımı.....	46
2.2.3.4.2.	CD133 (+)/ CD133 (-) hücrelerden total RNA izolasyonu	46
2.2.3.4.3.	RNA konsantrasyon ve saflık ölçümü	47
2.2.3.4.4.	cDNA sentezi.....	47
2.2.3.4.5.	Gradient PCR	48
2.2.3.4.6.	Agaroz jel elektroforezi.....	48
2.2.3.4.7.	qPCR.....	49
2.2.4.	İstatistiksel Analiz	49
3.	BULGULAR	50
3.1.	HÜCRE KÜLTÜRÜ	50
3.2.	KÜRE OLUŞUMU DENEYİ.....	50
3.3.	HANGİNG DROP METODU	52

3.4. RNA İZOLASYON SONUÇLARI	53
3.5. GRADİENT PCR BULGULARI	53
3.6. qPCR SONUÇLARI	54
4. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	71



ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1. Kanserin ayırt edici özellikleri.....	3
ŞEKİL 2. WHO, GLOBOCAN verilerine göre Türkiye’de görülen ilk on kanser türü grafiği.....	5
ŞEKİL 3. WHO verileri 2020 yılı Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser çeşidi (Erkek)	7
ŞEKİL 4. WHO verileri 2020 yılı Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser çeşidi (Kadın)	7
ŞEKİL 5. Akciğer kanseri çeşitleri	9
ŞEKİL 6. Akciğer Kanseri Çeşitlerinin LCFA (Amerika Akciğer Kanseri Vakfı) verilerine göre görülme sıklıkları.....	10
ŞEKİL 7. Farklı genlerde mutasyon saptanan KHDAK tümörlerinin yüzdesi.	12
ŞEKİL 8. Kök hücre çeşitleri	17
ŞEKİL 9. Kök hücre hiyerarşisi	19
ŞEKİL 10. Oosit gelişimi ve kök hücre oluşumu	20
ŞEKİL 11. İnsan vücudunda kök hücre farklılaşması.....	20
ŞEKİL 12. a). Stokastik model, tümör hücreleri heterojen fakat geniş çapta çoğalabilir ve yeni tümörler oluşturabilir. b). Hiyerarşik model, tümör hücreleri heterojendir ve sadece KKH alt kümesi olan hücreler fazlaca çoğalabilir ve yeni tümörler oluşturabilir.	21
ŞEKİL 13. Konvansiyonel tedavilerde tümörler küçültülebilir fakat KKH’ler diğer kanser hücreleri kadar duyarlı değilse tümör yeniden oluşabilir. KKH hedef alınırsa tümörler uzun vadede bile olsa yok olabilir.	23
ŞEKİL 14. KKH sinyal yolları	23
ŞEKİL 15. LIF/JAK/STAK sinyal yolağı.....	24
ŞEKİL 16. MAPK sinyal yolağı	25
ŞEKİL 17. PI3K/PTEN sinyal yolağı	26
ŞEKİL 18. Wnt sinyal yolağı	26
ŞEKİL 19. SHh sinyal yolağı	27
ŞEKİL 20. Notch sinyal yolağı	28
ŞEKİL 21. Genlerin kromozomal dizilişleri	29
ŞEKİL 22. In vitro olarak kültürlenmiş karsinom hücrelerinden ve tümör dokusundan kanser kök hücre izolasyon yöntemleri.....	30
ŞEKİL 23. LCM uygulama görseli	31
ŞEKİL 24. MACS ve FACS yöntemleri	32

ŞEKİL 25. Normal akciğer hücreleri ve kanser kök hücre karşılıkları.....	34
ŞEKİL 26. MACS analizi için hücrelerin çoğaltılması aşaması	40
ŞEKİL 27. H460 hücre hattından MACS yöntemi ile kanser kök hücre izolasyonu	41
ŞEKİL 28. MACS cihazı parçaları ve görüntüsü.....	43
ŞEKİL 29. CD133 (+) / CD133 (-) hücre ayrımı için MACS aşaması.....	44
ŞEKİL 30. Küre oluşumu deneyi	45
Şekil 31. A. H460 hücre hattının 10x mikroskop görüntüsü. B. H460 hücre hattının 20x mikroskop görüntüsü.....	50
Şekil 32. A. CD133 (-) kanser hücrelerinin (1000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü B. CD133 (-) kanser hücrelerinin (500 hücre) 40x mikroskop görüntüsü.....	50
Şekil 33. A. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (1000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü B. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (4000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü C. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (2000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü D. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (500 hücre) 40x mikroskop görüntüsü.....	51
Şekil 34. A. CD133 (-) kanser hücrelerinin (6000 hücre) 40x mikroskop Hanging drop görüntüsü B. CD133 (-) kanser hücrelerinin (6000 hücre) 40x mikroskop Hanging drop görüntüsü.....	52
Şekil 35. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (6000 hücre) 40x mikroskop Hanging drop görüntüleri	52
Şekil 36. Hanging drop deneyine ait petri kabı görüntüsü	53
Şekil 37. Gradient PCR sonuçları, genlerin çalışma sıcaklıkları	54
Şekil 38. CD133 (+) ve CD133 (-) H460 hücrelerinde <i>KLF-4</i> , <i>OCT-4</i> , <i>SOX-2</i> ve <i>CD133</i> genlerinin ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi.....	55

TABLO LİSTESİ

TABLO 1. 7. Baskı ve 8. Baskı Karşılaştırılması	14
TABLO 2. 6. ve 7. Baskı TNM Evreleme Sistemi.....	15
TABLO 3. 8. Baskı TNM Evreleme Sistemi	15
TABLO 4. H460 hücre hattının özellikleri.....	36
TABLO 5. H460 hücre hattı saklama koşulları.....	36
TABLO 6. H460 hücre hattı büyüme koşulları	36
TABLO 7. <i>SOX-2</i> , <i>OCT-4</i> , <i>CD133</i> ve β - <i>Aktin</i> genlerinin primer dizisi	46
TABLO 8. Gradient PCR mix içeriği.....	48
TABLO 9. Gradient PCR koşulları	48
TABLO 10. qPCR mix içeriği.....	49
TABLO 11. qPCR koşulları	49
TABLO 12. CD133 (+) ve CD133 (-) hücrelerin RNA izolasyon sonuçları	53

SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

A549: Akciğer Kanseri Hücre Hattı

ABCG2: ATP-Binding Cassette Super-Family G Member 2 Protein

AC: Adenocarcinoma

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AK: Lung Cancer/ Akciğer Kanseri

ALDH1A1: Aldehit Dehidrojenaz 1 Ailesi, Üye A1

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

AML: Akut Myeloid Lösemi

B27: HLA-B27

BCL2: B-hücre Lenfoma 2

BRAF: B-Raf Proto-Onkogen

BSA: Bovine Serum Albumin

CD133: Kanser Kök Hücre Spesifik Yüzey Markırı

cDNA: Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleit Asid

c-myc: Cellular Myelocytomatosis

CO₂: Karbondioksit

CRAB: Cancer Research and Bio Statistics

DEPC water: Diethylpyrocarbonate su

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleit Asit

EDTA: Etylen Diamine Tetra Acetic Acid

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

FACS: Flourescent Activating Cell Sorting/Floresan Aktivasyonlu Hücre Ayırma

FBS: Fetal Bovine Serum

FGF2: Fibroblast Growth Factor

GLOBOCAN: The Global Cancer Observation

GTPAZ: Guanozin Trifosfat Hidrolaz Enzimi

GWA: Genome-Wide Association Study

H460: Büyük Hücreli Akciğer Kanseri Hücre Hattı

IASLC: International Association for The Study of Lung Cancer

IUAC: International Union Against Cancer

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

KKH +: Kanser Kök Hücre Pozitif

KKH: Kanser Kök Hücre

KKH -: Kanser Kök Hücre Negatif

KLF-4: Kruppel-Like Factor 4

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Virus

LCA: Leber Konjenital Amorozisi

LCC: Large Cell Carcinoma/Büyük Hücreli Karsinom

LCFA: Amerika Akciğer Kanseri Vakfı

LCM: Laser-capture microdissection

LKB1: Liver Kinase B1

MACS: Magnetic Activated Cell Sorting/Manyetik Aktivasyonlu Hücre Ayırma

MCL1: Myeloid Leukemia Cell

MET: Mesenchymal Epithelial Transition

mRNA: Mesajcı RNA

MTT: Cell Viability Assay

NANOG: Nanog Homeobox

OCT-4: Octamer- Binding Transcription Factor 4

OD_{260/280}: Nükleik Asit Saflık ve Konsantrasyon ölçüm değeri

PBS: Posphate Buffered Saline

PCR: Polimerase Chain Reaction

PIK3CA: Phosphoinositide-3-Kinase

PS: Penycillin Streptomycin

qPCR: Real Time Polimerase Chain Reaction

RB: Retinoblastoma

RNA: Ribonükleik asit

SCC: Squamous Cell Carcinoma/SquamoZ Hücre Karsinomu

SOX2: Sex determining region Y-box 2

TBE: Tris-Borik Asit- EDTA

TNM: Kanser Evreleme Sistemi

TP53: Tümör Protein 53

TSP-1: Trombospondin-1

TTF1: Tiroid Transkripsiyon Faktör-1

UICC: Union Internationale Contre le Cancer

UV: Ultraviyole Işını

VEGF-A: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A

WHO: World Health Organization/ Dünya Sağlık Örgütü

$\Delta\Delta$ CT: Real Time PCR CT Değeri



GİRİŞ

Yaşam boyunca canlı hücrelerinde yer alan DNA materyali mutajenlere maruz kalır. Çoğu zaman canlı vücudu sistemi korumak için çalışsa da replikasyonda meydana gelen bazı hatalar DNA dizisinde küçük değişikliklere ve gen işleyişinin değişmesine sebep olabilir. Bazen gerçekleşen bu mutasyonlar baskılanamaz ve mutasyona uğrayan hücreler büyüyerek klon oluşmasına sebep olur. Bu durum kanser hastalığını ortaya çıkarır (Futreal ve ark., 2001). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, kanser hastalığının birçok çeşidinin son zamanlarda daha sık görüldüğü gözlemlenmektedir.

Akciğer kanseri, WHO (World Health Organisation) ve GLOBOCAN (The Global Cancer Observation) verileri baz alındığında tüm dünyada insidansı yüksek, mortalitesi en yüksek kanser çeşididir. Akciğer kanseri KHAD (Küçük Hücreli Akciğer Kanseri) ve KHDAK (Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri) olmak üzere iki ana başlıkta incelenir. KHDAK ise squamoz hücreli, büyük hücreli ve adeno karsinom olmak üzere üç alt gruba ayrılır (Dela Cruz ve ark., 2011).

Kök hücreler bulunma yerlerine ve farklılaşma yerlerine göre iki sınıfta incelenirler. Bulunma yerlerine göre embriyonik, yetişkin, indüklenmiş pluripotent; farklılaşma yerlerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent olarak ayrılırlar (Çerci ve ark., 2019). Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPSC) birbirlerine benzemektedirler çünkü IPSC'ler laboratuvar ortamında embriyonik kök hücre benzeri, tedavi amaçlı üretilen kök hücrelerdir. Birçok hücre tipine farklılaşabilirler (Aygar 2020). Yetişkin kök hücreler genellikle doku onarımı için kullanılan kök hücrelerdir ve organlarda sık görülürler (Bongso ve Lee 2005). Embriyonun ilk günlerinden totipotent kök hücre ile başlayan ve döllenmenin ilerleyen günlerinde pluripotent, multipotent olarak farklılaşma yeteneği gittikçe kısıtlanan kök hücreler, unipotent yani tek bir hücreye farklılaşabilen kök hücre çeşidi ile son bulmaktadır (Condic 2014).

Kanser kök hücreler hem kök hücre hem de kanser hücresi özelliği gösterebilen kanser başlatıcı hücrelerdir (Pardal 2003). Tümörlerde ilaç direnci, metastaz, invazyon gibi olaylardan sorumludurlar. Kanserli dokunun çok küçük bir kısmını oluşturan bu hücreler uygun tedavi ile yok edilmeye çalışılmadığı sürece hastalığı ilerletebilmekte veya nükse sebep olabilmektedir (Reya ve ark 2001).

Çalışmamızda KHDAK'ın alt türü olan büyük hücreli akciğer kanseri hücresi (H460 hücre hattı)'nden CD133 yüzey markırı içeren ve kanser kök hücre özelliği gösteren hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

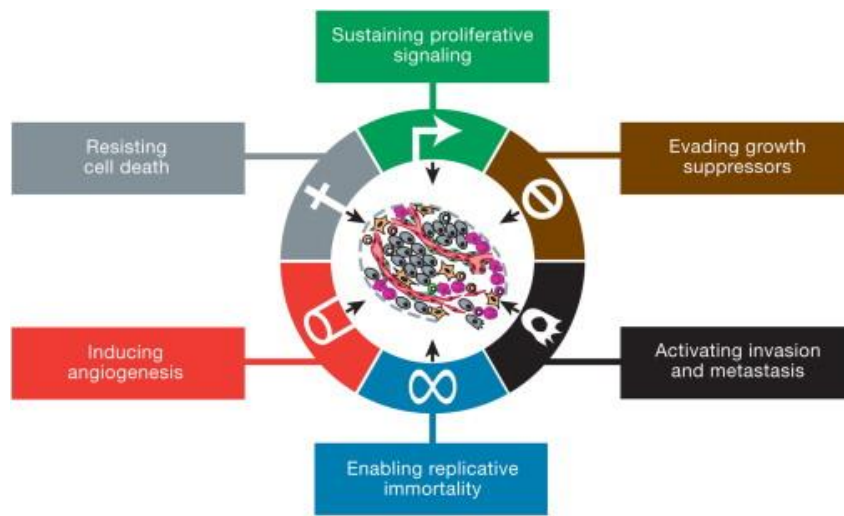


1. GENEL BİLGİLER

1.1. KANSER

Tüm kanserler DNA dizisinde meydana gelen bir anormallikten kaynaklanmaktadır (Futreal ve ark., 2001). Bu anormalliklerin çok uzun yıllardır bu hastalığa sebep olduğu fakat son yüzyılda çok daha sık karşımıza çıktığı görülmektedir. Kanser, ismen tanımlanmasından önce de birçok canlıda görüldüğü hatta bu tarihin M.Ö. 3000 yıllarında Mısır’da kaydedildiği bilinmektedir. Kanser isminin tam keşfi bilinmese de M.Ö. 3 yılında Yunan Doktor Hipokrat tarafından kullanıldığı düşünülmektedir. ‘Kanser’ kelimesi ise tümör şeklinin yengeç bacaklarına benzediğinin düşünülmesi sebebiyle Latince’de yengeç anlamına gelen yunanca ‘carcinos’ ve ‘canker’ kelimelerinden gelmektedir (Baykara, 2015).

Kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran birden fazla özellik bulunmaktadır. Kanserlerin ayırt edici özellikleri düşünüldüğünde Hanahan ve Weinberg’e göre, insan tümörlerinin gelişimi sırasında kazandığı altı adet özellik bulunmaktadır (Şekil 1). Bunlar; proliferatif sinyallemeyi sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, anjiyogenezi indüklemek ve son olarak metastaz ve invazyonu aktive etmek olarak gösterilebilir (Weinberg ve ark., 2000; Hanahan, 2011).



Şekil 1. Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2011).

Hücre büyümesini ve çoğalmasını sınırlandırmak için çalışan birden fazla tümör baskılayıcı gen bulunmaktadır. İki prototipik tümör baskılayıcı, RB (retinoblastoma) ve TP53 proteinlerini kodlar. Bu iki tümör baskılayıcı protein, hücrelerin çoğalma, yaşlanma, apoptoz programlamalarını yöneten anahtar tamamlayıcılar ve hücre düzenleyici merkezi kontrol düğmeleri olarak çalışırlar. RB, büyük ölçüde hücre dışı kaynaklı büyümeyi inhibe eden sinyalleri iletirken; TP53, hücre içi işletim sistemleri ile stres sensörlerinden bilgi alır. Genomda büyük bir hasar meydana geldiyse veya optimum koşullar sağlanmadıysa TP53 proteini, koşullar normale dönene kadar hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilir. Eğer hasarlar onarılamayacak durumda ise, yine TP53 proteini apoptozu tetikleyebilir (Hanahan ve ark., 2011). Tümör baskılayıcı genlerin birinde veya birkaçında oluşan mutasyon, tümör oluşumuna sebep olmaktadır (Yokuş ve ark., 2012).

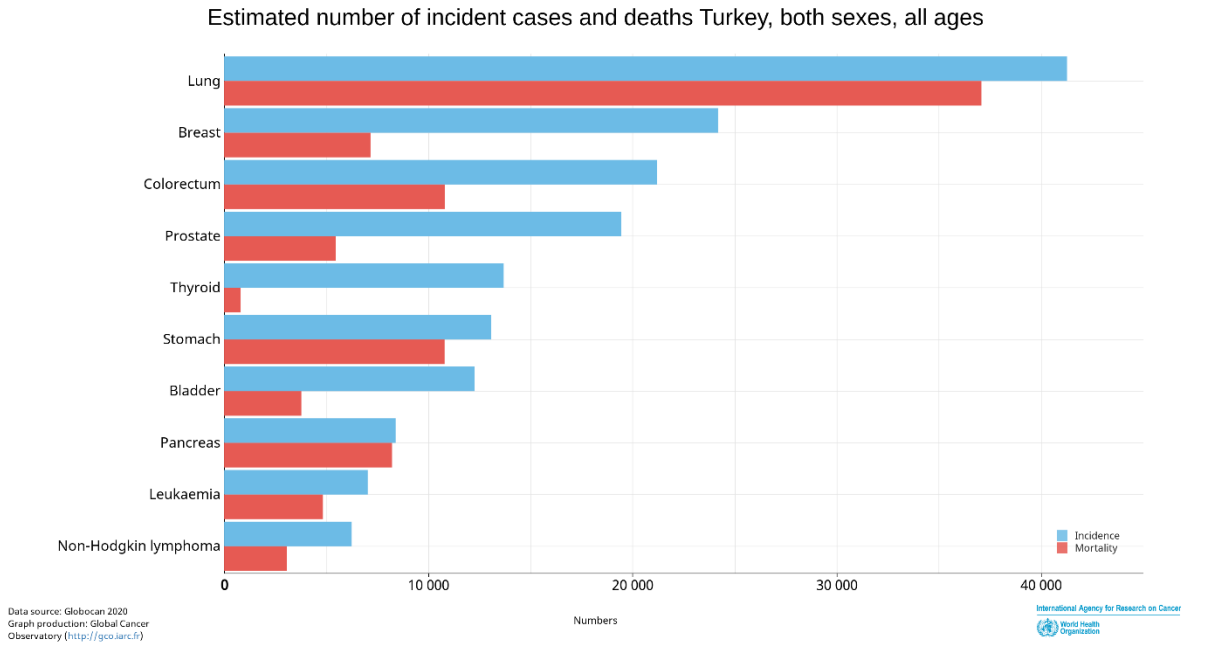
Apoptoz, onarılma imkânı olmayan, vücudun ihtiyaç duymadığı, normal olmayan veya yaşlı hücrelerin planlı olarak öldürülmesi işlemidir. Apoptozun düzenlenmesi, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge ile gerçekleştirilir. *BCL-2* (B-Hücre Lenfoma 2) ve *MCL-1* (myeloid leukemia cell) gen ailesindeki proteinler apoptozda belirleyici rol oynarlar. Kanser hücreleri, antiapoptotik *BCL-2* proteinlerini yukarı regüle ederek apoptozdan kaçabilir. Buna apoptoz direnci denir. Kanserli hücrenin apoptozla gösterdiği direnç, proliferasyon hızının giderek artmasını ve kanserli dokunun büyümesini tetikler. Bu olay aynı zamanda tedaviye dirence sebep olmaktadır (Celepli ve ark., 2020).

Anjiyogenez, kanserli hücrenin farklı doku ve organlara yayılabilmesi için gerekli olan besin alışverişini sağlamak amacı ile yeni damar uzantıları oluşturmaya verilen isimdir. Anjiyogenezin düzenlenmesini, vasküler endotelial hücreler tarafından uyarıcı veya inhibe edici hücrelere bağlanan sinyal proteinleri gerçekleştirmektedir. İndükleyici olarak VEGF-A (vasküler endotelial büyüme faktörü-A) ve inhibitör olarak TSP-1 (trombospondin-1) iyi bilinen prototipler olarak gösterilmektedir (Hanahan ve ark., 2011).

Çok sayıda çalışma, kromozom uçlarını koruyan telomerlerin sınırsız çoğalma yeteneği olduğunu göstermektedir. Telomerik DNA uzunluğu hücrenin ne kadar süre çoğalacağını belirlemektedir (Hanahan ve ark., 2011). Bazı çalışmalar göstermiştir ki kanser hücrelerinin bölünürken telomerleri kısaltmaya karşı dayanıklı olduğundan bölünme sayılarının sınırı yoktur (Miroğlu ve ark., 2011).

İnvazyon ve metastaz, kanserli hücrenin olduğu bölgeden başka bir bölgeye yayılması durumudur. İnvazyon, metastazdan farklı olarak kanser dokuda yer alan bazal membranı ayırır. Kanser hücresinin apoptozdan kaçarak sınırsız çoğalması ve anjiyogenez yaparak yayılması metastazı oluşturmaktadır. Primer tümörden kan ve lenf dolaşımı ile yayılan tümör hücreleri, başka bir dokuda yeni tümör oluşturarak primer tümör ile bağı koparır. İkincil tümörler, birincil yani kök tümörlere oranla daha ölümcüldür. Uzak metastaz oluşumu, kanserli hastalarda morbidite ve mortalitenin temel sebebidir (Duffy ve ark., 2008).

