

Trabektedinin Meme Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri

Cytotoxic and Apoptotic Effects of Trabectedin on Breast Cancer Stem Cells

Harika ATMACA İLHAN^a,
Burcu ÇAKAR^b,
Merve İŞSEVEN^a,
Burçak KARACA^b

^aBiyoloji Bölümü,
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi,
Manisa, TÜRKİYE
^bTıbbi Onkoloji BD,
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir, TÜRKİYE

Received: 10 Jan 2019

Received in revised form: 18 Mar 2019

Accepted: 26 Mar 2019

Available online: 01 Apr 2019

Correspondence:

Harika ATMACA İLHAN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Manisa,
TÜRKİYE/TURKEY
harika.atmaca@cbu.edu.tr

Bu çalışma, 3. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi (11-13 Mayıs 2018, Manisa) 'nde sözlü olarak sunulmuştur.

ÖZET Amaç: Bu çalışmada, etkileri henüz meme kanseri kök hücrelerinde araştırılmamış olan trabektedinin (ET743, Yondelis®) sitotoksik ve apoptotik etkileri MCF-7 hücreleri ve bu hücrelerden izole edilen CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücreleri üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** CD44⁺/CD24⁻ belirteçlerine sahip meme kanseri kök hücreleri MCF-7 hücre kültüründen akış sitometri metodu ile izole edildi. Trabektedinin MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek üzere XTT testi kullanıldı. Trabektedinin, hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi konsantrasyona ve zamana bağlı olarak ölçüldü. Apoptotik etki DNA fragment miktarının ölçümüyle, mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimler ise tetrametilrodamin etil ester (TMRE) boyamasıyla belirlendi. **Bulgular:** Trabektedin, hücre canlılığını MCF-7 meme kanseri ve CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücre gruplarının her ikisinde de konsantrasyona ve zamana bağlı olarak inhibe etti. MCF-7 hücreleri 48. saatteki IC₅₀ konsantrasyonları için 4,52±0,7 nM, CD44⁺/CD24⁻ hücreleri için ise 1,23±1,2 nM olarak hesaplandı. IC₅₀ konsantrasyonları değerlendirildiğinde, CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin trabektedine MCF-7'den daha hassas olduğu tespit edildi. Kontrol grubundaki hücrelerin mitokondriyal floresans TMRE boyası ile boyanırken, trabektedinle muamele edilen her iki hücre popülasyonunun da boyanma miktarlarında azalma gözlemlendi. Trabektedinin CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinde apoptozu daha etkin bir şekilde indüklediği belirlendi. **Sonuç:** Elde edilen veriler, trabektedinin meme kanseri hücre grubunda olduğu gibi meme kanseri kök hücrelerinde de sitotoksik ve apoptotik etkisini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, trabektedinin meme kanseri için potansiyel bir terapötik olabileceğini göstermektedir. Ancak trabektedinin meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkilerinin daha detaylı olarak çalışıldığı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Trabektedin; meme kanseri; MCF-7; kanser kök hücresi; sitotoksikite; apoptozis

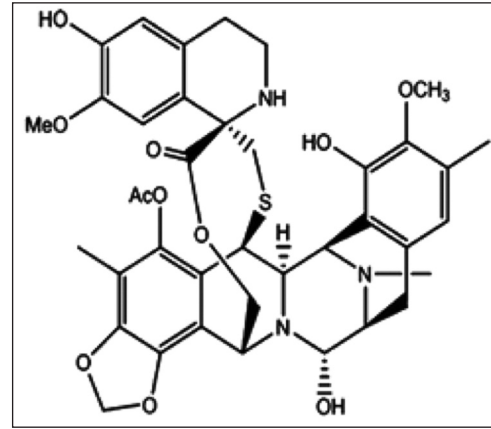
ABSTRACT Objective: In this study, effect of trabectedin (ET743, Yondelis®) was investigated on the viability of MCF-7 cells and CD44⁺/CD24⁻ breast cancer stem cells. **Material and Methods:** CD44⁺/CD24⁻ breast cancer stem cells were isolated from MCF-7 cells by using flow cytometry. XTT test was used to investigate the effect of trabectedin on the viability of MCF-7 and CD44⁺/CD24⁻ breast cancer stem cells. Apoptotic effect of trabectedin was investigated by measuring DNA fragmentation and changes in mitochondrial membrane potential were determined by tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) staining. **Results:** Trabectedin inhibited the cell viability of both MCF-7 breast cancer and CD44⁺/CD24⁻ breast cancer stem cells in a concentration and time dependent manner. IC₅₀ concentrations at 48 h was calculated as 4.52±0.7 nM for MCF-7 cells and 1.23±1.2 nM for CD44⁺/CD24⁻ cells. It was found that breast cancer stem cells were more sensitive to trabectedin than MCF-7 cancer cells. Cells in control group were stained with fluorescent TMRE stain but the staining was less in the both cell groups that were treated with the IC₅₀ concentrations of trabectedin. It was shown that trabectedin induced more apoptotic cells in CD44⁺/CD24⁻ breast cancer stem cells. **Conclusion:** According to the current data, it was shown that trabectedin induced cytotoxicity and apoptosis in breast cancer stem cells as well as MCF-7 cancer cells in a concentration and time dependent manner. These data indicates that trabectedin might be a potential therapeutic for breast cancer. However, more detailed studies investigating the effects of trabectedin on breast cancer stem cells are needed.

