

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE VE REJENERATİF TIP YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

WNT İNHİBİTÖRÜ PRI-724'ÜN PANKREAS KANSERİ
KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO
ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA AYDINOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. KEMAL ERGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
..... proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2021

KABUL VE ONAY

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Büşra AYDINOĞLU tarafından hazırlanan “Wnt inhibitörü PRI-724’ün pankreas kanseri kök hücre üzerine etkilerinin in vitro araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/12/2021

Üye (T.D) :	Prof. Dr. Kemal ERGİN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye :	Doç. Dr. Nuket ÖZKAVRUK ELİYATKIN	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir zaman hoşgörüsünü ve desteğini esirgemeyen, engin akademik bilgisiyle yoluma ışık tutan, bilgisine ve kişiliğine derin saygı duyduğum çok değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Kemal ERGİN' e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin akademik bilgileriyle yol gösteren hocalarım Sn. Prof. Dr. Filiz ABACIGİL, Sn. Prof. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya ARAL' a,

Tez çalışmasında kullanmış olduğumuz hücre hattını bizlere armağan ettiği için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinde öğretim üyesi olarak görev yapan Sn. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na,

Kök Hücre ve Akım Sitometri Laboratuvarında görev yapan, ilgisini ve nezaketini esirgemeyen, akım sitometri çalışmamda yardımcı olan Sn. Biyolog Ercüment ERDEM' e,

Tez çalışmamın deney aşamalarının kurulumu ve uygulanmasında her zaman yanımda olan, laboratuvar çalışmalarının büyük çoğunluğunu koordineli bir şekilde yürüttüğümüz, bilgisini, hoşgörüsünü ve desteğini esirgemeyen çok değerli arkadaşım Sn. Rahmi ÇETİNKAYA' ya, araştırma laboratuvarında malzeme, cihaz ve ekipman konusunda her zaman yardımcı olan Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik bölümü araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Lise sıralarında olduğu gibi tez çalışmam sürecinde de beni destekleyen, pes etmemem gerektiğini her fırsatta hatırlatan, İngilizce öğretmeni olmasına rağmen en az benim kadar bu tezi benimseyen canım dostum Semra ASLAN'a,

Hayatım boyunca beni koşulsuz seven sayan, bugünlere gelmemi sağlayan, desteklerini her daim hissettiğim canım annem Nihal AYDINOĞLU'na, canım babam Murat AYDINOĞLU'na ve canım kardeşim Erkan AYDINOĞLU'na,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1.Araştırmanın Tanımı ve Önemi	1
1.2.Araştırmanın Amacı	1
1.3.Araştırmanın Hipotezi.....	2
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Wnt Ailesi	3
2.1.1.Kanonik Wnt Sinyal Yolağı.....	4
2.1.2.Kanonik Olmayan Wnt Sinyal Yolakları	4
2.2.Kök Hücre	5
2.2.1.Kanser Kök Hücresi	7
2.2.2.Kanser Kök Hücrelerinde Rol Oynayan Sinyal Yolakları	10
2.3.Pankreas Kanseri.....	10
2.3.1.Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	11
2.3.2.Pankreas Kanserin Gelişme Sebepleri	13
2.3.3.Pankreas Kanserin Moleküler Patogenezi.....	14

2.4.Pankreas Kanserinde Wnt Sinyal Yolağının Rolü	15
2.5.Wnt İnhibitörü PRI-724'ün Rolü	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1.Hücre Kültürü.....	19
3.2.Hücrelerin Pasajlanması.....	19
3.3.Hücrelerin Dondurulması.....	20
3.4.Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözülmesi.....	20
3.5.Doğ Belirleme ve MTS/PMS deneyi.....	20
3.6.Flow Sitometri Analizi.....	21
3.7.Klonojenik Analizi	23
3.8.Tez kapsamında kullanılan malzeme ve ekipmanlar	23
4.BULGULAR	25
4.1.Hücre Kültürü Bulguları	25
4.2.Doğ Belirleme ve MTT Analizi	26
4.3.Flow Sitometri Analizi.....	28
4.4.Klonojenik Test.....	36
5.TARTIŞMA	39
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
BİLİMSEL ETİK BEYANI	49
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALDH:	Aldehit Dehidrogenaz
APC:	Adenomatöz Polipozis coli
ARID1A:	AT-rich Interactive Domain-Containing Protein 1A
ARID2:	AT-rich Interactive Domain-Containing Protein 2
ATM:	Ataxia-Telangiectasia
BCAT1:	Branched Chain Amino Acid Transaminaz 1
BMI1:	B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region Homolog 1
BRCA-1:	Breast Cancer Type 1
BRCA-2:	Breast Cancer Type 2
CBP:	CREB-binding Protein
Cdc42:	Hücre Bölünme Kontrol Proteini 42
CK1:	Kazein Kinaz 1
CDKN2A:	Cyclin-dependent Kinase 2A
Daam1:	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1
DM:	Diabetes Mellitus
DMEM:	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Mediumu
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
Dsh:	Disheveled
EKH:	Embriyonik Kök Hücre
FBS:	Fetal Bovine Serum
FKH:	Fetüs Kök Hücre
GSK3:	Glikojen Sentaz 3

HER2:	Human Epidermal Growth Factor Reseptor 2
Int-1:	Proto-onkogen Wnt-1
IPMN:	Intraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi
İHK:	İç Hücre Kütlesi
JAK/STAT:	Janus Kinases Signal Transducer and Activator of Transcription Factor
JNK:	c-Jun N-Terminal Kinase
KaKH:	Kanser Kök Hücre
KBH:	Kanser Başlangıç Hücreleri
KH:	Kök Hücre
KRAS:	Kirsten Rat Sarcoma Virus
LEF1:	Lymphoid-Enhancer Binding Protein
Lgr5:	Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein Coupled Receptor 5
LRP5/6:	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5
MCN:	Müsinöz Kistik Neoplazi
MLL3:	Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia Protein 3
MMP7:	Matrix Metalloproteinase-7
MSC:	Mezenkimal Kök Hücre
NFAT:	Nuclear Factor of Activated T Cells
OCT4:	Octamer-Binding Transcription Factor 4
PanIN:	Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi
PDAC:	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
Pen/Strep:	Penisilin /Streptomisin
PI3K:	Phosphoinositide 3-Kinase
PTEN:	Phosphatase and Tensin Homolog
Rac1:	Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1

RhoA:	Ras Homolog Gene Family Member A
ROCK:	Rho-associated Kinase
SMAD4:	Mothers against decapentaplegic homolog 4
STK11:	Serine/Threonine Kinase 11
TCF:	T-cell Factor
TE:	Trofoektoderm
tp53:	Tümör protein 53
YKH:	Yetişkin Kök Hücre
Wg:	Wingless

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Panc-1 hücre hattının inverted mikroskop görüntüleri.....	25
Şekil 2: PRI-724'ün doz belirleme sonuçları.	26
Şekil 3: Gemcitabine doz belirleme sonuçları.	27
Şekil 4: Gemcitabine,PRI-724 ve Gem+PRI-724 doz belirleme sonuçları.....	27
Şekil 5: PRI-724 uygulanan grupta CD24 antikorunun akım sitometri sonuçları.....	28
Şekil 6: PRI-724 uygulanan grupta CD133 antikorunun akım sitometri sonuçları.....	29
Şekil 7: PRI-724 uygulanan grupta CD44 antikorunun akım sitometri sonuçları.....	30
Şekil 8: Gemcitabine uygulanan grupta CD24 antikorunun akım sitometri sonuçları...31	
Şekil 9: Gemcitabine uygulanan grupta CD133 antikorunun akım sitometri sonuçları. 32	
Şekil 10: Gemcitabine uygulanan grupta CD44 antikorunun akım sitometri sonuçları. 33	
Şekil 11: Gem+PRI uygulanan grupta CD24 antikorunun akım sitometri sonuçları. 34	
Şekil 12: Gem+PRI uygulanan grupta CD133 antikorunun akım sitometri sonuçları...35	
Şekil 13: Gem+PRI uygulanan grupta CD44 antikorunun akım sitometri sonuçları. 36	

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubu klonojenik deney sonucu.	36
Resim 2: Gemcitabine grubunun klonojenik deney sonucu.	37
Resim 3: PRI-724 grubunun klonojenik deney sonucu.	37
Resim 4: Kombine (Gem+PRI-724) grubunun klonojenik deney sonucu.	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Dokuya özgü kanser kök hücre yüzey markerları.	9
Tablo 2: Hücre yüzey belirteçlerinin tanımı.	9
Tablo 3: Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler, cihazlar ve solüsyonlar.....	24
Tablo 4: Klonojenik deney verileri.	38

ÖZET

WNT İNHİBİTÖRÜ PRI-724'ÜN PANKREAS KANSERİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Aydınöglu B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Bu araştırmada, Wnt inhibitörü PRI-724'ün pankreas kanseri kök hücreleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmamız Adnan Menderes Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Laboratuvarında yapılmıştır. Araştırmamız Aralık 2020 tarihinde literatür taramasıyla başlamıştır. Nisan 2021- Eylül 2021 tarihinde deney grupları oluşturulmuş olup elde edilen hücrelerle MTS/PMS doz belirleme, Flow Sitometri ve Klonojenik deney yapılmıştır.

Bulgular: PRI-724, Gemcitabine ve Kombine (Gem+PRI-724) gruplarının IC₅₀ değerini belirlemek için doz belirleme deneyi yapıldı. Bu deney sonucunda PRI-724'ün IC₅₀ değeri 45 µM, Gemcitabinin IC₅₀ değeri 4 mg/ml, kombine (Gem+PRI-724) grubunun IC₅₀ değeri 4mg/ml+45 µM olarak belirlendi. Akım (Flow) Sitometri deneyinde kontrol, Gemcitabine, PRI-724 ve Kombine (Gem+PRI-724) grupları oluşturuldu. Her bir gruba CD44, CD133 ve CD24 antikorları eklenerek saçılım grafikleri elde edildi ve daha sonra saçılım grafiklerinin değerlendirilmeleri yapıldı. Klonojenik deneyde ise kontrol, gemcitabine, PRI-724 ve kombine (Gem+PRI-724) grupları oluşturuldu. Kontrol grubunda hücrelerin koloni oluşturulduğu gözlemlenirken, ilaç uygulanan diğer gruplarda koloni oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

Sonuç: Yaptığımız çalışmanın sonucuna göre Wnt inhibitörü PRI-724'ün pankreas kanser kök hücrelerini inhibe ederek pankreas kanser hücrelerini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın pankreas kanseri tedavisi için gelecekte umut olabileceği ve klinik çalışmalara öncülük edebileceği beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kök Hücre, Pankreas Kanseri Kök Hücre, PRI-724, Wnt Sinyal Yolağı.

ABSTRACT

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF WNT INHIBITOR PRI-724 ON PANCREATIC CANCER STEM CELLS

Aydınnoğlu B. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Stem Cell and Regenerative Medicine Program, Master's Thesis, Aydın, 2021.

Objective: In this study, it was aimed to evaluate the effect of Wnt inhibitor PRI-724 on pancreatic cancer stem cells.

Materials and Methods: Our research was conducted in the Laboratory of Basic Medical Sciences of Adnan Menderes University. Our research started with a literature review in December 2020. April 2021- September 2021 experimental groups were created and MTS/PMS dose determination, Flow Cytometry and Clonogenic Assay were performed with the obtained cells.

Results: A dose determination experiment was performed to determine the IC₅₀ value of the PRI-724, Gemcitabine and Combined (Gem+PRI-724) groups. As a result of this experiment, the IC₅₀ value of PRI-724 was determined to be 45 µM, the IC₅₀ value of Gemcitabine was determined to be 4 mg/ml, and the IC₅₀ value of the combined (Gem+PRI-724) group was determined to be 4mg/ml+45 µM. In the Flow Cytometry experiment, the control, Gemcitabine, PRI-724 and Combined (Gem+PRI-724) groups were created. By adding CD44, CD133 and CD24 antibodies to each group, scattering graphs were obtained and then scattering graphs were evaluated. In the clonogenic experiment, control, gemcitabine, PRI-724 and combined (Gem+PRI-724) groups were created. While it was observed that cells formed colonies in the control group, it was observed that they did not form colonies in other groups that were administered the drug.

Conclusion: According to the results of our study, it was observed that the Wnt inhibitor PRI-724 reduces pancreatic cancer cells by inhibiting pancreatic cancer stem cells. It is expected that this study may be the hope in the future for the treatment of pancreatic cancer and may lead to clinical trials.

Keywords: Stem Cell, Pancreatic Cancer Stem Cell, PRI-724, Wnt Signal Pathway.