GLOBOCAN verilerine göre, Türkiye’de 2020 yılında en sık görülen on kanser çeşidi akciğer, meme, kolon, prostat, tiroid, mide, mesane, pankreas, kan ve lenf kanseri olarak bildirilmiştir (Şekil 2) (GLOBOCAN, 2020).



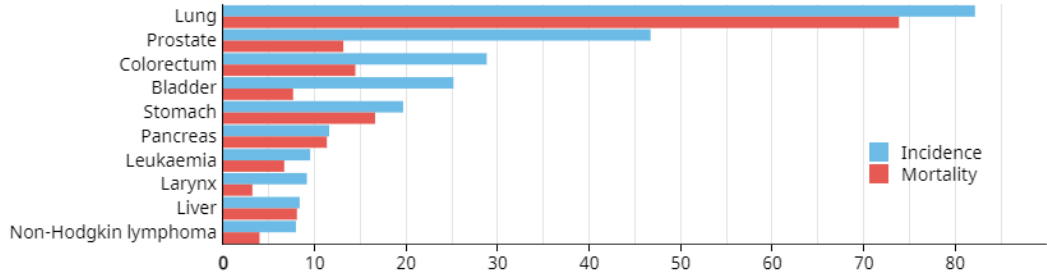
Şekil 2. WHO, GLOBOCAN verilerine göre Türkiye’de görülen ilk on kanser türü grafiği (GLOBOCAN, 2020)

1.2. AKCİĞER KANSERİ

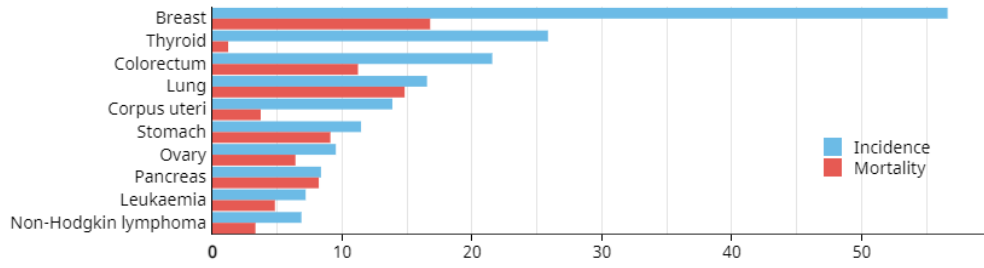
Kanser hastalığı, vücudun çoğu yerinde görülebildiği gibi akciğerlerde de görülmektedir. Normal yapıdaki akciğer hücrelerinin mutasyona uğramasından veya hatalı kopyalanmasından dolayı ihtiyaç ve kontrol dışı çoğalıp kitle oluşturmasıyla başlamaktadır. Anormal hücrelerin tümöre dönüşmesi birden fazla sebebe bağlı olmakla birlikte çoğunlukla çevresel faktörlere bağlıdır. Tütün ürünlerinin kullanımı en büyük etken olarak görülmektedir. Tütün ürünlerinin pasif içiciliği, radyasyona maruz kalmak, çeşitli akciğer hastalıklarının geçirilmiş olması, stres, zararlı ve zehirli gazların solunması, kanserojen malzemelerin gıda ile birleşmesi gibi diğer çevresel faktörler de akciğer kanserinin nedenleri arasındadır. Bunlara ek olarak cinsiyet, ilerleyen yaş gibi doğal olaylar ve kalıtsal bir faktör olan genetik geçiş de akciğer kanseri sebebi olarak yer almaktadır (Aydiner ve ark., 2010; Krist ve ark., 2021). Akciğer kanseri, kötü prognozlu, 5 yıllık sağ kalım oranı %20,5 olan (Krist ve ark., 2021) ve kanser sebepli ölümlerin en sık gerçekleştiği kanser türüdür. Erken evrede tanı ve tedavi iyileşme oranını artırsa da çoğunlukla erken evrede belirti göstermemektedir. İleri evrelerde fark edildiğinde ise çoğunlukla metastaz yapmış durumda olduğundan tedavi zorlaşmaktadır. Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılır (Cruz ve ark., 2011).

1.2.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

WHO 2020 verilerine göre; Akciğer kanseri, Dünya’da ve Türkiye’de insidansı ve mortalitesi en yüksek olan kanserlerden biridir. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen (Şekil 3), kadınlarda ise en sık görülen dördüncü kanser çeşididir (Şekil 4) (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 3. WHO verileri 2020 yılı Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser çeşidi (Erkek). Akciğer kanseri insidans: %82,2, mortalite: %73,9 (GLOBOCAN, 2020)



Şekil 4. WHO verileri 2020 yılı Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser çeşidi (Kadın). Akciğer kanseri insidans: %16,5, mortalite: %14,8 (GLOBOCAN, 2020)

Akciğer kanseri dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en yüksek mortaliteye sahip olan kanser türüdür. Bunun sebebi 5 yıllık sağ kalım oranının düşük olmasıdır. Akciğer kanseri erken teşhiste zorlanılan ve prevalansı yüksek olan bir kanser olduğundan tedavi başarı oranı da düşmektedir. Akciğer kanserinin erken evrede belirti göstermemesi ve bazı durumlarda sebepsiz ortaya çıkması, teşhisin erken evrede yapılmasına engel olmaktadır. İlerleyen evrelerde ise primer tümör çoğunlukla metastaz yapmış olduğundan mortalite oranını yükseltmektedir (Tanoue ve ark., 2015).

1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanseri günümüzde daha fazla karşılaştığımız ve kansere sebep olan çevresel faktörler sebebiyle görülmesi sıklaşan bir hastalıktır. Akciğer kanserine yakalanma riskini artıran öncelikli sebepler şunlardır;

Tütün ürünleri kullanımı: Akciğer kanserinde, tütün ürünlerinin ekseriyetle sigaranın kullanımı en büyük risk faktörü olarak görülmektedir. Yalnızca tütün kullanımı olmasa

da aktif-pasif içicilik oranı, kullanan kişinin yaşı, cinsiyeti, ne kadar süredir kullandığı, gün içinde kullandığı tütün ürünü sayısı, tütünün içeriği gibi faktörlere bağlı olarak (Harris ve ark., 2004) akciğer kanserinin %90'ından sorumlu tutulmaktadır (De Groot ve ark., 2018).

Zararlı ve zehirli maddelerle temas: Mesleki açıdan en çok maruz kalınan asbest mineralini solumak, diğer zararlı kimyasalları solumak, kirli havaya sahip yerlerde yaşamak, yine mesleki açıdan arsenik, nikel, krom, benzen vb. maddelere maruz kalmak kanser ve özellikle akciğer kanseri riskini kat kat artırmaktadır (Alar ve ark., 2012).

Akciğer hastalıkları geçmişi: Başta KOAH olmak üzere bronşit, tüberküloz, asbetozis, amfizem, pnömoni gibi geçirilmiş diğer akciğer hastalıklarının akciğer kanseri ile ilişkisi gözlenmiştir. Yine hastanın kişisel bilgilerine bağlı olarak düşünülen KOAH geçmişinin %40 ile %60 oranında kanseri etkilediği kanısına varılmıştır. 602 hasta ile yapılan bir çalışmada yeni tanıli akciğer kanseri hastalarının KOAH prevalansının sigara içenlerden 6 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Cruz ve ark., 2011).

Beslenme: İşlenmiş gıdalarda, mangal vb yöntemlerle pişmiş etlerde ortaya çıkan PAH (polisiklik aromatik hidrokarbonlar), yüksek karbonhidratlı gıdaların kızartılması sonucu ortaya çıkan akrilamid, dışarıdan sipariş edilen özellikle fazla yağlı besinlerin bulunduğu kutularda bulunan ve gıdaya bulaşan flatatlar, içlerinde kanserojen katkı maddeleri bulunan gıdalar ve içecekler belki bir seferde değil fakat sık kullanımda vücut dengesini bozarak kansere sebep olmaktadır (Uygun ve ark., 2010).

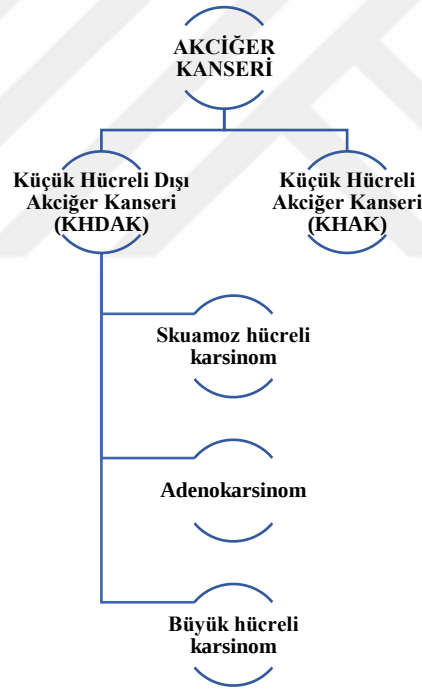
Genetik yatkınlık: Akciğer kanserinin genetik faktörlerden çok çevresel faktörlere bağlı olduğu fakat genetik yatkınlığı olan kişilerin daha fazla dikkat etmesi gerektiği bilinmektedir. GWA'ya (Genome Wide Association Study) göre akciğer kanseri ile bağlantılı olabilecek üç kromozom lokusu bulunmuştur; 15q24-25.1, 5q15.33 ve 6p21 (Brennan ve ark., 2011).

Cinsiyet: Kadınların kanserojen maddelerden daha fazla etkilendiği bilinirken, akciğer kanseri için sigara içen kadın ve erkeklerde cinsiyetsel bir fark yaratmadığı görülmektedir. Buna rağmen, sigara içmeyen kadınlarda sigara içen erkeklere oranla daha fazla akciğer kanseri görülmektedir (Wynder ve ark., 1950; Wakelee ve ark., 2007; Cruz ve ark., 2011).

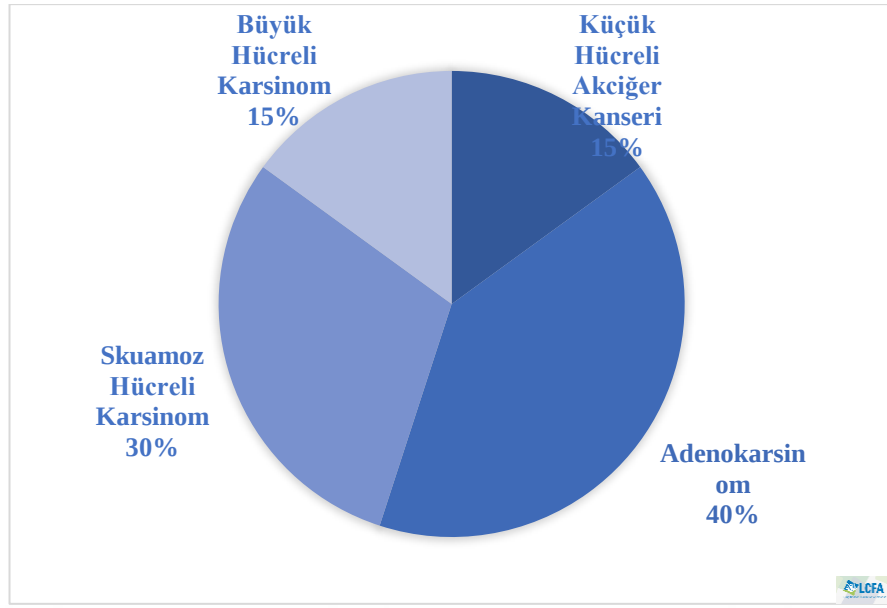
Yaş: ABD’de 2004-2008 yılları arasında yapılan bir çalışmada akciğer kanserinin yaşla ilişkisi araştırılmış ve ileri yaşlarda akciğer kanseri riskinin 55 yaşından itibaren fazla olduğu gözlemlenmiştir. 4 yıl süren bu çalışma sonucu 20 yaşından küçük hastalarda tanı konulmazken 20-34 yaş aralığında %0,2’lik bir oran görülmüştür. Buna ilaveten 35-44 yaş arasında %1,5, 45-54 yaş aralığında %8,8, 55-64 yaş arasında %20,9, 65-74 yaş aralığında %31,1, 75-84 arasında %29 ve son olarak 85 yaş ve üzerinde %8,3 oranında akciğer kanseri tanısı konduğu görülmüştür (Cruz ve ark., 2011).

1.2.3. Akciğer Kanseri Histopatolojisi

Akciğer kanseri, KHAK ve KHDAK olmak üzere iki ana grupta incelenir. KHDAK ise skuamoz hücreli karsinom (SCC), adenokarsinom (AC) ve büyük hücreli karsinom (LCC) olarak üç alt başlıkta incelenir (Şekil 5) Cruz ve ark., 2011).



Şekil 5. Akciğer kanseri çeşitleri



Şekil 6. Akciğer kanseri çeşitlerinin LCFA (Amerika Akciğer Kanseri Vakfı) verilerine göre görülme sıklıkları

1.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)

Lenfoma hücreleri ve KHAK hücreleri arasındaki mikroskopik benzerliklerden dolayı bu kanser çeşidinin lenfatik sistemden kaynaklandığı düşünülmektedir. 1879 yılında, Härting ve Hesse1 madencilerde arsenik kaynaklı lenfosarkom hücreleri tanımladılar. KHAK terimi ilk olarak epitelyal kökenin kabulü ile 1926 yılında kullanılmıştır. (Barnard 1926). KHAK’da, balgam veya bronkoskopi ile alınan numunede tanı şansı yüksektir. KHAK ve lenfomayı ayırt etmek için LCA (Lökosit ortak Antijeni), keratin, TTF1 (Tiroid Transkripsiyon Faktörü 1) ve nöroendokrin belirleyicilerin kullanılması tanıya yardımcı olmaktadır. LCA, lenfoma hücrelerinde pozitif iken keratin, TTF1 ve nöroendokrin belirleyicilerinin birden fazlası KHAK’da pozitifdir (Aydiner ve ark., 2010).

KHAK, genellikle geçmişte veya hala sigara içen kişilerde gözlenmektedir (Hann C. L. ve ark., 2019). Akciğer kanseri hastalarının %15’ini oluşturur ve kötü prognoza sahiptir. Hastalar yaygın olarak öksürük, kanlı öksürük ve nefes darlığı şikayetlerine sahiptir. Görüntülemelerde ise yaygın olarak merkezi akciğer kitlesi ve lenf nodu tutulumu görülür. Bu hastaların üçte ikisinde uzak metastaz vardır. En yaygın metastaz bölgeleri kontralateral akciğer, beyin, karaciğer, adrenal bezler ve kemiktir (Rudin ve ark., 2021).

1.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)

KHDAK, akciğer kanserlerinin büyük bir bölümünü oluşturur ve üç alt grupta incelenir.

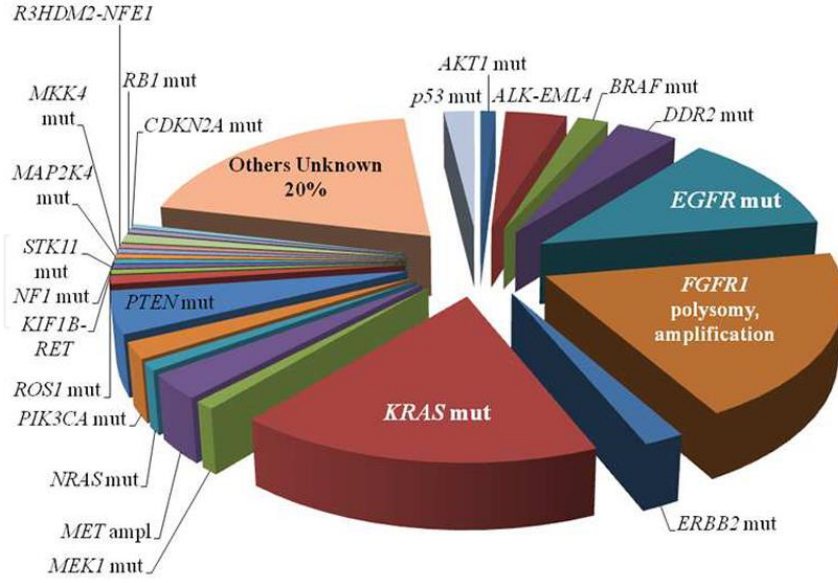
Skuamoz hücreli karsinom (SCC): Tüm akciğer kanserlerinin %20-30'unu oluşturmaktadır. Diğer akciğer kanseri tiplerine göre lokal kalma eğilimi göstermektedir ve yeniden nüks etme durumunda da lokal tekrarlamalar bu tipte daha fazla görülmektedir. LCFA verilerine göre; erkeklerde daha sık görülen bu kanser çeşidi akciğerin merkezinde, bronşlara yakın yerde oluşmaktadır (LFCA, 2021).

Büyük hücreli karsinom (LCC): Akciğer kanserinin ~%15 kadarı büyük hücreli karsinom yapısındadır. Akciğerin herhangi bir yerinde oluşabilir ve diğer iki KHDAK çeşidine göre daha hızlı büyüme ve yayılma yeteneğine sahiptir. LCFA'nın paylaştığı bilgilere göre; metastaz yapana kadar teşhis edilmesi zor olan bir kanser çeşididir. Her 10 vakadan sadece 1 tanesi bu gruba aittir. İlk akciğer kanseri teşhisinde büyük hücreli karsinom gibi görünen çoğu vaka kesin tanıda skuamoz hücreli karsinom veya adenokarsinom olarak güncellenmektedir (LFCA, 2021).

Adenokarsinom (AC): Görülme sıklığı ~%40'tır ve genellikle sigarayı bırakmış bireyler veya kadınlarda görülmektedir (Kefeli ve ark., 2015). Akciğer periferinde bulunan yerleşik tümörlerin metastaz yetenekleri daha fazladır ve çoğunda lenf nodu metastazı bulunmaktadır (Renyi-Vamos ve ark., 2005).

1.2.4. Akciğer Kanseri ile İlişkili Genler ve Mutasyonları

Akciğer kanseri hücrelerinde, kromozomal anormalliklerin yanı sıra tek gen mutasyonları da görülmektedir. Moleküler biyoloji teknikleriyle tanı konulabilen bu mutasyonlar genellikle hücre içi sinyal iletiminin bir ağında yer alan, doğru çoğalmanın, büyümenin, farklılaşmanın etkili olduğu genler ve onkogenler gibi sinyal proteinler ile ilgilidir. KHDAK hücrelerinde gözlenen en önemli genetik bozukluklar; nokta mutasyonları, küçük delesyonlar veya insersiyonlar ve translokasyonlar sonucu oluşan füzyon genleridir. Mutasyona uğrayan genler Şekil 7'de gösterilmiştir. (Krawczyk ve ark., 2012).



Şekil 7. Farklı genlerde mutasyon saptanan KHDAC tümörlerinin yüzdesi (Krawczyk ve ark., 2012).

EGFR (HER1 veya ERBB1): Epidermal büyüme faktörü 2'yi (HER2, HER3, HER4) içeren tirozin kinaz ailesine bağlı bir gendir (Herbst ve ark., 2018). Mutasyonlar çoğunlukla ekzon 18, 19, 20 ve 21'de görülmektedir ve en sık görülen mutasyonlar 18. ve 21. ekzonlarda bulunmaktadır (Lynch T. J. ve ark., 2004). Kullanılan en yaygın moleküler hedefli tedavi anahtarı olarak görülmektedir (El-Telbany ve Ma 2012).

KRAS: RAS proteinleri; hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını, hareketini ve farklılaşmasını kontrol eden büyük bir ailedir (Shields ve ark. 2000). KRAS gen mutasyonları, skuamöz hücreli karsinomda yaygın görülmemekle birlikte akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %15 ila %25'inde görülmektedir (Aviel-Ronen ve ark. 2006).

ALK: ALK geni 2p23.2'de lokalize olup 29 ekzona sahiptir. İnsülin reseptör protein tirozin kinaz süper ailesine üye 22 kDa'lık bir protein kodlar (Roskoski, 2013). İlk kez Morris ve arkadaşları tarafından lenfoma hücre hattındaki bir translokasyon sonucu 1994 yılında keşfedilmiştir (Morris ve ark., 1994). ALK-EML4 yeniden düzenlenmesi ise 2007 yılında Soda ve arkadaşları tarafından Japon hastaların ALK ve EML4 genlerinde yer alan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmıştır. ALK-EML4 füzyon rearanjmanı KHDAC hastalarının %6,7'sinde görülmektedir (Soda ve ark., 2007).

MET: 7. kromozomda yer alan bir proto-onkogendir. *EGFR* ve *HGF*'nin yanında yer alır. *MET*, *HGF*'ye diğer adıyla SF'ye (scatter factor) bağlanmak için tirozin kinaz reseptörünü kodlar (Ma ve ark. 2003). *MET*-*HGF*/SF yolağı, tümör büyümesi, hayatta kalma, hareketlilik ve göç, istila, tümör anjiyogenezi ve metastaz gibi pleiotropik etkilerin aracısı olarak gösterilmektedir (El-Telbany ve Ma 2012).

LKB1 (STK11): 19p13.3'de yer alan tümör baskılayıcı gendir. Hücre polaritesi ve fonksiyonlarını düzenler (El-Telbany ve Ma 2012).

BRAF: *ARAF*, *BRAF* ve *CRAF*'ı içeren serine-threonine protein kinaz ailesine aittir. *BRAF* mutasyonu, melanom, KHDAK, yumurtalık kanseri, papiller tiroid kanseri gibi kanser çeşitlerinin oluşumundan sorumludur. En sık tanımlanan *BRAF* mutasyonu V600E mutasyonudur (El-Telbany ve Ma 2012).

1.2.5. Akciğer Kanseri Evrelemesi

Kanserli hastalarda tedavi için evrenin belirlenmesi hem hastalar hem de hekimler için büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple çoğu tümör için evrensel sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir. UICC (Union Internationale Contre le Cancer) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer) evre sınıflandırma sistemlerini tanımlayan ve iyileştiren resmi organlardır (Frank, 2015).