Keywords: Trabectedin; breast cancer; MCF-7; cancer stem cell; cytotoxicity; apoptosis

Kanser kök hücreleri (KKH'ler), tümör dokusunu oluşturan heterojenik hücre popülasyonu arasında kök hücre benzeri özelliklere sahip olarak tanımlanmaktadır. Kendi kendini yenileyebilme ve farklı hücrelere farklılaşabilme özelliklerine sahip olan KKH'lerin bu özelliklerinin yeni kanser hücrelerinin oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir.^{1,2} Tümör başlatıcı hücreler olarak adlandırılan KKH'lerin, rekürrensler ve kemoterapi direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir.^{3,4}

KKH'ler farklı kanser tiplerinde hücre yüzey antijenleri ve intraselüler çözülebilen proteinlerin kombinasyonlarının bulunması sayesinde belirlenmiştir.¹ İlk kez 1997 yılında miyeloid lösemide, solid tümörlerde ise ilk kez meme kanserinde 2003 yılında tanımlanmıştır. Meme kanserinden elde edilen ilk KKH'ler **CD44⁺/CD24⁻** hücreleridir.² Bu alt popülasyonun, insan meme dokusundaki varsayılan kök hücreler olduğu bilinmektedir ve epitelial mezenkimal geçiş sırasında üretilmektedir. CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri hücreleri, diğer belirteçleri taşıyan hücrelere göre yüksek derecede **tümöröjenik** olup ilaç direnci oldukça yüksek hücrelerdir.⁵ Hücre ölüm mekanizmalarından kaçabilme özellikleri de bu hücre tipinin ilaç direncine katkıda bulunmaktadır. Bunun yanında, konvansiyonel ilaç tedavileri sonucu elimine edilemeyen dirençli KKH'ler yeniden proliferatif faza girerek nükse neden olmaktadır.⁶ Bu nedenlerden dolayı meme kanser kök hücrelerini elimine edebilecek yeni ajanların araştırılması özellikle önem kazanmaktadır.

Trabektedin (ET743, Yondelis®), Karayip Denizi'nde yaşayan bir tunikat olan *Ecteinascidia turbinata*'dan izole edilmiş deniz alkaloididir.⁷ Kendine özgü kimyasal yapısı olan trabektedin, diğer alkilleyici ajanlardan farklı olarak DNA'nın küçük oluğuna bağlanır. DNA hasarı oluşturmasının yanı sıra DNA tamiri ve transkripsiyon işlemlerinin fonksiyonunu bozarak hücre çoğalmasını engelleyici etki göstermektedir.⁷ İleri çalışmalar, trabektedinin sadece tümör hücrelerinde değil, tümör mikroçevresinde de etkili olduğunu göstermiştir.⁷ Çok çeşitli tümör hücrelerinde etkin aktivite gösteren trabektedinin klinik araştırmaları hâlâ



ŞEKİL 1: Trabektedinin kimyasal yapısı.⁸

devam etmektedir (Şekil 1).⁸ Daha önceki çalışmalarda, trabektedinin, sarkoma kanseri kök hücrelerinde hücre canlılığını inhibe ettiği, apoptozisi indüklediği ve DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir.⁹ Prostat kanseri kök hücrelerinde ise G2/M hücre siklusu blokajına neden olarak apoptozisi indüklediği ortaya konmuştur.¹⁰ Ancak trabektedinin meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkileri detaylı olarak çalışılmamıştır. Bu çalışmada, trabektedinin, MCF-7 kanser hücrelerinden izole edilen CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HÜCRE KÜLTÜRÜ

İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın [Health Protection Agency (HPA), İngiltere]'den satın aldığı hücre hatları stoğundan temin edildi. MCF-7 hücreleri, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10.000 unite/mL penisilin ve 10 mg/mL streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Binder, Almanya) çoğaltıldı. Hücre kültürleri, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından "inverted" ışık mikroskopunda günlük olarak izlendi. Meme kanseri kök hücreleri kök hücre stabilitesinin korunması için RPMI 1640 besiyerinde, hiçbir ek serum, antibiyotik, antimikotik kimyasal ilave edilmeden çoğaltıldı.