1. GİRİŞ

1.1.Araştırmanın Tanımı ve Önemi

Pankreas kanseri, dünya üzerinde son derece hızlı seyreden ve ölümcül malign kanserlerden biridir. Önümüzdeki 20 ila 30 sene içerisinde ABD’de kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alması beklenmektedir. Pankreas kanserinin gelişiminde obezite, tip 2 diyabet ve sigara kullanımı büyük rol oynamaktadır. ABD’de elde edilen verilere göre tanı konulduğu andan itibaren 5 yıllık sağ kalım oranı %10’dur. Hastaların yaklaşık %80-85’i cerrahi müdahale edilemeyen ya da metastatik hastalıkla başvurmaktadır. Cerrahi müdahale edilebilen hastaların, cerrahi müdahaleden 5 yıl sonra hayatta kalan hasta sadece %20 oranındadır (Mizrahi et al., 2020).

PRI-724, Wnt sinyal yolağını inhibe eden bir küçük moleküldür. Wnt/ β -catenin sinyal yolağında β -catenin ile transkripsiyon koaktivatörü olan CBP (CREB-binding protein) arasındaki etkileşimi baskılar ve CBP’nin çekirdek içine girişini engeller. PRI-724’ün pankreas kanseri üzerinde yapılan klinik öncesi çalışmalarda, bu küçük molekülün kemoterapiye direnç gösteren kanser kök hücrelerini ve tümör başlatan hücrelerini baskılayabileceği ve metastatik potansiyeli azaltılabileceği öne sürülmektedir (Ko et al., 2015).

Kanser kök hücresi, kendi kendini yenileyen, farklılaşma yeteneği olan, kemoterapi ve radyoterapi gibi uyarılara karşı direnç gösteren, apoptoza uğramayan hücrelerdir. Wnt, Hedgehog ve Notch gibi bir takım sinyal yolları kanser kök hücresinin gelişiminde rol oynamaktadır. Son yıllarda birçok kanserli dokuda, kanser kök hücresi saptanmış ve izole edilmiştir. Kanser türüne özgü kanser kök hücrelerini belirlemek için dokuya özgü kök hücre yüzey belirteçlerinden faydalanılmaktadır. (Toledo-Guzmán et al., 2018).

1.2.Araştırmanın Amacı

PRI-724, Wnt sinyal yolağındaki CBP proteinini inhibe etmektedir ve bu proteinin TCF/LEF molekülüne bağlanmasını engellemektedir. Aktive olmayan TCF/LEF molekülü

ekirdekte birok onkogenin bulunduğu hedef gen transkripsiyonunu gerekleştirmemektedir. Bu tez alışmasında PRI-724'ün Wnt sinyal yolağını inhibe edip, pankreas kanser kok hucresinin etkisiz hale gelmesi dolayısıyla pankreas kanser hucresinin oğalmamaları amalanmıştır.

1.3.Araştırmanın Hipotezi

PRI-724, Wnt sinyal yolağını inhibe ederek pankreas kanser kok hucresinin kanserli huce oluşturmasını engeller.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Wnt Ailesi

Modern moleküler tıp döneminde, bir organizmanın gelişmesinde rol oynayan sinyal yolları ve bu sinyal yollarının moleküler mekanizmasını öğrenmek için çok çaba harcanmıştır. Modern moleküler tıp araştırmacıları, bir organizmada normal gelişimi kontrol eden mekanizmaları öğrenmenin, bu mekanizmalardan kaynaklı oluşabilecek hastalıkları önlemede ve bu hastalıklara karşı tedavi etme olanağını arttırabilme fikrini ortaya atmışlardır. Bir organizmanın gelişiminde önemli rol oynayan sinyal yollarından biri de Wnt sinyal iletim yoludur (Komiya & Habas, 2008). İlk Wnt geni, 1982 yılında Int-1 olarak bilinen fare meme tümöründen izole edilmiştir. Wnt ismi *Drosophila*'da kanat gelişimi, segmentasyon ve vücut eksenini oluşumunda rol oynayan Wingless (Wg) geni ile Int-1 geninin birleştirilmesiyle oluşmuştur. Wnt sinyal yolu hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, hücre göçü ve hücre polaritesi dahil olmak üzere gelişimin birçok yönünü kontrol eden sinyal iletim yoludur (Ng et al., 2019). Wnt sinyal yolağı proteinleri, insanda 19 proteinden meydana gelmektedir. Wnt protein ailesinin hücredeki etkisi otokrin ve parakrin olmak üzere iki farklı biçimde gerçekleşmektedir. Hücreler tarafından salgılanan Wnt proteinleri, Frizzled (Fzd) adı verilen hücre reseptörüne bağlanarak hücre içindeki protein ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayıp, sinyal yolağının aşağı doğru etkinlik kazanmasına neden olmaktadır (Taciak et al., 2018). Wnt proteinleri hücrede üç yolağı etkinleştirmektedirler.

- i. Wnt/ β -catenin yolağı
- ii. Planar hücre kutuplaşma yolağı
- iii. Wnt/kalsiyum yolağı

Wnt/ β -catenin sinyal yolağı, kanonik Wnt sinyal yolağı olarak bilinmektedir. Planar hücre kutuplaşma yolağı ve Wnt/kalsiyum yolağı ise kanonik olmayan Wnt sinyal yolağı olarak bilinmektedir. Bunlar üzerinde pek çok araştırmanın yapıldığı ve mekanizmasının en iyi ortaya çıkarıldığı yolak Wnt/ β -catenin sinyal yolağıdır.

2.1.1. Kanonik Wnt Sinyal Yolağı

Kanonik Wnt sinyal yolağında, β -catenin hücre içindeki yıkımı kontrol edilmektedir (Sugimura & Li, 2010). β -catenin hücre-hücre yapışmasında ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Wnt proteinin yokluğunda, sitoplazmadaki β -catenin etkisini ortadan kaldırmak için parçalanması gerekmektedir ve bir parçalama kompleksi oluşmaktadır. Bu parçalama kompleksinde kazein kinaz 1 (CK1), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), axin ve adenomatöz polipozis coli (APC) yer almaktadır.

Wnt proteinin olmadığı durumda, β -catenin 4 farklı proteinin bulunduğu yıkım kompleksine bağlanır. CK1 ve GSK3 tarafından fosforile edilir. İki defa fosforile edilmiş olan β -catenin parçalanmak üzere ubiquitin molekülü ile işaretlenir ve proteazom yoluyla parçalanırlar (Nusse et al., 2008).

Wnt proteinin varlığında, Wnt proteinleri Frizzled reseptörü ve LRP ko-reseptörlerine bağlanarak bu iki reseptörü birbirine yaklaştırır. Parçalama kompleksi, LRP reseptörüne bağlanır ve Disheveled (Dsh) aracılığıyla CK1 ile GSK3, LRP reseptörünü fosforile eder. Parçalama kompleksindeki axin etkisiz hale getirilir ve β -catenin fosforilasyonu ve parçalanması inhibe edilmiş olur. Parçalanamayan β -catenin sitoplazmada birikir ve biriken bu β -catenin çekirdeğe girer. Transkripsiyon faktörü olan Lymphoid-enhancer binding factor 1 (LEF1) ve T-cell factor (TCF) bağlanarak burada hedef genleri sessiz halde tutan baskılayıcı protein Groucho'yu inhibe eder. LEF1/TCF proteinine bağlanan β -catenin çekirdekte bir dizi hedef genin transkripsiyonunu başlatır (Ng et al., 2019). Bu transkripsiyon faktörleri birçok genin ifade edilmesini sağlar. İfade edilen genler arasında c-Myc ve Cyclin d1 gibi kanser ile ilgili genler de bulunmaktadır. Sitoplazmada biriken β -catenin çekirdeğe girerek LEF1/TCF transkripsiyonunu aktive eder ve proto-onkogen olarak kabul edilen genlerin ifadesini sağlar. Sonuç olarak kontrolsüz hücre çoğalmasını tetikleyerek kanser gelişimine katkı sağlamış olur (Sevimli & Semerci Sevimli, 2016).

2.1.2. Kanonik Olmayan Wnt Sinyal Yolakları

Kanonik olmayan Wnt sinyal yolağında iki farklı yol bulunmaktadır. Bu yollar hücre göçü, hücre farklılaşması, hücre adezyonu ve hücre polaritesi ile ilişkilendirilmiştir.

Bunlardan ilki Wnt/Planar Hücre Kutuplaşma (PCP) Yolağıdır. Bu yolda Wnt ligandı Fzd reseptörüne bağlanır, Fzd reseptörü Dsh proteinini kendine yakınlaştırır ve Daam1 (Disheveled-associated activator of morphogenesis 1) ile kompleks bir yapı oluştururlar. Daam, küçük GTPaz olan RhoA (Ras homolog gene family member A)'yı uyarır, Rho ise ROCK (Rho-associated kinase) aktive ederek hücre iskeletinin düzenlenmesini sağlar. Aynı zamanda Dsh, Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1) proteinini uyarır ve Rac1 ise JNK (c-Jun N-terminal Kinase) aktivitesini uyarır ve profilinin aktive bağlanmasına aracılık etmiş olur (Ng et al., 2019).

Bir diğer yolağımız, Wnt/Ca²⁺ sinyal yolağıdır. Wnt/Ca²⁺ yolunu rolü endoplazmik retikulumdan Ca²⁺ salınımını düzenlemek ve hücre içi Ca²⁺ düzeylerini kontrol etmektir. Diğer Wnt yollarına benzer şekilde, Wnt/Ca²⁺ yolunun aktive edilmesi için Wnt ligandlarının Fzd reseptörüne bağlanması gerekir. Aktive edilmiş Fzd reseptörü, G proteinleriyle doğrudan etkileşime girip aktive ederek hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunda bir artışa yol açar. Salınan Ca²⁺ daha sonra kalsiyum/kalmoduline bağımlı kinaz II (CaMKII), kalsinörin ve Protein Kinaz C (PKC) 'yi etkinleştirir. Kalsinörin, NFAT (Nuclear factor of activated T cells) adı verilen transkripsiyon faktörünün transkripsiyonunu başlatır. NFAT transkripsiyon faktörü karın organlarının belirginleşmesinde görev üstlenmektedir. PKC, Cdc42 (cell division control protein 42) adı verilen hücre migrasyonu ve hücre adezyonunda önemli bir rol alan proteini uyarır. CaM Kinaz II ise TAK1 ve NLK Kinaz adı verilen proteinleri etkinleştirerek kanonik Wnt yolunu uyarabilir (Krausova & Korinek, 2014) (Ng et al., 2019).

2.2.Kök Hücre

Bir sperm ve bir yumurtanın dölleneninden meydana gelen tek hücreli yapıya zigot denir. Zigot totipotent özelliğe sahip hücredir. Totipotent, canlılardaki en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip hücreler olarak bilinmektedir. Zigotun mitoz bölünmesiyle meydana gelen hücrelere blastomer adı verilir. Oluşan her blastomer, totipotensi özelliğini yavaş yavaş kaybetmektedir. Zigotun birkaç kez ard arda bölünmesi sonucunda blastosist oluşur. Blastosistler iki farklı hücre tipine ayrılır; İç hücre kütesi (İHK) ve Trofoektoderm (TE). İHK'de bulunan hücreler embriyonik kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH), pluripotent özelliğe sahiptir. Embriyonun tüm hücre tabakaları ve bu hücre tabakalarından köken alacak doku ve organları oluşturma özelliğine sahiptir. TE ise embriyonun ihtiyaç

duyduğu plasenta ve vasküler yapılarını oluşturmakta rol almaktadır. Embriyogenez sırasında hücreler, germ tabakaları adı verilen hücre kümeleri oluştururlar. Bunlar; endoderm, mezoderm ve ektodermdir. Bu katmanların her biri fetüsün farklılaşmış hücre ve dokularını oluşturmaktadır (Kolios & Moodley, 2012).

Kök hücreler, yaşamın embriyonik, fetal ve yetişkinlik dönemlerinde bulunan, spesifik doku ve organ hücrelerine farklılaşabilen, farklılaşmamış hücrelerdir.

Kök hücrelerin genel özellikleri şu şekildedir;

- Kendi kendini yenileme
- Klonalite oluşturma yeteneği ve
- Farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğidir.

Bu özellikler çeşitli kök hücrelerde farklılık gösterebilmektedir.