Akciğer kanseri evrelemesinde, TNM (Tümörün özellikleri (T), lenf nodu (N), metastaz (M)) evreleme sistemi kullanılmaktadır (Çok, 2018).

2005 yılında, 1999-2000 yılları arasında akciğer kanseri olan 100.869 hastadan oluşan veriler IASCL'de CRAB (Cancer Research and Biostatistics) veri tabanına sunulmuştur. 20 ülkeden ve 46 kaynaktan alınan verilerin 81.495 kişisi çalışmaya katılmıştır. Çalışmaya katılan kişilerin 68.463'ü KHDAK ve 13.032'si KHAK hastasıdır. TNM evreleme analizi sonucu daha sonra Journal of Thoracic Oncology'de yayımlanmıştır (Goldstraw ve ark., 2006) ve TNM evreleme sisteminin 7. baskısı olarak sunulmuştur (Rami-Porta ve ark., 2014).

Daha sonra 1999-2010 yıllarını yılları arasında yapılan başka bir araştırmada 94.708 kişilik bir veri tabanı oluşturulmuştur. Veri tabanı için; Avrupa ülkelerinden Türkiye'nin 7304 hasta ile dahil olduğu toplamda 46.560, Asya kıtasından 41.705, Kuzey Amerika'dan 4660, Avustralya'dan 1593 hasta katılmıştır. Bu veri tabanından 70.967'si KHDAK ve 6.189'u KHAK olan, toplamda 77.156 hasta çalışmaya uygun

görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda TNM evreleme sistemi güncellenerek 8. baskıyı oluşturmuştur (Çok, 2018).

Tablo 1. 7. Baskı ve 8. Baskı Karşılaştırılması (Rami-Porta ve ark., 2014).

Element	Yedinci Baskı Verileri	Sekizinci Baskı Verileri
Tanı dönemi	1990 - 2000	1999 - 2010
Analizlenen toplam hasta	100,869	94,708
Coğrafi Konum		
Avrupa	58,701(58%).	46,560(49%).
Kuzey Amerika	21,130(21%).	4,660(5%).
Asya	11,622(11,5%).	41,705(44%).
Avustralya	9,416(9.3%).	1,593(1.7%).
Güney Amerika	0	190(0.3%).
Harici Hastalar	19,374(19%).	17,552(18%).
Analize Katılan Hastalar	81,495	77,154
KHDAK	68,463(84%).	70,967(92%).
KHAK	13,032(16%).	6,189(8%).
Tedavi Modeli		
Cerrahi	41%	57.7%
Radyoterapi + cerrahi	5%	1.5%
Kemoterapi + cerrahi	4%	21.1%
Kemoterapi	23%	9.3%
Radyoterapi	11%	1.5%
Kemoterapi + radyoterapi	12%	4.7%
Trimodal tedavi	3%	4.4%

TNM evreleme sistemi son olarak 2016 yılının sonunda 8. Baskı olarak güncellenmiştir ve 2017 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Rami-Porta ve ark., 2014; Çok, 2018).

Tablo 2. 6. ve 7. Baskı TNM Evreleme Sistemi (Rami-Porta ve ark., 2014).

Açıklama/TNM	Altıncı Baskı Tümör Evrelendirme	Yedinci Baskı Tümör Evrelendirme
Tümör boyutu ≤ 2 cm	T1	T1a
Tümör boyutu > 2 cm ama ≤ 3 cm	T1	T1b
Tümör boyutu > 3 cm ama ≤ 5 cm	T2	T2a
Tümör boyutu > 5 cm ama ≤ 7 cm	T2	T2b
Tümör boyutu > 7 cm	T2	T3
Primer tümör ile aynı lobda yer alan ek tümör nodülleri	T4	T3
Primer tümör ile farklı lobda yer alan ek tümör nodülleri	M1	T4
Plevral diseminasyon	T4	M1a
Perikardiyal diseminasyon	N/A	M1a
Intratorasik metastaz	M1	M1a
Ekstratorasik metastaz	M1	M1b
T2b N0 M0	1B	11A
T2a N1 M0	11B	11A
T4 N0-1 M0	111B	111A

Tablo 3. 8. Baskı TNM Evreleme Sistemi (Detterbeck, 2018).

T (Primer Tümör)	
TO	Primer tümör yok
Tis	Yerinde karsinom (skuamoz veya adenokarsinom)
T1	Tümör ≤ 3 cm
T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom
T1a	Santral hava yollarında yüzeysel yayılan tümör
T1a	Tümör ≤ 1 cm
T1b	Tümör > 1 ama ≤ 2 cm
T1c	Tümör > 2 ama ≤ 3 cm
T2	Tümör > 3 ama ≤ 5 cm
T2a	Tümör > 3 ama ≤ 4 cm
T2b	Tümör > 4 ama ≤ 5 cm
T3	Tümör > 5 ama ≤ 7 cm
T4	Tümör > 7 cm
N (Bölgesel Lenf Nodülleri).	
N0	Bölgesel nodül metastazı yok
N1	İpsilateral pulmoner veya hiler nodüllerde metastaz
N2	İpsilateral mediastinal veya subcarinal nodüllerde metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, hiler veya supraklaviküler nodüllerde metastaz
M (Metastaz Mesafesi).	
M0	Metastaz yok
M1a	Kontralateral lobda malign plevral veya perikardiyal efüzyon, plevral veya perikardiyal nodüller, ayrı tümör nodülleri
M1b	Tek ekstratoraksik metastaz
M1c	Çoklu ekstratoraksik metastaz (1 veya > 1 organ).

1.2.6. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavisi

Akciğer kanserlerinde TNM evreleme sistemi kullanılarak hastalığın evresi belirlenir ve buna göre tedavi protokolü seçilmektedir. Tedaviler cerrahi müdahaleleri, kemoterapileri, radyoterapileri, palyatif tedavileri, ilaçları ve tek veya kombine tedavileri barındırmaktadır. Erken evrede tanı almak tedaviyi kolaylaştırmaktadır. Birinci ve ikinci evrede tedavi yöntemi genellikle cerrahidir. Cerrahi müdahaleden sonra evre bir hastalarına risk tayini yapılır, gerek görülürse kemoterapi verilir. Evre iki hastalarına direkt kemoterapi önerilir. Üçüncü evre hastalarda ise asıl tedavi eşzamanlı kemoterapidir. Buna cerrahi müdahale eklenebilir. Dördüncü evre hastalarda sistemik tedaviler kullanılmaktadır. Tedaviler hastalığın alt tipine, saptanan mutasyonlara, tümör konumuna, metastazlarına, hastanın yaşına göre değişim göstermektedir. Bu ileri evrede amaç, sağ kalımı uzatmak ve yaşam kalitesini iyileştirmektir (Aydiner ve ark., 2010; Derneği ve ark., 2016).

1.3. KÖK HÜCRE

İlk kök hücre terimi 1800'lü yılların sonunda ortaya atılmış (Haeckel, 1868) olsa da 1960'lı yıllarda Dr. James Till ve Dr. Ernest McCulloch'ın yaptığı çalışmalar modern kök hücre çalışmalarının başlangıcı olmuştur (Maehle, 2011). Donör kemik iliği hücrelerinin, konak dalağında oluşturmuş olduğu kalitatif ve kantitatif analizinin ardından nakil sonucu in vivo dalak kolonisi oluşumu ve adaptasyonu sonucunda yetişkin kök hücreler karakterize edilmiştir (Till ve ark., 1961).

Kök hücreler, mitoz bölünme yardımıyla özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve kendini yenileyerek yeni kök hücrelerin üretimini sağlayabilen, çok hücreli canlıların dokularını oluşturan ana hücrelerdir. Kök hücreler bulunma yerlerine göre; yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler olmak üzere üç türde incelenirler. Farklılaşma tiplerine göre ise totipotent, pluripotent ve multipotent olarak ayrılırlar. Kök hücreler kendilerine has özelliklere sahiptirler. Kendini yenileme ve farklılaşabilme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre denilmektedir (Zakrzewski, 2019).

Canlı bedeninin kök hücreleri kullanabilmesi için hücre siklusu düzenleyicileri, sinyal yolları, transkripsiyon faktörleri ve miRNA'lar ile iletim sağlaması gerekmektedir. Kök hücrelerin özelleşmesine yardımcı olan sinyallerin iletimini sağlayan bazı sinyal yolları mevcuttur. LIF-STAT, MAP-ERK, PI3K ve Wnt gibi sinyal yolları kök

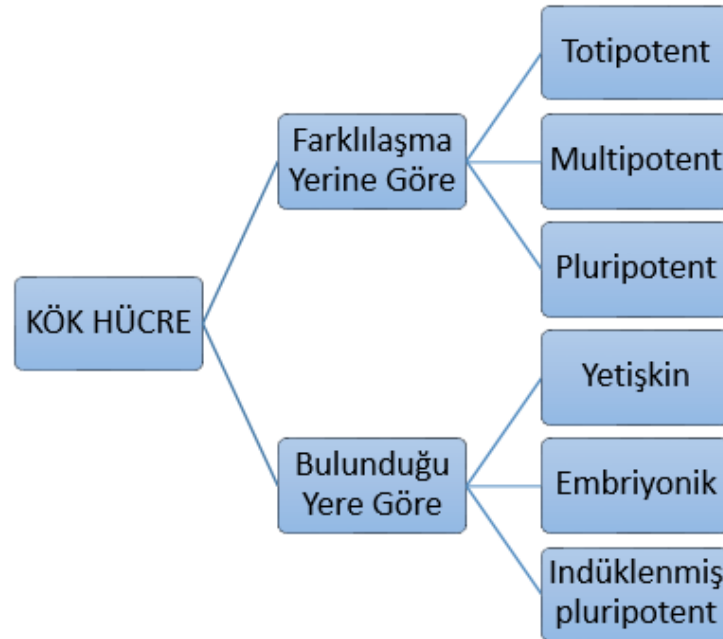
hücrelerin farklılaşmasında ve kendini yenilemesinde görev almaktadır. Kök hücreler farklılaşırken hücre içi mekanizmalar OCT-4, SOX-2, Nanog, KLF-4 ve c-myc gibi transkripsiyon faktörleriyle düzenlenmektedir (Kashyap ve ark., 2009).

1.3.1. Kök Hücre Özellikleri

Kök hücreler kendilerini yenileme ve başka hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahiptirler. Kendini yenileme özellikleri ile farklılaşmamış halde bölünerek çok sayıda yeni kök hücre meydana getirirler. Farklılaşabilme özellikleri ile de özelleşmiş hücrelere farklılaşarak, olgun hücrelerin görevlerini yapabilmektedirler (Çerci ve ark., 2019).

1.3.2. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa ve farklılaşma yeteneklerine göre iki ana gruba ayrılırlar (Şekil 8) (Çerci ve ark., 2019).



Şekil 8. Kök hücre çeşitleri

1.3.2.1. Bulundukları yerlere göre

Kök hücreler organizmada bulundukları yere göre embriyonik kök hücreler, yetişkin kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Kolios ve Moodley, 2013).

Embriyonik Kök Hücreler: Erken evre (5-7 gün) embriyosundan elde edilirler. Tüm fonksiyonel yetişkin hücre tiplerine süresiz olarak dönüşebilirler ve koloniler halinde çoğalabilirler. Transkripsiyon faktörlerini ve bazı yüzey proteinlerini eksprese edebilirler. Çeşitli hastalıklarda kullanılacak kök hücre tedavileri için çok faydalı olabilirler, fakat bir dezavantajları mevcuttur. Teratoma ismi verilen tümörleri oluşturma eğilimleri vardır. Bu sebeple araştırmalar dışında kullanılmazlar (Ayla ve ark., 2013).

Yetişkin Kök Hücreler: Germ hattı ve somatik olmak üzere iki alt başlık içeren bu kök hücre tipi, hematopoetik, mezenkimal, nöronal, epidermal dokularda ve bağırsak, karaciğer, pankreas, göz gibi organlarda bulunmaktadır. Genellikle doku onarımında görev alırlar (Bongso ve Lee, 2005).

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler: Genel olarak embriyonik kök hücrelere benzeyen bu hücreler farklılaşma yeteneğine ve teratom oluşturabilme özelliğine sahiptirler. Embriyonik kök hücrelere benzer bir yapıda laboratuvar ortamında oluşturulduklarından, alternatif olarak kullanılırlar. Birçok hücre tipine farklılaşabildikleri için tedavilerde kullanılabilirler (Aygar, 2020).

1.3.2.2. Farklılaştıkları yerlere göre

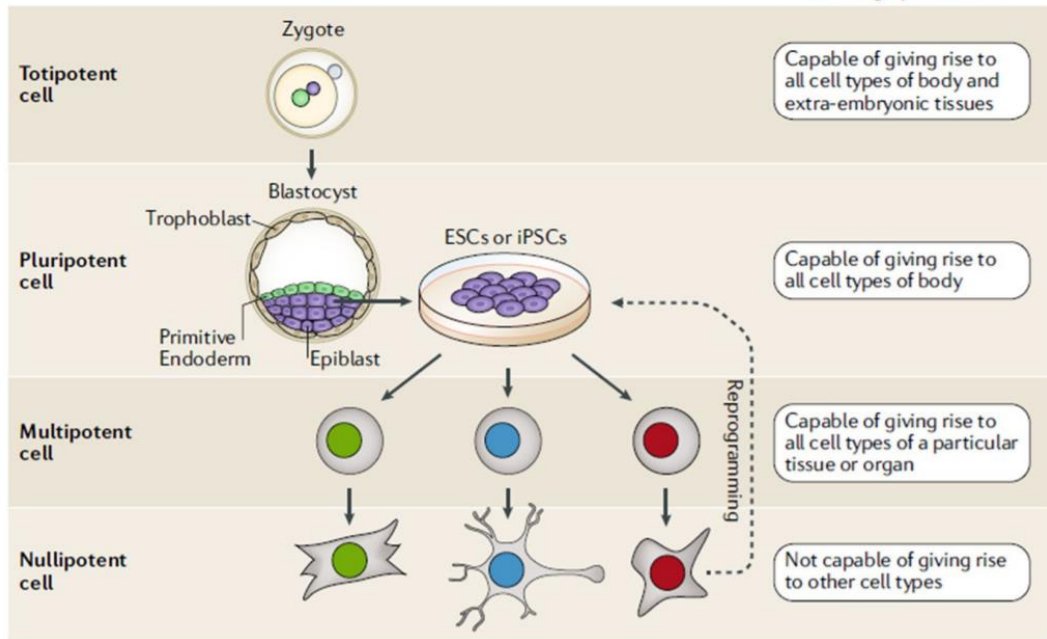
Kök hücreler, farklılaşma yerlerine göre ise farklılaşma yetenekleri baz alınarak; embriyonun ilk zamanlarında totipotent, ikincil olarak pluripotent ve son olarak multipotent kök hücreler olarak üçe ayrılırlar (Kolios ve Moodley, 2013).

Totipotent Kök Hücreler: National Institutes of Health'in yönettiği The Medical Dictionary'ye totipotent kök hücrelerin iki tanımı mevcuttur. Bunlar; yeni bir organizma oluşturacak yetenekte olan hücreler veya herhangi bir hücreye veya dokuya dönüşebilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Embriyonun ilk zamanlarında kök hücrelerin farklılaşma özellikleri daha fazladır, zaman ilerledikçe dönüşme yetenekleri kısıtlanır. Buradan yola çıkarak embriyonun ilk dönem yani 1-3 gün arasında yer alan

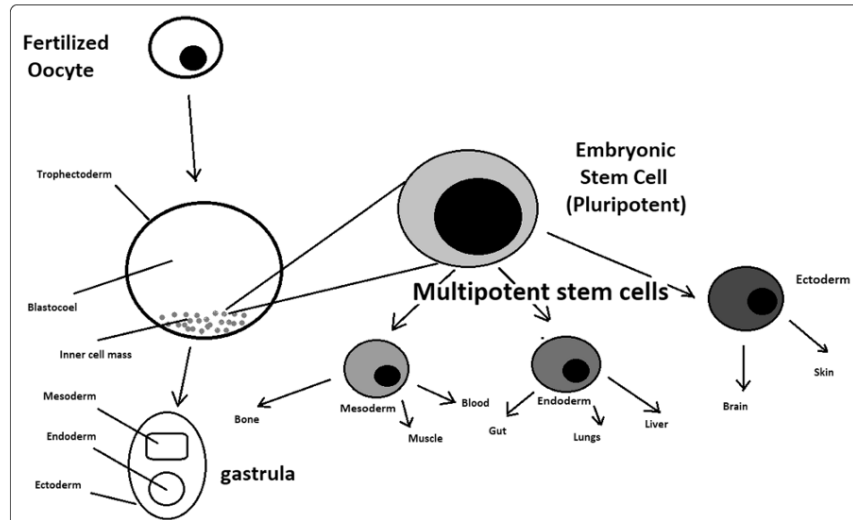
süredeki kök hücreler totipotent kök hücrelerdir denmektedir. İleri dönemde farklılaşarak pluripotent hücreleri oluştururlar (Condic, 2014; Aygar, 2020).

Pluripotent Kök Hücreler: Germ hücreleri dahil tüm hücre tiplerine farklılaşabilen kök hücre tipidir (Smith, 2006). Döllenmeden 4-5 gün sonra oluşmaya başlarlar. Endoderm, ektoderm ve mezoderm tabakalarının kökenini oluşturur (Atar, 2018; Aygar, 2020).

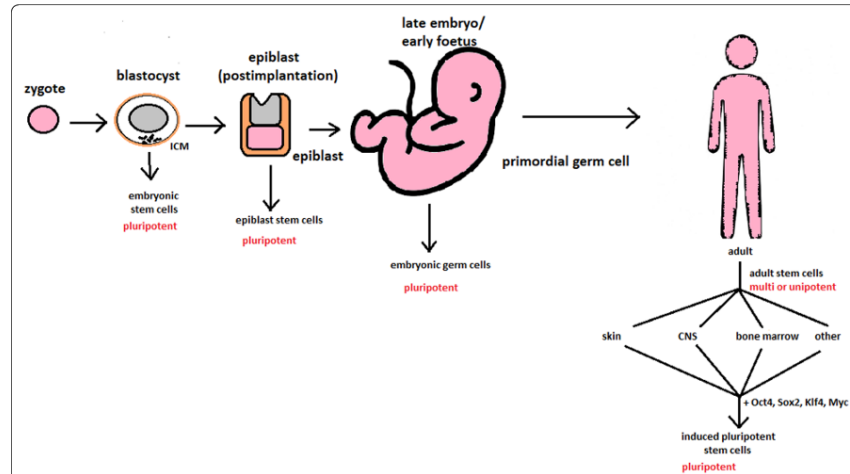
Multipotent Kök Hücreler: Belirli hücrelere farklılaşabilirler ve erişkin kök hücrelere dönüşürler (Ayla ve ark., 2013). Bulundukları doku ve organlara farklılaşabildikleri için totipotent veya pluripotent hücrelere göre daha düşük farklılaşma yetilerine sahiptirler. Doku ve organ bütünlüğü amacıyla oluşturulan progenitör hücre havuzlarının rezervlerini korumak multipotent kök hücrenin özelliğidir (Atar E., 2018; Aygar, 2020).



Şekil 9. Kök hücre hiyerarşisi (Balistreri ve ark., 2020)



Şekil 10. Oosit gelişimi ve kök hücre oluşumu (Zakrzewski, 2019)



Şekil 11. İnsan vücudunda kök hücre farklılaşması (Zakrzewski, 2019)

1.4. KANSER KÖK HÜCRE

Kanser kök hücreleri (KKH), diğer bir deyişle kanser başlatıcı hücrelerdir ve kanser kitlesinin yani tümörün başlangıcından sorumlu olan farklılaşmamış hücre topluluğunu oluştururlar (Pardal ve ark., 2003). KKH, ilk kez 1997 yılında akut myeloid lösemi (AML)’de tanımlanmıştır. CD34 (+), CD38 (-) yüzey markırlarını taşıyan hücrelerin bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde lösemik hücrelere farklılaştığını ve kendini yenilediği gösterilmiştir (Bonnet, 1997). Tümör hücreleri, kök hücre pozitif (KKH (+)) ve kök hücre negatif (KKH (-)) olarak ayrılırlar. KKH (+) hücreler normal kök hücre karakteri taşıyan hücrelerdir; sınırsız çoğalma, kendini

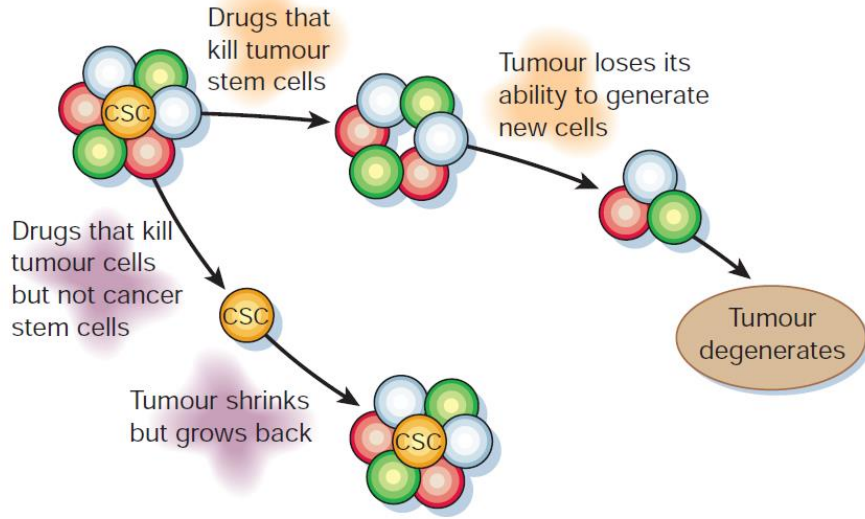
1.4.1. Kanser Kök Hücre Özellikleri

KKH'ler kök hücreler gibi davranma yetisine sahiptir. Kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma gibi özellikleri vardır. Buna ek olarak anjiyogenez, invazyon ve migrasyon gibi kanser hücresi özellikleri de barındırırlar.

