



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

HepG2 HÜCRE HATTININ CANLILIĞI ÜZERİNE MEDIUM pH'SİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neşe GÜVENALP

Samsun

Haziran-2019



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

HepG2 HÜCRE HATTININ CANLILIĞI ÜZERİNE MEDIUM pH'SİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neşe GÜVENALP

Danışman
Doç.Dr. Dilek GÜVENÇ

Samsun

Haziran-2019

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Neşe GÜVENALP tarafından Doç.Dr. Dilek GÜVENÇ Danışmanlığında hazırlanan HepG2 Hücre Hattının Canlılığı Üzerine Medium pH'sının Etkilerinin İncelenmesi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 25 /06 /2019 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :

(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :

(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :

(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :

(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof.Dr.Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez aşaması boyunca yardımlarını esirgemeyen, bilgileri ve tecrübeleri ile daima destek olan, yol gösteren ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum kıymetli danışman hocam Doç.Dr. Dilek GÜVENÇ'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimim boyunca bilgileri ve paylaşımları ile destek olan başta Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY'A, değerli hocalarım Doç.Dr. Oğuzhan YAVUZ'a, Doç.Dr. Yavuz Kürşad Daş'a ve Dr. Öğr. Üyesi Enes ATMACA'ya teşekkürü borç bilirim.

Lisansüstü çalışmalarım süresince destek ve motivasyon veren başta Arş.Gör. Orhan TOKUR'a ve doktora öğrencisi Sedat GÖKMEN'e ve sevgili Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı doktora öğrencilerine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Tolga GÜVENÇ'e ve doktora öğrencisi Nilüfer KURUCA'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde destek olan ve güç veren canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

HepG2 HÜCRE HATTININ CANLILIĞI ÜZERİNE MEDIUM pH'SININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Amaç: Kanser hücreleri glikolitik metabolizmalarına bağlı olarak asidik mikro-çevreye sahiptirler. Asidik mikro-çevre nedeniyle tümör hücreleri invazyon ve metastaz yapma gibi malign özellikler kazanırlar. Bu çalışmada insan hepatosellüler karsinom (HepG2) hücrelerinin medium pH'ları değiştirilerek asidik tümör mikro-çevresi taklidi ve alkali uygulamaların hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada HepG2 hücreleri farklı pH'lı mediumlarda çoğaltıldıktan sonra WST-1 ve tripan mavisi testleri ile hücre canlılık değerlendirmeleri yapıldı.

Bulgular: WST-1 testi sonuçlarına göre medium pH'sı 6.6 ve 6.8 olan gruplar ile kontrol grubu (pH 7.2) karşılaştırıldığında hücrelerin proliferasyon yeteneklerinde bozulma olmadan çoğalabildikleri gözlemlendi. Medium pH'sı azaldıkça (pH 6.4, 6.2, 6.0) hücre canlılığında önemli oranda azalma saptandı ($p<0,05$). Alkali gruplarda ise pH 7.6'dan itibaren hücre canlılığında kısmi azalma gözlemlenmiş olup, pH 7.8, pH 8.0 ve pH 8.5 grupların canlılık açısından belirgin bir azalma saptandı ($p<0,05$). Tripan mavisi testi sonuçlarına göre pH 6.6'da hücre sayısında artış gözlemlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Her iki alkali grupta da (pH 7.6 ve 7.8) hücre canlılığında azalma saptanmış olup bu azalma pH 7.8'de önemli bulundu ($p<0,05$).

Sonuç: Alkali ortamın kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve canlılık oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle mevcut tedavi stratejilerine ek olarak mikro-çevrenin pH'sını yükselten tampon tedavilerinin yapılması tümör hücrelerinin davranışını değiştirerek tedaviye olumlu yanıt şansını artıracaktır.

Anahtar Kelimeler: HepG2; kanser; mikro-çevre; proliferasyon

Neşe, GÜVENALP, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran – 2019

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF MEDIUM pH ON THE VIABILITY OF HepG2 CELL LINE

Aim: Cancer cells have an acidic micro environment due to their glycolytic metabolism. Depending on the acidic micro-environment, tumor cells gain malignant properties such as invasion and metastasis. In this study, it was aimed to evaluate the effect of acidic tumor micro-environment imitation and alkaline applications on cell viability by changing medium pH of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells.

Material and Method: In the study, HepG2 cells were grown in different pH mediums and WST-1 and trypan blue tests were performed to evaluate the cell viability.

Results: According to the WST-1 test results, it was observed that the cells were able to multiply without deterioration in their proliferation ability compared with the control group with medium pH of 6.6 and 6.8. As the pH of the medium decreased (pH 6.4, 6.2, 6.0), a statistically significant decrease was observed in cell viability. A slight decrease was observed in alkaline groups from pH 7.6 and a significant decrease in cell viability was found in the groups with pH 7.8, pH 8.0 and pH 8.5 ($p < 0.05$). According to the results of the trypan blue test, an increase in the number of cells in pH 6.6 was observed but this increase was not statistically significant ($p > 0.05$). In both alkaline groups (pH 7.6 and 7.8), cell viability decreased and this decrease was found to be significant at pH 7.8 ($p < 0.05$).

Conclusion: It was found that alkaline environment reduces the proliferation of cancer cells and decreases the viability of them. Therefore, in addition to the current treatment strategies, buffer therapies that increase the pH of the micro-environment will change the behavior of the tumor cells and increase the chance of positive response to treatment.

Keywords: Cancer; HepG2; micro-environment; proliferation

SİMGELER VE KISALTMALAR

μL	:	Mikro litre
μM	:	Mikromolar
ATCC	:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	:	Adenozin 3'-trifosfat
CA	:	Karbonik Anhidraz
CaCO_3	:	Kalsiyum Karonat
CO_2	:	Karbondioksit
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetat
FBS	:	Fötal dana serumu
FDA	:	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
H^+	:	Hidrojen
HBV	:	Hepatit B Virüsü
HCC	:	Hepatosellüler Karsinom
HCl	:	Hidroklorik Asit
HCV	:	Hepatit C Virüsü
Hep3B	:	İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücresi
HepaRG	:	İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücresi
HepG2	:	İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücresi
HIF1	:	Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör
HuH7	:	İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücresi
IL-1	:	İnterlökin-1
MEM	:	Minimum Essential Medium
ml	:	Mililitre
MRI	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRS	:	Manyetik Rezonans Spektroskopi
MT	:	Metallotiyonin
NADPH^+	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaOH	:	Sodyum Hidroksit

NASH	: Nonalkolik Steatohepatit
NEAA	: Non Esansiyal Aminoasit
nm	: Nanometre
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
V-ATPaz	: Vakuoler ATPaz
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
	2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-[2,4-disulfofenil]- 2H
WST-1	: tetrazolium monosodium tuzu (2- [4-diphenyl] -3- [4- nitrophenyl] -5- [2,4-di sulfonic] - 2H tetrazolium monosodium salt)
MDA-MB-231	: Metastatik Adenokarsinom Hücre Hattı
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
MTT	: 3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
CIK	: Sitokinle Uyarılmış Katil Hücreler
MHCC97H	: İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücresi
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
miRNA	: MikroRNA
PC3M	: Prostat Karsinoma Hücre Hattı
NHE-1	: Sodyum/Hidrojen Değiş-Tokuş Sistemi-1
A375	: Malign melanom hücre hattında
MCT	: Monokarboksilat Taşıyıcısı
CD44	Transmembran Reseptörü
MMP-2	Matriks Metallo Proteinaz-2
MMP-9	Matriks Metallo Proteinaz-9

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinom) Hücre Hattının Genel Özellikleri	3
2.2. Hepatosellüler Karsinom (HCC).....	4
2.2.1. HCC Tedavisi	5
2.3. Kanser Hücrelerinin Metabolizması ve Warburg Etkisi	6
2.3.1. Warburg Etkisi ve Hızlı ATP Sentezi	9
2.4. Kanser Hücrelerinin Davranışında Asidik Mikroçevrenin Rolü.....	10
2.5. Kanser Kemoterapisinde Asidik Mikroçevrenin Hedeflenmesi	12
2.6. Hücre Canlılık Testleri.....	13
2.6.1. WST-1 Hücre Canlılık Testi	13
2.6.2. Tripan Mavisi Hücre Canlılık Testi	14
3.MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı	16
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	16
3.1.3.Kullanılan Sarf Malzemeler	17
3.1.4.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.2.Metot	18
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı.....	18
3.2.2. HepG2 Hücre Hattına Uygun Medium'un Hazırlanması ve Özellikleri.....	18
3.2.3. Hücre Çözdürme.....	18
3.2.4. Hücrelerin Subkültür Yapılması.....	19
3.2.5. Çoğaltılan Hücrelerin 96 ve 6 Kuyucuklu Plakalara Aktarılması.....	20
3.2.6. WST-1 Testi	20
3.2.7. Tripan Mavisi Testi	22
3.2.8. İstatiksel Değerlendirme.....	24

4.BULGULAR.....	25
4.1. pH'sı Değiştirilmiş Mediumların HepG2 H¼ce Hattı Üzerindeki In vitro Sitotoksik Etkisinin WST-1 Testi İle Belirlenmesi.....	25
4.2.Çoğaltılan H¼crelerin Adaptasyon ve pH'sı Değiştirilmiş Mediumlar ile İnk¼basyon Sonrası 6 Kuyucuklu Plakalardaki Mikroskopik Gör¼nt¼leri.....	26
4.3. pH'sı WST-1 Sonuçlarına Göre Belirlenmiş Olan (pH 6.6, 6.8, 7.6, 7.8) Mediumların HepG2 H¼ce Proliferasyonuna Etkisinin Tripan Mavisini Testi İle Belirlenmesi	30
5.TARTIşMA.....	31
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİş	46

1. GİRİŞ

Kanser, onkogen etmenler veya DNA'da gerçekleşen bazı mutasyonlardan kaynaklanan metabolik bir hastalıktır (Dumas ve ark., 2017). Dünya çapında tüm gelir düzeyindeki ülkelerde önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Torre ve ark., 2016). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara ayrılan bütçe dünya genelinde yıllık olarak 100 milyar dolar civarındadır ve bu oranın 2020 yılında 150 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Prasad ve ark., 2017) Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre dünyada 2018 yılında 18.1 milyon insana kanser teşhisi konulduğu ve 9.6 milyon insanın kanserden dolayı hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Bray ve ark., 2018).

Tümör hücrelerinin enerji metabolizması üzerine yapılan ilk çalışmalardan birisi 1922 yılında Otto Warburg tarafından gerçekleştirilmiştir. Otto Warburg kanser hücrelerinin özel bir metabolizmaya sahip olduğunu ve hücrelerin kansere dönüştükten sonra oksidatif solunumu bırakarak anaerobik solunuma geçtiğini ortaya koymuş, bu durum daha sonraları "Warburg Etkisi" olarak adlandırılmıştır (Ferreira, 2010). Ayrıca Warburg kanser hücrelerindeki mitokondri sayısının da düştüğünü belirlemiş, kanser hücrelerinin azalan mitokondriyal ATP üretimini karşılayabilmek için glikoz alımını artırdığını bildirmiştir. Normal hücrelerde ATP'nin büyük kısmı mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyonla elde edilir. Ancak mitokondri aktivitesi ya da sayısı azaldığında gerekli enerji ihtiyacını sağlayabilmek adına oksijensiz solunum gerçekleştirilir. Oksijensiz solunum, oksidatif fosforilasyona oranla çok daha az ATP verimi sağlamak ve daha fazla glukoz molekülüne ihtiyaç duymaktadır. Fazla sayıda glukoz molekülünün bu yolla yıkılması ise laktik asit üretimini beraberinde getirerek hücre içi pH'da asidik bir ortam yaratmaktadır. Kanser hücrelerinde mitokondriyal aktivitenin azalmasına bağlı olarak laktik asit sekresyonu artar ve hücre dışı pH değeri normal hücrelere oranla daha asidik hale gelir (Schwartz ve ark., 2017).

Kanser çeşitleri arasında hepatoselüler karsinom (HCC), insan popülasyonundaki en ölümcül üçüncü ve en yaygın beşinci kanser türüdür (Liu ve ark., 2018). Karaciğer kanseri hepatoselüler karsinom, intrahepatik safra kanalı karsinomu (kolanjiokarsinom), hepatoblastoma, safra kanalı kist adenokarsinomu, hemanjiyosarkom ve epithelioid hemanjiyo endotelyoması gibi histolojik olarak farklı

primer hepatik neoplazmaları içerir (Farazi ve Depinho, 2006). Bu türler arasında hepatoselüler karsinom en yaygın karaciğer kanseridir (ACS, 2005).

HepG2 hücre hattı hepatoselüler karsinomlu 15 yaşındaki bir erkek hastanın karaciğer biyopsi örneğinden izole edilerek oluşturulmuştur. Bu hücreler tümörojenik olmayan ortalama 55 (50-56) kromozom içeren yüksek bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerdir (Donato ve ark., 2015; Qiu ve ark., 2015). Özel metabolik yolların araştırılması ve tedavide kullanılabilir ilaç adaylarının incelenmesi gibi birçok araştırmada HepG2 hücre hattı sıklıkla tercih edilmektedir (Zeilinger ve ark., 2016).

Kemoterapi, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan önemli seçeneklerden biridir. Kemoterapötik ilaçlara karşı oluşan direnç, terapötik başarısızlığa ve nihayetinde ölüme neden olmaktadır. Kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara direncini etkileyen çok sayıda faktörün bulunması tedavideki başarı şansını düşürmektedir (Schwartz ve ark., 2017). Bunlar arasında ilacın hücre içine geçişinin azalması, ilacın kanser hücrelerinden dış ortama atılması, zayıf kan perfüzyonu, hipoksi, tümör mikro-çevresinin asidik olması ve hastanın metabolizma özellikleri yer almaktadır (Navrátilová ve ark., 2013). Tümör hücrelerinin direnç mekanizmalarından birisi enerji metabolizmalarına bağlı olarak mikro-çevrelerinin normal hücrelere oranla daha asidik olmasıdır (Raghunand ve Gillies, 2000). Tümörlerin asidik pH değerlerinin 5.7 – 7.8 arasında olduğu ve normal doku pH'sının 7.4 olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2014). Tümörlerin, glikolitik metabolizmaları ve zayıf perfüzyon sebebiyle sahip oldukları asidik mikro-çevrenin, invazyon ve metastaz sürecini hızlandırdığı düşünülmektedir (Robey ve Nesbit., 2013).