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre ve köken aldıkları yere göre sınıflandırılırlar. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler 5 gruba ayrılır. Bunlar totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak adlandırılırlar. Totipotent hücreler, erken gelişim evresinde bulunan, en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir. Totipotensi, hücrelerin hem embriyonik hem de plasenta gibi ekstraembriyonik yapıların oluşmasına olanak sağlar. Totipotent kök hücreler, organizmanın tüm hücrelerine farklılaşma yetkinliğine sahiptir.

Pluripotent kök hücreler, oluşan 3 germ tabakasının hücrelerini oluşturur fakat plasenta gibi ekstraembriyonik yapıları oluşturmaz. Embriyonik KH'ler pluripotent kök hücrelere iyi bir örnektir. Multipotent kök hücreler, pluripotent kök hücrelerden daha dar bir farklılaşma alanına sahiptir ve spesifik hücrelerin hücre hatlarında özelleşebilirler. Mezenkimal kök hücreler (MSC), en çok bilinen multipotent kök hücrelerdir. Bu hücreler, kemik, kıkırdak, kas ve adipoz doku gibi mezoderm kökenli dokulara farklılaşabilir (Wojciech et al., 2008).

Kök hücreler köken aldıkları yere göre, embriyonik kök hücre (EKH), fetüs kök hücre (FKH) ve yetişkin kök hücre (YKH) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Kakarala & Wicha, 2007).

2.2.1. Kanser Kök Hücresi

Kanser kök hücre (KaKH), kanser hücrelerinin kendi kendini yenilemesini sağlayan, farklılaşma yeteneği olan, radyasyona, kemoterapiye, kimyasal uyarılara ve apoptoza karşı direnç gösteren hücrelerdir. Kanseri kök hücrelerinin özellikleri normal kök hücrelerin özelliklerine oldukça benzemektedir. Kendini yenileme mekanizması, normal kök hücrelerde olduğu gibi asimetrik ve simetrik hücre bölünmesiyle gerçekleşmektedir. Bu özelliğe sahip olduklarından dolayı 'Kanser Başlangıç Hücreleri' (KBH) olarak ifade edilmektedir. Kök hücrenin kendini yenileme, proliferasyon, sessizlik ve farklılaşma gibi özellikleri birçok sinyal yolağı tarafından kontrol edilmektedir. Normal kök hücrelerde bu yollar denge içerisinde ilerlerken, kanser kök hücrelerinde bu yollarda denge korunmamıştır. Proliferasyon ve kendini yenilemede rol oynayan Wnt, Hedgehog, PTEN ve Notch gibi bazı sinyal yollarının düzenli sinyalizasyonu normal kök hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Bu sinyal yollarında mutasyon oluşumu ya da sinyalizasyonun düzensiz gelişmesi sonucunda tümör oluşumu gerçekleşmektedir. Bu nedenle bu sinyal yollarının kanser kök hücrelerinde rol oynadığını da destekler niteliktedir (Kakarala & Wicha, 2007).

Kanser kök hücrelerinin meydana gelmesinde farklı varsayımlar ortaya atılmıştır.

1. Kanseri kök hücreleri normal kök hücrelerden kaynaklanmaktadır, tüm dokularda kök hücreler bulunmaktadır ve uzun yaşam süreleri vardır. Diğer hücrelere göre çeşitli mutasyonların oluşması ve tümör meydana gelmesi için daha olası bir durum gerçekleşmektedir. Bu varsayıma göre normal kök hücrelerde düzenleyici olarak etkin rol oynayan sinyal yollarını, kanser kök hücreleri kendini yenilemek için kullanmaktadır.
2. Kanseri kök hücreleri öncü hücrelerden kaynaklanmaktadır, öncü hücreler kısmen farklılaşmış hücreler olup fetüs ya da yetişkin dokularında bulunmaktadır. Olgun hücreleri meydana getirmek için bölünmektedirler. Öncü hücreler dokuda kök hücrelere göre daha fazla bulunmakta ve kısmen kendi kendini yenileme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bundan dolayı bazı araştırmacılar öncü hücrelerin, kanser kök hücrelerinin kökeni olabileceğini söylemişlerdir.
3. Kanseri kök hücreleri farklılaşmış hücrelerden kaynaklanmaktadır, bu varsayıma göre pek çok mutasyon meydana gelmesi sonucunda farklılaşmış olan hücreler yeniden programlanma geçirerek geriye doğru farklılaşma gerçekleştirirler. Dediferansiyasyon geçiren bu hücreler, kendini yenileme yeteneğini elde edip hayatta kalma sürelerini uzatmaktadır. Bu varsayım ile birlikte dokuda bulunan bir takım hücre grubunun tümör oluşturma olasılığı çıkmaktadır.

Fakat bu varsayımda hücreleri yeniden programlayacak bir mekanizmanın varlığı henüz gösterilmemiştir.

Bazı kanserlerde, kanser kök hücresi farklılaşmış hücrelerden meydana gelmektedir. Farklılaşmış hücrelerde meydana gelen bir dizi mutasyonlar kansere özgü kök hücresini ortaya çıkarabilmektedir. Tümörü meydana getiren hücre topluluğunda genetik bozukluklar, mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler oluşur bu durum yeni hücre klonlarının büyüüp gelişmesine, tümörlü hücre yapısının büyümesine neden olmaktadır. Meydana gelen bu modele klonal evrim modeli denilmektedir. Fakat kanser kök hücresi kemoterapi ya da radyoterapi gibi ajanların etkisi altında olabilir. Bu tedavilerin inhibe edici etkisinden kurtulan kanser kök hücreleri tekrar mutasyon geçirip tedavi ajanlarına dirençli hale gelir ve tümörün yeniden ortaya çıkması yani relaps denilen durumla karşı karşıya kalılabilmektedir (Can, 2013).

Kanser kök hücreleri yüzeylerinde bulunan reseptörler sayesinde ayırt edilebilmektedir. Kanser kök hücresini ayırt etmekte akım sitometri ya da FACS gibi teknikler kullanılmaktadır. Beyin, kolon, akciğer, karaciğer, pankreas kanser kök hücrelerinde yüzey markerı olarak CD133; melanoma kanser kök hücresi belirteci olarak CD20 ve ABCB5; meme, karaciğer, baş ve boyun, pankreas kanser kök hücresi belirteci CD44 kullanılmaktadır. Kanser kök hücresini ayırt etmede kullanılan yüzey markerları hem pozitif hem negatif olarak bulunabilmektedir (Clevers, 2011).

Tümör Tipi	Dokuya Özgü Kanser Kök Hücre Markerları	Kaynaklar
Meme Kanseri	CD24, CD44, CD133, ALDH, CD90	(Can, 2013)
Kolon Kanseri	CD133, CD44, CD200, CD166, CD206, CD49f, EpCAM, ALDH	(Yang et al., 2020)
Pankreas Kanseri	CD44, CD24, EpCAM, CD133, ALDH, c-Met	(Can, 2013)
Prostat Kanseri	EpCAM, CD133, CD117, ALDH, CD44, E-cadherin, CXCR4	(Yang et al., 2020)
Melanoma	CD20, ABCB5, CD271, CD133, ALDH	(Clevers, 2011) (Yang et al., 2020)
Akciğer Kanseri	CD166, CD90, CD87, ALDH, CXCR4, CD44, CD133	(Yang et al., 2020)

Karaciğer Kanseri	CD24, CD133, CD13, CD44, CD206, CD90, EpCAM	(Yang et al., 2020)
Beyin Kanseri	CD49f, CD90, CD44, CD36, EGRF, CD133	(Yang et al., 2020)
Baş ve Boyun Kanseri	CD44, ALDH, β 1- integrin	(Clevers, 2011) (Kakarala & Wicha, 2007)

Tablo 1: Dokuya özgü kanser kök hücre yüzey markerları.

Hücre Yüzey Belirteçleri	Tanımı
CD24	Heat stable antigen
CD44	Hyalurinic acid reseptör
CD133	Prominin-1
CD90	Thy-1 hücre yüzey antijeni
CD200	MRC OX-2 tarafından tanınan antijen
CD166	Aktif lökosit adezyon molekülü
ALDH	Aldehit dehidrogenaz
CD49f	Alfa 6 integrin
EpCAM	Epitelyal hücre yapışma molekülü (CD326)
c-Met	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
CD117	Mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü
CD271	Sinir büyüme faktörü reseptörü (TNF-reseptör üst ailesi)

Tablo 2: Hücre yüzey belirteçlerinin tanımı (Can, 2013).

2.2.2. Kanser Kök Hücrelerinde Rol Oynayan Sinyal Yolakları

Doku gelişimi ve homeostazi kök hücrelerin eylemleri tarafından yönetilmektedir. Kök hücre fonksiyonlarının doğru bir şekilde düzenlenmesi normal biyolojik aktivitede büyük bir rol oynamaktadır. Biyolojik aktivitenin düzenlenmesinde önemli role sahip birkaç sinyal yolağı bulunmaktadır. Bu sinyal yolakları, Wnt, Hedgehog, JAK/STAT, Notch, PI3K/PTEN, Nükleer faktör κ B'dir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu sinyal yolaklarının hepsi proliferasyon, farklılaşma, kendini yenileme, hayatta kalma, hücre kaderini belirleme gibi kök hücre özelliklerine aracılık ettiği gösterilmiştir. Fakat bu önemli sinyal yolaklarının büyük bir çoğunluğunun kanserde düzenli olmadığı gösterilmiştir. Sinyal yolaklarının kendi içinde ya da birbirleri arasındaki sinyalleşmenin anormal düzeyde olduğu ve bu durumda kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasına neden olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Matsui, 2016).

Pankreas kanseri kök hücreleri, tümör dokusunun çok küçük bir kısmında bulunurlar. Bu hücrelerin kendini yenileme, farklılaşma, metastaz ve geleneksel tedavi yöntemlerine karşı direnç gösterme özellikleri vardır. Yapılan ksenograft çalışmaları sonucunda, pankreas intraepitelyal neoplazisinin invaziv pankreas kanserine dönüşmesinde Notch, Hedgehog, Wnt, PI3K/Akt sinyal yolaklarının muhtemel rolü olduğu belirtilmiştir, bu çalışmalar sonrasında CD133, CD24, CD44, EpCAM/ESA, c-Met, ALDH ve Lgr5 pankreas kanser kök hücresi yüzey belirteçleri olarak tanımlanmıştır. Aktive edilmiş Wnt sinyalinin kanser kök hücre fenotipi ile ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Wnt hedef geni Lgr5'in pankreas adenokarsinom hücrelerinin sitoplazmasında aşırı miktarda ifade edildiği gösterilmiştir. Kanser kök hücrelerinin kemoterapiye direncinin, ATP bağlayıcı protein (ABC)'nin yukarı regülasyonu ve TCF/LEF'in hedef geni olan ABC-taşıyıcı B1 ekspresyonu nedeniyle olduğu belirtilmiştir (Javadinia et al., 2019).

2.3.Pankreas Kanseri

Pankreas, sağlıklı bir yetişkinde yaklaşık 100 gr ağırlığında, 14 ila 25 cm uzunluğundadır. Hem lobüler hem de uzun bir şekle sahiptir. Posterior ve üst karın duvarının arkasında eğik olarak konumlanmış bu organ beş anatomik kısma ayrılmaktadır. Bu kısımlar; baş, uncinata prosess, boyun, gövde ve kuyruk olarak tanımlanmaktadır.

Pankreas, endokrin ve ekzokrin salgı yapan bir organdır. Ekzokrin salgıyı asiner hücreleri aracılığıyla yapmaktadır. Asiner hücreleri, pankreasın yaklaşık olarak %85'ini oluşturmaktadır. Asiner hücreleri tripsin, lipaz ve amilaz gibi protein, yağ, karbonhidrat sindiriminde aktif rol oynayan enzimleri sentezlemekte ve salgılamaktadır. Endokrin salgıyı ise Langerhans adacıklarında bulunan hücreler salgılamaktadır. Langerhans adacıklarında beş farklı hücre bulunmaktadır. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri somatostatin, PP (F) hücreleri pankreatik polipeptit, epsilon hücreleri grelin salgılamaktadır. Bu hormonlar glikoz metabolizması üzerinde büyük bir öneme sahiptir. Örneğin, insülin yetersizliğinde dünya üzerinde etkili bir hastalık olan Diabetes Mellitus (DM) görülmektedir (Atkinson et al., 2020).