KKH'ler ve KH'ler arasında belirgin bir özellik farkı bulunmasa da KKH'lerinin çoğalırken sadece KKH'ye farklılaşabildiği ve normal kök hücrelerin aksine düzene uymak yerine bozmaya meyilli oldukları göz önünde bulundurulmalıdır. Kanser kök hücrelerin anahtar özellikleri şunlardır;

- Kendini yenileme kapasitesi: Normal kök hücreler gibi özdeş yavru hücreler üretme yeteneği.
- Tümör heterojenliği ve yaşatma yeteneği: heterojenliği artırmak için, farklılaşırken başka kanser hücre soylarına da dönüşerek çoğalması ve tümörün hayatta kalmasını sağlama yeteneği.
- Yüksek tümörijenik potansiyel: KKH'nin çoğalırken ve farklılaşırken, yeni tümörler oluşturma yeteneği (Reya ve ark., 2001).

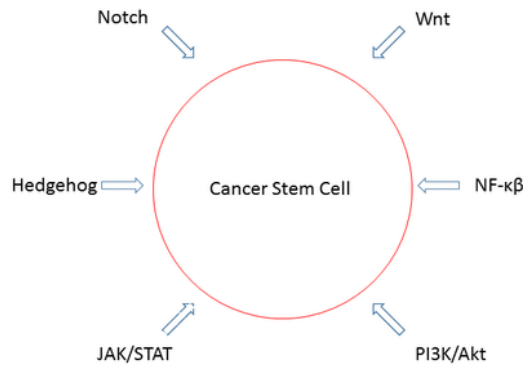
Kanser kök hücreler ile ilgili yapılan çalışmalar göstermektedir ki, çoğu tümör modelinde tedavi belirlenirken kanser kök hücreyi yok etmeye yönelik çalışmalar yapılmalıdır. Çünkü çoğu kanser modeli heterojenik yapıda hiyerarşik modeldedir. Sadece kanser hücrelerine yönelik uygulanan tedavilerde, ilaç, kemoterapi ve radyoterapi direnci gelişmektedir. Cerrahi tedavilerde ise yeniden nüks olayı sıkça görülmektedir. Böyle durumlarda KKH yok edilmeye çalışılmalıdır (Reya ve ark., 2001).



Şekil 13. Konvansiyonel tedavilerde tümörler küçültülebilir fakat KKH'ler diğer kanser hücreleri kadar duyarlı değilse tümör yeniden oluşabilir. KKH hedef alınırsa tümörler uzun vadede bile olsa yok olabilir (Reya ve ark., 2001).

1.4.2. Kanser Kök Hücre Sinyal İletim Yolakları

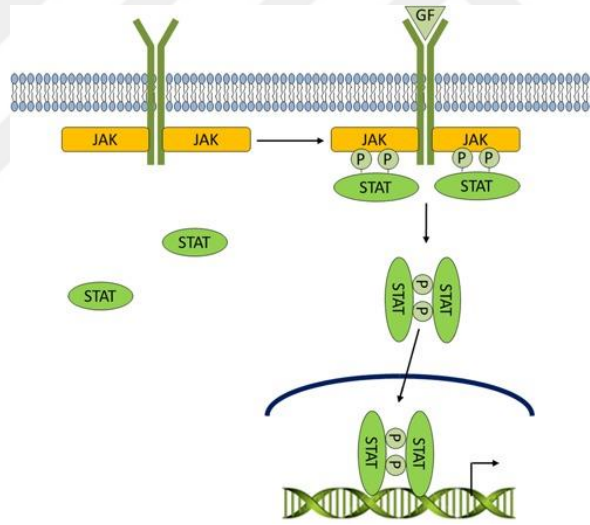
Kanser kök hücrelerin kendini yenileyebilmesi, dönüşebilmesi ve çoğalabilmesi için sinyal iletimine ihtiyaçları vardır. Sinyal iletimleri ise aşağıda bahsedilen yollar tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 14).



Şekil 14. KKH sinyal yolları (Dzobo, ve ark., 2016)

LIF-STAT Sinyal Yolağı:

Lösemi İndükleyici Faktör (LIF) (Şekil 15), interlökin-6 ailesine bağlı bir sitokinindir. Sinyal iletimini GP130 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. LIF ile GP130 bağlanarak heterodimer oluşturur ve bu da Janus Ailesi Kinaz (JAK)'ları etkinleştirir. GP130 ile bağlanan JAK'lar, fosforilasyon ve translokasyon işlemleri sonucunda Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) proteinini fosforlayarak heterodimer oluşmasını sağlar. Aktif hale gelen STAT3 ise hücre çekirdeğine geçerek hedef gen promotorlarına bağlanır ve transkripsiyon faktörü görevi görerek genlerin aktivasyonuna katılır. LIF yolağı aynı zamanda ERK ve PI3K yolaklarının aktivasyonunu da tetikler. STAT, ERK ve PI3K yolakları özellikle embriyonik kök hücre uyarımı için önemlidir (Kiraz ve ark., 2014).

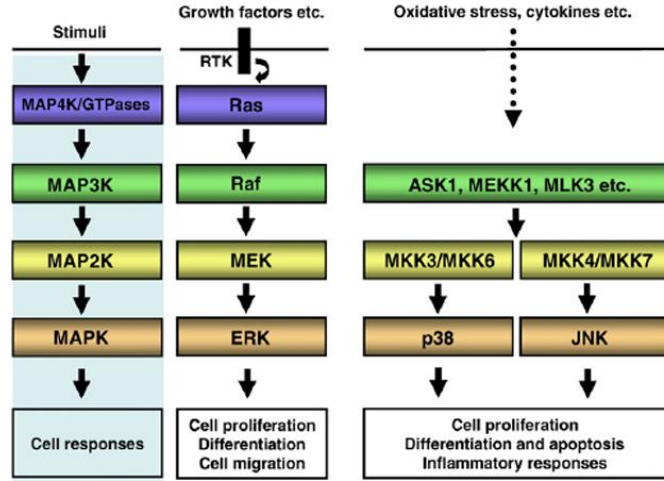


Şekil 15. LIF/JAK/STAT sinyal yolağı (Voskas ve ark., 2014)

MAPK-ERK Sinyal Yolağı:

GP130'un uyardığı sinyal ileti yolaklarından biri Ras/MAPK (Mitojen Aktifleştirici Protein Kinaz) (Şekil 16) yolağıdır. MAPK ve ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz) yolakları, somatik hücrelerde kök hücrelerin korunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Ras aktivasyonu sırasıyla Raf ve MAPK yolaklarının ardından ERK yolağının da aktivasyonuna sebep olmaktadır. Aktifleşen ERK,

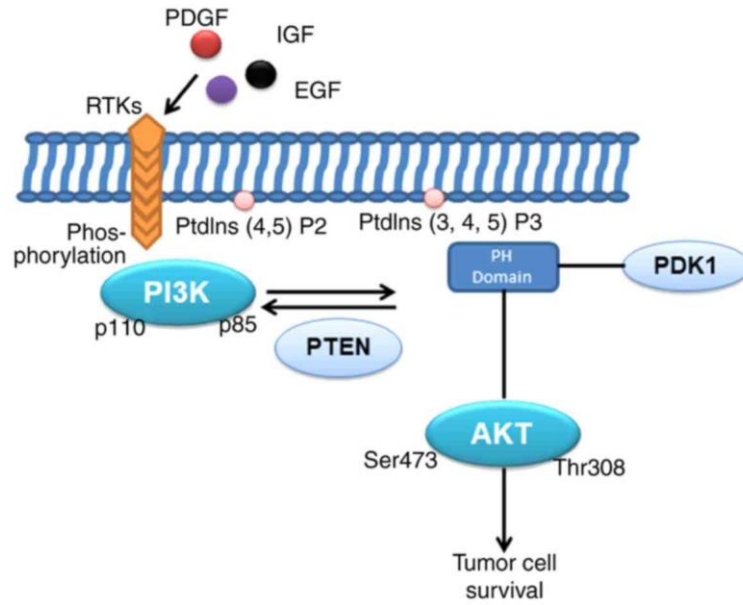
transkripsiyon faktörü düzenleyici Myc, Ets gibi proteinlerin aktivasyonunda kullanılmaktadır (Chen J. D. ve ark., 2014).



Şekil 16. MAPK sinyal yolağı (Kim E. K. ve diğer, 2010)

PI3K Sinyal Yolağı:

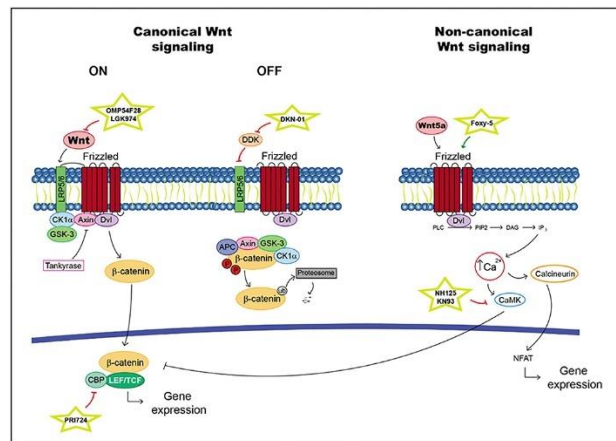
Fosfatidilinositol3-kinazlar (Şekil 17), reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılığıyla fosforlanarak aktive olurlar. İnsülin reseptör substratı olan IRS1 ile bağ kurarak PIP2'nin PIP3'e katalize olurlar. PI3K yolağının daha çok kardiyak kök hücrelerde ve göç etmelerinde rol aldığı bilinmektedir (Huang ve ark., 2014). Kök hücrelerin özelleşmeden kök hücre olarak devam etmelerinde de PI3K yolak aktivasyonun önemli bir rolü vardır. PI3K sinyal yolağının inaktivasyonunun mezenkimal kök hücrelerin kemik, sinir, kardiyak gibi dokulara farklılaşmasına yol açtığı bilinmektedir (Huang ve ark., 2014).



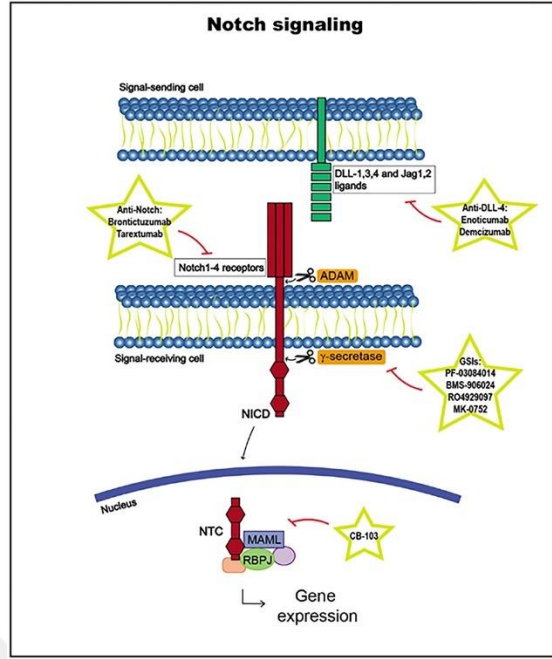
Şekil 17. PI3K sinyal yolağı (Shi ve ark., 2019)

Wnt Sinyal Yolağı:

Hücre yüzeyindeki Frizzled reseptörüne bağlanarak aktifleşen Wnt (Şekil 18), GSK-3'ün inaktivasyonunu katalizler ve hücrede beta-katenin birikimine yol açar. Betakatenin, aktif durumdayken T-hücresi ve spesifik faktörler (TCFs) birlikte hareket ederek Wnt'nin, c-Myc, Tcf1 ve siklinD1 gibi hedef genlerinin transkripsiyonlarını kontrol etmektedir (Van Es ve ark., 2003).



Şekil 18. Wnt sinyal yolağı (Espinosa-Sánchez ve ark., 2020)



Şekil 20. Notch sinyal yolağı (Espinosa-Sánchez ve ark., 2020)

1.4.3. Kanser Kök Hücreye Spesifik Genler

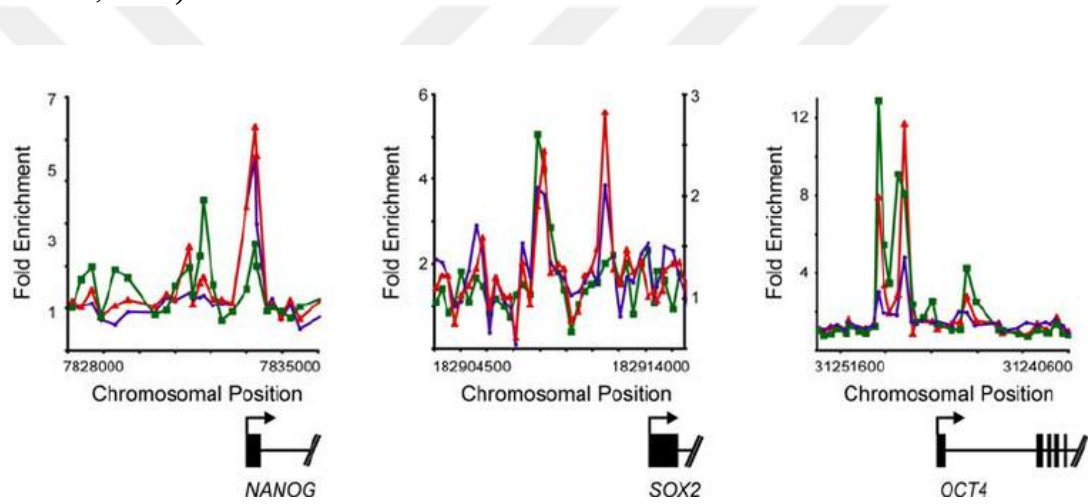
OCT-4, *SOX-2*, *KLF-4*, *Nanog* genleri, transkripsiyon faktörü olarak görev yaparlar ve kök hücre çalışmalarıyla ilişkilidirler. Bu genler eksprese edildiğinde farklı hücre tiplerinin çoğalıp farklılaşmasını düzenlemek için aktivatör ve baskılayıcı olarak iş görürler (Wei, 2009). Yamanaka Faktörleri ve pluripotensi genleri olarak da geçen bu genler önemli görevlere sahiptirler.

OCT-4: insanda 6. Kromozom kolunda yer alır (Litviakov ve ark., 2020). Kök hücrelerin en önemli transkripsiyon faktörüdür. DNA’da ATGCAAT dizisine bağlanarak, kanser kök hücrelerin pluripotensi, kendini yenileme özelliklerinden ve gen ekspresyon seviyelerinin optimum olmasından sorumludurlar (Niwa ve ark, 2000).

SOX-2: 3. Kromozomun uzun kolunda yer alır. Preimplantasyon evresindeki embriyoda, embriyonik kök hücre ve erişkin kök hücrede ifade edilirler. Oct-4’ün kofaktörüdür. Sox-2’nin fonksiyonu Oct-4 ile aynıdır (Graham, 2003). Sox-2 genleri Oct-4 benzeridir ve pluripotent özellik gösterir. Oct 4 multipotent ve unipotent kök hücrelerle ilişkili olabilirken, Sox-2 sadece pluripotent hücrelerde eksprese olur. (Rizzino, 2009)

KLF-4: *KLF* ailesi genlerinden olan *KLF-4* ilk olarak Yamanaka ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Jaenisch ve arkadaşları tarafından fare IPS hücreleri oluşumunda bir faktör olduğu doğrulanmıştır (El-Karim ve ark, 2013). Kendi geninin promotor bölgesine bağlanır ve kendi transkripsiyonunu aktive edebilir. Embriyonik kök hücrelerin korunmasında ve farklılaşmalarının önlenmesinde önemli rol oynar (Liu, 2008).

Nanog: Homeobox transkripsiyon faktörü olan bu gen, insan kanserlerinde önemli bir yer tutmaktadır (Jeter ve ark., 2015). Kolorektal tümörlerde *Nanog*'un fazla ekspresyonu CD133 (+) hücrelerde artışa sebep olmuştur. *Nanog* ekspresyonu aynı zamanda karaciğer ve lenf nodu metastazı ve evrelemesi ile de doğru orantılıdır (Xu ve ark., 2012).

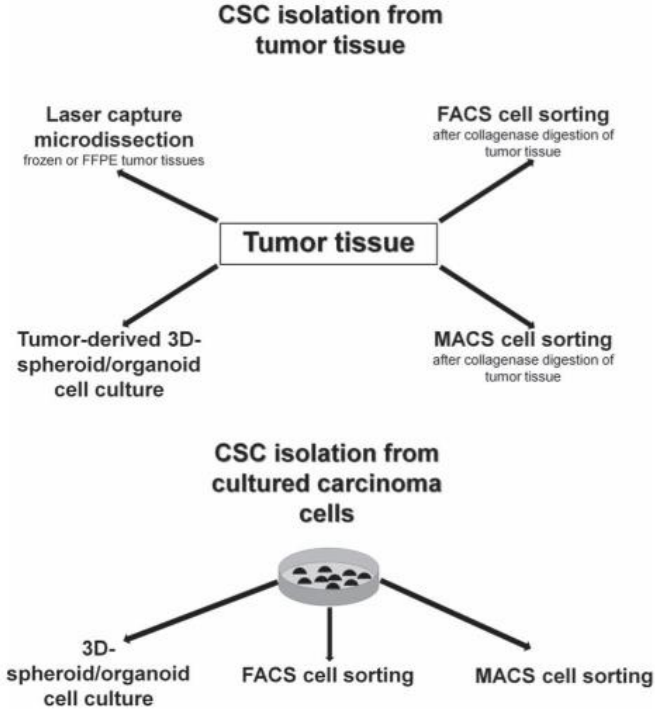


Şekil 21. Genlerin kromozomal dizilişleri. Grafikler, bir genomik bölge içerisindeki tüm problemler için işlenmemiş ChIP zenginleştirme oranlarını göstermektedir (Boyer, 2014)

Bu genlerin ekspresyonuna bakılarak genlerin çalışıp çalışmadığı, baskılayıcı veya başlatıcı olup olmadığı kontrol edilir.

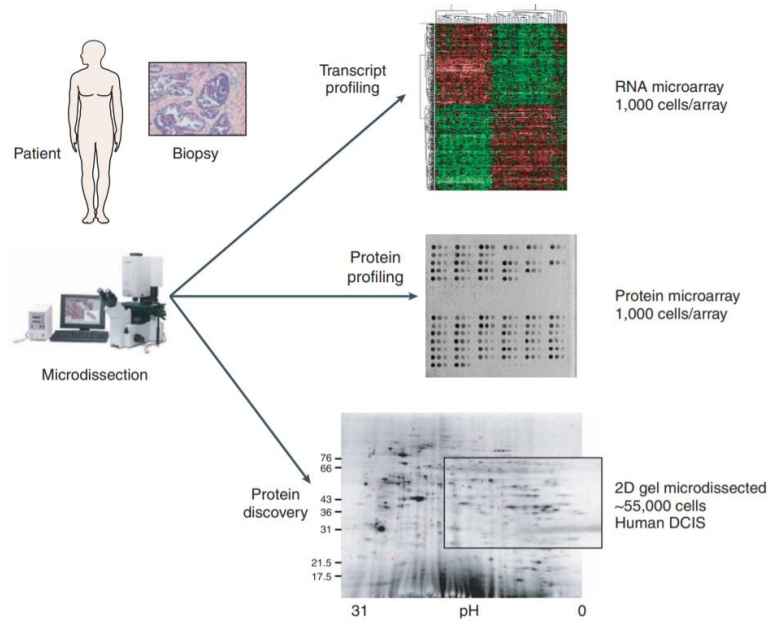
1.4.4. Kanser Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Kanser kök hücre izolasyonu için birden fazla izolasyon yöntemi bulunmaktadır. Bunlar arasında sık kullanılanlar MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)/FACS (Flourescent Activating Cell Sorting) ayırma yöntemleri, lazer mikrodiseksiyonu (LCM) ve küre oluşumu deneyidir (Şekil 22) (Skvortsov, 2014).