FLORESAN AKTİVE HÜCRE SEÇİMİ

CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücreleri, MCF-7 hücre kültüründen “Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)” (FACSAria™; BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) cihazı kullanılarak izole edildi. Hücre seçimi için kültür flasksındaki hücre yoğunluğunun %80'e ulaşması beklendi. Hücreler, enzimatik olmayan hücre ayırma solüsyonu (SigmaAldrich, ABD) kullanılarak yüzeyden ayrıldı ve santrifüjlendikten sonra Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Invitrogen, ABD) içinde resüspanse edildi. 5x10⁴ hücre sayıldı ve seçim için kullanılacak CD44 (FITC-işaretli, clone G4426; BD Biosciences, ABD) ve CD24 (PE-işaretli, Miltenyi Biotec Ltd., Woking, Surrey, İngiltere) monoklonal antikoları ile (1:100 in FACS yıkama ile %0,5 bovine serum albumin; 2 mM Na₃N ve 5 mM EDTA) 15 dk, 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüj edildi ve süspanse edilerek akım sitometrisi cihazından geçirildi. Yüzey belirteci pozitif olan ve negatif olan hücre grupları olarak ayrılıp hücrelerin saflıkları FACSAria™ flow sitometrisi analizi ile değerlendirildi, %85 ve üzerindeki saflığa sahip örnekler deneylerde kullanıldı.¹¹

HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

Trabektedinin MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek üzere XTT testi (Roche, Almanya) kullanıldı. Hücreler her bir kuyuda 10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Trabektedinin, hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi konsantrasyona ve zamana bağlı olarak ölçüldü. Trabektedin, (Pharma Mar, İspanya) dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma) içinde çözülerek 2 mM'lık stok solüsyonlar hâlinde hazırlandı. Artan konsantrasyonlarda (10⁻¹²-10⁻⁶ M) trabektedin 24, 48 ve 72 saat süresince hücrelere uygulandı. XTT solüsyonu sodyum 3'-[1-(fenil-aminokarbonil)-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-methoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat ile N-metil dibenzopirazin metil sülfatın 50:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100 µL hazırlanan XTT solüsyonu eklenerek, hücre kültür plakaları 37°C'de %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Dört saat sonunda, kuyucuklardaki absorbans de-

ğerleri 450-490 nm referans dalga boyu aralığında mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü.

MİTOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Trabektedin uygulamasından sonra mitokondriyal membran potansiyeli (MMP)'nde meydana gelen değişimler, tetrametilrodamin etil ester (TMRE) boyamasıyla belirlendi. TMRE, pozitif yüklü floresans bir boya olup hücredeki negatif yüklü (aktif) mitokondrileri boyar. Depolarize veya inaktif mitokondrilerde membran potansiyeli azalacağından gözlenen floresans miktarı da azalır. 5 mg TMRE, 1 mL DMSO içinde çözülerek boyanın 10 mM'lık stok solüsyonu hazırlandı. Her kuyucukta 5x10⁵ hücre olacak şekilde 6'lı plakalara ekilen hücreler tutunmaları için 37°C'de ve %5 karbondioksit içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. İnkübasyonun sonunda her iki hücre hattı da trabektedin için hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarıyla (MCF-7 için 4,8 nM, CD44⁺/CD24⁻ kök hücreleri için 1,8 nM) 48 saat süresince muamele edildi. Kırk sekiz saat sonunda 1:10 oranında TMRE boyası eklendi ve hücreler 37°C'de 15 dk daha inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerdeki floresans miktarı floresans mikroskopta 540 nm'de (Olympus, Hamburg, Almanya) görüntülendi.