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerdeki mortalite oranının en yüksek olduğu kanser tipidir. Dünya üzerinde de en ölümcül malign neoplazmalardan biri olarak bilinmektedir. Pankreas kanserinin başlıca iki tümör tipi bulunmaktadır; adeno karsinom ve pankreas endokrin tümörleri. Vakaların yaklaşık %85'inde adenokarsinom görülürken, pankreas endokrin tümörleri vakaların yaklaşık %5'inde görülmektedir (Ilic & Ilic, 2016). Pankreas kanseri teşhisi ve tedavisi zor bir kanser türüdür. Semptomlar genellikle ilerleyen evrelerde ortaya çıkmaktadır. İleri evre veya metastatik pankreas kanserinde geleneksel kemoterapi uygulanır ve bu tedavi sadece genel sağkalım yararı sağlamaktadır (Ho et al., 2020). Pankreas kanserine neden olabilecek bazı risk faktörleri belirlenmiştir. Bunlar aile öyküsü ve genetik, alkol ve sigara kullanımı, Diabetes mellitus, fiziksel hareketsizlik ve beslenme şeklidir. Bu risk faktörlerinin bir kısmı tanımlanmış olsa da pankreas kanserinin nedeni henüz yeterli bir şekilde aydınlatılamamıştır (Ilic & Ilic, 2016).

2.3.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Amerikan Kanser Derneğinin verilerine göre, 2019 yılında ABD'de teşhis edilen pankreas kanseri vaka sayısı yaklaşık 56000 iken, pankreas kanserinden ölenlerin sayısı yaklaşık 45000 olarak açıklanmıştır. Pankreas kanseri, kansere bağlı ölümlerde akciğer kanseri ve kolorektal kanserinden sonra üçüncü sırada yer almıştır. GLOBOCAN 2018 verilerine göre, küresel çapta hem kadın hem erkeklerde kansere bağlı ölümlerde yedinci sırada olduğu belirtilmiştir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında yaklaşık 459000 vaka tespit edilirken, yaklaşık 432000 vefat olduğu bildirilmiştir. Cancer Research

UK verilerine göre, pankreas kanseri Birleşik Krallık'taki en yaygın onuncu kanser türüdür. Birleşik Krallık'ta son on yıl içinde insidansının %10 oranında arttığı belirtilmiştir (Mizrahi et al., 2020).

Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülmektedir. 40 ila 85 yaş aralığındaki hastalarda görülüyor olsa da ileri yaşlardaki vaka oranları daha yüksektir. 2002 yılında Türkiye'de erkek vakalarda pankreas kanseri insidansı yüz binde 3.1 iken, 2016 yılında bu oran yüz binde 5.7'ye çıkmıştır. 2016 yılında kadınlarda bu insidans yüz binde 3.6 oranında seyretmiştir (KOÇATAKAN & ATASEVEN, 2021).

Pankreas kanseri için bir takım risk faktörleri tanımlanmıştır. Obezite, sigara ve alkol kullanımı, aile öyküsü, genetik, diyabet, beslenme şekli gibi faktörlerin pankreas kanseri geliştirme riski olan faktörler olduğu belirtilmiştir. 2011 yılında Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada pankreas kanserinin erkeklerde yaklaşık %26.2'sinin, kadınlarda ise yaklaşık %31'inin sigara kullanımı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada günde içilen her beş sigaranın pankreas kanser riskini arttırdığını, pasif içicilerde ise %50 arttırabileceğine dikkat çekmiştir. Amerikan Kanser Derneği'nin yapmış olduğu bir çalışmada pankreas kanserinden kaynaklanan ölümlerin obeziteden kaynaklandığını ilişkilendirmişlerdir. Vücut Kitle Endeksi (BKI), 30 ve üzeri olan obez erkek ve kadınlar ile BKI 25 ve altı olan normal erkek ve kadınlar karşılaştırıldığında, obez bireylerin pankreas kanser riski normal bireylere göre 2.08 kat fazla olduğu belirtilmiştir (Ilic & Ilic, 2016). Bir diğer risk faktörü olan tip 2 diyabet pankreas kanserinin artmasıyla ilişkilendirilmiş olup 10 yıldan fazladır tip 2 diyabetli hastalar ile diyabet olmayan bireylerle karşılaştırıldığında 1.51 kat daha fazla pankreas kanseri riski taşımaktadır.

Pankreas kanseri için diğer risk faktörleri aşırı alkol tüketimi ve kronik pankreatittir. Aşırı alkol tüketimi, hafif alkol tüketimine karşı kıyaslandığında 1.46 kat daha fazla pankreas kanseri riskini arttırdığı ortaya çıkmıştır. 10 vaka ile yapılan bir çalışmada, kronik pankreatit öyküsü olan hastaların diğer bireylerle kıyaslandığında 2.71 kat daha fazla pankreas kanser riskinin arttığı gösterilmiştir (Wolfgang et al., 2013). Bazı çalışmalar *Helicobacter pylori* ve Hepatit C enfeksiyonunun pankreas kanseri riskini arttıran bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir fakat bu durumu ilişkilendirebilmek için daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Pankreas kanserinin %5 ila %10'unun kalıtsal olduğu tahmin edilmektedir. Pankreas kanseri gelişim riskini arttıran birkaç ailesel kanser sendromu tanımlanmıştır. Lynch sendromu, Peutz-Jeghers sendromu, ailesel atipik multipli mole melanom sendromu, Li-Fraumeni sendromu, kalıtsal meme ve yumurtalık sendromunun pankreas kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir. BRCA-2, KRAS, p16, p53, PRSS1 gibi genlerde meydana gelen mutasyon ya da delesyonların pankreas kanseri geliştirme riski olduğu gösterilmiştir (Ilic & Ilic, 2016). Peutz-Jeghers sendromu, tümör baskılayıcı gen STK11'de bulunan mutasyondan kaynaklanmaktadır ve buna bağılı olarak pankreas kanseri geliştirme riskini %35 artmasına neden olmaktadır. Ek olarak, BRCA-1 ve BRCA-2'de meydana gelen mutasyonlar kalıtsal meme ve yumurtalık kanserinin yanı sıra pankreas kanserinde de rastlanılmaktadır. CDKN2A'deki germline mutasyonları ailesel atipik multipli mole melanom sendromunun meydana gelmesine neden olmaktadır ve bu germline mutasyonu pankreas kanser riskinin %17 artışı ile ilişkilendirilmiştir (Mizrahi et al., 2020).

2.3.2. Pankreas Kanserinin Gelişme Sebepleri

Pankreas adenokarsinomları ve varyantları, pankreas kanserinin %90'ını oluşturmaktadır. Pankreas adenokarsinomları Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından morfolojik varyantlarına göre sınıflandırılmıştır. Bu varyantlar prognoz ve moleküler açıdan farklılık gösterebilmektedir. Pankreas adenokarsinomu bir dizi mutasyon sonucunda invaziv malign yapıya dönüşmektedir. Bu malignitenin tanımlanan en iyi üç sınıfı bulunmaktadır. Bunlar, pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplazmalar (IPMN) ve müsinöz kistik neoplazm (MCN)'dir. Bu varyantların her biri kendine özgü klinik, patolojik ve moleküler özelliklere sahiptirler.

Pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), pankreas kanallarında meydana gelen non-invaziv mikroskopik bir lezyondur. PanIN'in pankreatit gelişiminde rol oynayabileceği ve pankreatit sonucunda ortaya çıkacak epitel hasarı ve onarım siklusu neoplazmi daha da yayabileceği öne sürülmüştür. PanIN'ler kendi arasında PanIN-1, PanIN-2 ve PanIN-3 olarak üç sınıfa ayrılmaktadır (McGuigan et al., 2018). PanIN-1 ve PanIN-2, KRAS onkojeninde kodon 12'de meydana gelen nokta mutasyonları ile karakterizedir. Bu mutasyon pankreatik duktal adenokarsinomunun (PDAC), yaklaşık %90'ında görülmektedir (Mizrahi et al., 2020).

İntraduktal papiller müsinöz neoplazmalar (IPMN), pankreasın ana kanalından ya da yan kanallardan kaynaklanan müsin üreten lezyonlardır. Geniş bir patoloji grubunu temsil etmesinin yanı sıra IPMN'ler pankreas kanseri için öncü lezyonlarda iyi tanınmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, ana kanaldan rezeke edilen IPMN'lerin ortalama %70'inin, yan kanallardan rezeke edilen IPMN'lerin ortalama %25'inin malign lezyonlar olduğu gösterilmiştir.

Müsinöz Kistik Neoplazmalar (MCN), IPMN'ler gibi müsin üreten lezyonlar olarak bilinmektedir. Ayrıca MCN'ler pankreasın premalign lezyonlarını meydana getirdiği belirtilmiştir. Çıkarılabilen pankreas kistlerinin %25'ini oluşturmakta olup, kadın hastalarda daha sık görüldüğü ifade edilmiştir. MCN için yapılan bir çalışmada, 163 hastadan pankreas lezyonları rezeke edilmiştir ve çıkarılan lezyonların %17.5'nin malign lezyon olduğu saptanmıştır (McGuigan et al., 2018).

2.3.3. Pankreas Kanserinin Moleküler Patogenezi

Pankreas kanseri, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen kalıtsal (germline) ve somatik mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Pankreatik adenokarsinoma oluşumunda KRAS, p16/CDKN2A, TP53 ve SMAD4 genlerinin rolü büyüktür.

KRAS, 12. kromozomda bulunan bir onkojendir. KRAS geni tarafından kodlanan protein GTPaz'dır. GTPaz, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ve diğer sinyal yolaklarında hücre sinyalleşmesinde önemli rol oynayan bir proteindir. İnvaziv pankreas adenokarsinomları %95'i KRAS tarafından meydana gelen nokta mutasyonlarıyla ilişkilidir. Pankreatik neoplazide, KRAS mutasyonları kodon 12, 13 ve 61'de meydana gelmektedir.

p16/CDKN2A, 9. kromozomunun p kolunda bulunan tümör baskılayıcı gendir. Pankreas kanserlerinin %95'inde inaktive edildiği belirtilmiştir. Bu genin proteini p16'dır. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Pankreas kanserinde, p16 fonksiyon kaybının sınırsız hücre büyümesine neden olduğu bildirilmiştir.

TP53 bir diğer adıyla p53, insanda 17. kromozomunun p kolunda bulunan tümör baskılayıcı bir gendir. Pankreas kanserlerinin %75'inde inaktive edildiği belirtilmiştir. TP53, p53 proteinini kodlamaktadır. p53, DNA onarımını aktive eder, hücresel stres durumunda

buna karşılık olarak hücre büyümesini durdurur ve hücre ölümünü (apoptoz) gerçekleştirir. TP53 geninin mutasyonu gerçekleşirse, p53 proteinin kaybindan dolayı bir takım kritik hücre fonksiyonlarda problemler meydana gelir ve bu durum pankreas neoplazisini teşvik etmektedir.

SMAD4, kromozom 18'in q kolunda bulunan tümör baskılayıcı gendir. SMAD4 geninin kodladığı protein Smad4, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β) sinyal yolağında rol oynamaktadır. Pankreas kanserinde SMAD4 geninde oluşan mutasyon, kötü prognoz ve metastatik hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, bu 4 ana gen haricinde başka genlerde pankreas kanserinde somatik olarak mutasyona uğramaktadır. Bunlar MLL3, TGFBR2, FBXW7, ARID1A, ARID2 ve ATM genleridir (Wolfgang et al., 2013).

2.4.Pankreas Kanserinde Wnt Sinyal Yolağının Rolü

Wnt sinyal yolağı hem embriyonik gelişimde hem de yetişkin homeostazında önemli rol oynayan bir yolaktır. Wnt sinyal yolağı kompleks bir yolaktır ve kanonik sinyal yolağı ve kanonik olmayan sinyal yolağı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kanonik yol, Frizzled/LRP reseptör yapısına bağlanan Wnt proteiniyle aktive hale gelir ve aşağı regülasyon başlamış olur. Wnt proteininin varlığında sitoplazmada bulunan yıkım kompleksi inaktive olur ve sitoplazma içinde biriken β -catenin çekirdeğe geçer burada TCF/LEF'e bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmış olur. Fakat Wnt sinyalinin yanlış düzenlenmesi gelişimsel anormallikleri ve çeşitli kanser türlerini ortaya çıkarabilmektedir (Nusse et al., 2008).

Pankreas kanserinin en yaygın rastlanılan türü pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC)'dır. PDAC'lar genomik olarak kararsızlıkla karakterize olup her bir tümörde çok sayıda mutasyon ve kromozomal anomaliler bulundurmaktadır. Genomların kompleksi yapısına rağmen, çoğu insan PDAC'ların da Wnt sinyal yolağı dahil 12 ana sinyal yolağında mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Yapılan genomik çalışmalarda, Wnt, Hedgehog ve Notch sinyallerinin uygun olmayan aktivasyonu gösterilmiştir (Zhang et al., 2013).