Bu tez çalışmasında, HepG2 hücre hattının farklı pH değerlerinde yaşama ve üreme kapasitesinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Çalışmada medium pH'sında değişiklik yapılarak alkali ve asidik pH ortamları oluşturulması, bu ortamlarda inkübe edilen hücrelerin proliferasyon kapasitesinin ve canlılığının ne derece etkilendiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

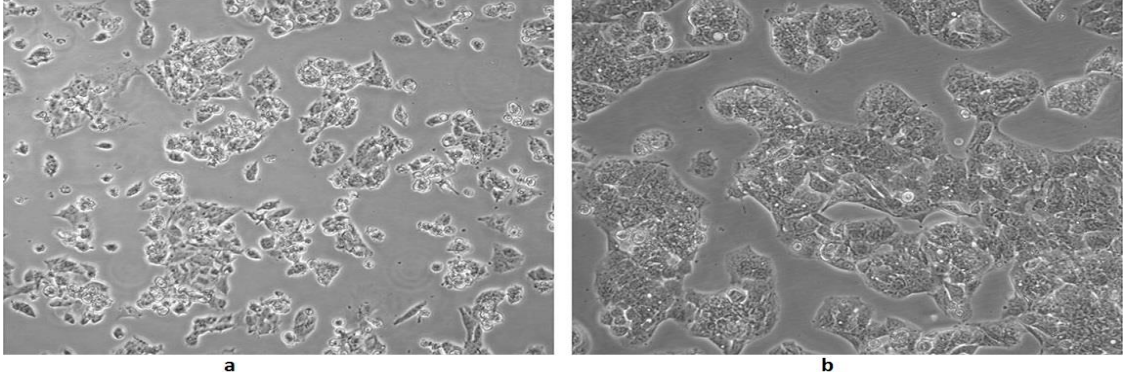
2.GENEL BİLGİLER

2.1. HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinom) Hücre Hattının Genel Özellikleri

Hepatoma hücre hatları, primer insan hepatositlerine *in vitro* alternatifler olarak sıklıkla kullanılırlar. Bu hücre hatları arasında, HepG2, Hep3B, HuH7 ve HepaRG gibi bir dizi insan hepatoma hücre hatları, ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. HepG2, farmakolojik ve toksikolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan insan hepatom hücre hattıdır (Vinken ve Rogiers., 2015).

Hepatoma hücrelerinin metabolik fonksiyonları, primer hepatositlere kıyasla daha sınırlı olmasına rağmen, yüksek erişilebilirlik, kolay kullanım, neredeyse sınırsız ömür ve donör özelliklerine bağlı olmayan sabit fenotip gibi özellikleri ile *in vitro* çalışmalar için önemli avantajlar sağlarlar (Tolosa ve ark., 2013). İlaç biyotransformasyon çalışmalarıyla ilgili dikkat edilmesi gereken önemli husus ise, hepatoma hücrelerinin biyotransformasyon aktivitelerinin sınırlı, metabolik seviyelerinin normal karaciğer hücrelerine kıyasla zayıf olmasıdır (Gomez ve ark., 2008).

HepG2 hücre hattı, 1980 yılında, Philadelphia Wistar Enstitüsü'ndeki araştırmacılar tarafından "The Human Hepatoma-Derived Cell Line" patenti alınarak literatüre girmiştir. O tarihten beri HepG2 hücreleri, 15 yaşındaki erkek bir hastanın karaciğer dokusundan elde edilen insan hücre hattı olarak (HB 8065 kodlu) Amerikan Tıp Kültür (American Type Culture Collection, ATCC) havuzunda bulunmaktadır (ATCC, 2016). HepG2 hücreleri yüksek proliferasyon yetenekleri olan ancak tümorojenik olmayan hücrelerdir. Epitelyal benzeri bir morfolojiye sahiptirler ve birçok farklılaşmış karaciğer fonksiyonunu gerçekleştirebilirler (Vinken ve Rogiers, 2015). HepG2 hücrelerinin histomorfolojik görüntüleri Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. HepG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (ATCC, 2016)

a: Düşük yoğunluk, **b:** Yüksek yoğunluk

HepG2 hücreleri, plazma proteinlerinin büyük bir kısmını üretebilmesi, biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlere benzerliği, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, sitokinler, IL6 proteinlerini (sitokin-IL6 gibi) işleyebilmesi, metal ve organik bileşiklere maruz kaldığında metalotiyonin (MT) oluşturması, lipoprotein sentezlemesi, serumsuz besiyerinde üretilmesi durumunda karaciğere özel çeşitli serum proteinlerini üretebilmesi, sitokrom p450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerine sahip olması ve glukuronat, sülfatla birleşme tepkimelerini gerçekleştirebilmesi gibi avantajlarıyla, *in vitro* toksisite modellemelerinde tercih edilmektedir (Dehn ve ark., 2004). Bu hücreler ayrıca, plazma proteinleri, kolesterol ve trigliserid metabolizması, lipoprotein metabolizması ve taşınımı, safra asidi sentezi ve glikojen sentezini gerçekleştirebilmektedir (Gomez ve ark., 2008; Vinken ve Rogiers, 2015).

2.2. Hepatosellüler Karsinom (HCC)

Hepatosellüler karsinom, en sık görülen primer karaciğer kanseri türüdür (Befeler ve Bisceglie, 2002). Diğer malignitelerin aksine HCC, kronik inflamasyon ile ortaya çıkan ve nekrozis, fibrozis ve rejenarasyon oluşumu ile gerçekleşen çok aşamalı karmaşık bir olgudur (Ringelhan ve ark., 2018).

Yılda 700.000'den fazla insana HCC teşhisi konulduğu için bu hastalık dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. HCC'nin başlıca risk faktörleri arasında viral hepatit enfeksiyonları (HBV ve HCV) ve alkole bağlı siroz bulunmaktadır. Bunların yanı sıra metabolik karaciğer hastalığı ve kronik inflamasyon da HCC'nin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Ringelhan ve ark., 2018). Son zamanlarda alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması da risk faktörleri arasında sayılmaktadır.. HCC'nin

insidansı giderek artmakta ve çoğu ülkede insidans oranı ile ölüm oranı eş değer düzeyde şekillenmektedir. Ölüm oranının yüksekliği etkili tedavilerin eksikliğini göstermektedir (Bruix ve ark., 2014). HCC'nin erkeklerde görülme olasılığı kadınlara göre 3 kat daha fazladır ve yaşa bağlı olarak ölüm oranı artmaktadır (Altekruse ve ark., 2014). HCC'nin erkeklerde daha sık görülmesinin sebebi sadece cinsiyet ile ilgili olmadığı ve erkek bireylerin daha fazla miktarda alkol ve sigara tüketmesi, vücut kitle indekslerinin kadınlara oranla daha yüksek olması ve yüksek testosteron seviyeleri olarak belirtilmektedir (Balogh ve ark., 2016).

Dişabet veya obezite hastası ve 50 yaşından büyük hastaların % 60'ının ileri fibrozlu Yağlı Karaciğer Hastalığı (NASH) olduğu düşünölmektedir. Diabetes mellitus (şeker hastalığı) ve obezite gibi kronik tıbbi durumlar HCC riskini arttırmaktadır. Diabetes mellitus, glikoz metabolizmasında oynadığı temel rol nedeniyle doğrudan karaciğeri etkilemektedir. Bu durum kronik hepatit, yağlı karaciğer, karaciğer yetmezliğı ve siroza neden olabilmektedir (Balogh ve ark., 2016).

2.2.1. HCC Tedavisi

HCC tedavi yöntemleri arasında karaciğer nakli, lokal ablasyon, rezeksiyon, intrahepatik bölgesel ve sistemik ilaç tedavisi yöntemleri yer almaktadır (Thomas ve ark., 2010)

HCC Tedavisinde Cerrahi Yaklaşımlar

Karaciğer rezeksiyonu, kanser hücrelerini içeren karaciğer kısmının cerrahi müdahale ile alınması işlemidir. Rezeksiyon işlemi, cerrahi müdahaleye uygun, vasköler invazyon yapmamış kanserli karaciğer hücrelerinde ve sirozu olmayan hastalarda tercih edilen bir tedavi yöntemidir (Befeler ve Bisceglie, 2002).

Karaciğer transplantasyonu, rezeksiyon yapılamayan hastalarda HCC'yi tedavi etmek için kullanılan en iyi yöntemlerden biridir. Ancak donör yetersizliğı, nakil bekleme süresinin fazla olması gibi nedenler karaciğer transplantasyonu olanağını azaltmaktadır. Canlı donör naklinde sağ kalım oranlarının daha iyi olduğu bilinmektedir. Karaciğer transplantasyonu tek tümör yayılımında tümörün çapı 5 cm'den büyükse ya da 3'den fazla tümör varlığında ve her birinin büyüklüğü 3 cm'den büyük ise uygulanamamaktadır (Befeler ve Bisceglie, 2002).

HCC Tedavisinde Cerrahi Olmayan Yaklaşımlar

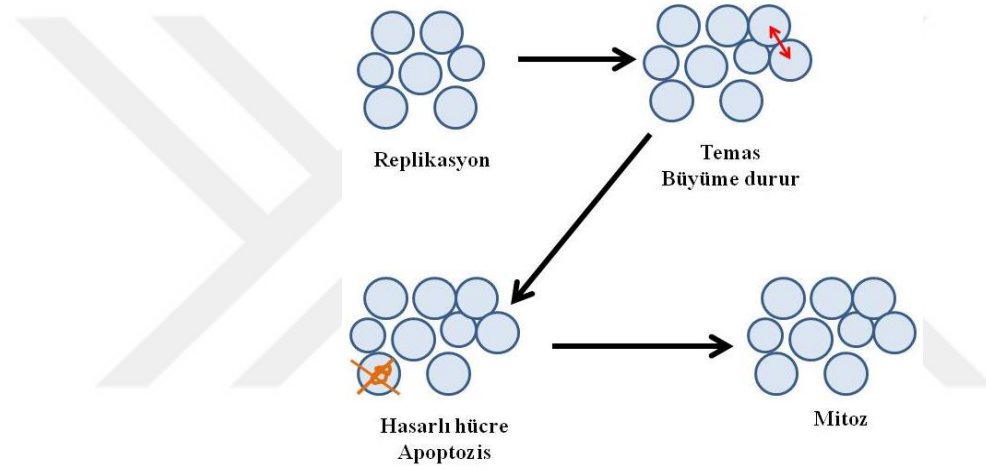
Kemoterapi genel olarak rezeksiyon, transplantasyon veya ablasyon gibi tedavilere uygun olmayan hepatosellüler karsinomlu hastalarda uygulanan bir tedavi yöntemidir. Kemoterapi bölgesel ya da sistemik olarak uygulanmaktadır (Befeler ve Bisceglie, 2002). Tümör hücrelerinin çoğalmasını ve anjiyogenezini azaltan, tümör apoptozunu artıran Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı multikinaz inhibitörü bir ilaç olan sorafenib, HCC'nin ileri evresinde (C evresi) olan hastalar için ilk sistemik tedavi seçeneğidir (Bruix ve ark.,2016). Regorafenib ise anjiyojeniz, metastaz ve tümör immünesinde rol alan protein kinazların aktivitesini bloke eden ağız yoluyla kullanılan bir multikinaz inhibitörüdür. Yapılan prelinik çalışmalarda, Regorafenib'in, Sorafenib'den daha güçlü bir farmakolojik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Regorafenib, sorafenib uygulamasına rağmen hastalığı ilerleyen HCC hastalarında hayatta kalmayı sağlamak için sistemik tedavi de kullanılmaktadır (Bruix ve ark., 2017; Pinter ve ark.,2018).

2.3. Kanser Hücrelerinin Metabolizması ve Warburg Etkisi

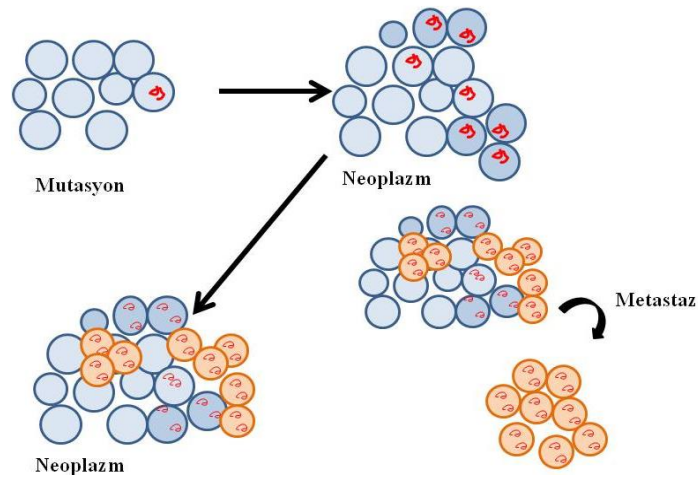
Kanser, vücuttaki anormal veya mutasyona uğramış hücrelerin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanan metabolik bir hastalıktır. Kanser hücreleri hızla büyüme, bölünebilme ve kontrolsüz proliferasyon yeteneği ile karakterizedir. Normal hücreler mitoz bölünme, apoptoz ve otofaji gibi bir dizi düzenlenmiş metabolik programları takip ederken, kanser hücreleri bu “yasa ve düzene” uymamaktadır. Vücutumuzdaki normal hücrelerin çoğu, mitoz bölünme ile düzenli bir şekilde bölünmeye uğrar ve hücreler belli bir yoğunluğa ulaştınca temas inhibisyonu ile büyümeyi durdururlar. Bir hücrede işlevsel kusur veya mutasyon meydana gelmişse, apoptozis mekanizmasıyla mutasyona uğramış ölü hücre yeni bir hücre ile değiştirilir (Şekil 2). Bazı durumlarda, hücre DNA'sında meydana gelen mutasyonlar, hücreyi apoptoza dirençli hale getirir veya daha hızlı replikasyon geçirmelerine neden olur. Böylece aynı mutasyonu içeren hücreler çoğalarak yığın meydana getirir ve neoplazmik yapılar oluşur (Şekil 3). Neoplastik hücreler bir yığın olarak kaldığı ve kontrolden çıkmadığı sürece iyi huylu oldukları kabul edilir. Bununla birlikte hasarlı genetik materyali içeren hücreler, metastaz ve komşu hücrelere invaze etme eğilimi gösterebilmekte ve bu özelliklere sahip kanser hücreleri bir araya gelerek tümör oluşturmaktadırlar. Kanser hücreleri programlanmış hücre ölümüne karşı direnç gösterebilme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca

kanser hücreleri metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmek için çok miktarda hücre besin tüketirler (Hannahan ve Weinberg, 2000; Galluzzi ve ark., 2010).

Bazı durumlarda kanser hücreleri birincil bölgeden ayrılarak kan dolaşımına girer ve diğer organ ya da dokulara nüfuz edebilirler. Kanser hücrelerinin birincil bölgeden ayrılarak diğer dokulara yayılması “tümör metastazı” olarak adlandırılır. Metastatik hücreler, köken aldıkları birincil bölgedeki kanser hücrelerinden çok farklı mutasyon yeteneğine sahip olabilirler. Bu nedenle birincil bölgedeki kanser hücreleri ve metastaz sonucu gelişen kanser hücrelerinin kemoterapiye verdikleri cevap birbirinden farklıdır. Bu durum kanser tedavisinin zor olmasının önemli nedenlerinden biridir (Kalyanaraman, 2017).