DNA FRAGMENTASYON MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

Hücre ölümü kaynaklı olarak oluşturulan sitoplazmik histon-ilişkili DNA framgentlerinin (mono- ve oligo- nükleozomlar) ölçümü için “Cell Death Detection ELISA Plus Kit” (Roche Applied Science, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Hücreler, her kuyucukta 10⁴ hücre olacak şekilde kuyucuklara ekildi ve tutunmaları için 37°C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Ardından hücreler, trabektedinin artan konsantrasyonları (10⁻¹²-10⁻⁶ M) ile trabektedin 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, kuyucuklara kitin içerdiği lizis solüsyonu eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen hücre lizatlarından 20 µL, kitin içerdiği streptavidin kaplı mikroplaka kuyucuklarına eklendi. Histon proteinleri ve nükleozomların örneklerle bağlanmasını sağlayan (anti-histon biotin ve anti-DNA-

peroksidaz) antikorları içeren immüno-kompleks eklenen mikropalaklar, orbital çalkalayıcı içerisinde 240 rpm'de oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasının ardından, nükleozom miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi, immüno-komplekslere bağlanan peroksidazların ölçülmesi ile gerçekleştirildi. Kuyucuklara ABTS substratı eklenen mikropalaka, DTX 880 Multimode Reader mikropalaka okuyucuda (Beckman Coulter, Miami, FL, ABD) 405 ve 490 nm dalga boyları referans alınarak ölçüldü.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Her deney 3 kez tekrar edilmiştir. İstatistiksel analiz, tek yönlü varyans analizi ve ardından Dunnett's post hoc testi kullanılarak yapılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

CD44⁺/CD24⁻ MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU

Akım sitometrisi ile MCF-7 hücrelerinden izole edilen CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerine ait grafik Şekil 2'de gösterildi. CD44⁺ popülasyonu yoğun ve CD24⁻ olan hücreler meme kanseri kök hücresi olarak değerlendirildi (Şekil 2).

TRABEKTEDİNİN CD44⁺/CD24⁻ MEME KANSERİ KÖK HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Trabektedinin 10^{-12} - 10^{-6} M konsantrasyon aralığındaki 24, 48 ve 72 saat sürelerinde hücre canlılığına etkisi MCF-7 meme kanseri ve bu hücrelerden elde edilen CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücre grubunda araştırıldı. Şekil 3 ve Şekil 4'te görüldüğü gibi, trabektedin, her iki hücre grubunda da hücre canlılığını konsantrasyona ve zamana bağlı olarak inhibe etti ($p < 0,05$). Trabektedin ile muamele edilen hücre kültürlerinde araştırılan zaman aralıklarından istatistiksel olarak anlamlı ve en etkin sonuç 48. saatte elde edildi. Kırk sekizinci saatteki IC₅₀ konsantrasyonları MCF-7 hücreleri için $4,52 \pm 0,7$ nM, CD44⁺/CD24⁻ hücreleri için ise $1,23 \pm 1,2$ nM olarak hesaplandı. IC₅₀ konsantrasyonları değerlendirildiğinde, CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin trabektedine MCF-7'den daha hassas olduğu tespit edildi.

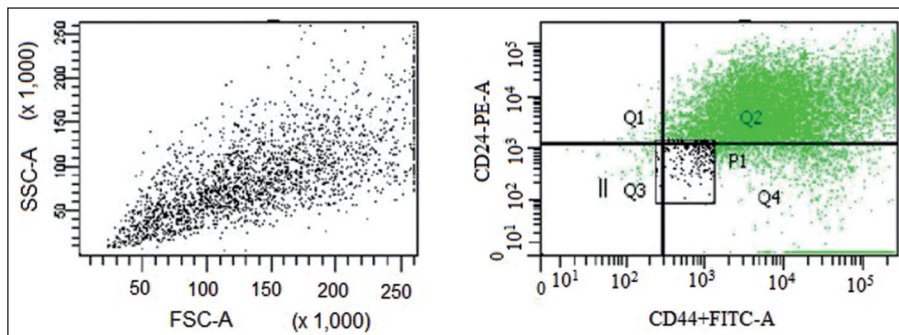
Trabektedinin MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde MMP üzerindeki etkilerini araştırmak için hücreler TMRE ile boyanarak floresan mikroskop altında görüntülendi. Kontrol grubundaki hücrelerin mitokondrileri floresans TMRE boyası ile boyanırken, trabektedinin IC₅₀ dozlarıyla 48 saat muamele edilen her iki hücre popülasyonunda boyanma miktarlarında azalma gözlemlendi (Şekil 5). Hücre canlılığı verilerine paralel olarak CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinde TMRE boyanmasındaki azalmanın MCF-7 hücrelerine oranla daha fazla olduğu tespit edildi.