Pankreas kanseri mutasyonlarının haritası kapsamlı olarak araştırılmakta olup öncü lezyonlarda en sık rastlanılan mutasyonun KRAS mutasyonu olduğu belirtilmiştir. KRAS mutasyonuna en sık PanIN öncü lezyonunda rastlanmakta olduğunu ve hastalığın erken evrelerinde saptanabilme potansiyelinin olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada,

deney farelerinde pankreas kanserinin başlatılması ve sürdürülmesi için KRAS onkojeninin gerekli olduğu gösterilmiştir (Collins et al., 2012). Son çalışmalar, PDAC'ta Wnt/ β -catenin sinyal yolağının önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. β -catenin birikimi bu hastalığın karakteristik bir özelliği olmasa da PanIN lezyonlarında ve PDAC'ta hem çekirdekte (yaklaşık %10-60) hem de sitoplazmada (yaklaşık %25-65) β -catenin birikimi gözlemlenmiştir. PDAC'ın oluşumu ve ilerlemesinde β -catenin rolü olduğu fonksiyonel kanıtlarla gösterilmiştir. Ek olarak, artan β -catenin seviyeleri PanIN dereceleri ve invaziv PDAC ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, KRAS mutasyonunun etkilerinin β -catenin sinyal yolağı modülatörleri ile inhibe edilebileceği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise β -catenin molekülü siRNA ile inhibe edilmiş ve PDAC proliferasyonunu önemli derecede etkileyip hücreleri apoptoza sürüklemiştir.

Son zamanlarda, ATDC geninin PDAC'de aşamalı β -catenin birikimine neden olduğu ve β -catenin hedef genlerinin aktivasyonuna katkıda bulunduğu belirtilmiştir. ATDC'nin öncülük ettiği β -catenin birikimi kanonik Wnt yolağında hedef gen olan c-Myc ekspresyonunu arttırdığı ifade edilmiştir. PDAC hücre hatlarında bulunan ATDC fonksiyonunun inhibe edilmesi β -catenin aktivitesini, tümör büyümesini ve metastazı azalttığı gösterilmiştir (Morris IV et al., 2010).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Wnt/ β -catenin sinyal yolunun pankreas kanserinde, özellikle en yaygın türü olan pankreatik duktal adenokarsinomunda (PDAC), altta yatan önemli bir neden olduğu saptanmıştır. Bu hastaların büyük bir kısmında anormal Wnt/ β -catenin sinyalizasyonu saptanmıştır. PDAC olan hastalar, pankreas adenokarsinomlarının Wnt ligandlarında RNF43 mutasyonel inaktivasyonunu barındırırlar. Bu durum normal pankreas dokusunun önce intraepitelyal neoplaziye daha sonra invaziv pankreas kanserine neden olmaktadır. RNF43, 17. kromozomun q kolunda bulunan bir gendir. Bu genin kodladığı protein E3 ubiquitin ligazdır. PDAC vakalarının intraduktal epitelyal müsinöz neoplazmlarında en sık bildirilen mutasyon RNF43'tür. RNF43 mutasyonunun oluşmasıyla Wnt/ β -catenin yolağındaki ubiquitin ligaz aktivitesinin yokluğuna ve bununla birlikte hücre büyümesinin artışına neden olmaktadır (Javadinia et al., 2019).

2.5.Wnt İnhibitörü PRI-724'ün Rolü

Wnt sinyal yolunun, kanser oluşumundaki büyük rolü olduğu yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. Bu durum Wnt sinyal yolağını küçük moleküllerle hedef alma konusunda kapsamlı araştırmaya neden olmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda, Wnt sinyalinde yer alan birçok molekülü baskılayıcı ya da aktive edici küçük moleküller tanımlanmıştır. Çeşitli kanser çalışmalarında tanımlanmış olan bazı küçük moleküller IWP, XAV939, IWR, Pyrvinium'dur. IWP küçük molekülünün amacı Porcupin molekülünü baskılayıp Wnt salgılanmasını ve aktivitesini inhibe etmektir. XAV939 ve IWR küçük moleküllerinin hedef molekülleri Tankyraz/Axin'dir. Bu küçük moleküllerin amacı Axin molekülünü aktive edip sitoplazma içindeki β -catenin molekülünün yıkımının gerçekleşmesidir (Clevers & Nusse, 2012).

Pankreas kanseri tedavisi için de Wnt sinyal yolağını hedef alan tedaviler önceki yapılan çalışmalarda denenmiştir. Bu terapötik ajanlar Wnt sinyal yolunu direkt yada dolaylı yoldan hedef alabilmektedir. Wnt sinyal yolunu direkt hedef alan terapötik ajanlar PRI-724, OMP-18R5, OMP-54F28 iken Wnt sinyal yolağını dolaylı yoldan hedef alan terapötik ajanlar BAY86-9766, NSAID'ler ve D vitamindir (Javadinia et al., 2019).

β -catenin, Wnt sinyal yolunun önemli bir bileşenidir. Wnt proteininin yokluğunda, β -catenin sitoplazma içinde bulunan yıkım kompleksi tarafından parçalanmaktadır. Wnt proteini varlığında ise yıkım kompleksi işlevsiz hale gelmektedir. Bu durumda sitoplazmada β -catenin birikimi meydana gelir ve biriken β -catenin molekülü çekirdeğe geçiş yapar. Çekirdekte TCF/LEF adı verilen transkripsiyon faktörlerine bağlanarak kompleks bir yapı oluşturur. Daha sonra bu kompleks yapı, hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmak için CREB-binding protein (CBP) bağlanır. β -catenin, TCF/LEF ve CBP'nin oluşturduğu kompleksle hedef genlerin transkripsiyonu başlatılmış olup hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Fakat bazı kanser hücrelerinde β -catenin sitoplazmada aşırı birikmesi ve nükleusa geçişi sonrasında kontrolsüz proliferasyonun meydana geldiği gösterilmiştir. Araştırmacılar bu kanser hücrelerinin kontrolsüz proliferasyon göstermesinin sebebi β -catenin CBP'ye bağlanmasından kaynaklı gen mutasyonları olabileceği fikrini ortaya atmışlardır (Gabata et al., 2020).

Bizim çalışmamızda kullandığımız küçük molekül PRI-724, β -catenin CBP'ye bağlanmasını engelleyen bir inhibitördür. Bir Wnt inhibitörü olan PRI-724, β -catenin,

TCF/LEF ve CBP kompleksinin oluşmasına engel olup hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmamaktadır. Bu sayede kontrolsüz proliferasyon olmamakta ve hedef genlerde var olan onkogenlerin ekspresyonu gerçekleşmemektedir. Wnt sinyal yolağının hem tümör gelişiminde hem de kanser kök hücreindeki rolü olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Bu terapötik ajanların kanser kök hücresi üzerinde de sonuçlar verdiği gösterilmiştir. PRI-724 ve benzeri küçük moleküllerle tedavi fikri ileri evre ve metastatik kanser çalışmalarında umut olmuştur (Yang et al., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan hücre hattı pankreas kanser hücresi Panc-1'dir. Panc-1 hücre hattı in vitro ortamda uygun kültür koşullarında çoğaltılmıştır. Uygun koşullarda çoğaltılıp, yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli bileşenlerden oluşan besi ortamları hazırlanmıştır. Bu bileşenler; DMEM High Glukoz, Fetal Sığır Serum, L-Glutamin ve Penisilin-Streptomisindir. Panc-1 hücre hattının in vitro ortamda çoğalması için ihtiyaç duyduğu bileşenler her uygulamada gereken miktarda hazırlanmıştır. 50 ml'lik falkona serolojik pipet aracılığıyla 44 ml DMEM High Glukoz, 5 ml Fetal sığır serumu ve 1 ml Penisilin-Streptomisin eklenerek besiyeri oluşturulmuştur.

Besiyeri değişiminde Panc-1 hücre hattının çoğalma hızı, flasttaki hücre yoğunluğu ve besi yerinde gözlenen renk değişimi dikkate alınmıştır. İki günde bir ortama taze besi yeri eklenmiştir. Çalışmada kullanmış olduğumuz hücre hattı adherent hücre olduğu için herhangi bir santrifüj işlemi yapılmamış, ortamda var olan besi yeri ortamdaki uzaklaştırılıp taze besi yeri ortama eklenmiştir.

3.2.Hücrelerin Pasajlanması

Adherent olarak büyüyen hücrelerimiz mikroskop altında gözlemlenmiştir. Hücre yoğunluğu 10^5 - 10^6 aralığında olan flastlar pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde flastta bulunan besi yeri uzaklaştırılmıştır. Flastta 1 ml Tripsin/EDTA solüsyonu eklenip, flastın her bir noktasına nüfuz edecek şekilde muamele yapılmıştır. Tripsin/EDTA hücreleri süspanse etmesi için %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde 3 ila 5 dakika bekletildi. Hücreler süspanse hale geldikten sonra flastta birkaç ml taze besi yeri eklendi ve flasttaki bütün sıvı 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet birkaç ml taze besi yeri ile pipetlendi. Hücreler iki farklı flastta aktarıldı ve %5 CO₂ içeren 37°C inkübatöre konuldu.

3.3.Hücrelerin Dondurulması

Deneyimizde ihtiyacımızın olmadığı fazla hücreleri hem hücrelerimizin yaşlanmasını engellemek amacıyla, hem de ihtiyaç halinde başka deneylerde tekrar kullanmak amacıyla dondurularak saklandı. Dondurulmasını istediğimiz hücrelerin besi yeri uzaklaştırıldı ve 1ml Tripsin/EDTA ekleyerek hücrelerin süspanse olması sağlandı. Süspanse olan hücrelerin üzerine birkaç ml taze besi yeri eklendi daha sonra flastaki bütün sıvı çekildi ve 15ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Bu esnada hazırlanan %5 lik DMSO:C-MEDIUM solüsyonundan 1ml pellete eklenerek pipetlendi. Pipetlenen hücreler kriyo tüplere aktarıldı. Kapakları parafilmelenen kriyo tüpler önce 1-2 saat -20°C'de bekletildi. Daha sonra buz üzerinde -86°C'ye kaldırıldı.

3.4.Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözülmesi

-86°C'de saklanan kriyo tüpler alındı önce -20°C'de 1 saat bekletildi daha sonra su banyosunda birkaç dakika bekletilerek erimesi sağlandı. DMSO'nun toksik etkisini en aza indirmek için 15 ml santrifüj tüpüne, hazırladığımız besi yerinden birkaç ml eklendi ve üzerine kriyo tüpte bulunan sıvıyı ekleyerek pipetleme yapıldı. Daha sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet kısmına birkaç ml taze besi yeri eklenerek pipetleme işlemi yapıldı. 25T flaska 6-7 ml taze besi yeri konuldu ve pipetlenen pellet kısmı flaska aktarıldı. %5 CO₂ içeren 37°C inkübatöre yerleştirilerek büyümesi ve çoğalması sağlandı.

3.5.Doz Belirleme ve MTS/PMS deneyi

İnkübatörde muhafaza edilen flasklar mikroskop altında gözlemlendi ve ekim yapılması için yeterli miktarda hücre bulunan flask kabine alındı. Flaskın içindeki besi yeri ortamdaki uzaklaştırıldı ve ortama 1 ml Tripsin/EDTA eklendi. 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin/EDTA sayesinde süspanse olan hücrelerin üzerine birkaç ml taze besi yeri eklendi ve bütün sıvı çekilerek 15 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı, pellet kısmı 1 ml ile çözdürüldü. 1-10 µl pipet ucuyla 10µl

sıvı çekildi ve Thoma hücre sayımı lamına konuldu. Ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Sayılan hücreler AxSFx10000 formülüne göre hesaplandı böylece ml başına düşen hücre sayısı bulundu. Bu çalışmada kuyucuk başına 3000 hücre olacak şekilde hesaplamamızı yaptık ve her bir kuyucuğa 100 µl hücre ekildi. 24 saat inkübatörde bekletilen hücrelerin tutunması ve çoğalması sağlandı.

96 kuyucuklu plaka steril kabine alındı ve blank hariç bütün sütunlardaki sıvı pipetle çekilerek atık kabına atıldı. Gemcitabine uygulanan grupta ilaç dozları sırasıyla, 500 µg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml şeklinde uygulandı. PRI-724 uygulanan grupta ilaç dozları sırasıyla, 5µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM, 80 µM, 100 µM, 200 µM şeklinde uygulandı. Gemcitabine+PRI-724 kombinasyonu uygulanan grupta ilaç dozları 4 mg/ml+45 µM şeklinde uygulandı.