Şekil 2. Normal hücrelerin çoğalması (Kalyaraman, 2017'den uyarlanmıştır)



Şekil 3. Neoplazmaların oluşumu, invazyon ve kanser hücrelerinin metastazı (Kalyaraman, 2017'den uyarlanmıştır)

Memeli hücreleri, faaliyetleri için gerekli enerjiyi bir dizi kimyasal reaksiyon veya metabolizma yoluyla elde ederler. Metabolizma, anabolizma (yapım) ve katabolizma (yıkım) arasında bir denge olarak görülebilir. Normal memeli hücrelerinde ATP; karbonhidratların, proteinlerin ve yağların katabolizması yoluyla üretilir (Deberardinis ve ark., 2008). Kanseri hücreleri ise büyümelerini, hayatta kalmalarını ve çoğalmalarını devam ettirebilmek için metabolizmalarını değiştirirler (Liberti ve Locasale, 2016). Normal memeli hücreleri, hücresel faaliyetlerini yerine getirebilmek için ihtiyaç duydukları enerjiyi mitokondrilerinde oksidatif fosforilasyon aracılığıyla gerçekleştirirler. Bunun için hücreler oksijen varlığında glikozu, glikolizis yoluyla pirüvata parçalar ve oluşan pirüvatın büyük çoğunluğunu oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondride tamamen okside edip CO₂'e dönüştürürler. Bu olay sonunda bir glikoz molekülünden 36 ATP'ye yakın bir enerji üretilir. Bu olay "aerobik glikoliz" olarak adlandırılır. Memeli hücreleri oksijen yokluğunda ise, glikozu pirüvata çevirdikten sonra laktata indirgerler. Bu yolla bir molekül glikoz başına sadece 2 ATP meydana gelir. Bu olaya da "anaerobik glikoliz" adı verilir. Kanseri hücrelerinde ise, elde edilen ATP miktarı az olmasına rağmen glikoz, aerobik ortamda laktata dönüştürülmektedir (Heiden ve ark., 2009).

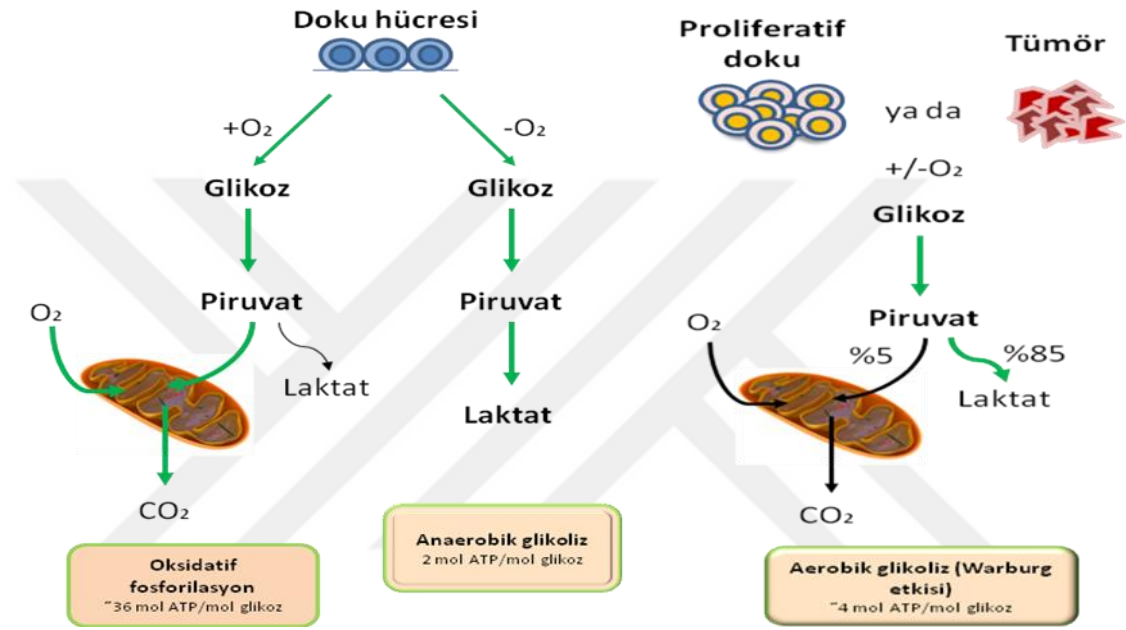
Yaklaşık 100 yıl önce Otto Warburg, kanseri hücrelerinin, oksijen varlığında bile glikozu laktata metabolize ettiğini gözlemlemiş ve bu olay "Warburg Etkisi" ya da "aerobik glikolizis" olarak adlandırılmıştır (Gatenby ve Gillies, 2004). Bu özellik normal proliferatif dokular ile de benzerlik göstermektedir. Aerobik glikoliz, ATP üretimi açısından oksidatif fosforilasyondan oldukça geridedir. Proliferatif hücrelerde, glikozun yaklaşık % 10'u piruvat oluşturulmak üzere biyosentetik yollara yönlendirilir (Şekil 4) (Heiden ve ark., 2009). Böylece Warburg etkisi sonucu kanseri hücrelerinin ekstrasellüler pH değeri asidik özellik kazanır (Schwartz ve ark., 2017). Aerobik glikoliz ile elde edilen ATP miktarı yetersizdir. Bu yüzden yeteri kadar ATP üretimi için gereken glikoz miktarı da artar. Glikolizin son ürünü ise laktik asittir.

Aerobik glikolizin iki önemli dezavantajı vardır:

a. Enerji üretiminde oksidatif metabolizmadan 18 kat daha az etkilidir, bu da daha büyük glikoz alımını ve kullanılmasını gerektirir.

b. Memeli hücrelerine toksik etkisi olan oldukça asidik bir mikroçevre ortamı yaratır. Böyle bir ortama ilaveten hipoksi de eklenirse mikroçevre oldukça kostik bir hal alır (Gatenby ve Gillies, 2004).

Tümörler hücre içi pH değerinin, hücre dışı pH değerinden daha büyük olması ile normal hücrelere göre ters pH profili gösterirler. Bu sayede kanser hücreleri apoptozu engelleyerek bölünmelerini devam ettirebilirler (Schwartz ve ark., 2017).



Şekil 4. Oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikoliz (Warburg etkisi) arasındaki fark (Heiden, 2009'dan uyarlanmıştır)

2.3.1. Warburg Etkisi ve Hızlı ATP Sentezi

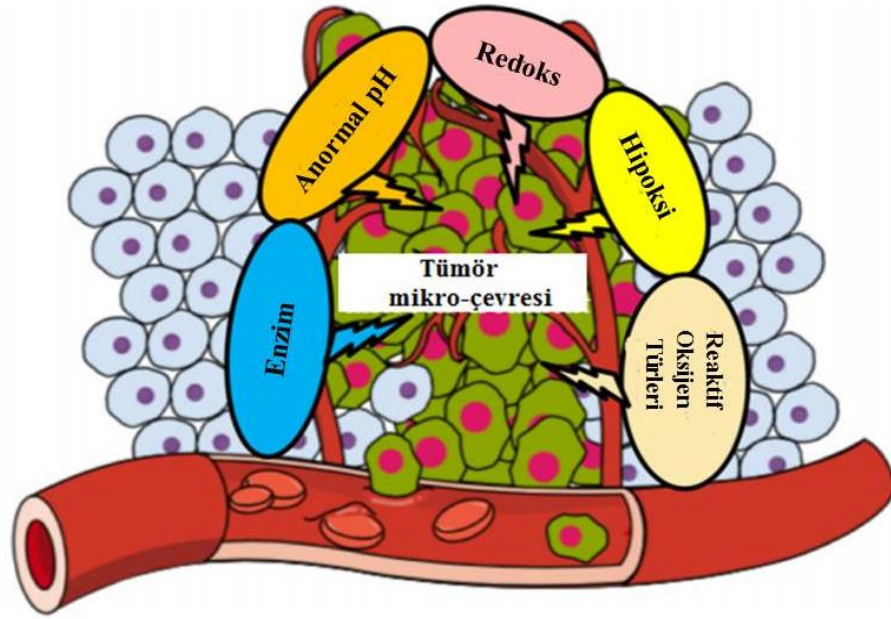
Kanser hücrelerinde aerobik glikoliz ile elde edilen ATP miktarı, mitokondriyal solunum yolu ile karşılaştırıldığında oldukça azdır. Aerobik glikolizde glukoz metabolizması hızlıdır ve ortalama olarak oksidatif fosforilasyondan 10-100 kat daha hızlı gerçekleşir (Liberti ve Locasale, 2016).

ATP üretim hızı yüksek hücreler, üretim miktarı az olsa dahi, sınırlı enerji kaynakları için rekabet ederken seçici bir avantaj elde ederler. Kanser hücreleri sınırlı glikoza sahip olan mikro çevrelerinde stromal hücreler gibi diğer hücreler ile besin rekabetine girmektedirler. Hücrelerde ATP gereksinimi artığında hızlı bir ATP üretim süreci Warburg etkisi yoluyla ayarlanır (Shestov ve ark., 2014). Ayrıca yapılan bazı deneysel çalışmalarla, hücre büyümesi ve bölünmesi için gereken ATP miktarının,

normal hücresel faaliyetler için gerekli olandan daha az olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle ATP ihtiyacı tümör hücrelerinin büyümesi için kısıtlayıcı bir engel oluşturmamaktadır. Bunun yanı sıra kanser hücreleri büyüme ve çoğalma gibi metabolik faaliyetler için diğer hücre türlerinde mevcut olan kreatin kinaz ve adenilat kinazdan hızlı ATP üretimi gibi enerji üretim mekanizmalarına da sahiptirler (Liberti ve Locasale, 2016).

2.4. Kanser Hücrelerinin Davranışında Asidik Mikroçevrenin Rolü

Kanser çevresi, mikroçevre veya stroma olarak da adlandırılmaktadır. Kanser hücresi ve mikroçevresi arasındaki iletişim kanserin başlangıcı, ilerlemesi ve metastazı için oldukça kritik öneme sahiptir. Temelde, tohum gibi davranan bir tümör için mikroçevresi onun büyümesini, gelişmesini sağlayacağı toprak görevi görmektedir (Plaks ve ark., 2015). Tümör mikroçevresinin belli başlı karakteristik özellikleri vardır. Bunlar enerji üretim mekanizmasından kaynaklı asidik ortam, düzensiz damar ağları nedeni ile hipoksi, bazı enzimlerin (metaloproteinazlar veya fosfolipaz A2) aşırı ekspresyonu ve reaktif oksijen türlerinin yüksekliğidir (Şekil 5) (Uthaman ve ark., 2018).



Şekil 5. Tümör mikro-çevresinin özellikleri (Uthaman ve ark., 2018'den uyarlanmıştır)

Mikroçevrenin ana bileşeni olan ekstrasellüler matriks fiziksel, biyokimyasal ve biyomekanik özelliklere sahip kompleks bir makromolekül ağıdır. Normal hücrelerin pH değerinden daha asidik değerde olan ekstrasellüler matriks hücresel

transformasyonu ve metastazı doğrudan teşvik ederek kanser ilerlemesini etkiler. Bunlara ek olarak anormal yapıdaki ekstrasellüler matriks stromal hücrelerin davranışını düzenler, tümörle ilişkili anjiyogenez ve enflamasyonu kolaylaştırarak tümörejenik mikroçevrenin oluşmasına neden olur (Lu ve ark., 2012).

Aside bağlı invazyon hipotezine göre kanser hücrelerinden salgılanan H^+ iyonları çevreye yayılarak tümör-stroma ara yüzünü değiştirir ve invazyon yeteneğinin artmasını sağlar (Xu ve ark., 2015).

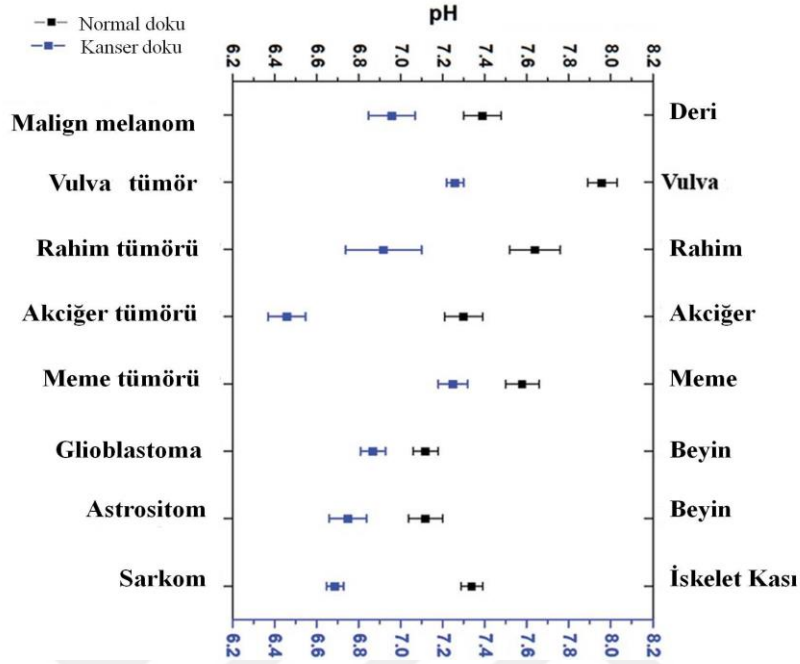
Aerobik veya anaerobik glikolizin bir ürünü olarak tümör hücreleri tarafından üretilen laktik asit, vasküler endotel büyüme faktörü ekspresyonunu ve tümör ile ilişkili makrofajların M2 tip makrofaj benzeri polarizasyonunu indükler. Bunun sonucunda tümörün yakın ve uzak dokulara yayılımı, anjiyogenez, immun sistem baskılanması ve kemoterapötik ajanlara direnç gelişir (Colegio ve ark., 2014). Tümör ilişkili makrofajlar tümör çevresinde bol miktarda bulunmakta ve tümörün ilerlemesinin tüm aşamalarında yer almaktadırlar (Noy ve Pollard, 2014).

Asidik pH, bazı lizozomal enzimlerin aktivasyonunu artırabileceği gibi aynı zamanda pro-metastatik faktörlerle ilgili birtakım genlerin ekspresyonunu da artırmaktadır. Asidik mikroçevre tümör metastazı ile yakından ilişkili olduğu gibi homeostaz ve bağışıklık sisteminde de rol oynamaktadır (Kato ve ark., 2013).

Tümör hücrelerindeki hücre içi pH'nın anormal derecede yükselmesi hücre içi sinyal iletimini aktive ederek hücrelerin çoğalmasını ve migrasyonunu artırmaktadır. Tümör hücrelerinde H^+ iyonlarının dışarı atılması suyun hücre içine girmesi ve osmotik basıncın artmasına neden olarak hücrelerin migrasyon yeteneğine katkı sağlar (Oudin ve Weaver, 2016).