TRABEKTEDİNİN MİTOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

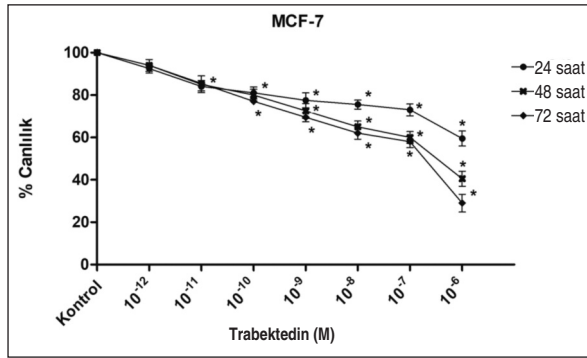
Trabektedinin MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde MMP üzerindeki etkilerini araştırmak için hücreler TMRE ile boyanarak floresan mikroskop altında görüntülendi. Kontrol grubundaki hücrelerin mitokondrileri floresans TMRE boyası ile boyanırken, trabektedinin IC₅₀ dozlarıyla 48 saat muamele edilen her iki hücre popülasyonunda boyanma miktarlarında azalma gözlemlendi (Şekil 5). Hücre canlılığı verilerine paralel olarak CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinde TMRE boyanmasındaki azalmanın MCF-7 hücrelerine oranla daha fazla olduğu tespit edildi.

TRABEKTEDİNİN APOPTOTİK ETKİSİ

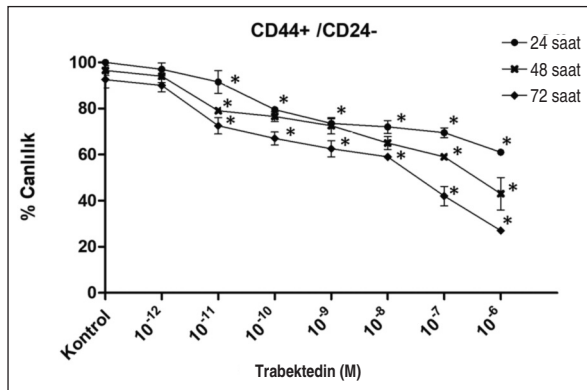
Trabektedinle muamele edilen MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ hücrelerindeki apoptotik etkisini belirle-



ŞEKİL 2: MCF-7 hücre kültüründen, CD44⁺/CD24⁻ belirteçleri üzerinden meme kanseri kök hücrelerinin FACS (FACSAria; BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) cihazı ile izolasyonu.



ŞEKİL 3: Trabektedinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki konsantrasyona ve zamana bağlı etkileri (p<0,05).



ŞEKİL 4: Trabektedinin CD44+/CD24- meme kanseri kök hücrelerinin canlılığı üzerindeki konsantrasyona ve zamana bağlı etkileri (p<0,05).

mek üzere trabektedinin en etkin olduğu 48. saatte sitoplazmik histon-ilişkili DNA fragment miktarları ölçüldü. Elde edilen verilere göre trabektedin her iki hücre grubunda da DNA fragment miktarında doza bağlı artışa neden oldu (Şekil 6).