İlaç dozları yapılan solüsyon hesaplaması sonrasında taze besi yeri ile seyreltildi ve her kuyucuğa 100 µL şeklinde eklendi. İlaç uygulaması yapılan 96 kuyucuklu plakalar 48 ve 72 saat inkübatörde bekletildi.

48 saat ve 72 saat inkübatörde ilaca maruz bırakılan hücreler kabine alındı. Bu sefer ilaç uygulanan sıvılar atık kabına atılmadı. 15 ml falkona 2 ml MTS, 100 µl PMS eklenerek karıştırıldı. Her kuyucuğa 20 µl MTS/PMS eklendi ve kuyucukların tabanına değmeden dikkatli bir şekilde pipetleme yapıldı. Bu işlem karanlık ortamda yapıldı ve hazırlanan MTS/PMS falkonunun etrafına alüminyum folyo kaplayarak ışık girişi engellendi. Her kuyucuğa MTS/PMS sıvısı uygulandıktan sonra 4 saat boyunca 96 kuyucuklu plakalar inkübatörde bekletildi.

4 saatin sonunda inkübatörden çıkarılan 96 kuyucuklu plakaların üzerine alüminyum folyo sarıldı. Mikroplate okuyucuyu, okuma işlemine hazırladıktan sonra 96 kuyucuklu plakalar mikroplate okuyucuya yerleştirildi. 490 nm dalga boyunda okutulmuş istatistiksel verileri alındı.

3.6.Flow Sitometri Analizi

Büyümesi ve çoğalması için inkübatörde muhafaza edilen hücreler inkübatörden çıkartılarak mikroskop altında incelendi. Yeterli miktarda hücre bulunan flasklar kabine alındı

ve içerisinde var olan besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı. Flaska 1 ml Tripsin/EDTA konuldu ve 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildi. Adherent olan hücrelerimizin tabandan kaldırıldığını gözlemlediğimizde flaska birkaç ml taze besi yeri konuldu. Flask içerisindeki bütün sıvı çekilerek 15 ml santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı, pellet kısmı 1 ml besi yeri konuldu ve pipetlendi. Pipetlenen bu kısımdan 10 µl sıvı çekilerek Thoma Lamına konuldu ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. AxSFX10000 formülüne göre hesap yapıldı ve ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Bu deneyde, her bir deney grubuna 4×10^5 hücre ekimi yapıldı. 24 saat inkübatörde bekletildi, tabana tutunmaları ve büyümeleri sağlandı.

Bu deneyde 7 farklı grup oluşturuldu. Bunlar sırasıyla; Negatif kontrol, pozitif kontrol, Gemcitabine 4 mg/ml, PRI-724 45 µM ve kombine (PRI-724+Gemcitabine) tedavi şeklindedir. Hücreler tutunması için 24 saat bekletildikten sonra steril kabine alındı ve içindeki besi yerleri çekilerek atık kabına atıldı. Her iki kontrol grubuna da yeniden taze besi yeri eklendi. Diğer gruplara uygulanacak ilaçların doz miktarı gerekli olan hesaplamalar ile yapıldı. İlaçlar her bir deney grubu için ayrı falkonlarda hazırlandı. Hazırlanan ilaçlar deney gruplarına uygulandı ve her bir flaskın üzerine hangi deney grubu olduğu etiketlendi. Deney gruplarımız 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde bekletildi.

48 saat inkübatörde bekletilen hücreler inkübatörden çıkartıldı ve mikroskop altında gözlemlendi. Kontrol grubu hariç diğer gruplarda hücrelerin besi yeri üzerinde yüzdüğü görüldü. Flasklar steril kabine alındı. Kontrol grubu flaskların içerisinde bulunan besi yeri uzaklaştırıldı ve 1 ml Tripsin/EDTA eklendi, 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildikten sonra üzerine birkaç ml besi yeri eklendi ve 15 ml santrifüj tüpüne aktarıldı. İlaç gruplarında ise flaskların içindeki besi yeri çekilerek 15 ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Her bir deney grubunu farklı santrifüj tüpüne aktardı ve her birinin hangi deney grubu olduğu belirtildi. Deney gruplarımız 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet kısmı 350 ml taze besi yeri ile iyice pipetlendi. Pipetlenen örnekler vorteksledi. Her bir deney grubundan 300 mL santrifüj tüpüne konuldu. Flow sitometride kapı alınması için negatif kontrol tüpüne hiç antikor eklenmedi. Diğer deney gruplarına kontrol antikor olarak 60 µl CD45 eklendi. Yine her biri 60 µl olmak üzere sırasıyla; CD133, CD44 ve CD24 antikorları deney tüplerimize eklendi. 15 dakika boyunca karanlık ortamda bekletildi. Karanlık ortamdan çıkartılan tüplerimize 200 µl Lyse eklendi ve 10 dakika daha karanlık ortamda bekletildi. 250 µl shealt sıvısı her tüpe eklendi ve vorteksleme işlemi yapıldı. 15 dakika daha karanlık ortamda bekletildi. Her bir santrifüj tüpü 400 g'de 5 dakika santrifüj

edildi. Süpernatant kısmı atıldı. Pellet kısmının üzerine 500 µl shealt sıvısı eklendi ve pipetlendi. Hücre tekrardan vortekslenerek flow sitometri cihazında saçılım grafiği alınmak üzere işleme alındı.

3.7.Klonojenik Analizi

Pankreas kanseri hücrelerinin koloni oluşturma özelliklerini göstermek amacıyla klonojenik test yapıldı. Bu testte 2 adet 6 kuyucuklu plaka kullanıldı. Her iki plakanın, her bir kuyucuğuna yaklaşık 8000 hücre ekimi yapıldı. 2 hafta boyunca hücreler inkübe edildi ve tutunmaları sağlandı. Hücre tutunması gözlemlendikten sonra ilk 6 kuyucuklu plakada sadece kontrol grubu oluşturuldu, diğer 6 kuyucuklu plakanın her bir sütununa farklı ilaç uygulamaları yapıldı. İlaç uygulamasında her bir ilacın IC₅₀ değerinin yarısı baz alınıp, uygulandı. Daha sonra kontrol grubunun kuyucuklarında hücre sayısının artışı için inkübe edildi. İstenilen hücre artışı gerçekleştikten sonra her bir kuyucuk kristal viyole ile boyandı ve kontrol grubunda koloni oluşturan hücreler gözlenirken, ilaç uygulaması yapılan kuyucuklarda koloni oluşturan hücre gözlenmedi.

3.8.Tez kapsamında kullanılan malzeme ve ekipmanlar

Tez çalışması boyunca kullanılan sarf malzeme, cihaz ve solüsyonlar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Sarf Malzeme, Cihazlar ve Solüsyonlar	Marka
DMEM High Glukoz	Sigma
Fetal Bovine Serum	Biological Industries
Penisilin/Streptomisin	Capricorn Scientific
L-Glutamin	Biological Industries
Trypsin EDTA	Multicell
MTS	Promega
PMS	Sigma
PRI-724	Abcam
Gemcitabine	Gemco
CD133	R&D System
CD44	R&D System

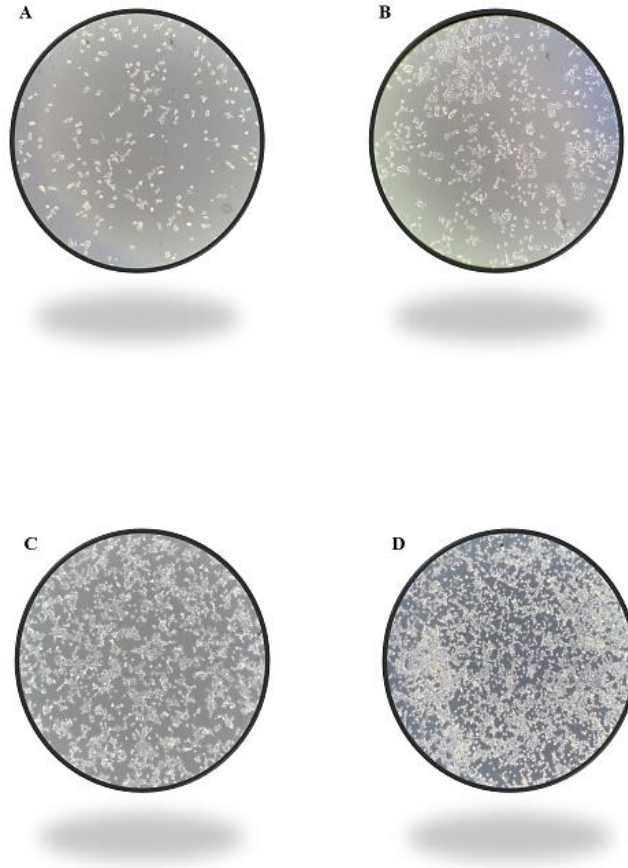
CD24	R&D System
CD45	Beckman Coulter
25 ve 75 cm ² Flask	Corning
60x15mm Cell Culture Dish	Isolab
6 Well Plate	NEST
96 Well Plate	NEST
Serolojik Pipet	SPL Life Science
15 ve 50 mL Santrifüj Tüpü	NEST
Laminar Flow Kabin	Biobase
CO ₂ 'li İnkübatör	NUAIRE
Santrifüj	NÜVE
Mikroskop	Olympus
Su banyosu	NÜVE
Thoma Lamı	Thermo Fisher Scientific
Kriyo tüp	Eppendorf
-86°C Derin Dondurucu	WiseCryo
Mikroplate Okuyucu	BioTek
Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter

Tablo 3: Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler, cihazlar ve solüsyonlar.

4. BULGULAR

4.1.Hücre Kültürü Bulguları

Araştırmamızda kullanmış olduğumuz Panc-1 hücre hattı, flask tabanına yapışarak çoğalan hücrelerdir. Panc-1 hücre hattının komplement besiyerinde L-Glutamin içeren DMEM-High Glukoz , %10 Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin/Streptomisin kullanıldı. Panc-1 hücre hattı 25T flasklara ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde çoğalması sağlandı.

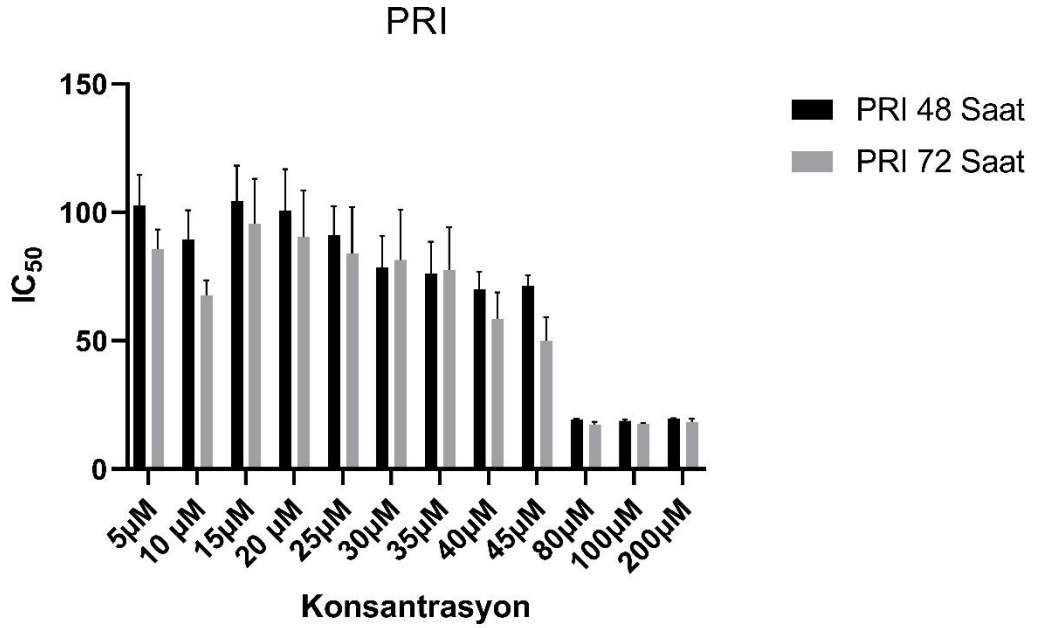


Şekil 1: Panc-1 hücre hattının inverted mikroskop görüntüleri. A: %20 konfluent panc-1 hücre hattı. B: %40 konfluent panc-1 hücre hattı. C: %70 konfluent panc-1 hücre hattı. D: %90 konfluent panc-1 hücre hattı.