Son yıllarda pH-duyarlı nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (MRS), pozitron emisyon tomografisi (PET) , manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve optik görüntüleme gibi gelişmiş teknikler kullanılarak kanser hücrelerinde intrasellüler ve ekstrasellüler pH'yı ölçmek mümkün olmuştur. Tümör hücresinin ekstrasellüler pH'sı normal hücrelere göre 0.3-0.7 birim kadar düşüktür. Örneğin malign melanom dokularında ekstrasellüler pH değeri ortalama 6.96 olmasına rağmen normal cilt hücrelerinde ortalama pH değeri 7.39'dür ve arada 0.43 fark bulunmaktadır. Uterus pH ortalaması 7.64 iken uterus tümörlerinde ekstrasellüler pH ortalama 6.92' dir. Çeşitli

doku ve tümör hücrelerinin pH değerleri arasındaki farklar Şekil 6.'da gösterilmiştir (Hao ve ark., 2018).



Şekil 6. Farklı tümör dokularının ortalama hücre dışı pH değerlerinin normal dokularla karşılaştırılması (Hao ve ark., 2018'den uyarlanmıştır).

2.5. Kanser Kemoterapisinde Asidik Mikroçevrenin Hedeflenmesi

Son yıllarda tümörün asidik mikroçevresi nedeni ile pH duyarlı kontrollü ilaç salınım sistemleri kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2014).

Kanser tedavisinde ekstrasellüler pH değeri, kemoterapötik ilaçların ve taşıyıcıların hücre içine endositoz yoluyla alınması ve bu ilaçların endozomal ve lizozomal kompartmanlarda tutulması açısından önemlidir (Liu ve ark., 2014).

Kemoterapötik ilaçların istenilen etkiyi göstermesi için, pH duyarlı nanosistemlerin ilacı fizyolojik pH'da depolaması ve stabilize etmesi, pH istenilen değere ulaştığında ilacın hızlı bir şekilde salınması ve hücre içi ilaç konsantrasyonunun terapötik doza ulaşması gereklidir. Bu amaçla pH duyarlı kontrollü ilaç salınım stratejileri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Liu ve ark., 2014). Moleküler yapıda ve pKa değerliği tümörün interstisyel pH'sına yakın olan altın nanopartiküller, insan serum albümin nanoparçacıkları, altın nanokluster gibi çeşitli pH duyarlı nanoparçacıklar son yıllarda kanser tedavisi araştırmalarında kullanılmaktadır (Uthaman ve ark., 2018). Prostat kanser hücre hattında kalsiyum karbonatlı (CaCO_3) silika nanopartiküllerle enkapsüle edilmiş doksorubisin'in terapötik etkinliğinin yüksek

olduğu ve tümör büyümesini önemli oranda baskıladığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019).

Tümör hücrelerinde temel pH düzenleyicileri; karbonik anhidraz (CA) izoformları (CAII, CAIX, CAXII), anyon değiştirici izoformlar, Na⁺/HCO₃ (sodyum bikarbonat) taşıyıcıları, Na⁺/H⁺ iyon değiştiricileri, monokarboksilat taşıyıcıları ve vakuoler ATPaz (V-ATPaz) içermektedir. Bu pH düzenleyicilerinin kanserin tedavisinde keşfedilecek olan ilaçlar için stratejik önemi vardır (Neri ve Supuran, 2011).

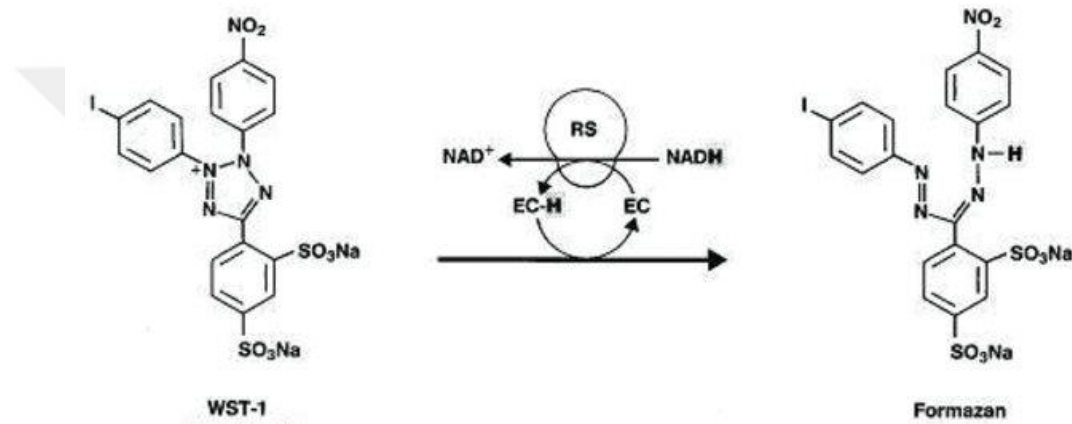
2.6. Hücre Canlılık Testleri

In vitro hücre canlılık testleri, kültür edilmiş hücrelerde ilaç tarama testleri ve kimyasalların sitotoksosite değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılırlar. Son yıllarda onkolojik ilaç araştırmalarında hem bileşiğin toksisitesini hem de tümör hücresi büyüme inhibisyonun değerlendirilmesinde bu testlere olan ilgi giderek artmaktadır. Testlerden hızlı sonuç alınması, ucuz olması, çok sayıda örneği aynı anda analiz edebilme gibi avantajları vardır. Hücre canlılığı testleri, hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre uyumu, ATP üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotit alım aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır. Bu yöntemler ölçüm prensibine göre kolorimetrik, boya dışlama, flurometrik, luminometrik olarak sınıflandırılırlar (Aslantürk, 2018).

2.6.1. WST-1 Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığını tespit etmek için WST-1 [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum], MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür], MTS [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum] gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değerikliği esasına dayanan kolorimetrik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. WST-1 hücre canlılık testi, WST-1 bileşiğinin hücre yüzeyinde meydana gelen bir dizi karmaşık hücresel mekanizma ile formazana indirgenmesi esasına dayanan spektrofotometrik ve kolorimetrik bir yöntemdir. WST-1 bileşiği negatif yüklü olduğundan hücre membranını geçememektedir. Bundan dolayı sarı renkli tetrazolyum tuzu koyu kırmızı formazan ürününe indirgenmesi için sitoplazmadan veya plazma zarından elektron transfer edebilen bir ara elektron alıcı molekül [örneğin; mPMS (1-metoksi-5-metil-fenazinyum metil sülfat)] kullanması gereklidir. Bu indirgenme reaksiyonu canlı hücrelerde NADPH⁺'nin glikolitik üretimine bağlıdır

(Formül 1). WST-1 bileşiminin indirgenmesi sonucu oluşan formazan suda ve dolayısıyla hücre kültüründeki medium ortamında çözünebilir özelliktedir. Test sonunda meydana gelen renkli boya suda çözünür olduğundan ek inkübasyon süresi ve çözücü gerektirmez. WST-1 reaktifi ile gerçekleşen reaksiyon hücre kültüründeki mitokondriyal dehidrojenaz miktarıyla orantılı olarak renk değişikliği meydana getirir. Oluşan formazan boyasının miktarı kültür ortamındaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Kullanımı kolay, güvenilir, tekrarlanabilirliği yüksektir. Hem hücre canlılığı hem de sitotoksite testlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılır (Riss ve ark.,2013; Aslantürk, 2018).



Formül 1. WST-1 testi prensibi (Sigmaaldrich/Roche'den alınmıştır.)

2.6.2. Tripan Mavisi Hücre Canlılık Testi

Boya dışlama yöntemlerinden olan tripan mavisi hücre kültüründeki canlı ve / veya ölü hücrelerin sayısını belirlemek amacıyla kullanılır. Tripan mavisi negatif yüklü ve non-vital özelliktedir. Sitoplazma membran bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerde birikme özelliği göstermektedir. Fakat canlı hücrelerin sitoplazma membranı bu boyayı kabul etmez. Canlı hücrelerin sitoplazmaları açık renkte görünürken ölü hücrelerin sitoplazması mavi renkte görülecektir. Tripan mavisi ile hücre canlılık testinde genel yöntem olarak elle boyama ve sayım için hemositometre (thoma lamı) kullanılmaktadır. Hücreler hemositometre yardımı ile mikroskop altında incelendiğinde canlı hücreler yapısal bütünlüğü bozulmamış hücre zarına sahip olduğu için ortamdan boya almazlar. Ancak canlılığını kaybetmiş hücrelerde sitoplazma zar bütünlüğü bozulduğu için ortamdan boya alarak belirgin mavi renkte görünürler. Sonuçta canlı ve canlı olmayan hücreler birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Teknolojideki gelişmeler yardımıyla tekniğin verimliliğini ve doğruluğunu artırmak için otomatik hücre sayım

cihazları geliştirilmiştir. Cell Counter TC20 (Biorad) cihazı otomatik hücre sayımını gerçekleştiren cihazlardan biridir. Hücreler bir sayma lamına yerleştirildikten sonra hücre sayım cihazında okutulur. Cihaz hızlı bir şekilde (< 30 sn) tripan mavisini almış hücreler ile canlı hücreleri değerlendirmektedir. Bu yöntem basit ve ekonomiktir. Ölü hücrelerin sitoplazması boya uygulamasını takiben kısa sürede mavi renkte boyanmaktadır. Bunun yanında hücre sayımı genellikle bir hemositometre kullanılarak yapılır. Bu nedenle sayma hataları (~%10) meydana gelebilir. Ancak bu dezavantaj otomatik hücre sayım cihazları kullanılarak giderilebilmektedir (Louis ve Siegel, 2011; Aslantürk, 2018).



3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı

İnsan Hepatosellüler Karsinom (HepG2) Hücre Hattı	ATCC, HB-8065, Manassas,VA,USA
--	--------------------------------

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

-80°C Derin Dondurucu	Nüve-DF 490
Buzdolabı (+4)	Arçelik 5006 NF
Hücre Sayım Cihazı (Cell Counter)	Bio-RadTC20™ - 1450102
CO ₂ İnkübatör	Nüve-EC 160
Hassas Terazı	Shimadzu Auw 220 D
Su Banyosu	Nüve-Nb 20
İnkübatör	Nüve
İnvert Mikroskop	Zeiss-Vert.A1
Laminer Akışlı Güvenlik Kabini	Nüve-MN 120
Mikroplaka Okuyucu Spektrofotometre	Tecan software Magellan
Orbital (Manyetik) Karıştırıcı	Wise-Stir-MSH-20A
Otoklav	Nüve-OT 40L
Otomatik Pipetör	Thermo S1 Filler
pH Metre	Thermo 710 A
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Milli-Di, Simplicity 185

3.1.3.Kullanılan Sarf Malzemeler

75 cm ² Hücre Kültürü Flaskı	SPL Life Sciences
6 Kuyucuklu Mikroplaka	Corning
96 Kuyucuklu Mikroplaka	Corning
Hücre Sayım Lamı (Cell Counting Slide)	Bio-Rad 145-0011
Falkon Tüp (50 mL)	ISOLAB
Portüp	ISOLAB
Kriyo Vial (2 mL)	ISOLAB
Pudrasız Lateks Eldiven	Tentyflex
Steril disposable pipet (5-10-25 ml)	LP Italiana
Steril Pipet Ucu (10-200-1000 µl)	ISOLAB

3.1.4.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fetal Sığır Serumu	GIBCO
L-Glutamin	SIGMA-49419
Minimum Esansiyal Medium (MEM)	SIGMA-M0275
MEM NEAA Non Esansiyal Aminoasit	GIBCO-Thermo Fisher-11140-035
NaOH (Sodyum Hidroksit)	Merck-106462
HCl (Hidroklorik asit)	SIGMA - 30721
Penisilin streptomisin	SIGMA-P4333
Sodyum bikarbonat	SIGMA-31437
Sodyum pirüvat	SIGMA-Thermo Fisher-11360070
Tripan Mavisi	SIGMA-T8154
Tripsin-EDTA	Biological Industries, 03-051-5B
WST-1 Hücre Proliferasyon Re-ajanı	Roche, REF 11644807001

3.2. Metot

Hücre Kültür Çalışmaları

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

HepG2 hepatoma hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Havuzu bankasından temin edilmiştir. Hücre hatları çözündürülene kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2. HepG2 Hücre Hattına Uygun Medium'un Hazırlanması ve Özellikleri

Hücreler, % 10 fetal dana serumu (%10 FBS), 2 mM L-glutamin, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 sodyum pirüvat, % 1 esansiyel olmayan amino asit (NEAA), 2.2 g/l sodyum bikarbonat içeren Minimal Esansiyel Medium (MEM)'de 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda çoğaltıldı.

3.2.3. Hücre Çözdürme

- % 20 oranında FBS ve % 1 oranında antibiyotik solüsyonu içeren MEM hazırlanarak 37 °C su banyosunda bekletildi.
- Hazırlanan mediumdan 75 cm²'lik steril flaslara 20 mL aktarıldı.
- -80°C derin dondurucudan çıkartılan HepG2 hücreleri 37°C 'lik su banyosunda süratli bir şekilde çözümlene kadar bekletildi. Kriyo vial tüpünün kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi.
- Çözünen HepG2 hücreleri, içerisinde hücre mediumu bulunan 75 cm²'lik flaska yavaş bir şekilde damla damla aktarıldı.
- Hücrelerin tamamı aktarıldıktan sonra dikkatli bir şekilde yapılan pipetasyon işlemi ile medium içine homojen olarak dağılımları sağlandı.
- Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücre kültürü flaskı 37°C de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Hücre çözüldükten 24 saat sonra vasat % 10 oranında FBS ve % 1 oranında antibiyotik içeren MEM ile değiştirildi.
- Daha sonra hücreler %80 oranında yoğunluk (confluence) sağlayana kadar invert mikroskopla kontrol edildi ve 2 günlük aralıklar ile mediumlar değiştirildi.

3.2.4. Hücrelerin Subkültür Yapılması

75 cm²'lik steril flasklarda üretilen HepG2 hücreleri % 80 yoğunluk sağladıktan sonra subkültürleri yapıldı. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- Subkültür işlemi için flask inkübatörden alındı ve laminar akışlı kabin içerisinde medium uzaklaştırıldı.
- Hücre yüzeyi % 0.25 lik Tripsin-EDTA ile yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra Tripsin-EDTA solüsyonundan 5 mL eklendi ve flask 37 °C'de 2-3 dakika bekletildi.
- Yüzeyden kalkan hücre üzerine tripsini inaktive etmek için 5 mL medium konuldu ve pipetleme işlemine geçildi. Pipetleme işlemine, hücreler tek tek ayrılan kadar devam edildi.
- Süspansiyon haldeki hücreler bir falkon tüpe alınarak 2500 rpm de 5 dk santrifüj edildi ardından mediumla tekrar resuspanse edildi.
- İçinde hücrelerin homojen olarak dağıldığı hücre süspansiyonundan 20 µL alınıp üzerine 20 µL Tripan Mavisi eklenerek hücre sayım cihazında sayım yapıldı.
- Çıkan sonuca göre gerekli sulandırma yapıp içerisinde % 10 FBS ve % 1 antibiyotikli medium bulunan 75 cm²'lik her bir hücre kültürü flaskına 10⁸ hücre düşecek şekilde aktarıldı ve inkübasyona bırakıldı (Şekil 7 ve 8).