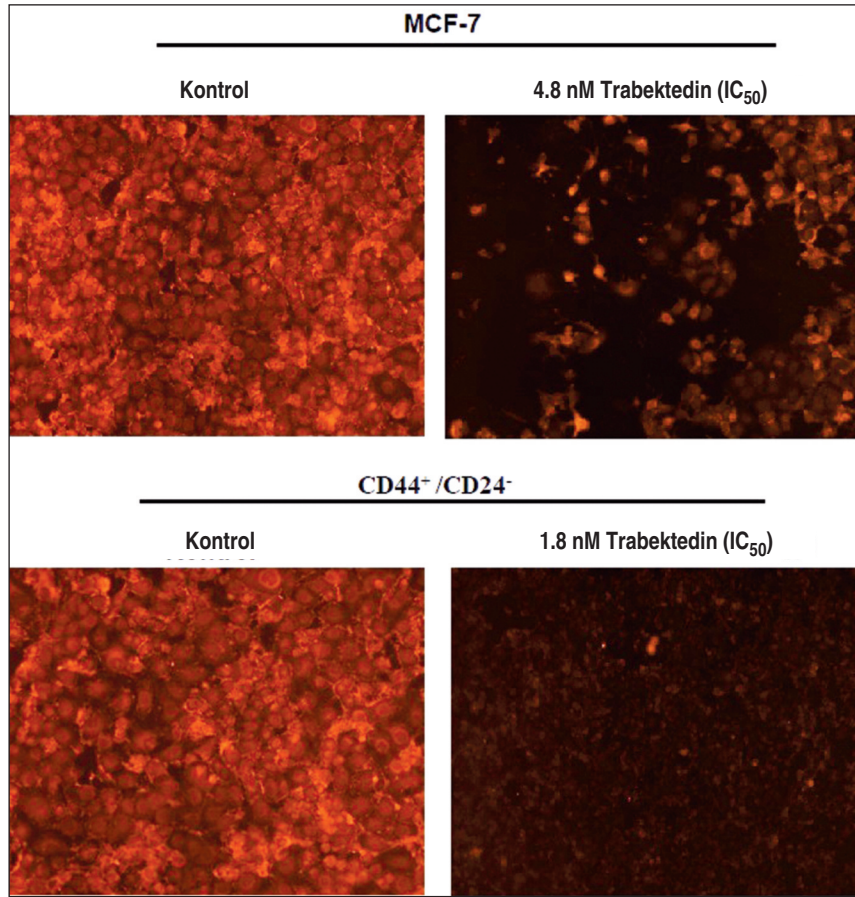
TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda görülme sıklığı hızla artan kanserlerden biridir ve invaziv meme kanserli hastalar için henüz etkili bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır.¹² Mevcut tedaviler sırasında gelişen ilaç direnci ve tedavi sonrası hastalığın nüks etmesi tedavi seçeneklerini kısıtlayan önemli etkenlerdir. Son yapılan çalışmalar, kanserli hastalara uygulanan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin başarısız olmasının temel nedenlerinden birinin KKH'lerdeki direnç mekanizmaları olduğunu ortaya koy-

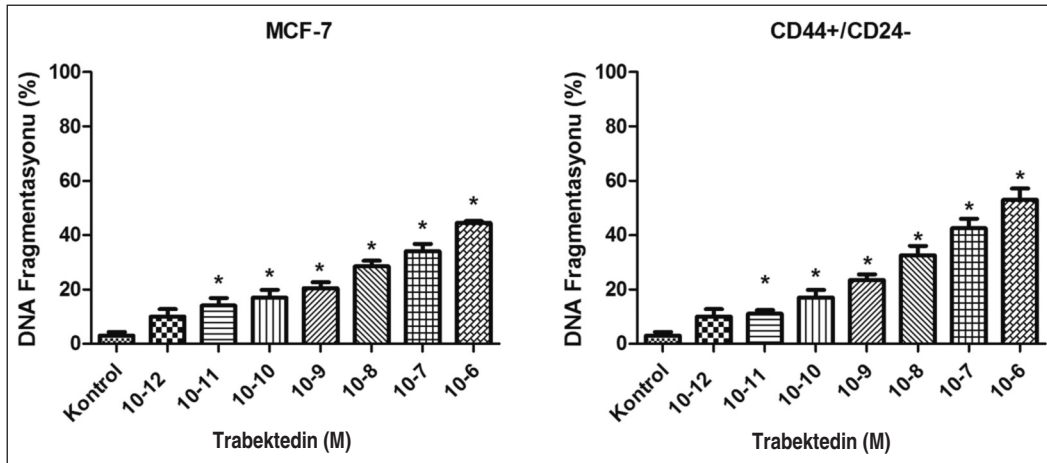
muştur.^{4,12} Bu nedenle KKH'leri hedefleyen yeni ajanların araştırılması giderek önem kazanmaktadır.

KKH'leri belirlemek üzere kullanılan yöntemlerin en bilineni, karakteristik yüzey belirteçlerine göre yapılan sınıflandırmadır. Meme kanseri kök hücrelerinde CD44'ün yüksek ve CD24'ün düşük ekspresyonu (CD44⁺/CD24⁻düşük) bu belirteçlerden biridir. CD44⁺/CD24⁻düşük özellikteki KKH'lerin CD44⁺/CD24⁺ olan hücelere göre daha tümörjenik olduğu, invaziv ve metastatik özelliklerinin daha çok olduğu bilinmektedir.¹³⁻¹⁵