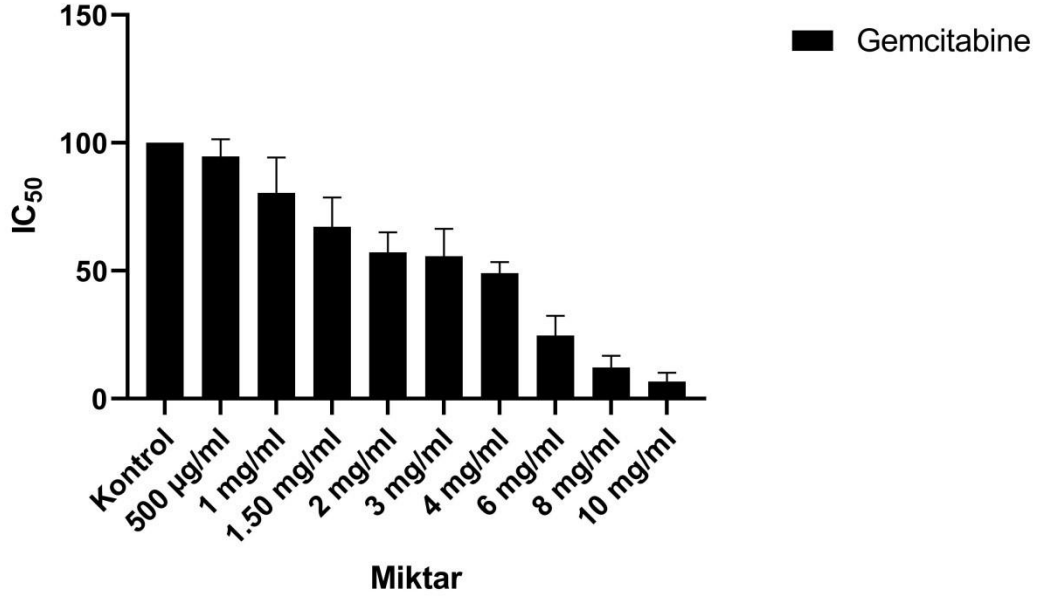
4.2.Doç Belirleme ve MTT Analizi

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz PRI-724 isimli ilaç toz halde olduğundan, kullanma talimatlarına uygun bir şekilde DMSO ile seyreltilmiştir. İlacımızın stok konsantrasyonu 5 milimolar olacak şekilde DMSO ile seyreltilti. PRI-724 sırasıyla 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM, 80 µM, 100 µM, 200 µM olacak şekilde denendi. Bir kemoterapi ilacı olan Gemcitabine sırasıyla 500 µg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml şeklinde denendi. Oluşturulan deney grupları 96 kuyucuklu plakada üçer tekrarlı olacak şekilde yapıldı, 48. Ve 72. Saatte analiz edilmek üzere inkübe edildi.

Yapılan analizler sonucunda, 48. Saatte yapmış olduğumuz deney gruplarımızda anlamlı sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda PRI-724'ün IC₅₀ değeri 45 µM olarak belirlendi (Şekil 2). Gemcitabinin IC₅₀ değeri ise 4 mg/ml olarak belirlendi (Şekil 3).

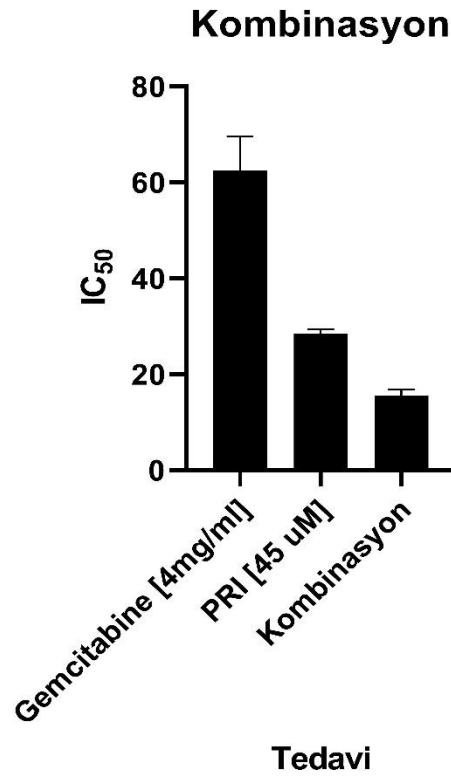


Şekil 2: PRI-724'ün doz belirleme sonuçları.



Şekil 3: Gemcitabine doz belirleme sonuçları.

Bu sonuçlarımızı göz önünde bulundurarak kombinasyon grubumuz olan PRI-724+Gemcitabine grubu (45 µM+ 4 mg/ml) şeklinde oluşturuldu (Şekil 4).



Şekil 4: Gemcitabine, PRI-724 ve Gem+PRI-724 doz belirleme sonuçları.

4.3.Flow Sitometri Analizi

Flow sitometri analizinde, 4 deney grubu oluşturuldu. Bunlar, kontrol, PRI-724, Gemcitabine ve kombine (PRI-724+Gemcitabine) gruplarıdır. Kontrol grubu hariç diğer gruplar 3 tekrarlı olacak şekilde deney oluşturuldu. PRI-724, Gemcitabine ve kombine gruplarımızın her birine CD133, CD44, CD24 ve CD45 antikorları eklendi. Kontrol grubuna kapı alabilmek için hiç antikor eklenmedi.

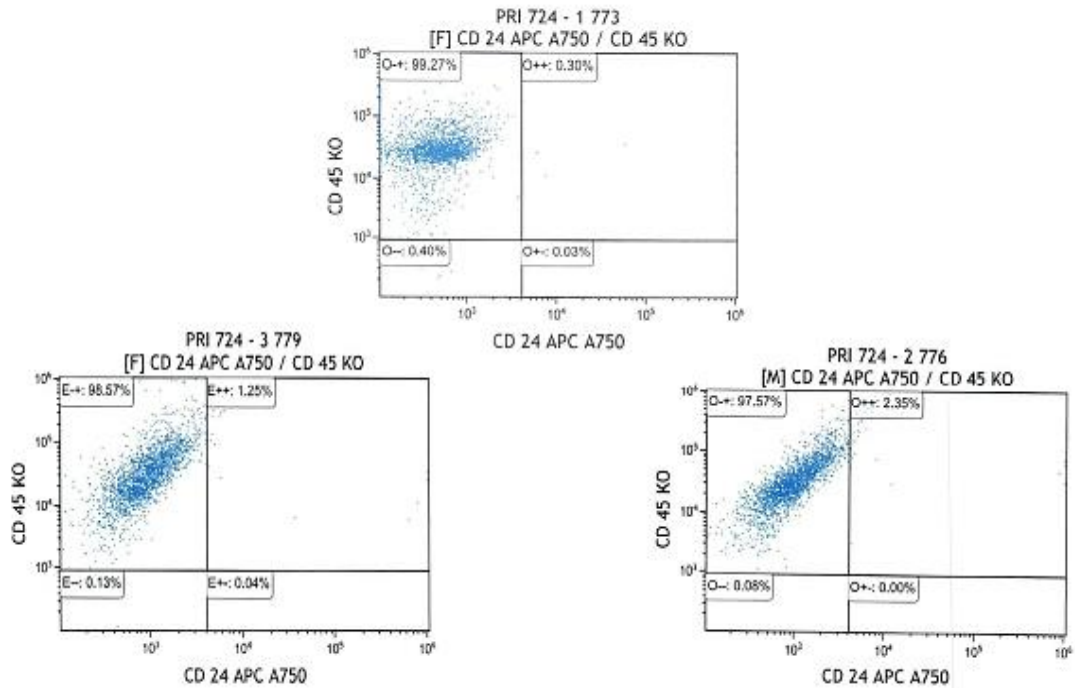
PRI-724 ilacı uygulanan deney gruplarımızda sonuçlar şu şekildedir.

CD 24 antikorunu için;

PRI-724 1. Grup %0,30 + %0,03

PRI-724 2. Grup %2,35 + %0,00

PRI-724 3. Grup %1,25 + %0,04 şeklindedir. PRI-724 deney grubunun CD24 antikorunu için ortalama oranı %1,32 olarak hesaplanmıştır (Şekil 5).



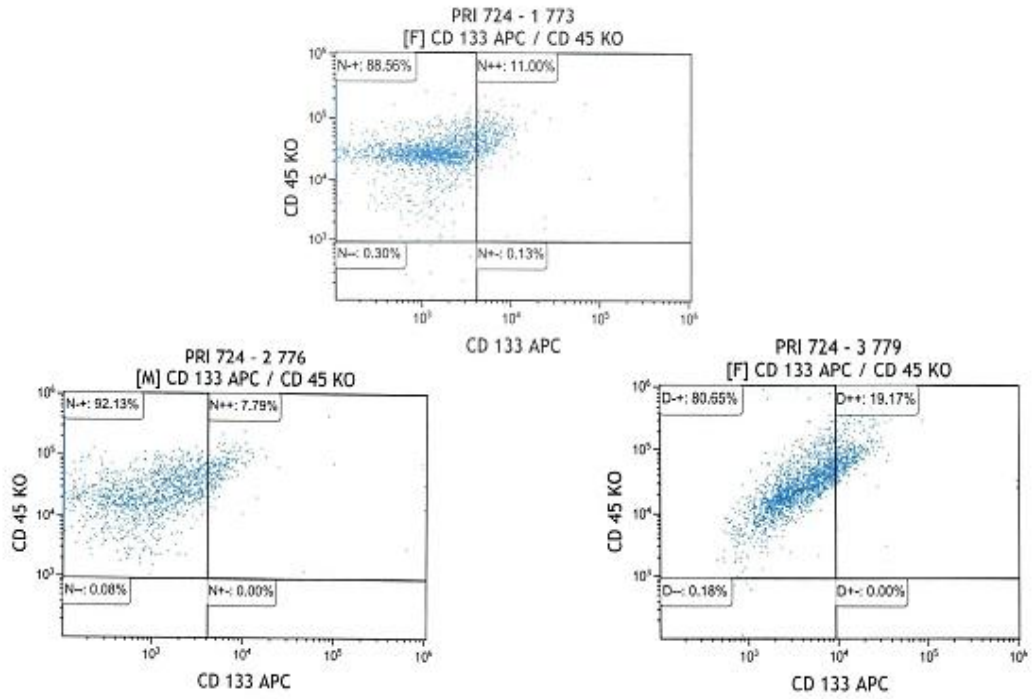
Şekil 5: PRI-724 uygulanan grupta CD24 antikorunun akım sitometri sonuçları.

CD 133 antikorü için;

PRI-724 1. Grup %11,00 + %0,13

PRI-724 2. Grup %7,79 + %0,00

PRI-724 3. Grup %19,17 + %0,00 şeklindedir. PRI-724 deney grubunun CD133 antikorü için ortalama oranı %12,69 olarak hesaplanmıştır (Şekil 6).



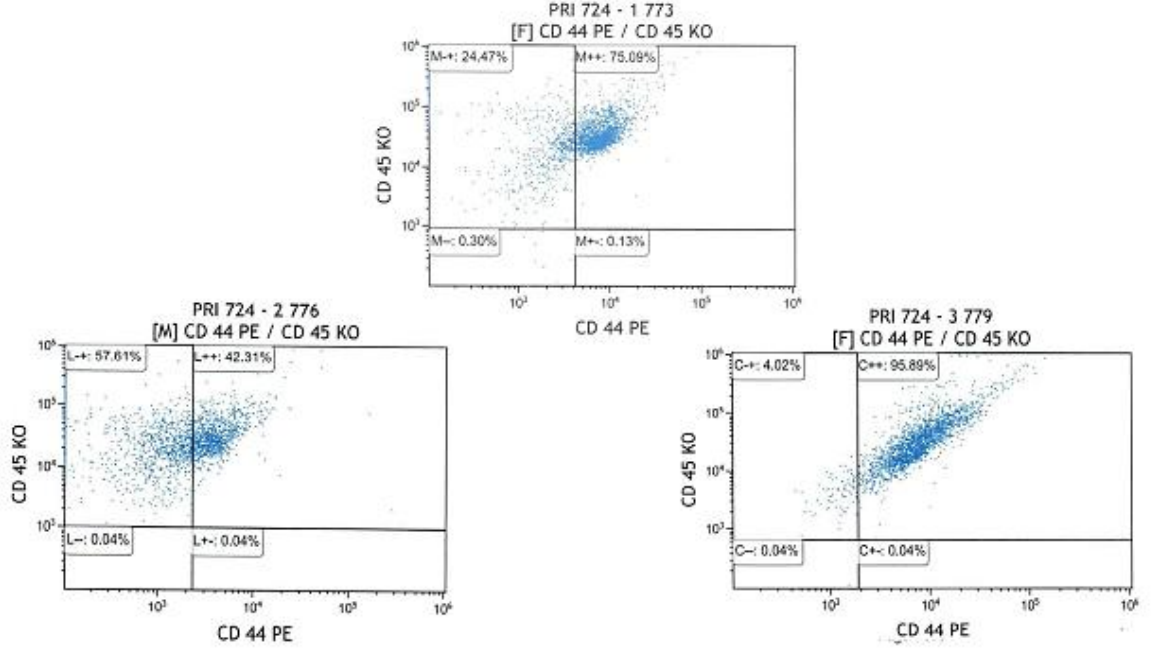
Şekil 6: PRI-724 uygulanan grupta CD133 antikorünün akım sitometri sonuçları.