Şekil 7. Hücrelerin subkültür yapılması



Şekil 8. Hücrelerin inkübasyona bırakılması

3.2.5. Çoğaltılan Hücreslerin 96 ve 6 Kuyucuklu Plakalara Aktarılması

Hücresler subkültür yapıldıktan sonra çoğalmaları için 37 °C'lik % 5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Hücreslerin morfolojik ve sayısal kontrolleri ışık mikroskobunda yapıldı. Ayrıca mediumun renk değişikliği, bulanıklığı ve kontaminasyon olup olmadığı sıklıkla kontrol edildi. Hücresler flask yüzeyini kapladıkları zaman (% 80 yoğunluk) aşığıdaki işlemler uygulandı.

- Flask içerisindeki medium uzaklaştırıldı ve ardından hücre yüzeyi % 0.25 lik Tripsin-EDTA ile yıkandı.
- Yıkama işleminde sonra flaska 5 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C'lik etüvde birkaç dakika bekletildi.
- Yüzeyden kalkan hücelere 5 mL medium eklenip pipetleme yapıldı ve 2500 rpm de 5 dk santrifüj işleminde uygulandı.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılarak mediumla resüspanse edildi. Resüspanse olan hücelerden 20 µl alınıp ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 20 µl tripan mavisi eklendi.
- Hücre+ tripan mavisi karışımı hücre sayım cihazının lamına aktarılıp cihazda sayım gerçekleştirildi.
- Sayımdan sonra gerekli sulandırma yapılarak 96 kuyucuklu plakaya 3x10⁴ hücre/kuyu, 6 kuyucuklu plakaya ise 3x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
- Plakalara aktarılan hücelerin zemine tutunabilmeleri için 37 °C'lik % 5 CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı.

Hücre Canlılık Testleri

3.2.6. WST-1 Testi

WST-1 testi, sarı renkli tetrazolyum maddesinin canlı hücelere tarafından koyu kırmızı renkli formazana dönüştürülmesi esasına dayanarak canlı hücre sayısını analiz etmeye yarayan spektrofotometrik bir yöntemdir. WST solüsyonlarının canlı veya apoptozun erken evresindeki hücelere mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolyum halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. Böylece renk ayırımının yoğunluğına göre canlı/ölü hücre sayısının tespiti

yapılabilmektedir. WST-1 testi, üretici firmanın belirttiği protokole göre aşağıdaki şekilde uygulandı (Sigma, 2019a):

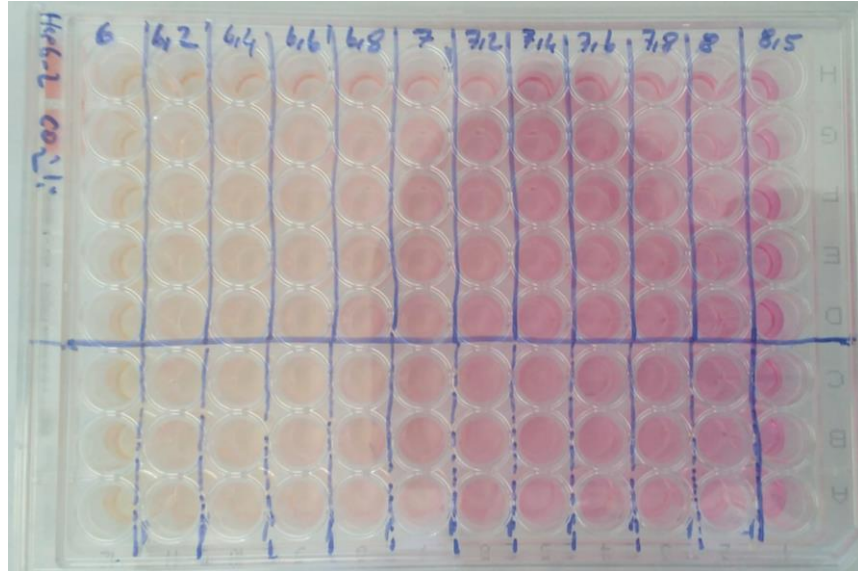
- Hücreler 100 µL kültür ortamı içeren 96 kuyucuklu steril hücre kültürü mikropalakaya, hücre yoğunluğu her bir göz başına 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve mikropalaka tabanına tutunabilmeleri için 37°C'lik CO₂'li etüvde 24 saat bekletildi.

- Hücrelerin muamele edileceği vasat pH'ları NaOH ve 1.2 N HCl kullanılarak medium pH değerlikleri 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.5 olarak ayarlandı ve 0.22 µm şırınga ucu filtre ile süzülerek steril hale getirildi.

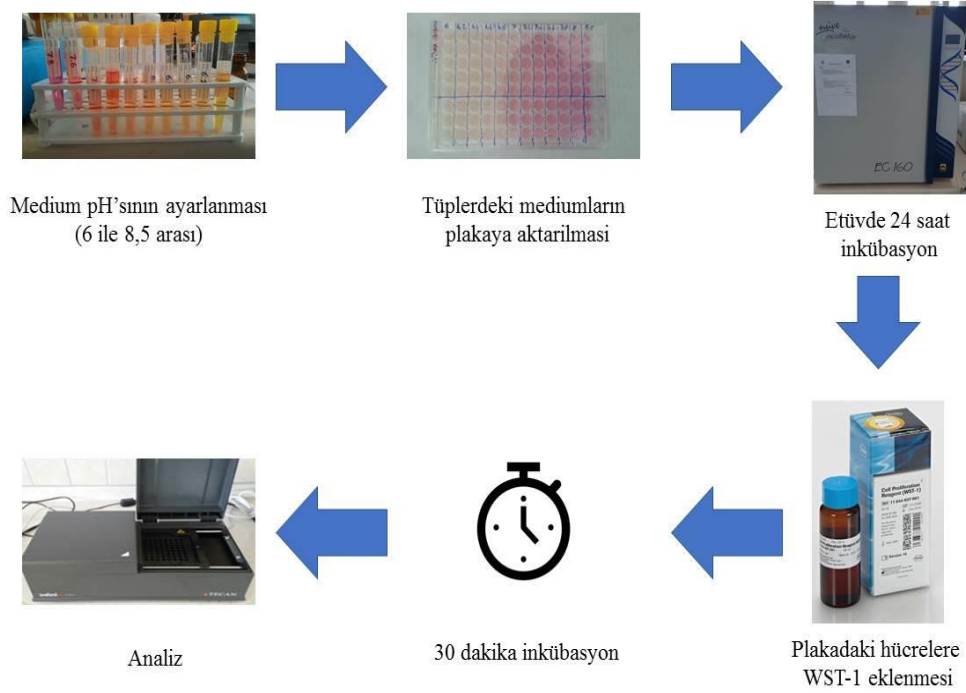
- Ertesi gün hücrelerin mediumu uzaklaştırıldı ve hücreler 6.0-8.5 pH aralığında ayarlanan 12 farklı pH değerine sahip vasat ile 24 saatliğine ve 3 tekrar olacak şekilde inkübe edildi (Şekil 9).

- 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğun üzerine 10 µL WST-1 bileşiği pipet yardımı ile eklendi ve ardından orbital karıştırıcıda bir dakika boyunca karıştırılan hücreler 30 dk boyunca 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücre olmaksızın WST-1 eklenmiş besi yeri negatif kontrol olarak kullanıldı.

- İnkübasyon sonrasında absorbans değeri 450 nm, referans dalga boyu 620 nm'ye ayarlanmış mikropalaka okuyucu kullanarak ölçüm yapıldı (Şekil 10).



Şekil 9. 6.0-8.5 pH aralığında ayarlanan mediumların HepG2 hücrelerine uygulanması



Şekil 10. WST-1 testi uygulanması

- Farklı pH değerlerindeki yüzde canlı hücre tespiti aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

- Hücre canlılık oranı = $(A_{test} - A_{blank} / A_{kontrol} - A_{blank})$
- %Hücre canlılık oranı = $(A_{test} - A_{blank} / A_{kontrol} - A_{blank}) \times 100$
- A_{test} = Test grubunun absorbanı
- $A_{kontrol}$ = Kontrol grubunun absorbanı
- A_{blank} = Blank grubunun absorbanı

3.2.7. Tripan Mavisi Testi

Tripan mavisi üretici firmanın belirttiği protokole göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Sigma, 2019b):

- pH'ları WST-1 test sonuçlarına göre ayarlanmış mediumlar 50 ml falkon tüplerde hazırlandı (Şekil 11).
- pH'ları ayarlanmış mediumlar süzme işlemi için laminer kabin içerisine alındı ve 0.22 µm şırınga ucu filtre ile süzülerek steril hale getirildi (Şekil 12).

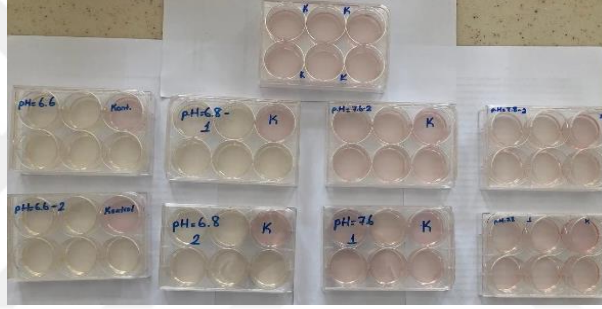
▪ Kuyu başına 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılan 6 kuyucuklu plakaya yine kuyu başına 2 mL pH'sı ayarlanmış vasat ile 24 saatliğine ve 3 tekrar olacak şekilde inkübe edildi (Şekil 13). İnkübasyon öncesi ve 24 saatlik inkübasyon sonrası invert mikroskop altındaki görüntülerinin fotoğrafları çekildi.



Şekil 11. pH'ları ayarlanmış mediumlar



Şekil 12. Mediumların steril hale getirilmesi



Şekil 13. Mediumların 6 kuyucuklu plakaya aktarılması

- İnkübasyon sonunda hücrelerin mediumları laminer kabin içerisinde uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılması için 1 mL tripsin-EDTA ile yıkandı.
- Daha sonra 750 μ L tripsin eklenip 37°C'lik etüvde birkaç dakika bekletildi.
- Bu işlemden sonra invert mikroskop altında hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi.
- Hücreler plaka yüzeyinde kalktıktan sonra 750 μ L vasat eklendi ve pipetleme işlemi yapıldı.
- Her bir gözde bulunan hücreler 1.5 ml'lik ependorfa aktarıldı ve 2500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi.
- Hücreler ependorfun dibine çökünce üzerindeki süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 750 μ L vasat eklenerek resüspanse edildi.
- Homojenize edilmiş vasattan 20 μ L alınıp steril ependorfa aktarıldı ve üzerine 20 μ L tripan mavisi eklendi.

- Elde edilen karışımdan 20 µl alındı ve hücre sayım cihazında hücre sayım işlemi gerçekleştirildi (Şekil 14).



Şekil 14. Hücre sayım cihazı ve sayım işlemi

3.2.8. İstatiksel Değerlendirme

Üç tekrarlı sitotoksisite denemelerinden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS v 21 base lisanslı istatistiksel analiz programı yardımıyla yapıldı. Elde edilen tüm veriler ortalama \pm S.E (Standart hata) olarak alındı. Elde edilen verilere normalite testi Shapiro-Wilk testi ile yapıldı ve bütün veriler normal dağılım gösterdiğinden, veri ortalamalarının karşılaştırılmasında parametrik yöntem olan tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ve sonrasında (post hoc) Tukey ve Dunnet testleri uygulandı. İstatiksel değerlendirme ve veriler arasındaki farkın önem derecesi $p \leq 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

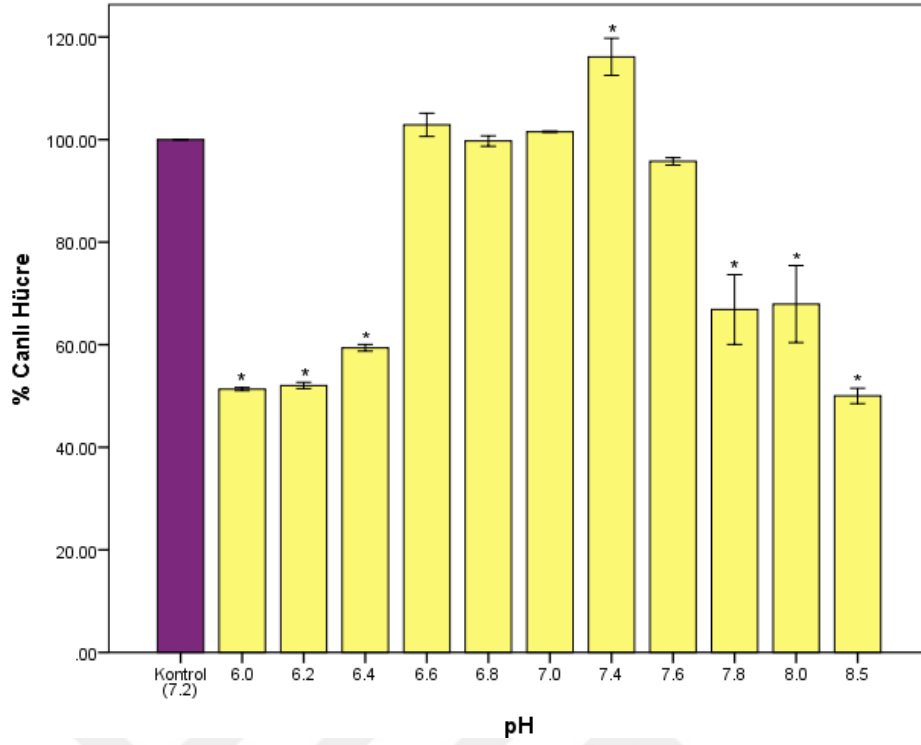
4.1. pH'sı Değiştirilmiş Mediumların HepG2 Hücre Hattı Üzerindeki In vitro Sitotoksik Etkisinin WST-1 Testi İle Belirlenmesi

Çalışmamızın ilk kısmında 96 kuyucuklu plakada gerçekleştirilen WST-1 testinden elde edilen absorbans değerlerine göre hesaplanan hücre canlılığı % değerleri Şekil 15 ve Tablo 1'de gösterilmiştir. Medium pH'sı 7.2 olan (kontrol) gözlerdeki hücre sayısı ile medium pH'sı 7 olan gruptaki hücre sayıları karşılaştırıldığında ise yakın bir değer elde edilmiştir. Medium pH'sı 6.6 ve 6.8 olan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücrelerin proliferasyon yeteneklerinde bozulma olmadan çoğalabildikleri gözlemlenmiştir. Medium pH'sı azaldıkça (pH 6.4, 6.2, 6.0) hücre canlılığında istatistiksel olarak önemli olan azalma saptanmıştır ($p<0.05$). Kontrol pH'sına yakın değerlikte olan pH 7.4'te hücre canlılığı kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0.05$). Alkali gruplarda pH 7.6'dan itibaren azalma gözlemlenmiş olup bu gruplardan pH 7.8, pH 8.0 ve pH 8.5 olan gruplarda hücre canlılığı açısından önemli bir azalma saptanmıştır ($p<0.05$).