Şekil 22. In vitro olarak kültürlenmiş karsinom hücrelerinden ve tümör dokusundan kanser kök hücre izolasyon yöntemleri (Skvortsov, 2014)

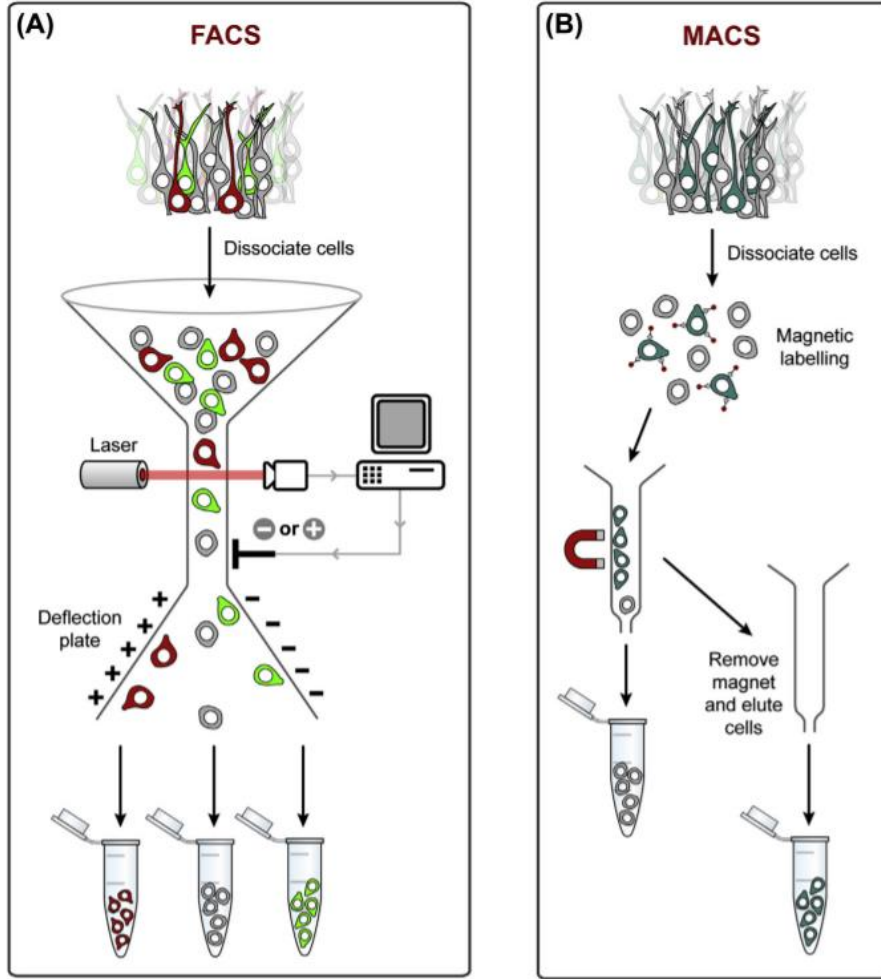
Lazer mikrodiseksiyonu (LCM): LCM, ilk olarak National Institutes of Health (NIH)'de bir araştırma aracı olarak ortaklar yardımıyla tasarlandı ve geliştirildi. Lazer mikrodiseksiyonu, hücrelerin doğrudan mikroskop ile görselleşmesi yoluyla heterojen dokudan veya hücre kültüründen saf hücre popülasyonu elde etmek için kullanılan bir tekniktir (Bonner ve ark., 1997). Bu sistemde mikroskoba entegre lazer ışını hedefe yönlendirilir, hedefin üzerine yerleştirilen polimer film sıvılaşarak altındaki hedef hücreye yapışır ve katı hale geçer. Bu sayede hedef hücreler toplanmış olur (Baloğlu ve ark., 2002).



Şekil 23. LCM tekniği uygulama görseli (Espina ve ark., 2006)

MACS: Miltenyi Biotec firması tarafından geliştirilen manyetik ayırma yöntemi en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Şekil 24’te belirtildiği gibi, çeşitli hücre tipleri için farklı manyetik boncuklar bulunduran bu yöntem, hücreleri manyetik etkiyle basit bir şekilde izole etmektedir. Manyetik probalar ile işaretlenen hücreler, mıknatıs yardımıyla tüp çeperinde tutularak hedef hücre dışındaki hücrelerin elimine edilmesini sağlamaktadır (Tomlinson ve ark., 2013).

FACS: Bu yöntemde MACS kadar sık kullanılan bir ayırma yöntemidir. Yine Şekil 24’te gösterilen FACS yönteminde hücreler fiziksel ve yapısal özelliklerine göre tanımlanmakta ve floresan işaretli hedef hücre belirlenmiş olmaktadır. Sonrasında hücreler akış sitometrisinden geçirilir ve hücre yüzeyine bağlı antikorlar ekstra enerji yüklü olduklarından dolayı floresan ışığı yayarlar. Bu işaretli hücreler hava basıncı ile ışın boyunca kanaldan geçirilir ve ayrılmış olurlar (Tomlinson ve ark., 2013).



Şekil 24. MACS ve FACS yöntemleri (McClure ve ark., 2015)

Küre oluşumu deneyi: Hücrelerin petrilere ekilerek veya damlatma yöntemiyle çoğaltılarak birbirlerine yaklaşması ve küre oluşturması beklenir.

1.4.5. Akciğer Kanseri Kök Hücresi

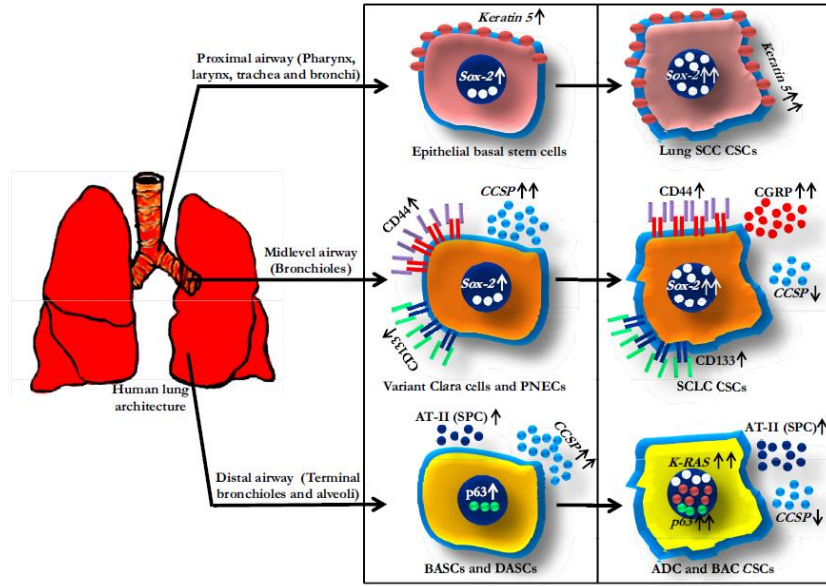
1.4.5.1. Akciğer kanseri kök hücre özellikleri

Akciğer kanseri, dünya üzerinde en sık görülen ve ölüm oranı en fazla olan kanserlerden biri olmaya devam etmektedir. Bunun sebebi tedaviye direnç ve tekrar nüks olaylarının sıkça görülmesinden dolayı radyoterapi, kemoterapi, cerrahi müdahaleler gibi geleneksel tedavi yöntemlerinin yeteri kadar etkili olmamasıdır. Tedaviye karşı geliştirilen direncin ve tümör hücrelerinin yok olmasına rağmen yeniden oluşabilmesinin sebebi olarak kanser kök hücreler görülmektedir (Prabavathy ve ark., 2018; Maiuthed ve ark., 2018).

Kanser kök hücrelerin keşfi 1997 yılında yapılmış ve o zamandan bu zamana kanser kök hücrelere olan merak gün geçtikçe artmıştır. Tümör hücrelerinin totalinde %1'den küçük bir miktarda bulunmasına rağmen kanser kök hücreler, kanserin kök nedeni olarak görüldüğü için kanser başlatıcı hücreler olarak da adlandırılmaktadır.

Akciğer kanseri kök hücreleri yapısal olarak farklı hücresel sinyallerden dolayı farklı fenotipler sergileyen heterojen kanser hücreleri sebebiyle karakterize edilse de (Maiuthed ve ark., 2018) diğer KKH'lerden özellik bakımından bir farkı yoktur. Yüksek tümörjenite, metastaz özelliği, immün sistemden kaçma, kemoterapiye direnç gibi özellikler yenilenme, farklılaşma ve çoğalma özelliklerinin yanında yer almaktadır (Maiuthed ve ark., 2018).

Akciğer kanseri kök hücrelerin tanımlanması için kullanılabilecek birden fazla yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler arasından en sık ve efektif olarak kullanılanlar side population ve akciğer kanserine spesifik yüzey markırları kullanılarak FACS/MACS analizleri yapmaktır. Side population, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının hoechst boyası akış özelliğine dayalı olacak şekilde kök hücre elde etmesini sağlayan bir flow sitometri yöntemidir. Yüzey markırları ile MACS/FACS analizi yöntemi, yüzey markırları kesin olarak bir kansere spesifik olmasa da akciğer kanseri için spesifik sayılabilecek birkaç yüzey markırı bulunmaktadır. Bu yüzey markırları kanser kök hücreler ile birleşerek ya manyetik ayırma ile ya da floresan ayırma ile izole edilmektedir.



Şekil 25. Normal akciğer kök hücreleri ve kanser kök hücre karşılıkları (Shukla ve ark, 2015)

1.4.5.2. Akciğer kanseri kök hücre yüzey markırları

ALDH: Aldehitlerin oksidasyonunu katalize eden sitozolik izoenzimdir. Jiang ve arkadaşının yaptığı bir çalışmada ALDH1 (+) hücreleri insan akciğer kanseri hücre hattından ilk kez izole edilmiş ve kendini yenileme, farklılaşma ve çoklu ilaç direnci kapasitesi gibi önemli kanser kök hücre özellikleri gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, üç hastanın ALDH1 ekspresyon analizinde ALDH1 protein seviyesinin hastalığın evresi ile doğru, hastaların sağkalım oranları ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2009; Prabavathy ve ark., 2018).

CD44: Hücre göçü, hücre yapışması ve hücre matris etkileşiminin modülasyonu dahil birçok rolü olan zara bağlı bir glikoproteindir (Fasano ve ark., 1997). Başlangıçta kolorektal kanser için kanser kök hücre belirteci olarak gösterilmiş (Napier ve ark., 2007) olsa da çeşitli akciğer kanseri hücre hatlarından yapılan in vitro ve in vivo ekspresyon profillemeleriyle akciğer kanseri hücrelerinde de tümör başlatıcı markır olarak görev aldığı bulunmuştur (Leung ve ark., 2010). Ek olarak, PI3K sinyal yolağı ile ilişkisi, suPAR (Solubl Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü/Urakinaz Plazminojen Aktivatör Reseptörü) ile aşırı ekspresyonuna sebep olduğundan kanser hücrelerinin invazyonunu ve çoklu ilaç direncini artırdığı gözlemlenmiştir (Gutova ve ark., 2007; Zakaria ve ark., 2017).

CD166: Akciğer kanseri kanser kök hücre belirteci olarak tanımlanmış bir markıdır. *CD166* markırı ile birçok çalışma yapılmış olsa da işlevi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Diğer akciğer kanseri belirteçleri ve *CD166* ile yapılan bir çalışmada görülmüştür ki; *CD166*'nın kendini yenileme potansiyeli ve in vivo çalışmalarda tümör başlatma kapasitesi diğer markırlardan yüksektir (Leon ve ark., 2016).

CD133: *CD133* Yüzey Markırı, Prominin-1 olarak bilinen *PROM1* geni tarafından kodlanan beş transmembran alanına sahip (Jang ve ark., 2017) bir glikoproteindir. Fare nöro-epitelyal kök hücrelerinde ve insan hematopoietik kök hücrelerinde tanımlanmıştır (Jang ve ark., 2017). İlk olarak FACS yöntemi ile insan sinir sistemi hücrelerini izole etmek için etiket olarak kullanılmıştır (Glumac, 2018). Sonrasında birden fazla kanser hücresi için yüzey markırı olarak kullanılmıştır. Araştırmalar, akciğer kanseri hücrelerinde *CD133* (+) kanser kök hücrelerin daha tümörijenik olduğunu ve ilaç direnciyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Bertolini, 2009; Salnikov, 2010). Başka bir araştırmada, KHDAK'lı hastaların tümör örneklerinden izole edilen *CD133* (+) kanser kök hücrelerin, *CD133* (-) kanser hücrelerine kıyasla kendini yenileme kapasitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada bağışıklığı baskılanmış farelerde yapılan deneyde *CD133* (+) kanser kök hücrelerinin *CD133* (-) kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek tümörijenik özellik taşıdığı teyit edilmiştir (Tirino, 2009). *CD133* yüzey markırı, en sık kullanılan kanser kök hücre belirtecidir. *CD133* (+) kanser kök hücreler kendini yenileme, tümör başlatma ve ilaç direnci konusunda yüksek oranlara sahiptir (Herpel ve ark., 2011).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

Kullanılan Hücre Hattı:

Kanser kök hücre izolasyonu ve karakterizasyonu için H460 hücre hattı kullanıldı. NCI-H460 hücre hattı (HTB-177) ATCC'den satın alındı.

Adherent özellik taşıyan H460 hücresi, büyük hücreli akciğer karsinomuna sahip bir erkek hastanın plevral sıvısından A.F. Gazdar tarafından 1982 yılında elde edilmiştir.

Tablo 4. H460 Hücre hattının özellikleri (ATCC, 2021)

Organizma	Homo sapiens, İnsan
Morfoloji	Epitel
Doku	Akciğer; Plevral efüzyon
Hastalık	Karsinom
Büyüme Özelliği	Adherent

Tablo 5. H460 Hücre Hattı Saklama koşulları (ATCC, 2021)

Ürün Formatı	Dondurulmuş
Saklama Koşulları	Sıvı nitrojenin gaz fazı

Tablo 6. H460 Hücre Hattı Büyüme koşulları (ATCC, 2021)

Sıcaklık	37°C
Atmosfer	%95 hava, %5 karbondioksit

Kullanılan Cihazlar

- ✓ NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific
- ✓ T100 Thermal Cyclers, Bio-Rad
- ✓ Elektroforez Güç Kaynağı, Thermo Scientific
- ✓ CFX96 Real-time PCR Thermocyclers, Bio-Rad
- ✓ 10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Eppendorf
- ✓ -80°C Buzdolabı, Aucma

- ✓ -20°C Buzdolabı, Bosch
- ✓ +4 °C Buzdolabı, Bosch
- ✓ CO₂ inkübatörü, Thermo Fisher Scientific
- ✓ Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2
- ✓ Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard
- ✓ Santrifüj, CF16RN, Hitachi
- ✓ Mikro Santrifüj, 5418 Eppendorf
- ✓ Vorteks, Stuart
- ✓ Mikrospin, Cence
- ✓ Su Banyosu, Nuve
- ✓ Pipetör, Isolab
- ✓ GEN-BOX imagER Mini, Erbiyotek
- ✓ Hassas Terazı, Ohaus
- ✓ Mikrodalga Fırın, Altus
- ✓ MiniMACS MultiStand ve Separator, Miltenyi Biotec

Kullanılan Sarf Malzemeler

- ✓ Santrifüj tüpleri (1,5 ve 2 mL), Axygen
- ✓ PCR tüpleri (0,5 ve 0,2 mL), Axygen
- ✓ Serolojik pipet (5-10-25-50 mL), Costar
- ✓ Pipet uçları (10-100-200-1000 µl), Axygen
- ✓ 25 cm² ve 75 cm²'lik flask, Granier Bio-One
- ✓ 5 mL ve 10 mL'lik enjektörler, Genject
- ✓ 6 ve 96 kuyucuklu plaka, Tpp
- ✓ Steril falkon tüpleri (15-50 mL), Cellstar
- ✓ Enjektör filtresi (0,2 µm), Isolab
- ✓ Cryo tüp 2 mL, Nest
- ✓ Thoma lamıneubauer improved, Isolab
- ✓ MiniMACS MS Column
- ✓ 100 mm'lik petri kabı

Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ✓ Meridian Bioscience™ SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit

- ✓ %0,25 Trypsin-EDTA, Biological Industries
- ✓ 1x PBS, Biological Industries
- ✓ Taq DNA Polymerase, Thermo Scientific
- ✓ Etanol, Sigma
- ✓ RPMI 1640, Biological Industries
- ✓ Foetal Bovine Serum, Biological Industries
- ✓ Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml), Gibco
- ✓ L-Glutamin, Gibco
- ✓ Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- ✓ CD133 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec
- ✓ Tripan mavisi, Sigma
- ✓ Trizol, Invitrogen
- ✓ Kloroform, Sigma
- ✓ 2-propanol, Sigma
- ✓ DEPC Water, Bio Basic
- ✓ Bovine Serum Albumin, Sigma
- ✓ EDTA, Sigma
- ✓ NaOH, Sigma
- ✓ 1X TE BUFFER, Thermo Scientific
- ✓ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific
- ✓ 10x TBE BUFFER, Multicell
- ✓ Agaroz, Multicell
- ✓ Ethidium Bromide, Merck
- ✓ 6x Loading dye, Himedia
- ✓ 100 bp DNA ladder, Hibrigen
- ✓ NF Water, Bio Basic
- ✓ Primer, Sentebiolab
- ✓ SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit, Meridian Bioscience
- ✓ EGF (100 ng/ml), Abcam
- ✓ FGF2 (20 ng/ml), Abcam
- ✓ B27 Supplement (50X), Gibco
- ✓ N2 Supplement, (100X), Gibco

2.2. METOD

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Medyum hazırlanışı

Çalışmada L-glutamin ve phenol red içeren RPMI 1640 medyum (500 ml) içerisine %10 FBS (Fetal bovine serum) (50 ml) ve %1 PS (penisiline/streptomisin) (5 ml) eklendi ve 0,22 µm'lik enjektör filtresinden geçirilerek kullanıldı. Medyum +4 °C'de saklandı.

2.2.1.2. Stoktan hücre ekimi

-85 °C'de saklanan stok hücreler 37 °C'ye hızlıca alınarak sıcak su banyosunda 2 dakika boyunca çözündürüldü. 15 ml'lik falkon tüpüne %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 medyumundan 9 ml eklendi. Çözülen hücre süspansiyonu medyum içeren falkon tüpüne eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Falkon tüp 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. 75 cm²'lik flaskın içine 9 ml besiyeri konuldu. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücreleri içeren pellet 4 ml medyum ile çözüldü ve flaska aktarıldı. Flask hafifçe karıştırılarak hücrelerin flask yüzeyine eşit dağılması sağlandı. 37 °C'de %5 CO₂'lik inkübatörde kültüre edildi.

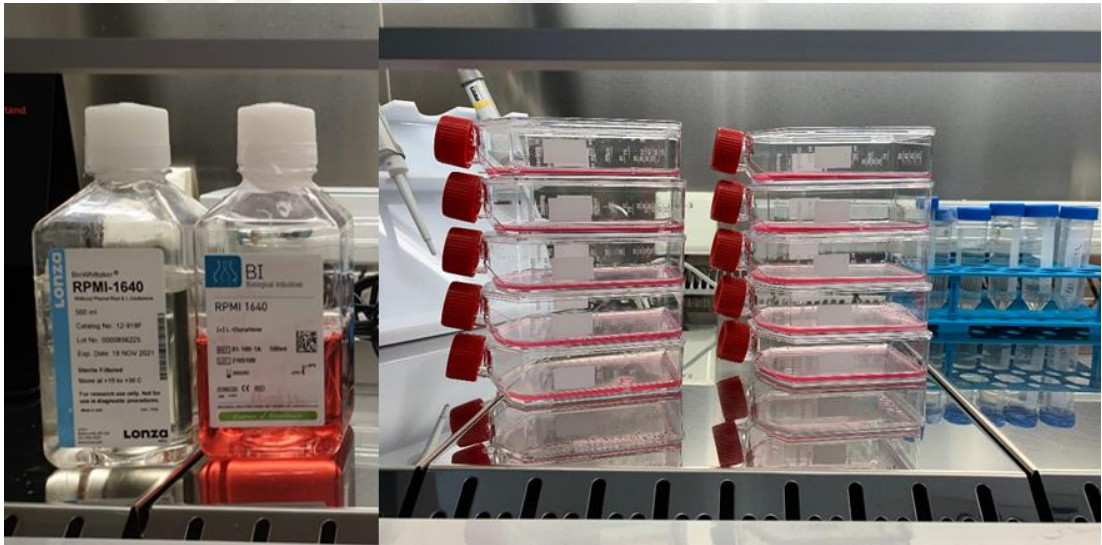
2.2.1.3. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştıkları zaman pasajlama işlemi yapıldı. Medyum ve %0,25 Tripsin-EDTA, 37 °C'lik su banyosunda ısıtıldı. Pasajlama işlemi flask içerisindeki medyum tamamen aspire edilerek başlatıldı. Kalıntılardan arınması için hücrelerin yüzeyi 5 ml 1xPBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. 75 cm²'lik flaska 3 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C inkübatörde 2-5 dakika arası inkübe edildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop ile teyit edildikten sonra 10 ml medyum ile flask yüzeyi yıkanarak hücreler 15 ml falkon tüpe toplandı. 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Hücreleri içeren pellet medyum ile homojen olacak şekilde çözüldü ve hücre sayısına uygun şekilde 75 cm²'lik flaska ekim yapıldı. 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında kültüre edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

2.2.1.4. Hücrelerin stoklanması

Hücreler %5 DMSO içeren FBS kullanılarak stoklandı. Stok solüsyonu taze olarak hazırlandı. Stok solüsyonu soğuk olarak kullanılacağından falkon tüp alüminyum folyo ile sarıldı ve 4 °C’de saklandı.

Flask içindeki medyum tamamen uzaklaştırıldı ve 4 ml 1xPBS ile yıkandı. 3 ml %0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. 12 ml medyum eklendi ve flask yüzeyi yıkandıktan sonra hücreler 15 ml falkon tüpte toplandı. 500 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Peşinden süpernatant kısım aspire edildi. Hücre sayısı ile bağlantılı olacak miktarda (her cryo tüp için 1×10^6 hücre) soğuk olan stok solüsyonu karanlık ortamda eklendi. Stok solüsyonu 1 ml olacak şekilde cryo tüplere aktarım yapıldı. Cryo tüpler önce 15 dakika boyunca +4°C’de ve sonra 30 dakika boyunca -20°C’de bekletildi. Hemen sonrasında ise süresiz -85°C’ye kaldırıldı.