Bu çalışmada, etkileri henüz meme kanseri kök hücrelerinde araştırılmamış olan trabektedinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MCF-7 hücreleri ve bu hücrelerden izole edilen CD44⁺/CD24⁻ kanser kök hücreleri üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Trabektedin uygulanan her iki hücre grubunda da hücre canlılığı konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azaldı. Ancak, MCF-7 hücreleri için 4,52±0,7 nM olarak hesaplanan IC₅₀ değeri, CD44⁺/CD24⁻ hücreleri için 1,23±1,2 nM olarak hesaplandı. Kırk sekizinci saatte hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonları karşılaştırıldığında, CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerinin trabektedinin sitotoksik etkisine MCF-7 hücrelerinden daha hassas olduğu belirlendi. Literatürde, trabektedinin KKH'ler üzerindeki etkilerinin çalışıldığı araştırmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Martinez-Cruzado ve ark., sarkoma hücre hatları ve bunlardan elde edilen KKH alt gruplarında trabektedinin etkilerini araştırmışlardır.⁹ 402,91 ve 1765 miksoid/yuvarlak hücreli lipo-sarkom hücre hatlarında trabektedinin 72. saatteki IC₅₀ değerlerini sırasıyla 0,09 ve 1,0 nM, bunlardan elde edilen KKH hatları MSC-5H-FC ve T-5H-FC#1'de ise sırasıyla 0,51 ve 0,55 nM olarak tespit etmişlerdir. Aynı KKH'lere trabektedin uygulaması sonrasında KKH'lerin tümorosfer oluşumunu da inceleyen araştırmacılar, trabektedinin 72 saat sonunda tümorosfer sayısı ve canlılığını doza bağlı azalttığını tespit etmişlerdir. IC₅₀ değerlerinin de aderan hücrelerde elde edilen sonuçlara benzer hesaplandığını belirtmişlerdir. Hem total hücre grubu hem de KKH alt gruplarında elde ettikleri benzer IC₅₀ değerleri sonucu, trabektedinin kanser hücrelerinde



ŞEKİL 5: Kırk sekiz saat trabektedin muamelesi sonrası TMRE boyası ile boyanan MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerinin floresans mikroskop görüntüleri (x40).



ŞEKİL 6: Trabektedinin artan konsantrasyonlarıyla 48 saat muamele edilen MCF-7 ve CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücrelerindeki DNA fragmentasyon yüzdeleri (*p<0,05).

olduğu gibi KKH alt grubunun da canlılığını benzer verimlilikle inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Diğer bir çalışmada ise trabektedinin KKH'ler üzerindeki etkileri,

PC-3 ve DU-145 prostat kanseri hücreleri ve bunlardan elde edilen CD133⁺/CD44⁺ KKH'ler üzerinde araştırılmıştır.¹⁰ DU-145 hücre-

lerinde trabektedinin 48. saatteki IC₅₀ değeri 10 nM, DU-145 hücrelerinden elde edilen CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerde ise IC₅₀ değeri 100 nM olarak hesaplanmıştır. PC-3 hücreleri için 100 nM olarak hesaplanan IC₅₀ değeri, PC-3 hücrelerinden elde edilen KKH'ler için hesaplanamamıştır. CD133⁺/CD44⁺ prostat kanseri kök hücrelerinin trabektedine prostat kanser hücrelerinden daha dirençli olduğunu ortaya koyan araştırmacılar, bu direncin kanser kök hücrelerinin metabolizması ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.¹⁰ Bu hücrelerin, DNA hasar kontrol yolağının aktivasyonunda ve tamir mekanizmalarında artış olması nedeni ile trabektedine daha dirençli olabileceği, ayrıca KKH'lerin G0 fazında ve nispeten daha yavaş proliferasyon hızına sahip olmasından ötürü bu direnci göstermiş olabilecekleri düşünülmektedir.

Meme kanseri hücreleri ve bunlardan izole edilen KKH'lerde elde ettiğimiz sonuçlarda ise meme kanseri kök hücrelerinin, trabektedine KKH'lerden daha duyarlı olduğunu tespit ettik. KKH'lerin ilaç direncine sebep olan temel mekanizmalardan birinin Wnt/β-katenin, Notch, Hedgehog gibi sinyal yolaklarını kullanmaları olduğu bilinmektedir. Trabektedinin bu sinyal yolaklarındaki çeşitli molekülleri modüle ettiği ise önceki çalışmalarda gösterilmiştir.^{16,17} Dolayısıyla trabektedinin bu selektif etkisinin muhtemel sebeplerinden birinin, KKH'lerin çoğalması ve idamesi için kilit rol oynayan bu sinyal yolaklarını modüle etme yeteneğiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre canlılığının önemli bir göstergesi olan DNA fragmentasyonu ve MMP'nin azalması apoptozun temel göstergelerindedir.¹⁸ Mitokondrinin iç ve dış membranında, transmembran potansiyelinde bozulma ve sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör gibi mitokondriyal proteinlerin sitoplazmaya salınımının farklı apoptotik yolları başlattığı ve aktive ettiği gösterilmiştir.¹⁸ **Çalışmamızda, trabektedinin CD44⁺/CD24⁻ KKH'lerinde DNA fragmentasyonunu artırdığı ve MMP'yi azalttığı gösterilmiştir.** Trabektedinin KKH'lerdeki apoptotik etkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Martinez-Cruzado ve ark., sarkoma hücrelerinden elde edilen KKH alt grupla-