Bu sonuçlara göre hücrelerin üremeye devam ettiği ve kontrol grubuna (pH 7.2) yakın olan ikişer asidik (pH 6.6 ve 6.8) ve alkali (pH 7.6 ve 7.8) pH grubu sayısal veri elde etmek için Tripan Mavisi testi uygulanmıştır.

Tablo 1. Hücre Canlılığında pH'ya Bağlı % Değişim Oranları

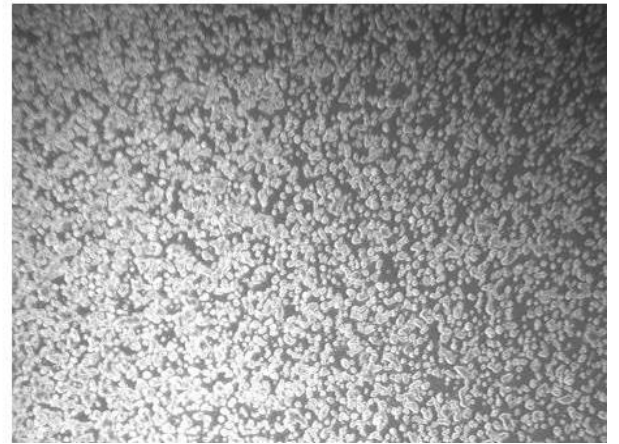
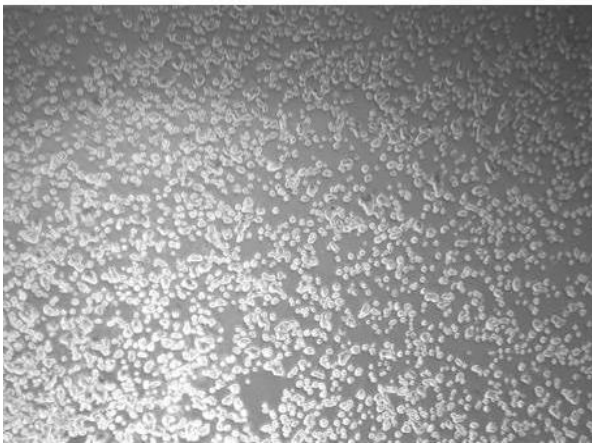
Medium pH Değeri	% Hücre Canlılığı
6	51,35
6.2	52,04
6.4	59,40
6.6	102,88
6.8	99,71
7	101,52
7.2	100
7.4	116,13
7.6	95,75
7.8	66,86
8	67,92
8.5	50,02



Şekil 15. Medium pH'sı değiştirilmiş HepG2 hücrelerinde WST-1 analiz sonuçları. * Kontrole göre fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). % canlı hücre ortalama \pm standart hata (S.E.) olarak verilmiştir.

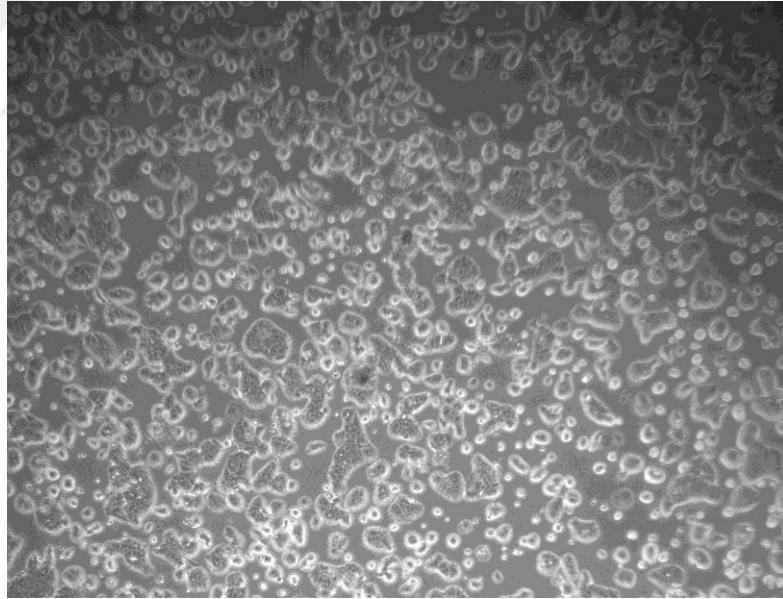
4.2.Çoğaltılan Hücrelerin Adaptasyon ve pH'sı Değiştirilmiş Mediumlar ile İnkübasyon Sonrası 6 Kuyucuklu Plakalardaki Mikroskopik Görüntüleri

Başlangıçta 6 kuyucuklu plakaya 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılan hücreler adaptasyon süreci için 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerin morfolojik görüntüleri invert mikroskop altında çekildi (Şekil 16).

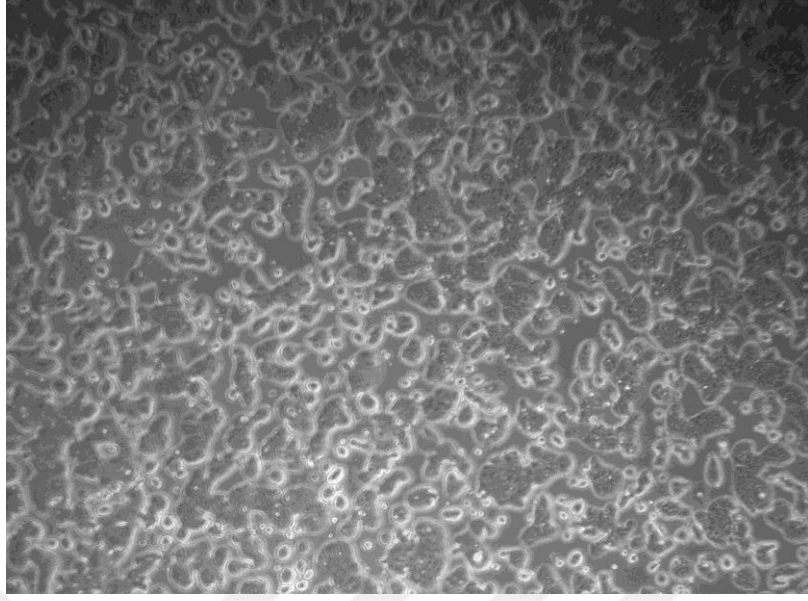


Şekil 16. 6 kuyucuklu plakada adaptasyon için 24 saat inkübe edilen HepG2 hücrelerinin farklı sahalardan mikroskopik görüntüsü (büyütme,x80)

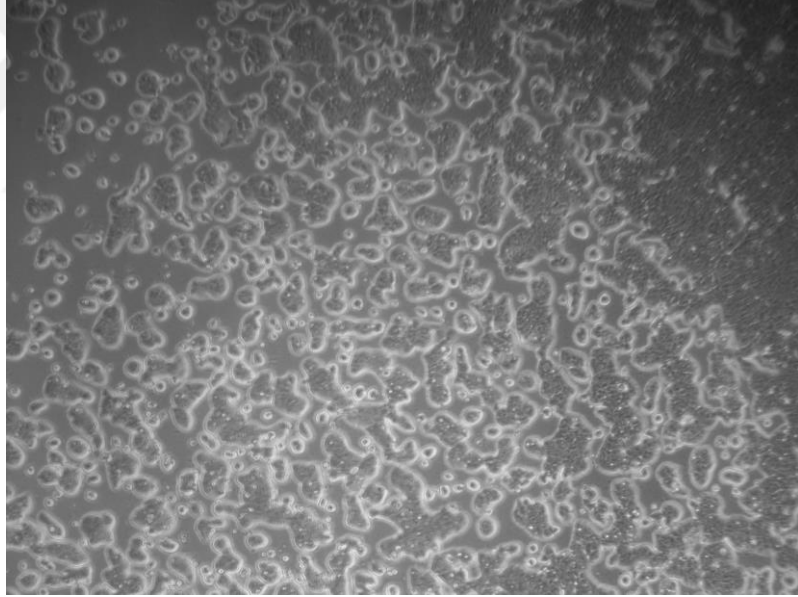
Medium pH'sı 6.0-8.5 aralığında tutulan HepG2 hücrelerine WST-1 testi uygulanmış ve % canlı hücre oranları değerlendirildi. HepG2 hücre hattı üretilirken kullanılan MEM mediumu için üretici firmanın önermiş olduğu pH 7.2 kontrol grubu olarak tutuldu. WST-1 testi sonuçlarına göre kontrol grubu ile kıyaslandığında maksimum proliferasyonun olduğu iki asidik pH (6.6 ve 6.8) ve minimum proliferasyonun olduğu iki alkali pH (7.6 ve 7.8) değerleri olmak üzere 4 farklı pH grubu belirlendi. Bu gruplara ait plakalara dağıtılan ve adaptasyon sonrası mediumları, pH'sı ayarlanmış mediumlarla değiştirilen hücrelerin 24 saatlik inkübasyon sonrasında mikroskop altında morfolojik incelemeleri yapıldı. Kontrol grubuna göre asidik pH (6.6 ve 6.8) ortamında inkübe edilen hücrelerin daha fazla adacık görünümüne ulaştığı ve hücreler arası boşluğun azalarak proliferasyon oranının arttığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile alkali pH (7.6 ve 7.8) ortamında çoğaltılan hücreler kıyaslandığında ise hücrelerin morfolojik olarak bozulduğu, hücreler arası boşlukların fazlaştığı ve proliferasyon oranının azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 17-21)



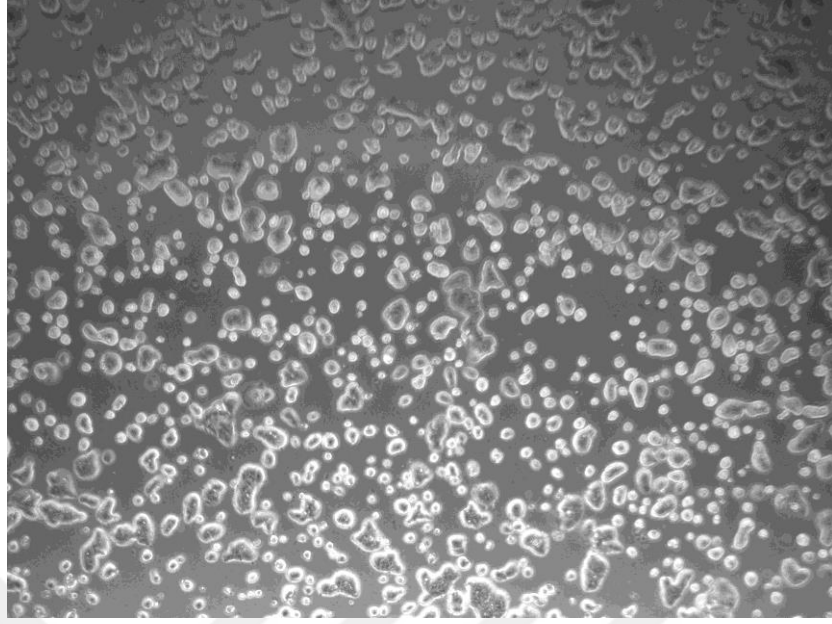
Şekil 17. pH 6.6 olan mediumda 24 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (büyütme, x80)



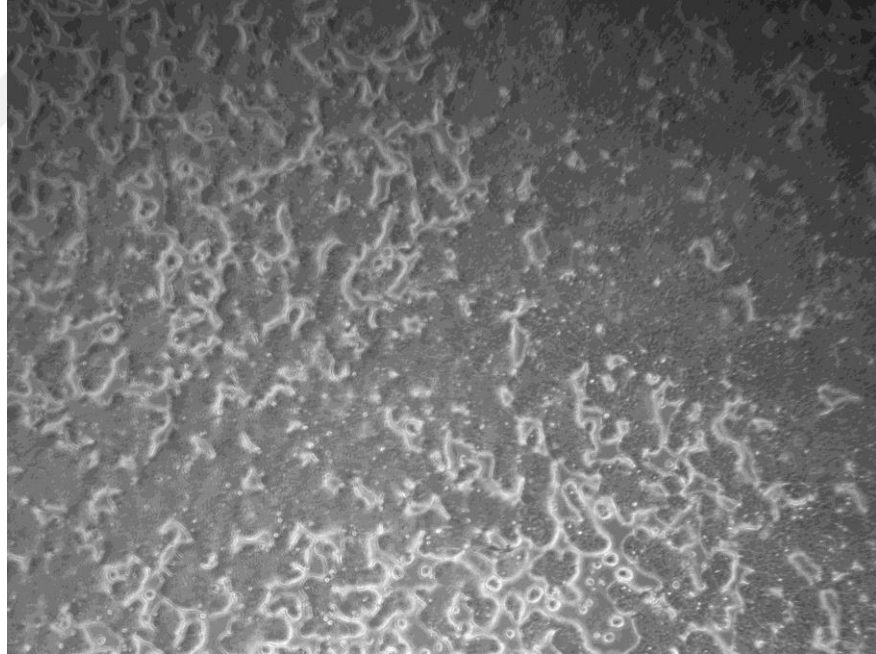
Şekil 18. pH 6.8 olan mediumda 24 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (büyütme,x80)



Şekil 19. pH 7.2 olan mediumda 24 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (büyütme,x80)



Şekil 20. pH 7.6 olan mediumda 24 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskobik görüntüsü (büyütme,x80)



Şekil 21. pH 7.8 olan mediumda 24 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskobik görüntüsü (büyütme,x80)

4.3. pH'sı WST-1 Sonuçlarına Göre Belirlenmiş Olan (pH 6.6, 6.8, 7.6, 7.8) Mediumların HepG2 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Tripan Mavisi Testi İle Belirlenmesi

Morfolojik değerlendirmeden sonra hücelere Tripan Mavisi testi uygulanarak canlı/ölü hücre sayıları hesaplandı (Tablo 2).