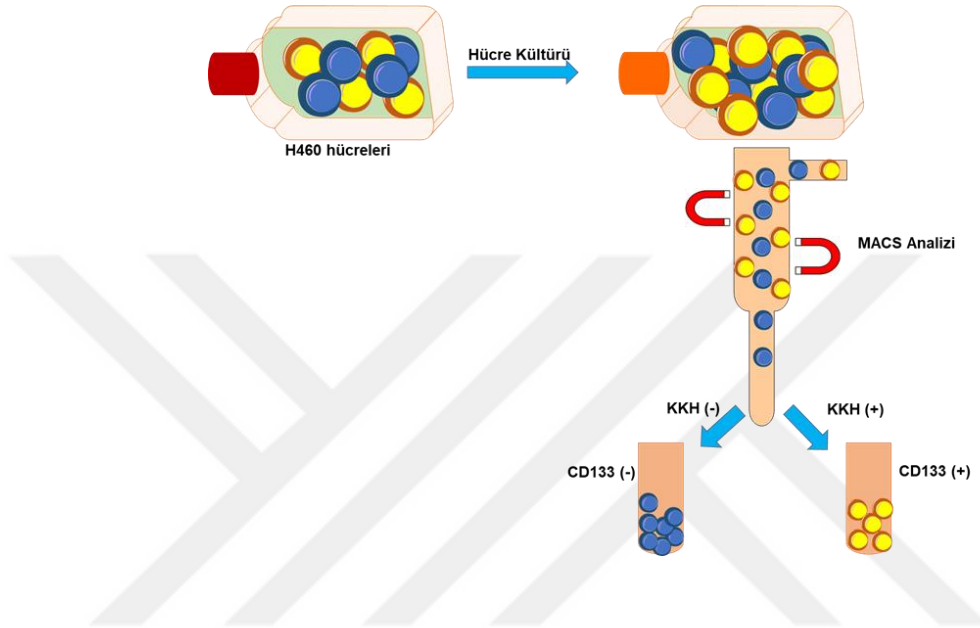


Şekil 26. MACS analizi için hücrelerin çoğaltılması aşaması

2.2.2. Kanser Kök Hücre İzolasyonu

Çalışmada CD133 yüzey markırı kullanılarak H460 hücre hattından CD133 (+) kanser kök hücreleri ve CD133 (-) kanser hücreleri izole edildi.

2.2.2.1. MACS analizi



Şekil 27. H460 hücre hattından MACS yöntemi ile kanser kök hücre izolasyonu

Çalışmada MACS analizi için Miltenyi Biotec firmasının CD133 MicroBead Kit'i (Order no:130-097-049) üreticinin doğrultusunda protokolde bazı düzenlemeler yapılarak kullanıldı.

Bu sistemin CD133 (+) kanser kök hücrelerini ve CD133 (-) kanser hücrelerini ayırması kısaca şu şekildedir;

İlk olarak, CD133 (+) hücreleri, CD133 MicroBeads ile manyetik olarak etiketlendi. Daha sonra hücre süspansiyonu, MACS seperatörün manyetik alanına yerleştirilen bir MACS kolona yüklendi. Manyetik olarak etiketlenmiş CD133 (+) kanser kök hücreleri kolon içinde tutuldu. Etiketlenmemiş hücreler kolondan aşağıya geçti ve bu hücreler CD133 (-) kanser hücrelerini içermiş oldu. Kolon manyetik alandan çıkartıldıktan sonra, manyetik olarak tutulan CD133 (+) hücreleri ayrıştırıldı.

2.2.2.1.1. MACS buffer hazırlanışı

MACS Buffer her kullanım için taze olarak hazırlandı ve +4°C’de saklandı. Çalışmada soğuk olarak kullanıldı.

1xPBS (9 ml), %5’lik BSA (1 ml) ve 0,5 M EDTA (40µl) kullanılarak MACS Buffer hazırlandı.

%5 BSA (Bovine Serum Albumin) hazırlanışı: 0,5 gr BSA (Sigma A2153-10g) 10 ml nükleaz free su ile çözüldü. BSA tamamen çözüldükten sonra 0,22 µm’lik enjektör filtresinden geçirildi ve +4°C’de saklandı.

0,5 M EDTA (pH:8) hazırlanışı: 18,6 gr EDTA (Sigma E5134) üzerine 80 ml nükleaz free su eklendi. 2 gr NaOH yavaş yavaş eklenerek pH’ın 8’e gelmesi ve EDTA’nın tamamen çözünmesi sağlandı. EDTA 0,22 µm’lik enjektör filtresinden geçirilerek +4°C’de saklandı.

2.2.2.1.2. Manyetik işaretleme ve ayırma

CD133 MicroBeads üzerine 2 ml Reconstitution buffer eklendi ve pipetaj ile homojen karışım olması sağlandı. 100 µl olacak şekilde aliquot yapıldı ve aliminyum folyaya sarılarak +4°C’de saklandı.

Manyetik işaretleme:

Manyetik işaretleme deneylerinde 10^8 hücre kullanıldı.

- ✓ Hücrelere 5 ml soğuk 1xPBS eklendi.
- ✓ Hücreler 300 g’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant tamamiyle uzaklaştırıldı.
- ✓ Hücre pelleti 300 µl soğuk MACS Buffer ile çözüldü.
- ✓ 100 µl FcR Bloklama solüsyonu eklendi.
- ✓ 100 µl CD133 MicroBeads eklendi.
- ✓ İyiye karıştırıldı ve tüp aliminyum folyo ile sarıldı.
- ✓ 2-8°C de 30 dakika buzdolabında shakerda inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 2 ml soğuk MACS Buffer eklenerek hücreler yıkandı.
- ✓ 300 g’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pipetle çekilip atıldı.
- ✓ Pellet 1500 µl soğuk MACS Buffer ile çözüldü. Manyetik ayırma aşamasına geçildi.

Manyetik ayırma:

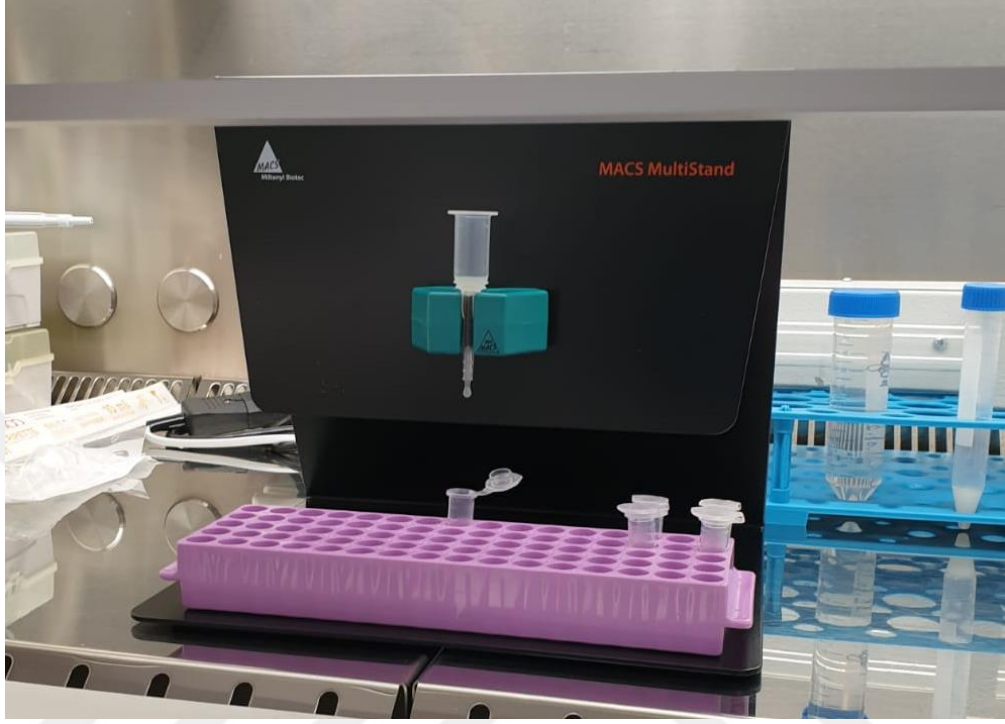
MiniMACS separatör multistand'a yerleştirildikten sonra MS kolon MiniMACS separatörün manyetik alanına yerleştirildi.



Şekil 28. MACS cihazı parçaları ve görüntüsü

- ✓ MS kolonun altına 1,5 ml'lik ependorf tüp yerleştirildi. MS kolonun üzerine 500 µl soğuk MACS Buffer eklendi ve süzüntü ependorf tüpte toplandı.
- ✓ MS kolona hücre süspansiyonu aktarıldı, köpük oluşturulmamaya dikkat edildi.
- ✓ İşaretlenmemiş hücreler MS kolondan aşağıya geçirildi ve MS kolonun altına konulan ependorf tüpte biriktirildi. Ependorf tüpün üzeri "Negatif 1" olarak yazıldı. CD133 işaretli hücreler MS kolonda kaldı.
- ✓ MS kolona 500 µl soğuk MACS Buffer eklendi ve yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Her defasında MS kolonun altına farklı ependorf tüp konuldu ve çıkan ependorf tüpler sırasıyla "Negatif 2, 3, 4" olarak numaralandırıldı.
- ✓ Bu aşamalarda; manyetik işaretli CD133 pozitif hücreler MS kolon içerisinde kaldı ve CD133 negatif hücreler MACS Buffer ile yıkanarak uzaklaştırıldı.
- ✓ CD133 pozitif hücreleri içeren MS kolon separatörden çıkarılıp boş ependorf tüpe alındı. MS kolona 1 ml soğuk MACS Buffer eklendi ve piston yardımıyla ittirilerek işaretli hücreler ependorf tüpe aktarıldı. Ependorf tüpün üzeri "Pozitif 1" olarak yazıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Ependorf tüpün üzerine "Pozitif 2" yazıldı ve ayırma işlemi gerçekleştirilmiş oldu.

- ✓ Pozitif 1, Pozitif 2 ve Negatif 4 hücreleri 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Kök hücre karakterizasyonu deneylerinde bu hücreler kullanıldı.



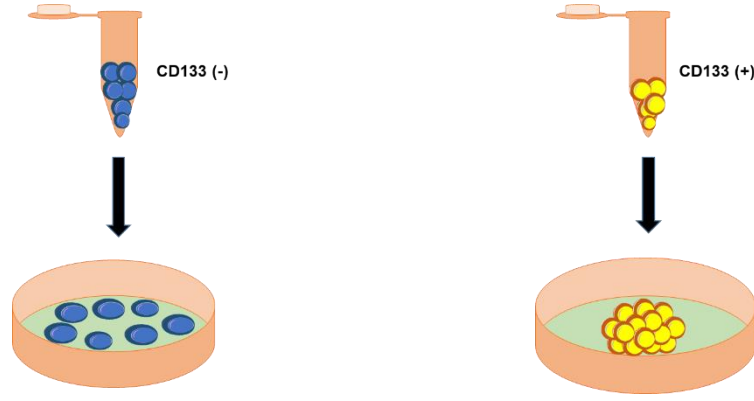
Şekil 29. CD133 (+) / CD133 (-) hücre ayırımı için MACS aşaması

2.2.3. Kanser Kök Hücre Karakterizasyonu

İzole edilen CD133 (+) kanser kök hücreleri ve CD133 (-) kanser hücrelerinin kanser kök hücre özellikleri küre oluşum deneyi, Hanging Drop Metodu ve qPCR yöntemiyle incelendi.

2.2.3.1. Küre oluşumu deneyi

Küre oluşumu, kanser kök hücrelerinin kendini yenileme özelliklerinin gösterildiği ve kanser kök hücreye spesifik bir özelliktir. Bu yüzden MACS yöntemi ile kanser kök hücre izolasyonu yapıldıktan sonra kök hücre özelliğinin kontrolü bu yöntem kullanılarak yapıldı. CD133 (+) ve CD133 (-) hücreler, kanser kök hücre medyumunu (büyüme faktörleri ile desteklenmiş, serum içermeyen RPMI 1640 medyumunu) kullanılarak agaroz kaplı platelerde kültüre edildi. Kanser kök hücre özelliği olan hücrelerin yüzen küreler oluşturması beklendi (Şekil 30) (Wang, 2017).



Şekil 30: Küre oluşumu deneyi

Küre oluşum deneyi için well plate'ler %2'lik agar ile kaplandı. CD133 (+) ve CD133 (-) hücreler well platelere ekildi. 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında kültüre edilerek hücrelerin küre oluşumları gözlemlendi.

2.2.3.1.1. %2'lik agarlı plate hazırlanması

2 gr agarose ile 100 ml dH₂O karıştırıldı ve 2 dakika mikrodalga fırında ısıtıldı. Eriyerek şeffaf hale gelen agar hızlıca 12 well plate'e ve 96 well plate'e konuldu. Kabin içerisinde 20 dakika agarın kuruması beklendi ve kuruyan agarlı plateler, alüminyum folyoya sarılarak 4 °C'de saklandı.

2.2.3.2. Kanser kök hücre medyumunu hazırlanması

Kanser kök hücre medyumunu kullanılacağı kadar, taze olarak hazırlandı.

Kanser kök hücre medyumunu hazırlanırken; 50 ml RPMI 1640 medyumuna içine 10 µl EGF (100 ng/ml) (ab179628), 10 µl FGF2 (20 ng/ml) (ab9596), 1 ml B27 supplement (17504-044), 500 µl N2 supplement (17502-048) ve 500 µl Penisilin-Streptomisin (%1) (10.000U/ml) eklendi.

Tüm bileşenler eklendikten sonra medyum 0,22 µm'lik enjektör filtresinden geçirildi ve 4°C'de saklandı.

2.2.3.3. Hanging Drop (asılı damla) metodu

20 µl kanser kök hücre medyumunda 250, 500, 1000, 2000, 4000 ve 6000 hücre olacak şekilde CD133+ ve CD133- hücreler 100 mm'lik petri kabının kapak kısmına

ekildi. Petri kabının taban kısmına 10 ml 1xPBS eklendi. 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında kültüre edilerek hücrelerin küre oluşumları gözlemlendi.

2.2.3.4. Kanser kök hücre spesifik genlerin ekspresyon profili

Kanser kök hücrelere spesifik olan *CD133*, *SOX-2*, *OCT-4* ve *KLF-4* genlerinin ekspresyon profiline bakıldı. Housekeeping gen olarak β -aktin kullanıldı.

2.2.3.4.1. Primer tasarımı

SOX-2, *OCT-4*, *CD133*, β -Aktin ve *KLF-4* genlerine spesifik primerler, Primer-BLAST-NCBI, Ensembl, Primer3 ve SnapGene programları kullanılarak tasarlandı.

Tablo 7. *SOX-2*, *OCT-4*, *KLF-4*, *CD133* ve β -Aktin genlerinin primer dizisi

GEN	Forward Primer	Reverse Primer	Ürün Büyük- lüğü
<i>SOX-2</i>	TTTGTCGGAGACGGAGA AGC	TAAGTGTCCATGCGCTGG TT	237 bp
<i>OCT-4</i>	CAGTGCCCGAAACCCAC AC	GGAGACCCAGCAGCCTCA AA	161 bp
<i>KLF-4</i>	AAGCCAAAGAGGGGAA GACG	ATGTGTAAGGCGAGGTGG TC	287 bp
<i>CD133</i>	TCACCAGGTAAGAACCC GGA	TCGGTCAAGAATTCCGCC TC	193 bp
β - <i>Aktin</i>	TTCCTGGGCATGGAGTC CT	AGGAGGAGCAATGATCTT GATC	204 bp

2.2.3.4.2. *CD133* (+) / *CD133* (-) hücrelerden total RNA izolasyonu

CD133 (+) ve *CD133* (-) hücrelere 500 µl Trizol eklendi ve hücrelerin çözünmesi sağlandı. Üzerine 100 µl Kloroform eklendi ve renk değişimi gözlenene kadar hafifçe çalkalandı. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12000 rpm’de 4 °C’de 15 dakika santrifüj edildi, ardından buza konuldu.

Üstte kalan RNA içeren şeffaf kısım yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Üzerine 200 µl 2-propanol eklendi. Hafifçe çalkalanarak karışması sağlandı. 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpler buz üzerine konuldu. Süpernatant dikkatlice aspire edildi. Peşinden 1 ml %75'lik etanol eklendi, hafifçe çalkalandı ve tekrar 12000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüje konuldu. Süpernatant uzaklaştırıldı ve alkolün uçması için tüpler kapakları açık olacak şekilde, oda sıcaklığında, 10-15 dakika süresince bekletildi. Son olarak 40 µl DEPC water eklenerek RNA'nın pipetaj yardımıyla çözünmesi sağlandı. RNA örnekleri buz üzerinde tutuldu ve hemen konsantrasyon ve saflık ölçümü yapıldı.

2.2.3.4.3. RNA konsantrasyon ve saflık ölçümü

Thermo Fisher Scientific Marka'nın NanoDrop cihazı kullanılarak CD133 (+) ve CD133 (-) hücrelerinden elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçümü yapıldı.

İlk olarak 2 µl DEPC Water ile blank ölçümü yapıldı. Cihazın doğru ve temiz çalıştığından emin olunduktan sonra 2 µl RNA, optik alt yüzeye kabarcık oluşturmayacak şekilde konuldu. Konsantrasyon (ng/µl) ve OD_{260/280} değeri ölçüldü. Ölçüm sonrasında RNA örnekleri -80 °C'de saklandı.

2.2.3.4.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi için Meridian Bioscience™ SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Kit içerisindeki ürünler buz üzerinde çözündürülüp vortex, spin işleminden geçirildi. RNA numuneleri 1 µg'a eşitlendi.

Her bir örnek için birer 0,2 ml'lik PCR tüpü hazırlandı ve aşağıdaki bileşenler eklendi:

- ✓ Total RNA- 1 µg
- ✓ 5x TransAmp Buffer- 4µl
- ✓ Reverse Transkriptaz- 1µl
- ✓ DNase/RNase free-water-Toplam volüm 20 µl'ye tamamlayacak miktarda değişken
- ✓ Toplam volüm 20 µl

Hazırlanan karışım pipetajla homojen olana kadar karıştırıldı. Sırasıyla 25°C' de 10 dakika, 42°C'de 15 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler hemen buzda 5 dakika soğutuldu. Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3.4.5. *Gradient PCR*

Real Time PCR’da kullanılacak olan primerlerin bağlanma sıcaklığını belirlemek için aşağıdaki solüsyonlar ile gradient PCR yapıldı.

Tablo 8. Gradient PCR mix içeriği

Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
2x Master Mix	16 µl
cDNA	2 µl

Gradient PCR Biorad T100 cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullara göre gerçekleştirildi.

Tablo 9. Gradient PCR koşulları

95 °C	5 dakika	36 Döngü
95 °C	30 saniye	
58-64 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	5 dakika	
4 °C	∞	

2.2.3.4.6. *Agaroz jel elektroforezi*

PCR sonrası *SOX-2*, *OCT-4*, *CD133*, β -*Aktin* ve *KLF-4* genlerinin doğru çoğalıp çoğalmadığı, PCR ürünlerinin %2’lik agaroz jele yüklenmesiyle kontrol edildi. Agaroz jel için, 2 g Agaroz tartıldı ve üzerine 100 ml 1xTBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu eklendi. Agaroz jel eriyip bufferla karışana kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Çözeltinin soğuması beklendikten sonra, 2 µl (2 mg/ml) etidyum bromür eklendi, hafifçe karıştırılarak jel tablasına döküldü. Jel tablasının tarakları yerleştirildi ve jelin donması bekledi. Jel donduktan sonra, taraklar nazikçe çıkartıldı.

Jel tablası içerisinde 1xTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. 4 µl PCR ürünü 1 µl yükleme boyası ile karıştırıldı. Sırasıyla kuyucuklara yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüğünü belirleyebilmek için, Hibrigen 100 bp’lik DNA ladder jele

yüklendi. Örnekler 20 dakika boyunca 130 Volt'luk akımda yürütüldü ve UV ışık altında görüntülendi.

2.2.3.4.7. qPCR

Housekeeping gen olarak β -aktin kullanıldı ve *KLF-4*, *OCT-4*, *SOX-2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak tespit edildi.

qPCR deneylerinde SensiFAST SYBR Kit (Meridian Bioscience) kullanıldı. Reaksiyon karışımı toplam hacim 20 μ l olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

Tablo 10. qPCR mix içeriği

2x SensiFAST SYBR Mix	10 μ l
Forward Primer (10 pmol)	0,8 μ l
Reverse Primer (10 pmol)	0,8 μ l
cDNA	3 μ l
DNase/RNase Free Water	5,4 μ l

Amplifikasyon için “Bio-Rad CFX96 Real-time PCR” cihazı kullanıldı. PCR programı aşağıdaki şekilde kuruldu.

Tablo 11. qPCR Koşulları

95 °C	2 dakika	40 Döngü
95 °C	5 saniye	
60 °C	10 saniye	
72 °C	20 saniye	

2.2.4. İstatistiksel Analiz

CD133 (+) ve CD133 (-) hücrelerin gen ekspresyonlarının karşılaştırılmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

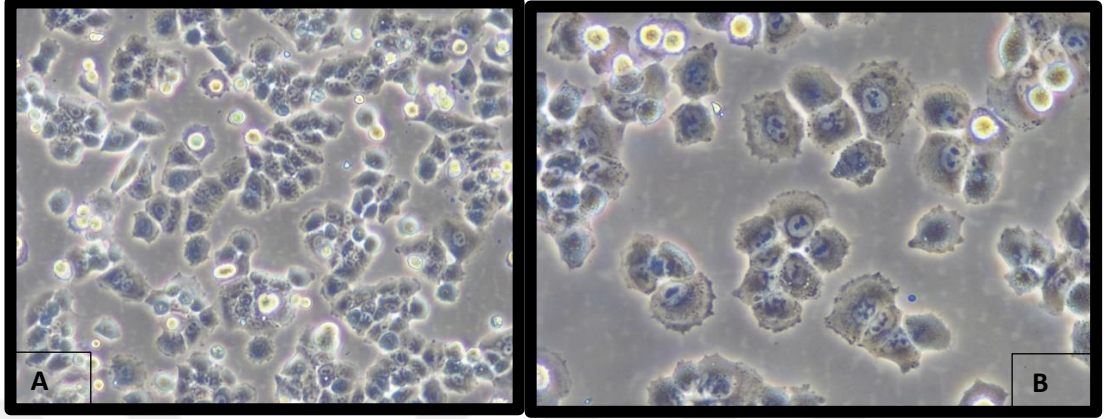
$\Delta\Delta CT$ değerleri bu formüle göre hesaplandı.

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})_{\text{deneysel grup}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})_{\text{kontrol grubu}}$

3. BULGULAR

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

H460 hücre hattı başarılı bir şekilde kültüre edildi.