rında trabektedinin konsantrasyona bağlı olarak apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir.⁹ Açık-göz ve ark.nın çalışmasında, trabektedinin prostat kanseri kök hücrelerinde apoptozu doza bağlı olarak indüklediğini ayrıca trabektedinin IC₅₀ konsantrasyonları uygulandığında kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, p53 moleküllerini artırdığı, Bcl-2 molekülünü ise azalttığını göstermiştir.¹⁰

SONUÇ

Elde edilen veriler, trabektedinin meme kanseri hücre grubunda olduğu gibi meme kanseri kök hücrelerinin canlılığını da konsantrasyona ve zamana bağlı olarak inhibe ettiğini ve meme kanseri kök hücre grubunda apoptozu daha etkin bir şekilde indüklediğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, trabektedinin meme kanseri için potansiyel bir terapötik olabileceğini göstermektedir. Ancak trabektedinin meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkilerinin daha detaylı olarak çalışıldığı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Harika Atmaca, Merve İşseven; **Tasarım:** Harika Atmaca, Burçak Karaca; **Denetleme/Danışmanlık:** Burcu Çakar, Burçak Karaca; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Burcu Çakar, Harika Atmaca; **Analiz ve/veya Yorum:** Burcu Çakar, Burçak Karaca; **Kaynak Taraması:** Merve İşseven, Burçak Karaca; **Makalenin Yazımı:** Merve İşseven, Harika Atmaca; **Eleştirel İnceleme:** Burcu Çakar, Burçak Karaca; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Burcu Çakar, Burçak Karaca; **Malzemeler:** Harika Atmaca, Burcu Çakar; **Deneyler:** Burçak Karaca, Harika Atmaca, Merve İşseven, Burcu Çakar.

KAYNAKLAR

1. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Translational potential of cancer stem cells: a review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res.* 2015;335(1):135-47. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
2. Jin X, Jin X, Kim H. Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumour Biol.* 2017;39(10):1010428317729933. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
3. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(12):2144-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
4. La Porta CA. Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9(3):391-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Nami B, Wang Z. HER2 in breast cancer stemness: a negative feedback loop towards trastuzumab resistance. *Cancers (Basel).* 2017;9(5). [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
6. Tume L, Paco K, Ubidia-Incio R, Moya J. CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. *Gac Mex Oncol.* 2016;15(1):22-30. [[Crossref](#)]
7. D'Incalci M, Galmarini CM. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(8):2157-63. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Larsen AK, Galmarini CM, D'Incalci M. Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77(4):663-71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Martinez-Cruzado L, Tornin J, Rodriguez A, Santos L, Allonca E, Fernandez-Garcia MT, et al. Trabectedin and camptothecin synergistically eliminate cancer stem cells in cell-of-origin sarcoma models. *Neoplasia.* 2017;19(6):460-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
10. Acikgoz E, Guven U, Duzagac F, Uslu R, Kara M, Soner BC, et al. Enhanced G2/M arrest, caspase related apoptosis and reduced E-cadherin dependent intercellular adhesion by trabectedin in prostate cancer stem cells. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141090. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
11. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:708036. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
12. Ercan C, van Diest PJ, Vooijs M. Mammary development and breast cancer: the role of stem cells. *Curr Mol Med.* 2011;11(4):270-85. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
13. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
14. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R59. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
15. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1154-9.
16. Radpour R. Tracing and targeting cancer stem cells: new venture for personalized molecular cancer therapy. *World J Stem Cells.* 2017;9(10):169-78. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
17. Peraldo-Neia C, Cavalloni G, Soster M, Gammaitoni L, Marchiò S, Sassi F, et al. Anti-cancer effect and gene modulation of ET-743 in human biliary tract carcinoma preclinical models. *BMC Cancer.* 2014;14:918. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
18. Mirabella M, Di Giovanni S, Silvestri G, Tonali P, Servidei S. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain.* 2000;123(Pt 1):93-104. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]