Tablo 2. Asit ve alkali pH'lardaki HepG2 hücrelerinin proliferasyon oranlarının Tripan Mavisi testine göre analizi

pH	Canlı Hücre Sayısı (Ortalama ± Standart Hata)
6.6	2.007.866,67 ± 132460.63 ^a
6.8	1.802.400,00 ± 72549.81 ^{a,b}
7.6	1.604.000,00 ± 87090.81 ^b
7.8	1.161.066,67 ± 103052.11 ^c
Kontrol (7.2)	1.903.986,67 ± 63017.82 ^{a,b}

^{a,b,c} Aynı sütundaki gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$)

Tripn Mavisi testi sonuçlarına bakıldığında pH 6.6'da hücre sayısında kontrol grubuna göre sayısal artış gözlemlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). Medium pH'sı 6.8 olan grup ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında düşüş belirlenmiş olup, aradaki farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlar aynı gruplar için WST-1 testi ile karşılaştırıldığında pH 6.6 (% hücre canlılığı 102,88) ve pH 6.8 (99,71) ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Alkali grup olan pH 7.6'da kontrol grubuna göre canlı hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir ($p > 0.05$). Bir diğer alkali grup pH 7.8'de ise hücre sayısında belirgin bir azalma tespit edilmiş olup bu azalma istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Medium pH'sı 7.6 ve 7.8 olan alkali grupların WST-1 testinden elde edilen hücre canlılığı sonuçları (canlılık pH 7.6 için % 95.75 ve pH 7.8 için % 66.86) tripan mavisi testinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında benzerlik göstermektedir.

5.TARTIŞMA

Warburg etkisi (aerobik glikoliz), oksijen varlığında dahi yüksek glikoliz nedeniyle anormal metabolizma sergileyen kanser hücrelerinin tipik bir özelliğidir. Artmış glikoz alımı ve laktat üretimi ile tümör büyümesini kolaylaştırabilen Warburg etkisi, günümüzde kanserin ayırıcı bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu etkinin metabolik bir sonucu olarak şekillenen tümör mikro-çevresi düşük glikoz, yüksek laktat konsantrasyonu ve düşük ekstrasellüler pH ile karakterizedir. Düşük ekstrasellüler pH ve hipoksik ortam tümörlerde çoklu mekanizmaların aracılık ettiği metastaz ve invazyonu indükleyerek, tümör büyümesi ve gelişmesini etkiler. Bu mekanizmalar arasında nokta mutasyonu, gen amplifikasyonları ve delesyonlara bağlı olarak şekillenen metastaz supresör genlerin inaktivasyonu, genomik instabilite, metastatik yolaktaki görevli genlerin ekspresyonunun artırılması yer almaktadır. Örneğin hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF1 α)'in aracılık ettiği kompleks gen ekspresyon programını aktive ederek glikolizisın up-regülasyonuna ve sonuçta laktik asit ve CO₂ üretiminin artmasına neden olur. Ayrıca düşük hücre dışı pH, apoptozu tetikleyen hücre içi ortamı da olumsuz yönde etkileyebilir. (Rofstad, 2000; Swietach ve ark., 2007). Tümör hücrelerinin mikro-çevresinin asidik olması kemoterapi ve radyoterapiye direnci artırırken anti tümör immün yanıtın azalmasına ve cerrahi müdahalelerden sonra sağ kalım oranını düşürerek prognozunu kötü olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle son yıllarda kanser prognozunda bu denli öneme sahip olan tümör mikro-çevresi ve bu mikro-çevreye sebep olan metabolik yolak hedefli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Bu sürecin kontrolünün anlaşılması, kanser tedavisi için potansiyel hedeflerin belirlenmesinde oldukça önemlidir (Lacroix ve ark., 2018).

Bu çalışmada kanser asidik mikro-çevresini taklit etmek için HepG2 hücreleri asidik büyüme ortamında çoğaltılarak hücrelerin proliferasyonuna etkisi değerlendirildi. WST-1 testinden elde edilen sonuçlara göre medium pH'sı azaldıkça hücre canlılığı kontrol grubuna göre yakın veya artmış olarak saptanırken, pH 6.4'ten itibaren canlı hücre sayısında önemli bir azalma belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu sonuca göre pH 6.6'dan daha düşük olan medium pH'larında hücrelerin yarıdan fazlasının öldüğü gözlemlenmiştir. *In vivo* ortamda çeşitli tümörlerin ekstrasellüler pH'larının 6.6 ile 7.0 aralığında değiştiği bildirilmiştir (Hao ve ark., 2018). WST-1 testinden elde ettiğimiz

sonuçlar literatürdeki bu bilgiyle paralellik göstermiştir. Bu nedenle çalışmanın ikinci kısmında tripan mavisi testinde, pH 6.6'dan daha asidik değerler için hücre sayımı yapılmamıştır. Tripan mavisi testinden elde ettiğimiz sonuçlarda pH 6.8'de hücre canlılığı oranları kontrol grubuna benzerlik gösterirken pH 6.6'da hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. Çalışmamızda taklit edilen asidik mikro-çevrenin hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Hücre proliferasyonu ve enerji metabolizmasında görevli olan İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) hepatosellüler karsinomada overeksprese olan onkolojik bir faktördür. Birçok kanser tipinde miRNA'lar supresör gen olarak görev almaktadır. Bunlardan miR-342-3p'nin hepatosellüler karsinom hücrelerinde, IGF-1 aracılı nude farelerde ve *in vitro* hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında (HepG2 ve MHCC97H); hücre proliferasyonunu, glikoz alımını, laktat oluşumunu, ATP üretimini ve hücre dışı asitleşme oranını azalttığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, alışma sonucunda miR-342-3p'nin HCC'deki Warburg etkisini düzenleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2018).

Kanser biyolojisi, metastaz, anjiyenez, invazyon, migrasyon ve proliferasyon gibi birbiri ile ilgili birden fazla basamaktan oluşan kompleks olaylar dizisini içerir. Başlangıçta hücrelerin yeterli düzeyde proliferere olup tümörün belli bir büyüklüğe ulaşması gereklidir. Bu aşamadan sonra yeni damar oluşumunu uyarırlar ve primer tümör dokusundan ayrılarak kan damarlarına doğru lokal invaziv göç, intra ve ekstrasvazyonun ardından uzak dokuları işgal ederler (Lu, 2019).

Tümör progresyonunun erken evrelerinde, hücre dışı asitlik, invazyonla ilgili reseptörleri, sinyal proteinlerini, transkripsiyon faktörlerini, sitokinleri, hücre döngüsü kontrolünü ve çoğalmasını kodlayan yüzlerce genin modülasyonu yoluyla gen ekspresyonunu etkileyerek daha kötü huylu bir hücre fenotipine yol açar (Rofstad ve ark., 2006; Moellering ve ark., 2008; Fukamachi ve ark., 2013).

Rofstad ve ark., (2006), melanom hücre hatlarını (A-07, D-12, ve T-22) pH 6.8 ve pH 7.4 olmak üzere iki farklı ortamda kültüre etmişlerdir. Kültür sonrası hücreleri atimik nude farelere kuyruk venasından enjekte ederek enjeksiyon sonrasında pulmoner metastazı değerlendirmişlerdir. Çalışmada asidik ortamda kültüre edilen melanom hücrelerinin farelerde proteolitik enzimlerden olan matriks metallo proteinaz-2 ve 9

(MMP-2 ve MMP-9), katepsin B ve L'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak pulmoner metastazı artırdığını bildirmişlerdir.

Fibroblast hücre kültüründe (HS27) yüksek laktat miktarına bağlı olarak mikro çevrede hücre hareketliliğini kolaylaştıran glikozaminoglikan yapısındaki hyalüronik asit ve hücre adhezyonu ve migrasyonunda rol oynayan CD44 transmembran reseptörü ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Asidik mikro-çevrede yüksek oranda bulunan laktatın hyalüronik asit ve CD44'ün miktarını artırdığını ve bunların invazyon ve metastaz sürecine katkıda bulunabileceği görülmüştür (Stern ve ark., 2002). Malign melanom hücre hattında (A375) laktatın taşınmasına aracılık eden monokarboksilat taşıyıcısı (monocarboxylate transporter-MCT) 1 ve 4 ile etkileşimde olan transmembran glikoproteinlerinden CD147'nin sentezinin baskılanması, kanser hücrelerinin glikolizis oranı, ATP üretimi ve hücre dışının asitleşmesini önleyerek hücre proliferasyonunu ve metastazı azaltmıştır (Su ve ark., 2009).

Normal dokularda proliferasyon ve ölüm arasındaki denge hücreler arası iletişim yoluyla sağlanarak hücre homeostazisi korunur. Normal hücre davranışının ve doku homeostazinin devam ettirilmesinde ekstrasellüler matrisin önemli rolü vardır. Normal dokularda organ homeostazinin sürdürülmesi stabil doku yapısını koruyarak neoplastik transformasyona dönüşümü engeller. Stabil doku yapısının şekillenmesinde sıkı birleşme proteinleri ile $\beta 1$ integrinler ve epithelial (E)-cadherin gibi adezyon molekülleri görev alır (Johanna ve ark., 2009). E-cadherin tümör baskılayıcı bir hücre adhezyon molekülüdür. E-cadherin'in down-regülasyonu, tümör hücrelerinin artmış migrasyon ve invazyonu ile ilişkilendirilmiştir. HepG2 hücrelerinin medium pH'sının 6.6'ya düşürülmesi, E-cadherinin fosforilasyonuna neden olarak inaktivasyonuna, bu da hücre-hücre bağlantılarının ayrılmasına yol açmaktadır. Asidik mediumun hücre adhezyon moleküllerinin yapısını değiştirerek tümör hücrelerinin metastazını ve invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2009).

İlginç olan bir yaklaşımla kanser biyolojisi ekolojik ve evrimsel bir süreç olarak görülmektedir. Bu bağlamda kanser hücrelerinde yaygın olarak gözlemlenen tüm fenotiplerin, özellikle de artmış glikoz metabolizması ve bunun sonucunda interstisyel asidozun, tümör hücresi proliferasyonunu destekleyen evrimsel bir avantaj sağladığı vurgulanmaktadır. Dahası, bölgesel asidoz, doğada yaygın olarak gözlemlenen, bitkilerin ve hayvanların kendi büyümelerini ve hayatta kalmalarını teşvik eden

şekillerde çevrelerini değiştirdiği ve/veya rakiplerinin değerini azalttığı “**Alan Açma Mühendisliği (niche engineering)**” olarak görölmektedir. Bu stratejik yaklaşım ise asit-aracılı invazyon hipotezinin temelini oluşturmaktadır (Gatenby ve ark., 2006; Gatenby ve Gillies, 2008; Gillies ve ark., 2012). Bu modele göre kanser hücreleri evrimsel süreçte, hücre içi pH düzenlenmesinde rol alan sistemlerin ekspresyonunu değiştirerek asidik ortama adapte olurlar. Bu sistemlerden en önemlileri Sodyum/Hidrojen değiş tokuş sistemi-1 (NHE-1) ve karbonik anhidraz-9 (CA-IX)’dur. Bu bağlamda, kanser hücrelerinde pH-düzenleyici proteinlerin, hücreSEL pH değişikliklerinin yaratılması yoluyla hücre migrasyonundaki rolleri önemlidir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinin evrimsel kapasitesine sahip olmayan normal memeli hücreleri, asidik pH'ya uzun süre maruz kalmaya tolerans gösteremezler (Cardone ve ark., 2005; Lou ve ark., 2011; Svastova ve ark., 2012). Çalışmamızda HepG2 hücrelerinin asidik mediumda göstermiş oldukları artmış proliferasyon davranışı, asit-aracılı invazyon hipotezine bağlı olarak gelişen “Alan Açma Mühendisliği”nin başlangıç safhası olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda medium pH’sı kontrol grubuna göre alkalileştike her iki test sonucuna göre hücre canlılığında azalma saptanmıştır. Özellikle pH 7.8’de belirlenen azalma hem WST-1 hem de tripan mavisi testinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Alkali ortam kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır. Benzer şekilde Trived ve ark. (2018), çalışmasında alkali pH’daki artış meme kanseri hücrelerinin (MDA-MB-231) canlılığında azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca, neem ağacı (*Azadirachta indica*) ekstraktı ile alkali pH’ın kombine şekilde uygulanması, doz ve pH artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe sebep olmuştur.

Tümör mikro-çevresinin pH’sı sodyumbikarbonat (NaHCO_3) uygulaması ve alkali diyetle besleme gibi yöntemlerle yükseltildiğinde tümörlerin davranış profillerinde değişiklik olduğunu vurgulayan *in vivo* ve *in vitro* alışmalar bulunmaktadır. İmmun yetersizliği olan farelerde deneysel olarak metastatik adenokarsinom (MDA-MB-231) hücre enjeksiyonu ile oluşturulan meme kanser modelinde oral olarak uygulanan bikarbonat tedavisinin metastaz insidansını azalttığı tespit edilmiştir. Aynı araştırıcılar PC3M hücreleri ile oluşturulan prostat kanser modelinde de tümör mikro-çevresinin oral bikarbonat uygulaması ile alkali hale getirilip metastaz oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir (Robey ve ark.,2009). Epidermal büyüme

faktörü (EGFR) mutasyonlu küçük hücreli dışı akciğer kanserli 11 hastada standart tedavi dozuna göre düşük doz EGFR inhibitörlerine (gefitinib, erlotinib, afatinib) ek olarak hastalara alkali diyet rejimi uygulanmıştır. Hastalar uzun süreli takibe alındıklarında benzer hasta popülasyonlarında bildirilen sağkalım (progresyonsuz sağkalım 9.2 ay, genel sağkalım 18.6 ay), sürelerine göre uzun süreli progresyonsuz (19.5 ay) ve genel sağkalım süresi (28.5 ay) uzamıştır. Araştırmacılar ileri akciğer kanseri hastalarında uygulanan alkali diyetin tedaviyle ilgili olumlu sonuçlar alınabileceğine dair klinik kanıt olduğunu vurgulamışlardır (Hamaguchi ve ark., 2017)

Asidik mikro-çevrede tümöre karşı gelişen immün yanıt da değişmektedir. Yuan ve ark., (2016), yaptıkları çalışmada HepG2 hücrelerini, HCC hastalarının kanından izole ettikleri sitokinle uyarılmış katil hücreler (CIK) ile pH'sı 6.5 ve 7.4 olan medium ortamında kültüre etmişlerdir. MTT ve floresan testlerinden elde ettikleri sonuçlarda HepG2 hücrelerinin canlılığı ve proliferasyon oranının pH 7,4' te pH 6,5'e oranla önemli düzeyde azaldığını tespit etmişlerdir ($p < 0.05$). CIK hücrelerinin HepG2 hücrelerine karşı antitümör aktivitelerinin asidik ortamda % 35 düzeyinde azaldığı bildirilmiştir. Asidik mikro-çevrenin NaHCO_3 ile nötralize edilmesi CIK hücrelerinin HepG2 hücrelerine karşı aktivitesini artırmıştır.

Çoğu antikanser ilaç hücre içine aktif veya pasif transport yoluyla girdiğinden tümör pH değişiklikleri tedavi açısından da önem taşımaktadır. Bu nedenle ilaçların sitotoksik etkinliği hem hücre içi pH hem de hücre dışı pH'ya bağlı olabilmektedir (Stubbs ve ark.,2000). Tümör dokusunda pH düzenleyicilerinin (NHE ve MCT gibi) ekspresyon profili de farklıdır. Çeşitli lipofilik antikanser ajanların hücre içi birikiminin, hücrel pH gradyanı tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, pH değişikliklerindeki bu fark, seçici kanser kemoterapisi için temel sağlayabilmektedir (Izumi ve ark., 2003).