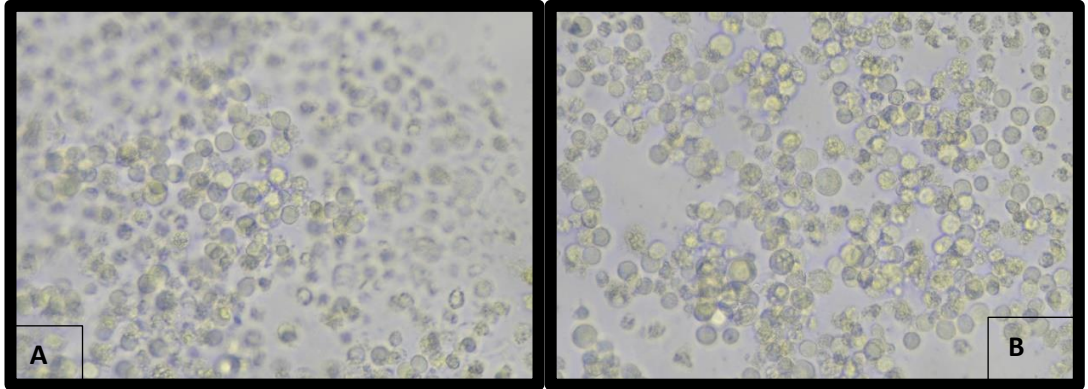


Şekil 31. A. H460 hücre hattının 10x mikroskop görüntüsü

B. H460 hücre hattının 20x mikroskop görüntüsü

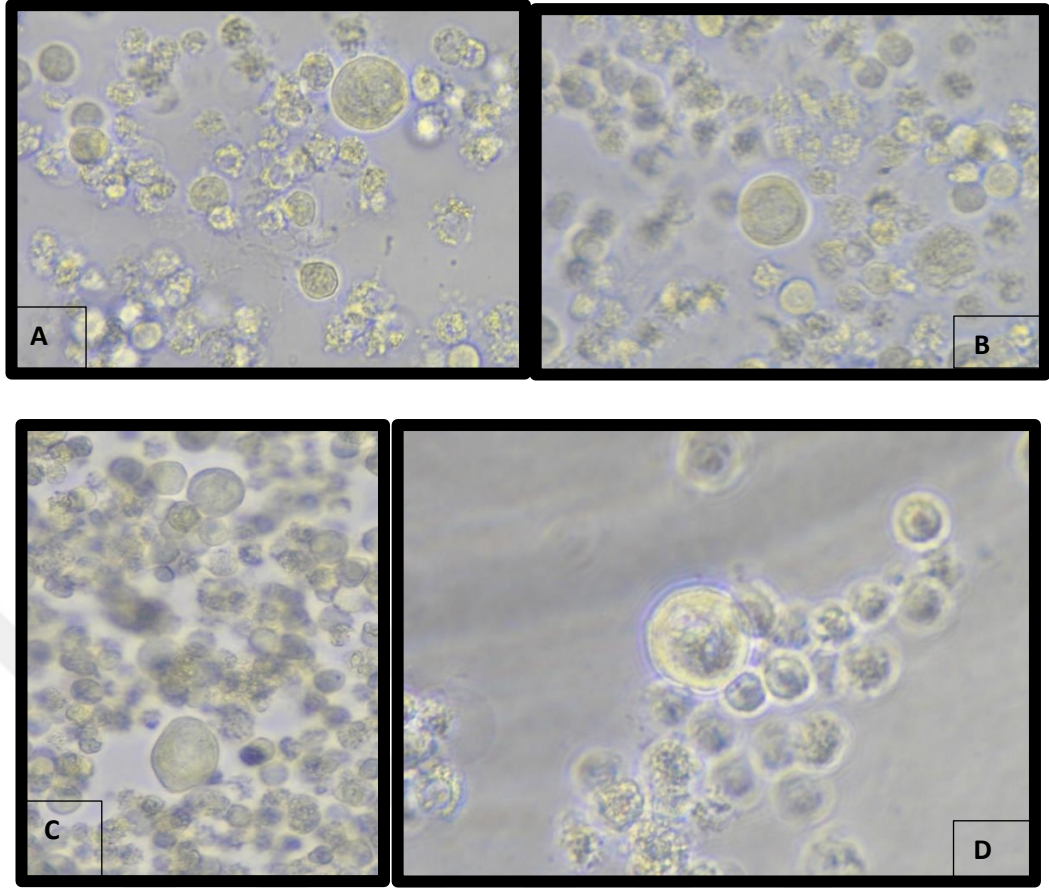
3.2. KÜRE OLUŞUMU DENEYİ

CD133 (+) kanser kök hücreleri 3 günde küre oluştururken, CD133 (-) kanser hücrelerinin küre oluşturmadığı gözlemlendi.



Şekil 32. A. CD133 (-) kanser hücrelerinin (1000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü

B. CD133 (-) kanser hücrelerinin (500 hücre) 40x mikroskop görüntüsü



Şekil 33. A. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (1000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü

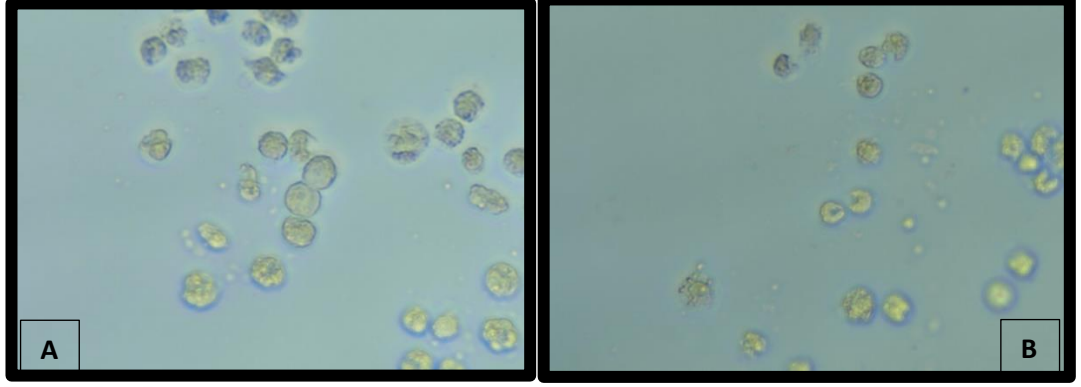
B. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (4000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü

C. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (2000 hücre) 40x mikroskop görüntüsü

D. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (500 hücre) 40x mikroskop görüntüsü

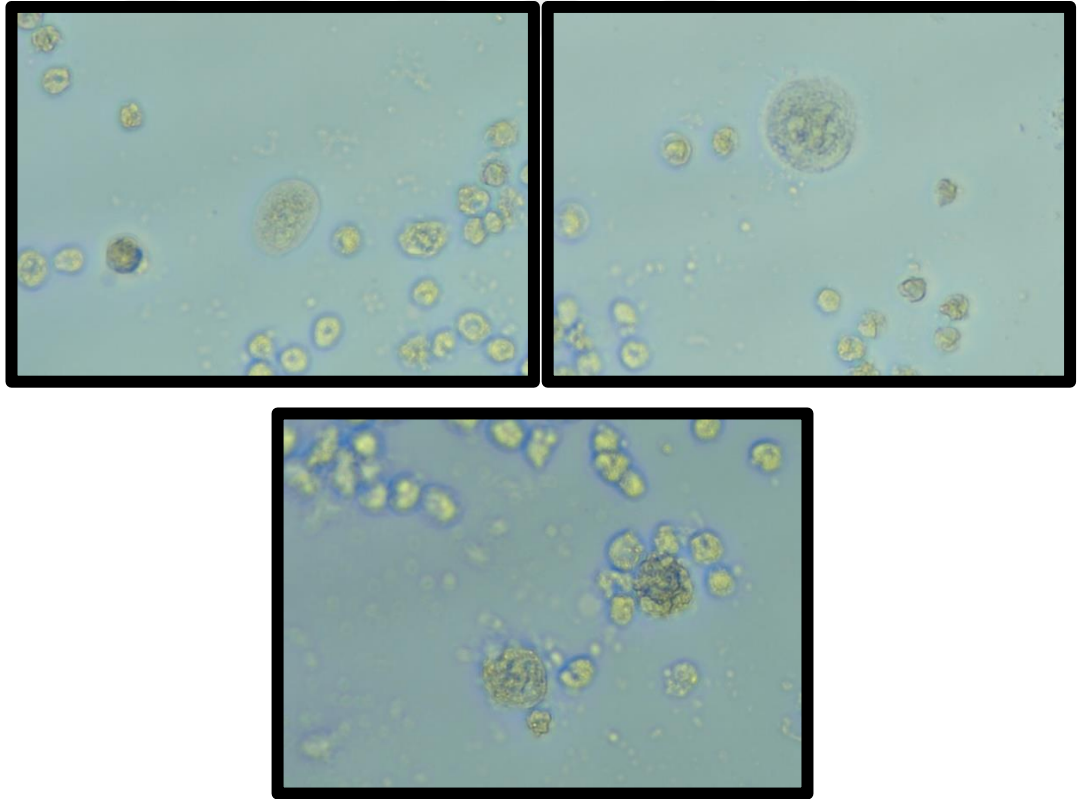
3.3. HANGİNG DROP METODU

Bu yöntem ile CD133 (+) kanser kök hücrelerin 2 günde küre oluşturmaya başlarken, CD133 (-) kanser hücrelerinin küre oluşturmadığı gözlemlendi.

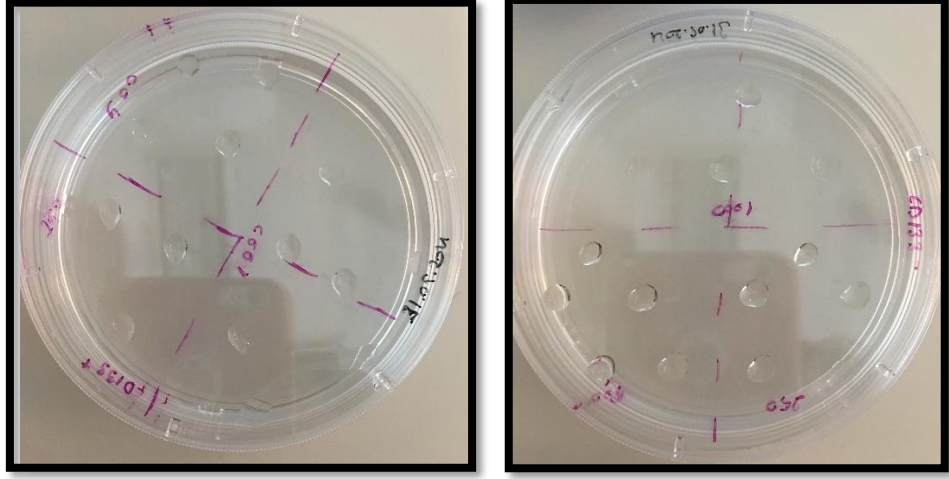


Şekil 34. A. CD133 (-) kanser hücrelerinin (6000 hücre) 40x mikroskop Hanging drop görüntüsü

B. CD133 (-) kanser hücrelerinin (6000 hücre) 40x mikroskop Hanging drop görüntüsü



Şekil 35. CD133 (+) kanser kök hücrelerin (6000 hücre) 40x mikroskop Hanging drop görüntüleri



Şekil 36. Hanging drop deneyine ait petri kabı görüntüsü

3.4. RNA İZOLASYON SONUÇLARI

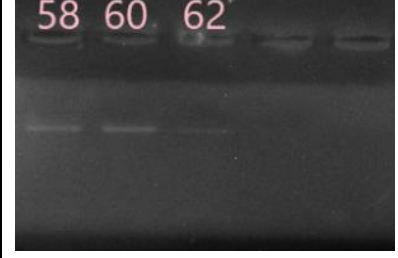
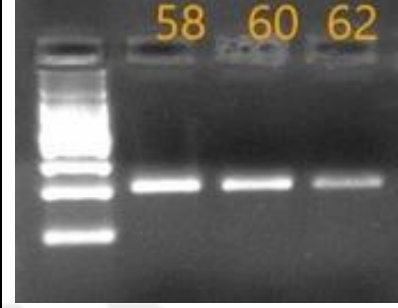
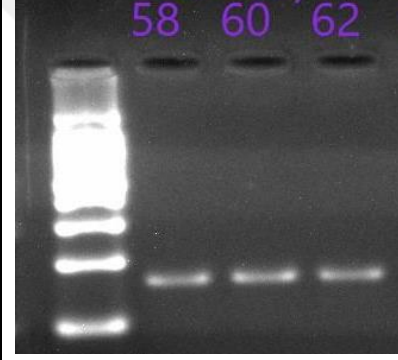
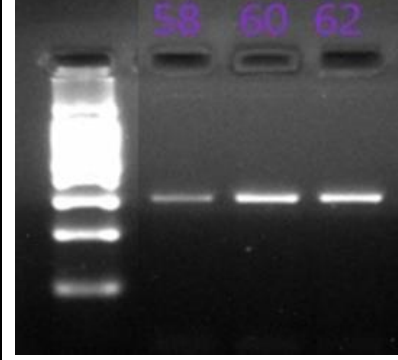
Tablo 12. CD133 (+) ve CD133 (-) hücrelerin RNA izolasyon sonuçları

Hücre Tipi	Konsantrasyon	OD 260/280
CD133 (+)	219 ng/µl	2.01
CD133 (-)	371 ng/µl	2.02

3.5. GRADİENT PCR BULGULARI

CD133, *SOX-2*, *KLF-4*, *OCT-4* ve β -*Aktin* genleri için 58-60-62-64 derece sıcaklıklarda gradient PCR yapıldı. PCR sonrası ürünler %2'lik agaroz jele yüklendi ve aşağıdaki görüntüler elde edildi. Tüm genler için çalışma sıcaklığının 60 derece olmasına karar verildi.

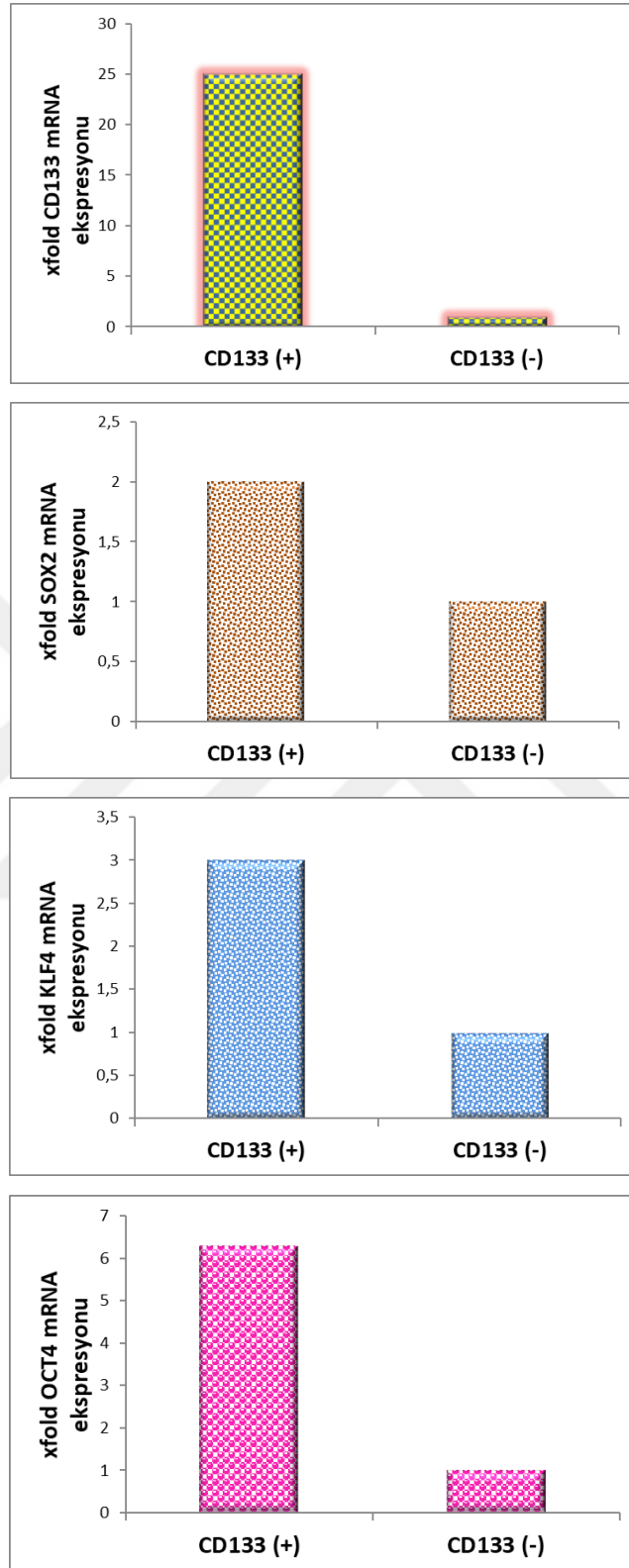
	<i>CD133</i> genine ait jel görüntüsü Çalışma sıcaklıkları 58, 60, 62, 64 derece
--	--

	<i>SOX-2</i> genine ait jel görüntüsü Çalışma sıcaklıkları 58, 60, 62 derece
	<i>β-Aktin</i> genine ait jel görüntüsü Çalışma sıcaklıkları 58, 60, 62 derece
	<i>OCT-4</i> genine ait jel görüntüsü Çalışma sıcaklıkları 58, 60, 62 derece
	<i>KLF-4</i> genine ait jel görüntüsü Çalışma sıcaklıkları 58, 60, 62 derece

Şekil 37. Gradient PCR sonuçları, genlerin çalışma sıcaklıkları

3.6. qPCR SONUÇLARI

qPCR ile CD133 (+) kanser kök hücreleri ile CD133 (-) kanser hücreleri arasında *CD133* gen ekspresyon farkının yaklaşık 25 kat olduğunu belirledik. İki hücre grubu arasında kanser kök hücre markırı olan *OCT-4*'da 6 kat, *KLF-4*'te 3 kat ve *SOX-2*'de ise 2 kat fark bulduk.



Şekil 38. CD133 (+) ve CD133 (-) H460 hücrelerinde *KLF-4*, *OCT-4*, *SOX-2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi

4. TARTIŞMA

Kanser son yıllarda önceki yıllara oranla artan ve hızla artmaya devam eden bir hastalıktır. Akciğer kanseri, 5 yıllık sağ kalım oranının %20'nin altında olması sebebiyle tanı ve tedavide yetersizliklere sahiptir. Erken tanı ve tedavi kanserin iyileşme oranını artırmaktadır fakat genelde erken evrede belirti göstermediğinden mortalitesi en yüksek kanser çeşidi olmaya devam etmektedir.

Akciğer kanserinin en bilinen sebebi sigara kullanımıdır. Bunu takiben diğer tütün ürünlerinin kullanımı, zehirli gazlara ve zararlı kimyasallara maruziyet, genetik yatkınlık, yaş, cinsiyet, akciğer hastalıkları geçmişi gelmektedir. Bazı hastalarda ise hiçbir sebep mevcut değilken akciğer kanseri görülmektedir.

Akciğer kanseri tedavisi evrelere bağlı olmakla beraber genelde kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır, ancak iyileşme oranı düşüktür. Bu sebeple yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi bir umut olarak görülebilmektedir. Kanser kök hücrelerinin araştırılmasındaki asıl amaç, tüm kanserlerde küçük bir miktarda da olsa bulunması ve metastazda öneminin büyük olmasıdır.

Kanser kök hücreler kanser başlatıcı hücreler olarak da adlandırılırlar. Yenilenebilme, farklılaşabilme ve çoğalma gibi somatik kök hücrelerle aynı özelliği taşımaktadır. Bu da kanserin yayılmasını ve ilerlemesini hızlandırmaktadır. Kanser kök hücrelerin kontrol altına alınması veya apoptozunun gerçekleşmesi kanser tedavisine yeni bir bakış açısı getirebilir.

1997 yılında ilk kanser kök hücre izolasyonunun yapılmasından bu yana literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Kök hücre izolasyonu için en sık kullanılan yöntem kök hücreye spesifik yüzey markırlarının kullanılmasıdır. Kanser türleri için kullanılan spesifik yüzey markırları bulunmaktadır. Örneğin akciğer kanseri için kullanılan spesifik markırlar; CD24, EPCAM, CD44, ALDH, CD166 ve CD133'tür. Bu yüzey markırları MACS veya FACS yöntemleriyle KKH (+) kanser kök hücrelerin ve KKH (-) kanser hücrelerin ayırt edilmesini sağlamaktadır.

Akciğer kanseri kök hücreleri CD133 (Tirino ve ark., 2009), CD44 (Leung ve ark., 2010), CD166 (Zhang ve ark., 2012) ve CD326 (EpCAM) (Lin ve ark., 2012) gibi hücre yüzey markırlarını aşırı ekspresye etmeleri ve ABCG2 ve ALDH1A1'in (Jiang ve ark., 2009) artmış ekspresyonu ile karakterize edilmiştir. CD133, bir pentaspan

membran glikoproteinidir. CD133, beyin kanseri (Singh ve ark., 2004), prostat kanseri (Collins ve ark., 2005), kolon kanseri (O'Brien ve ark., 2007), akciğer kanseri (Eramo ve ark., 2008), hepatosellüler karsinoma (Suetsugu ve ark., 2006) ve yumurtalık kanserini (Kryczek ve ark., 2012) içeren birçok solid tümör tipinde kanser kök hücre popülasyonlarının tanımlanmasında kullanılan bir markıdır. Yapılan çalışmalar, CD133 (+) akciğer kanseri kök hücrelerinin stemness (köklülük) özelliklerine sahip olduğunu ve CD133 (-) kanser hücrelerinden daha yüksek bir tümörojenik potansiyel sergilediğini göstermiştir (Jiang ve ark., 2009; Bertolini ve ark., 2009). Ayrıca CD133 ekspresyonu akciğer kanseri hastalarında ilaç direnci ile ilişkilidir (Salnikov ve ark., 2010). CD133 (+) kanser kök hücreler tümör gelişimi, invazyon ve metastazı indüklemeye yeteneğine sahiptir. KHDAK'lı hastaların tümör örneklerinden izole edilen CD133 (+) kanser kök hücrelerinin, CD133 (-) kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek kendini yenileme kapasitesine sahip olduğunu gösterilmiştir. CD133 (+) ve CD133 (-) hücrelerinin kendini yenileme kapasitesi, hücrelerin NOD/SCID farelerine enjekte edilmesiyle de teyit edilmiş ve CD133 (+) kanser kök hücrelerinin CD133 (-) kanser hücrelerine kıyasla daha fazla tümörojeniteye sahip olduğu gösterilmiştir (Tirino ve ark., 2009). CD133 pozitif hücreler, akciğer kanseri kök hücrelerinin özelliklerini göstermektedir ve dolayısıyla CD133, akciğer kanseri kök hücrelerinin önemli bir belirteçidir (Pavon ve ark. 2018; Kim ve ark. 2019).

Wang ve arkadaşları sülforafan'nin akciğer kanseri kök hücrelerinin çoğalması ve kendini yenilemesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. A549 ve H460 hücrelerinden CD133 MicroBeads (MiniMACS separator- MiltenyiBiotec) kullanarak CD133 (+) akciğer kanseri kök hücrelerini izole etmişlerdir. Daha sonra, CD133'ün ifadesini akış sitometri ile ölçmüşlerdir. Hücre proliferasyon yeteneğini, MTT ve küre oluşum deneyleri ile değerlendirmişlerdir. MACS yöntemi ile A549 ve H460 hücrelerindeki CD133 pozitifliğini sırasıyla %2,8 ve %2,4 olarak bulmuşlar ve CD133 pozitif kanser kök hücrelerinin, küre oluşumunu gözlemlemişlerdir. Biz çalışmamızda CD133 (+) pozitifliğini %0,3 olarak bulduk ve bu hücrelerin kendini yenileme özelliklerini küre oluşum deneyi ile başarılı bir şekilde gösterdik.

CD133 (+) kanser kök hücrelerinde *CD133*, *OCT-4*, *KLF-4* ve *SOX-2* ekspresyonlarının CD133 (-) kanser hücrelerine göre daha fazla eksprese olmasını bekliyorduk. qPCR sonucu H460 hücre hattında CD133 (+) kanser kök hücreleri ile CD133 (-) kanser hücreleri arasında CD133 ekspresyon farkının yaklaşık 25 kat

olduğunu tespit ettik. Bu sonuç bizim MACS ile yaptığımız CD133 izolasyonunun doğruluğunu göstermiş oldu. Kanseri kök hücre markırlarının ekspresyon seviyeleri arasında, *OCT-4*'da 6 kat, *KLF-4*'te 3 kat, *SOX-2*'de ise 2 kat fark bulduk.

Akciğer kanseri başta olmak üzere tüm kanser türlerinde tedavi yıpratıcıdır. Bu sebeple tedavi belirlenirken tümör evresinin ve tümör modelinin önemi büyüktür. Kanseri kök hücrelerin tedaviye direnci artırdığı ve nükse sebep olduğu bilinen bir gerçektir. Tümör tedavilerinde kanseri kök hücrenin izole edilmesi tedavinin seyri ve etkinliği için avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada amaç CD133 (+) kanseri kök hücrelerin doğru bir şekilde izole edilmesi ve tanımlanması idi. Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda kanseri kök hücreler doğru ve yeterli sayıda izole ve karakterize edilmiştir.



KAYNAKLAR

1. Alar, T., & Şahin, E. M. (2012). Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma Lung cancer: Diagnosis, treatment and prevention in primary care. *Smyrna Tıp Derg*, 68-74.,
2. Andrew Futreal, P., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409, 850-852.
3. Arthur, P., Patel, N., Surapaneni, S. K., Mondal, A., Gebeyehu, A., Bagde, A., ... & Singh, M (2020). Targeting lung cancer stem cells using combination of Tel and Docetaxel liposomes in 3D cultures and tumor xenografts. *Toxicology and applied pharmacology*, 401, 115112.
4. Atar E. (2018). Akciğer Kanseri Hastalarında Kanseri Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu. Yayınlanmış Tez: Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri. Erişim Adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=MPMo_pq1H7uCN SI-yI7xsw&no=BAtyp4TYSvO1V0mt3oUAog
5. ATCC, (2021). American Type Culture Collection, Erişim adresi <https://www.atcc.org/products/htb-177>
6. Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer*. 2006;8:30-8.
7. Aydın, A., Ece, T., & Topuz, E (2010). Akciğer kanseri tanı-tedavi-takip Antakya konsensus raporu 2010. *İstanbul: Nobel tıp kitabevleri*, 3.
8. Aygar, S. (2020). Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Araştırma Amaçlı Bankalanmasında Standardizasyon ve Kalite Süreci-Bir Uygulama Modeli:“Pedı-Stem”.
9. Ayla, Ş., Öktem, G., Tanrıverdi, G., Bilir, A. (2013). Kanseri Kök Hücreleri. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni* 44-4
10. Balistreri, C. R., De Falco, E., Bordin, A., Maslova, O., Koliada, A., & Vaiserman, A (2020). Stem cell therapy: old challenges and new solutions. *Molecular biology reports*, 47(4), 3117-3131.
11. Baloğlu, H., Aydın, T., Yıldırım, Ş., Küçükodacı, Z., & Yılmaz, İ., (2002). Moleküler analizler için hücre örneklemesine başlarken: lazer yardımcı mikrodiseksiyon ve bir down-stream uygulaması Türk Patoloji Derneği, 18(3-4):61-63

12. Barnard, W. G. (1926). The nature of the “oat-celled sarcoma” of the mediastinum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(3), 241-244.
13. Baykara, O (2015). Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment. *Horizons in Cancer Research*, 57, 105-156.
14. Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., ... & Sozzi, G (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16281-16286.
15. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
16. Bongso, A., & Lee, E. H. (2005). Stem cells: their definition, classification and sources. *Stem Cells: from bench to bedside*, 1.,
17. Bonner, R. F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., & Liotta, L. A (1997). Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 278(5342), 1481-1483.
18. Bonnet, D., & Dick, J. E (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3(7), 730-737.
19. Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., ... & Young, R. A. Supplemental Data Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells.
20. Bozkurtlar, E., & Kaya, H (2018). Molecular Pathology of Lung Cancer. *Nukleer Tıp Seminerleri*, 4(1), 26.
21. Brennan, P., Hainaut, P. ve Boffetta, P. (2011). "Genetics of lung-cancer susceptibility." *Lancet Oncol*, 12(4), 399-408.
22. Celepli, S. Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P.H. (2020). Apoptoz Direnci ve Kanser, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ankara Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, Ankara Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu, Ankara
23. Chen JD, Xu FF, Zhu H, Li XM, Tang B, Liu YL, Zhang Y. ICAM-1 Regulates Differentiation of MSC to Adipocytes via Activating MAPK Pathway. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2014;22:160-165.

24. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6, 1521–1533
25. Christiani, D. C (2000). Smoking and the molecular epidemiology of lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 21(1)., 87-93.
26. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J., Weissman, I.L., Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells–perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66:9339–9344.
27. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*, 65(23), 10946-10951.
28. Condic, M. L. (2014). Totipotency: what it is and what it is not. *Stem cells and development*, 23(8), 796-812.
29. Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and presendin. *Clinics in chest medicine*, 32(4)., 605-644.
30. Çerci, E., & Erdost, H. (2019). Kök Hücre. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 14(2), 221-228.
31. Çok, G (2018). Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi. *Nükleer Tıp Seminerleri*, 4, 1-5.
32. de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W. ve Munden, R. F. (2018). "The epidemiology of lung cancer." *Transl Lung Cancer Res*, 7(3), 220-233.
33. Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. ve Matthay, R. A. (2011). "Lung cancer, epidemiology, etiology, and prevention." *Clin Chest Med*, 32(4), 605-644.
34. Derneği, İ. O., Derneği, T. A. K., Derneği, T. T. O., & Derneği, T. T. (2016). Akciğer Kanseri Yol Haritası. *Toraks Dergisi*, 1, 5-6.
35. Detterbeck, F. C (2018). The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: what does it mean on main street?. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 155(1)., 356-359.
36. Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., & Tanoue, L. T (2009). The new lung cancer staging system. *Chest*, 136(1)., 260-271.

37. Duffy, M. J., McGowan, P. M., & Gallagher, W. M (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *The Journal of pathology*, 214(3), 283-293.
38. Dzobo, K., Senthebane, D. A., Rowe, A., Thomford, N. E., Mwapagha, L. M., Al-Awwad, N., ... & Parker, M. I (2016). Cancer stem cell hypothesis for therapeutic innovation in clinical oncology? Taking the root out, not chopping the leaf. *Omics: a journal of integrative biology*, 20(12), 681-691.
39. El-Karim, E. A., Hagos, E. G., Ghaleb, A. M., Yu, B., & Yang, V. W. (2013). Krüppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Molecular cancer*, 12(1), 1-12.
40. El-Telbany, A., & Ma, P. C (2012). Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any?. *Genes & cancer*, 3(7-8), 467-480.
41. Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., ... & De Maria, R (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation*, 15(3), 504
42. Espina, V., Wulfschlegel, J. D., Calvert, V. S., VanMeter, A., Zhou, W., Coukos, G., ... & Liotta, L. A (2006). Laser-capture microdissection. *Nature protocols*, 1(2), 586-603.
43. Espinosa-Sánchez, A., Suárez-Martínez, E., Sánchez-Díaz, L., & Carnero, A (2020). Therapeutic Targeting of Signaling Pathways Related to Cancer Stemness. *Frontiers in Oncology*, 10, 1533.
44. Fasano, M., Sabatini, M. T., Wieczorek, R., Sidhu, G., Goswami, S., & Jagirdar, J. (1997). CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis?. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 80(1), 34-41.
45. Fennell, D (2011). Small Cell Lung Cancer. *Lancet*, (9804), 1741-1755.
46. GLOBOCAN, (2020) Global Cancer Observatory. Erişim adresi: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multiple-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=792&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientatio

n=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D

47. Glumac, P. M., & LeBeau, A. M (2018). The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clinical and translational medicine*, 7(1), 1-14.
48. Goldstraw, P., & Crowley, J. J (2006). The International Association for the Study of Lung Cancer international staging project on lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(4), 281-286.
49. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 Functions To Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* 2003; 39:749–765.
50. Guruharsha, K. G., Kankel, M. W., & Artavanis-Tsakonas, S (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 654-666.
51. Gutova, M., Najbauer, J., Gevorgyan, A., Metz, M. Z., Weng, Y., Shih, C. C., & Aboody, K. S. (2007). Identification of uPAR-positive chemoresistant cells in small cell lung cancer. *PloS one*, 2(2), e243.
52. Haeckel, E (1868). *Natürliche Schöpfungsgeschichte*, Georg Reimer. *Berlin, Germany*.
53. Hanahan, D., & Weinberg, R. A (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
54. Hann, C. L., Wu, M. A., Rekhtman, N. & Rudin, C. M. in *Cancer Principles & Practice of Oncology* Ch. 49 (eds DeVita, V. T., Lawrence, T. S. & Rosenberg, S. A.). 671–700 (Wolters Kluwer, 2019).
55. Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F (2012). Pi3k-pkb/akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a011189.
56. Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454.
57. Herpel, E., Jensen, K., Muley, T., Warth, A., Schnabel, P. A., Meister, M., ... & Gottschling, S. (2011). The cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Anticancer research*, 31(12), 4491-4500.
58. Holland, J. D., Klaus, A., Garratt, A. N., & Birchmeier, W (2013). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Current opinion in cell biology*, 25(2), 254-264.

59. Huang W, Xiao DZ, Wang Y, Shan ZX, Liu XY, Lin QX, Yang M, Zhuang J, Li Y, Yu XY. Fn14 promotes differentiation of human mesenchymal stem cells into heart valvular interstitial cells by phenotypic characterization. *J Cell Physiol* 2014;229:580-587.
60. Jang, J. W., Song, Y., Kim, S. H., Kim, J., & Seo, H. R (2017). Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life sciences*, 184, 25-29.
61. Jeter, C. R., Yang, T., Wang, J., Chao, H. P., & Tang, D. G (2015). Concise review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions. *Stem cells*, 33(8), 2381-2390.
62. Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N. W., Deepak, J., Xing, L., ... & Katz, R. L. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Molecular cancer research*, 7(3), 330-338.
63. Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J., & Mongan, N. P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem cells and development*, 18(7), 1093-1108.
64. Kefeli, U., USTAALIOĞLU, B. Ö., USTAALIOĞLU, B. B. Ö., YILDIRIM, M. E., YILDIRIM, M., ERKOL, B., ... & AÇIKGÖZ, Ö (2015). Akciğer kanserinde sağkalımı etkileyen klinikopatolojik özellikler. *Marmara Medical Journal*, 28(1), 21-26.
65. Kim TM, Ko YH, Ha SJ, Lee HH (2019) Impact of in vitro driven expression signatures of CD133 stem cell marker and tumor stroma on clinical outcomes in gastric cancers. *BMC Cancer* 19:119.
66. Kim, E. K., & Choi, E. J (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.
67. Kiraz Y., Miray Ü., Yandım M. K., Baran Y. (2014). Kök Hücrelerin Moleküler Biyolojisi. Türk Hematoloji Derneği. Erişim Adresi: [chrome-81 extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fwww.thd.org.tr%2FthdData%2FBooks%2F991%2Fkok-hucrelerin-molekuler-biyolojisi.pdf&cldn=239306](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fwww.thd.org.tr%2FthdData%2FBooks%2F991%2Fkok-hucrelerin-molekuler-biyolojisi.pdf&cldn=239306)

68. Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1), 3-10.
69. Krawczyk, P., Kucharczyk, T., & Wojas-Krawczyk, K (2012). *Screening of gene mutations in lung cancer for qualification to molecularly targeted therapies*. InTech.
70. Krist, A. H., Davidson, K. W., Mangione, C. M., Barry, M. J., Cabana, M., Caughey, A. B., ... & US Preventive Services Task Force (2021). Screening for lung cancer: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA*, 325(10), 962-970.
71. Kryczek, I., Liu, S., Roh, M., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., ... & Zou, W. (2012). Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *International journal of cancer*, 130(1), 29-39.
72. LCFA (2021). Lung Cancer types. Erişim Adresi: <https://lcfamerica.org/lung-cancer-info/types-lung-cancer/>
73. Leon, G., MacDonagh, L., Finn, S. P., Cuffe, S., & Barr, M. P. (2016). Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacology & therapeutics*, 158, 71-90.
74. Leung, E. L. H., Fiscus, R. R., Tung, J. W., Tin, V. P. C., Cheng, L. C., Sihoe, A. D. L., ... & Wong, M. P. (2010). Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PloS one*, 5(11), e14062.
75. Liao, X., Makris, M., & Luo, X. M (2016). Fluorescence-activated cell sorting for purification of plasmacytoid dendritic cells from the mouse bone marrow. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (117).
76. Lin, S., Sun, J. G., Wu, J. B., Long, H. X., Zhu, C. H., Xiang, T., ... & Chen, Z. T. (2012). Aberrant microRNAs expression in CD133+/CD326+ human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. *Molecules and cells*, 33(3), 277-283.
77. Litviakov, N. V., Bychkov, V. A., Stakheeva, M. N., Ibragimova, M. K., Tsyganov, M. M., Gaptulbarova, K. A., ... & Slonimskaya, E. M. (2020). Breast tumour cell subpopulations with expression of the MYC and OCT4 proteins. *Journal of Molecular Histology*, 51(6), 717-728.
78. Liu, X., Huang, J., Chen, T., Wang, Y., Xin, S., Li, J., ... & Kang, J (2008). Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell research*, 18(12), 1177-1189.

79. Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., ... & Haber, D. A (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129-2139.
80. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:309-25.
81. Maehle, A. H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and Records of the Royal Society*, 65(4), 359-378.
82. Maiuthed, A., Chantarawong, W., & Chanvorachote, P (2018). Lung cancer stem cells and cancer stem cell-targeting natural compounds. *Anticancer research*, 38(7), 3797-3809.
83. Matsui, W. H (2016). Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine*, 95(Suppl 1).
84. McClure, C. D., & Southall, T. D (2015). Getting down to specifics: profiling gene expression and protein-DNA interactions in a cell type-specific manner. *Advances in genetics*, 91, 103-151.
85. MİROĞLU, Y. Y., DIRAMAN, E., & Zafer, E. R. E. N. (2011). Telomer ve Telomeraz. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(2), 41-48.
86. Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., & Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263(5151), 1281-1284.
87. Napier, S. L., Healy, Z. R., Schnaar, R. L., & Konstantopoulos, K. (2007). Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *Journal of biological chemistry*, 282(6), 3433-3441.
88. Nicholson, A. G., Chansky, K., Crowley, J., Beyruti, R., Kubota, K., Turrisi, A., ... & Yokoi, K (2016). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the clinical and pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming eighth edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(3), 300-311.

89. Niwa, H., Miyazaki, J. I., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics*, 24(4), 372-376.
90. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106-110.
91. Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 895-902.
92. Pavon LF , Sibov TT, de Souza AV , da Cruz EF , Malheiros SMF , Cabral FR (2018) Tropism of mesenchymal stem cell toward CD133(+) stem cell of glioblastoma in vitro and promote tumor proliferation in vivo. *Stem Cell Res Ther* 9:310. 23.
93. Prabavathy, D., Swarnalatha, Y., & Ramadoss, N (2018). Lung cancer stem cells—origin, characteristics and therapy. *Stem cell investigation*, 5.
94. Ramalho-Santos M, Willenbring H (2007). On the origin of the term “stem cell”. *Cell Stem Cell* 1(1):35–38
95. Rami-Porta, R., Bolejack, V., Giroux, D. J., Chansky, K., Crowley, J., Asamura, H., & Goldstraw, P (2014). The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(11), 1618-1624.
96. Renyi-Vamos, F., Tovari, J., Fillinger, J., Timar, J., Paku, S., Kenessey, I., ... & Dome, B. (2005). Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(20), 7344-7353.
97. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111.
98. Rizzino, A., Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009. 1(2): p. 228-36.
99. Roskoski Jr, R. (2013). Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacological research*, 68(1), 68-94.

100. Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 1-20.
101. Salnikov, A. V., Gladkich, J., Moldenhauer, G., Volm, M., Mattern, J., & Herr, I (2010). CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *International journal of cancer*, 126(4), 950-958.
102. Scales, S. J., & de Sauvage, F. J (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 30(6), 303-312.
103. Serrano, D., Bleau, A. M., Fernandez-Garcia, I., Fernandez-Marcelo, T., Iniesta, P., Ortiz-de-Solorzano, C., & Calvo, A. (2011). Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Molecular cancer*, 10(1), 1-15.
104. Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D., & Zhou, X (2019). Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer. *Molecular medicine reports*, 19(6), 4529-4535.
105. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A and Der CJ. (2000). Trends Cell. Biol., 10, 147–154.
106. Shukla, S., Khan, S., Sinha, S., & Meeran, S. M (2018). Lung cancer stem cells: an epigenetic perspective. *Current cancer drug targets*, 18(1), 16-31.
107. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396-401.
108. Skvortsov, S., Debbage, P., & Skvortsova, I (2014). Proteomics of cancer stem cells. *International journal of radiation biology*, 90(8), 653-658.
109. Smith, A (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060-1060.
110. Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., ... & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561-566.
111. Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., & Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(4), 820-824.

112. Tanoue, L. T., Tanner, N. T., Gould, M. K., & Silvestri, G. A. (2015). Lung cancer screening. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(1), 19-33.
113. Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14(2), 213-222.
114. Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Malanga, D., La Rocca, A., Viglietto, G., ... & Pirozzi, G (2009). The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 36(3), 446-453.
115. Tomlinson, M. J., Tomlinson, S., Yang, X. B., & Kirkham, J (2013). Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of tissue engineering*, 4, 2041731412472690.
116. Uygun, U., & Köksel, H. (2010). Gıda güvenliğini tehdit eden kimyasallar. *Gıda Güvenliği Derneği, Ankara*.
117. Van Es J. H., Barker N, Clevers H. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:28-33.
118. Voskas, D., Ling, L. S., & Woodgett, J. R (2014). Signals controlling undifferentiated states in embryonic stem and cancer cells: Role of the phosphatidylinositol 3' kinase pathway. *Journal of cellular physiology*, 229(10), 1312-1322.
119. Wakelee, H. A., Chang, E. T., Gomez, S. L., Keegan, T. H., Feskanich, D., Clarke, C. A., ve ark. (2007). "Lung cancer incidence in never smokers." *J Clin Oncol*, 25(5), 472-478.
120. Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., ... & Lu, W (2009). Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem cells*, 27(12), 2969-2978 (REF 16SI).
121. Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., ... & Lu, W. (2009). Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem cells*, 27(12), 2969-2978.
122. Weinberg, R. A., & Hanahan, D (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

123. Wynder, E. L., & Graham, E. A (1950). Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma: a study of six hundred and eighty-four proved cases. *Journal of the American medical association*, 143(4), 329-336.
124. Xu, F., Dai, C., Zhang, R., Zhao, Y., Peng, S., & Jia, C (2012). Nanog: a potential biomarker for liver metastasis of colorectal cancer. *Digestive diseases and sciences*, 57(9), 2340-2346.
125. YOKUŞ, B., & ÇAKIR, D. Ü (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.).
126. Zakaria, N., Satar, N. A., Halim, A., Hanis, N., Ngalim, S. H., Yusoff, N. M., ... & Yahaya, B. H. (2017). Targeting lung cancer stem cells: research and clinical impacts. *Frontiers in oncology*, 7, 80
127. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-22.
128. Zhang, W. C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., ... & Lim, B. (2012). Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*, 148(1-2), 259-272.