Son yıllarda tümör mikro-çevresinin nanopartiküllerle alkalileştirilmesi ve partiküllerin hücre hatlarındaki sitoksisitesinin değerlendirmesi yönündeki çalışmalara yoğun bir ilgi vardır. Alüminyum oksihidroksit, magnezyum ve kalsiyum hidroksit bazlı nanopartiküllerin antitümör özelliklere sahip olduğu, bu etkinin hücrelerin mikro-çevre pH değişimlerine bağlı olarak metabolik süreçlerinin değişmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin, kanser hücrelerine, normal hücrelere nazaran daha fazla sitotoksositeye sahip olduğu gösterilmiştir (Lozhkomoev, 2017).

Asidik tümör mikro-çevresine duyarlı nanoparçacıkların gelişimindeki son gelişmeler, asidik ve hipoksik ortamdan kaynaklanan dezavantajları değiştirerek kanserle mücadele için umut verici stratejiler sunmaktadır (Feng ve ark., 2017; Xia ve ark.,2018).



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı geliştirdiği mekanizmalardan biri de ekstrasellüler pH'larının normal hücrelere oranla asidik olmasıdır. Asidik mikro-çevre kanser hücrelerinin proliferasyon, metastaz ve invazyon gibi malign özelliklerini artırmaktadır. Bu durum glikoz metabolizmasında son ürün olan laktat nedeniyle oluşmakta ve Warburg etkisi hipotezi adıyla anılmaktadır. Kanser bu özelliğinden faydalanılarak pH güdümlü ilaç salınım mekanizmaları geliştirilmekte ve mikro-çevre asiditesinin değiştirilmesine yönelik çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Asidik mikro-çevrenin mekanizmaları üzerine yapılacak olan çalışmalar kemoterapi ilaçlarının etkinliğinin artırılması, tümör davranışının değiştirilmesi ve malignite özelliğinin azaltılması ile kanser tedavisinde daha başarılı sonuçlar elde edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışmamızda, glikoz metabolizması sonucu oluşan asidik mikro-çevre taklit edilerek hücre proliferasyonu ve canlılık incelemesi yapılmıştır. Benzer şekilde alkali pH ortamında canlılık ve proliferasyon değerlendirilmiştir. Asidik mikro-çevrede hücre sayısında artış gözlenirken pH 6,4'ten itibaren daha kuvvetli asidik değerlerde hücre sayısında anlamlı olarak azalma saptanmıştır. Kontrol grubunun (pH 7,2) canlılık oranı ile karşılaştırıldığında pH 6.6'da hem WST-1 hem de tripan mavisi sonuçlarına göre bir artma olduğu tespit edilmekle birlikte bu artma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Ortam pH'sının yüksek asidik ve alkali derecelere sahip olması durumunda hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Hafif alkali gruplarda (pH 7,0, 7,4) hücrelerin kontrol grubuna göre benzer oranda çoğaldığı tespit edilmiştir. Daha alkali gruplarda ise giderek azalma ve pH 7,8'den itibaren bu azalmanın önemli olduğu bulgusu elde edilmiştir. Alkali ortamın, kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve canlılık oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle mevcut tedavi stratejilerine ek olarak fizyolojik sınırlar dışına çıkılmadan metabolik alkoloz riski de göz önünde bulundurularak mikro-çevrenin pH'sını yükselten tampon tedavilerinin yapılması tümör hücrelerinin davranışını değiştirerek tedaviye olumlu yanıt şansını artıracaktır. Kanser hücrelerinde karmaşık metabolik değişiklikler ve düzenleyici mekanizmaların açık bir şekilde anlaşılması kanser tedavisi için yeni terapötik ajanların ve etkili rejimlerin başarılı bir şekilde geliştirilmesi için esastır. Kanser hücrelerinin tercihli olarak öldürülmesi amacıyla bir strateji olarak glikolizin inhibisyonu ve anti kanser ajanlar olarak glikolitik inhibitörlerin geliştirilmesi, Warburg

hipotezine dayanan önemli araştırma alanlarındadır. Tümör mikro-çevresinin bir sonucu olarak değişen reseptör, sinyal proteini, transkripsiyon faktörleri, sitokinler, hücre döngüsü kontrolünü sağlayan genler düzeyinde daha ileri ve detaylı çalışmaların yapılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Altekruse SF, Henley SJ, Cucinelli JE, McGlynn KA. Changing hepatocellular carcinoma incidence and liver cancer mortality rates in the United States. *Am J Gastroenterol* 2014;109(4): 542–553.
- American Cancer Society 2005. Cancer Facts and FIGS. <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp>. Erişim Tarihi:18/11/2018
- Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity: A Predictable Risk to Our Actual World* 2018; <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- ATCC 2016. Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™) https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=tr, Erişim Tarihi:18/11/2018
- Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma* 2016; 3: 41–53.
- Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122(6):1609-1619.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians* 2018;65(6):394-424.
- Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A., Huang YH, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2017;389 (10064): 56-66.
- Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2016;150 (4):835-853.
- Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Recent advances in clinical practice* 2014;63(2):544-855.
- Cardone R.A, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nature Rev Cancer* 2005;5(10): 786–795.
- Chen Y, Chen CH, Tung PY, Huang SH, Wang SM. An Acidic Extracellular pH Disrupts Adherens Junctions in HepG2 Cells by Src Kinases-Dependent Modification of E-Cadherin. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 108:851–859
- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips

- AJ, Medzhitov R. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014;513(7519):559-563.
- Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick:metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev* 2008;18(1):54-61.
- Dehn P, White C, Connors D, Shipkey G, Cumbo T. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2004;40(5):172-182.
- Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* 2015;77-93.
- Dumas J, Brisson L, Chevalier S, Mahéo K, Fromont G, Moussata D, Besson P, Roger S. Metabolic reprogramming in cancer cells, consequences on pH and tumour progression: Integrated therapeutic perspectives with dietary lipids as adjuvant to anticancer treatment. *Seminars in Cancer Biology* 2017;43:90–110.
- Farazi P, DePinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis:from genes to environment. *Nature Publishing Group* 2006;6:674-687.
- Feng Q, Shen Y, Fu Y, Muroski ME, Zhang P, Wang Q, Xu C, Lesniak MS, Li G, Cheng Y. Self-assembly of gold nanoparticles shows microenvironment-mediated dynamic switching and enhanced brain tumor targeting. *Theranostics* 2017; 7(7): 1875–1889.
- Ferreira L. Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology* 2010;89(3):372-380.
- Fukamachi T, Ikeda S, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H. Gene expressions for signal transduction under acidic conditions. *Genes (Basel)* 2013; 4(1): 65-85.
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, Michaud M, Zischka H, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial gateways to cancer, *Mol Asp Med* 2010;31(1):1-20.
- Gatenby R, Gillies R. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:891-899.
- Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res.* 2006;66(10):5216-23.
- Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Rev Cancer* 2008;8:56-61.

- Gillies RJ, Verduzco D, Gatenby RA. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nature Rev. Cancer* 2012;12: 487–493.
- Gomez M, Donato M, Lahoz A, Castell J. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current Drug Metabolism* 2008;9(1):1-11.
- Hamaguchi R, Okamoto T, Sato M, Hasegawa M, Wada H. Effects of an Alkaline Diet on EGFR-TKI Therapy in EGFR Mutation-positive NSCLC. *Anticancer Res* 2017;37(9):5141-5145.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100 (1):57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–674.
- Hao G, Xu ZP, Li L. Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy. *The Royal Society of Chemistry* 2018;8:22182-22192018.
- Heiden M. Cantley, L. Thompson, C. 2009. “Understanding the Warburg Effect: The metabolic requirements of cell proliferation”. *National Institutes of Health* 2009;324(5930): 1029–1033.
- Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 2003;29: 541–549.
- Lu J. The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2019: <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09794-5>
- Johanna A. Joyce W, Jeffrey W. Pollard. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 239–252.
- Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox biol* 2017;12:833-842.
- Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 2013;13-89.
- Lacroix R, Rozeman EA, Kreutz M, Renner K, Blank CU. Targeting tumor-associated acidity in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67(9):1331-1348.
- Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells. *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):211-218.

- Liu C, Chen G, Zhng J, Li H, Sheng M, Guo S, Cancer cell membrane-cloaked mesoporous silica nanoparticles with a pH-sensitive gatekeeper for cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019;175:477-480.
- Liu J, Huang Y, Kumar A, Tan A, Jin S, Mozhi A, Liang X. pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances* 2014;32(4): 693-710.
- Liu W, Kang L, Han J, Wang Y, Shen C, Yan Z, Tai Y, Zhao C. miR-342-3p suppresses hepatocellular carcinoma proliferation through inhibition of IGF-1R-mediated Warburg effect. *OncoTargets and Therapy* 2018;11:1643–1653.
- Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, Kyle A, Auf dem Keller U, Leung S, Huntsman D, Clarke B, Sutherland BW, Waterhouse D, Bally M, Roskelley C, Overall CM, Minchinton A, Pacchiano F, Carta F, Scozzafava A, Touisni N, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.*2011;71: 3364–3376.
- Louis KS, Siegel AC, Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In *Mammalian cell viability*, Springer: 2011;740:7-12.
- Lozhkomoev AS. Alkalization of Tumor Microenvironment for Cancer Treatment. *Physics of Cancer: Interdisciplinary Problems and Clinical Applications AIP Conf Proc* 2017;1882(1):10.1063/1.5001625
- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Bio* 2012;196(4):395-406.
- Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin. Exp. Metastasis* 2008;25:411–25.
- Navrátilová J, Hankeová T, Beneš P, Šmarda J. Acidic pH of tumor microenvironment enhances cytotoxicity of the disulfiram/Cu²⁺ complex to breast and colon cancer cells. *Chemotherapy* 2013;59:112-120.
- Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:767-777.
- Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41(1):49-61.
- Oudin MJ, Weaver VM. Physical and chemical gradients in the tumor microenvironment regulate tumor cell invasion, migration, and metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2016;81:189-205.

- Pinter M, Peck-Radosavljevic M. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2018;48(6): 598-609.
- Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?. *Cell Stem Cell* 2015;16(3):225-238.
- Prasad V, Jesus K, Mailankody S. The high price of anticancer drugs: origins, implications, barriers, solutions. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017;14:381-390.
- Qiu G-H, Xie X, Xu F, Shi X, Wang Y, Deng L. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology* 2015;67(1):1-12.
- Raghuhand N, Gillies R J. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resistance Updates* 2000;3(1):39-47.
- Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol* 2018;19:222-232.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability Assays. 2013: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/2019>.
- Robey I, Nesbit L. Investigating mechanisms of alkalinization for reducing primary breast tumor invasion. University of Arizona 2013; DOI:10.1155/2013/485196.
- Robey I, Baggett B, Kirkpatrick N, Roe D, Doseescu J, Sloane B, Hashim A, Morse D, Raghuhand N, Gatenby R, Gillies R. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases. *National Institutes of Health* 2009; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5575.
- Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006; 66:6699–6707.
- Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis. *International Journal of Radiation Biology* 2000; 76(5):589-605.
- Schwartz L, Seyfried T, Alfarouk K, Moreira J, Fais S. Out of Warburg effect: An effective cancer treatment targeting the tumor specific metabolism and dysregulated pH. *Seminars in Cancer Biology* 2017;43:134–138.
- Shestov A, Liu X, Ser Z, Cluntun A, Hung Y, Huang L, Kim D, Le A, Yellen G, Albeck J, Locasale W, Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux

through the enzyme GAPDH as a limiting step Alexander".eLife. 2014;3:e03342. DOI: 10.7554/eLife.03342.001:1-18.

Sigma Aldrich / Cell Proliferation WST-1
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=en®ion=TR&gclid=EAIaIQobChMIp9OX_9m54gIVjIGyCh1geAMaEAAYAiAAEgJndvD_BwE.Erişim Tarihi:18.03.2019.

Sigma. Cell Proliferation Reagent WST-1, Description.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=en®ion=TR>, 2019. Erişim Tarihi: 15.04.2019, a.

Sigma. Cell Culture Protocol 6: Cell Counting Using a Hemocytometer.
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>, 2019. Erişim Tarihi: 15.04.2019, b.

Stern R, Shuster, S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Experimental Cell Research* 2002; 276(1):24-31.

Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today* 2000; (1):15-19.

Su J, Chen X, Kanekura T. A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis. *Cancer Letters* 2009; 273(1):140-147.

Svastova E, Witarski W, Csaderova L, Kosik I, Skvarkova L, Hulikova A, Zatovicova M, Barathova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J Biol Chem* 2012; 287:3392–3402.

Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):299-310.

Thomas MB, Jaffe D, Choti MM, Belghiti J, Curley S, Fong Y, Gores G, Kerlan R, Merle P, O'Neil B, Poon R, Schwartz L, Tepper J, Yao F, Haller D, Mooney M, Venook A. Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the national cancer institute clinical trials planning meeting. *J Clin Oncol* 2010; 28(25): 3994–4005.

Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Perez-Cataldo G, Castell JV, Donato MT. HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol* 2013;87(6):1115-1127.

- Torre L, Siegel R, Ward E. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25(1):16-27
- Trived A, Ahmad R, Sahabjada, Misra A. Effect of alkaline pH on cytotoxicity profile of neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extract against human breast cancer cell line MDA-MB-231. *European Journal of Integrative Medicine* 2018;24:1-7.
- Uthaman S, Huh K, Park I. Tumor microenvironment-responsive nanoparticles for cancer theragnostic applications. *Biomaterials Research* 2018;22:1-11
- Vinken M, Rogiers V. Protocols in In-vitro Hepatocyte Research. *Methods Mol Biol* 2015;1250: 5-8.
- Xia F, Hou W, Zhang C, Zhi X, Cheng J, de la Fuente JM, Song J, Cui D. pH-responsive gold nanoclusters-based nanoprobe for lung cancer targeted near-infrared fluorescence imaging and chemophotodynamic therapy. *Acta Biomaterialia* 2018;68(1):308–319.
- Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC, Wang YL, Wang XS, Niu HT. Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol Res Treat* 2015;38(3):117-22
- Yuan YH, Zhou CF, Yuan J, Liu L, Guo XR, Wang XL, Ding Y, Wang XN, Li DS, Tu HJ. NaHCO₃ enhances the antitumor activities of cytokine-induced killer cells against hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Oncol Lett* 2016;12(5):3167-3174.
- Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine* 2016;241(15):1684-1698.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Neşe GÜVENALP

Doğum Yeri: Ordu/ Fatsa

Doğum Tarihi:25.02.1992

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans Mezuniyeti, Ondokuz Mayıs Üniversitesi/
Eğitim Fakültesi / Biyoloji Öğretmenliği /2016

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Atakum Koleji – 2016-Halen

E-posta: nguvenalp@gmail.com