CD 44 antikorü için;

PRI-724 1. Grup %75,09 + %0,13

PRI-724 2. Grup %42,31 + %0,04

PRI-724 3. Grup %95,89 + %0,04 şeklindedir. PRI-724 deney grubunun CD44 antikorü için ortalama oranı %71,16 olarak hesaplanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7: PRI-724 uygulanan grupta CD44 antikorunun akım sitometri sonuçları.

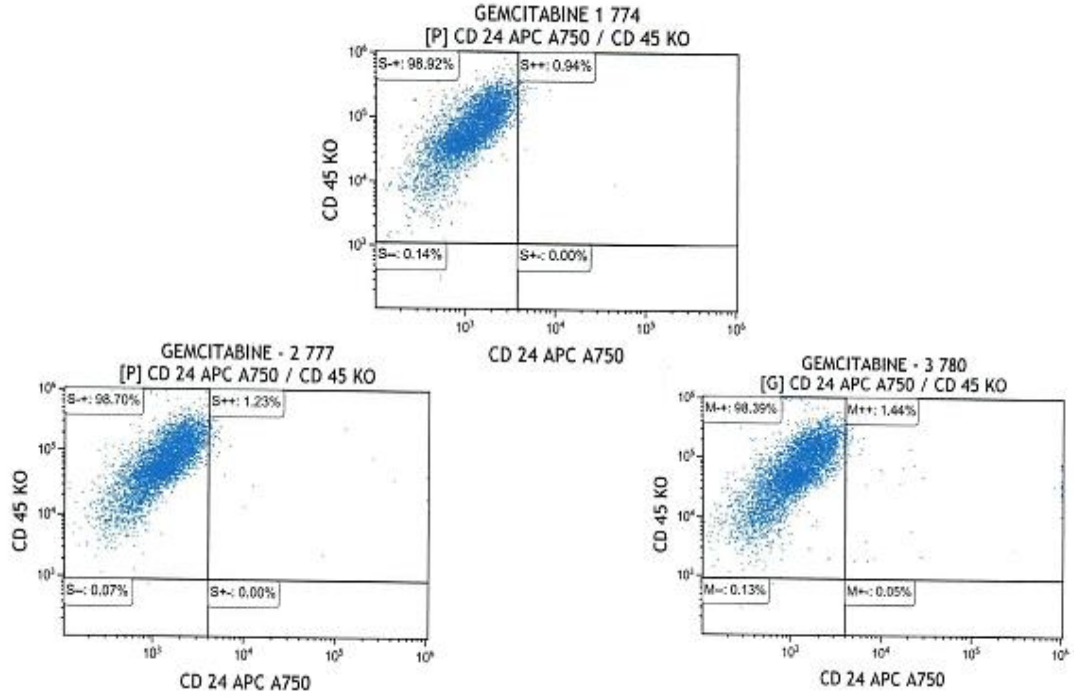
Gemcitabine uygulanan deney gruplarımızda sonuçlar şu şekildedir.

CD 24 antikoru için;

Gemcitabine 1. Grup %0,94 + %0,00

Gemcitabine 2. Grup %1,23 + %0,00

Gemcitabine 3. Grup %1,44 + %0,05 şeklindedir. Gemcitabine deney grubunun CD24 antikoru için ortalama oranı %1,22 olarak hesaplanmıştır (Şekil 8).



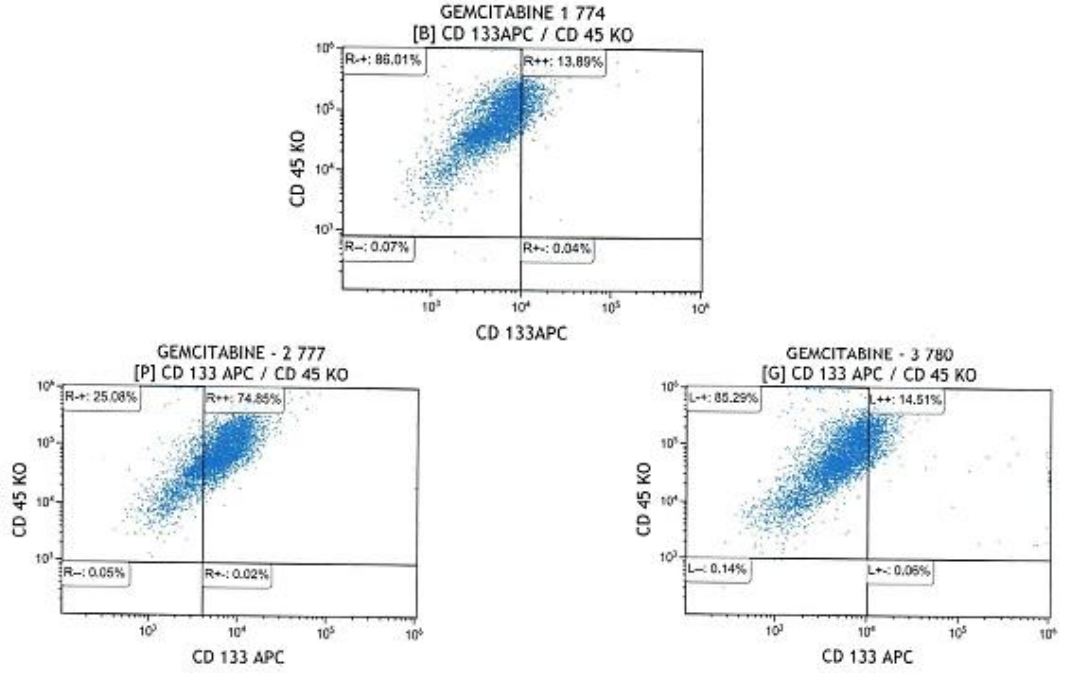
Şekil 8: Gemcitabine uygulanan grupta CD24 antikorunun akım sitometri sonuçları.

CD 133 antikoru için;

Gemcitabine 1. Grup %13,89 + %0,04

Gemcitabine 2. Grup %74,85 + %0,02

Gemcitabine 3. Grup %14,51 + %0,06 şeklindedir. Gemcitabine deney grubunun CD133 antikoru için ortalama oranı %34,45 olarak hesaplanmıştır (Şekil 9).



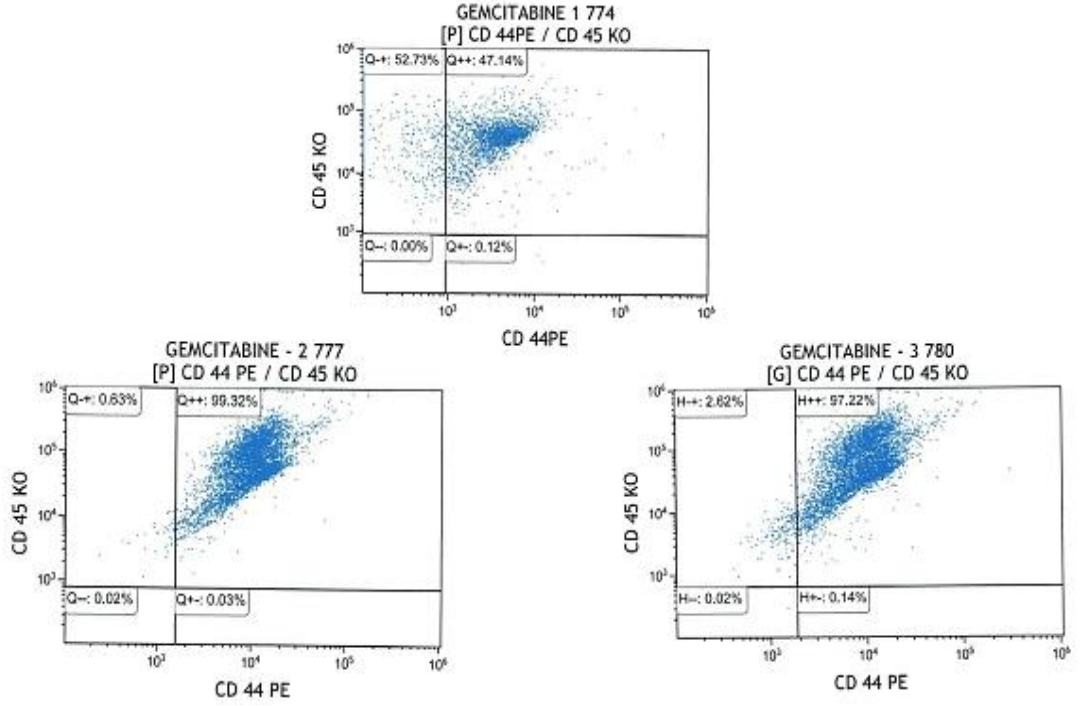
Şekil 9: Gemcitabine uygulanan grupta CD133 antikorunun akım sitometri sonuçları.

CD 44 antikoruna için;

Gemcitabine 1. Grup %47,14 + %0,12

Gemcitabine 2. Grup %99,32 + %0,03

Gemcitabine 3. Grup %97,22 + %0,14 şeklindedir. Gemcitabine deney grubunun CD44 antikoruna için ortalama oranı %81,32 olarak hesaplanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Gemcitabine uygulanan grupta CD44 antikorunun akım sitometri sonuçları.

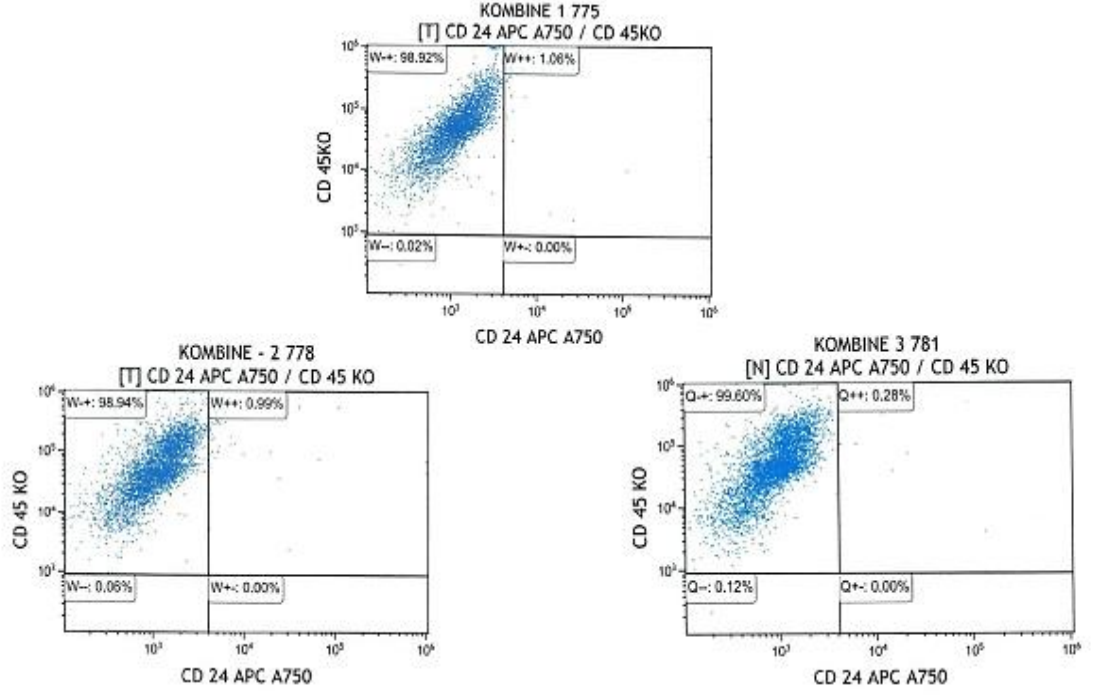
Kombine tedavi (PRI-724+gemcitabine) uygulanan deney grubumuzda sonuçlar şu şekildedir.

CD 24 antikoru için;

Kombine tedavi 1. Grup %1,06 + %0,00

Kombine tedavi 2. Grup %0,99 + %0,00

Kombine tedavi 3. Grup %0,28 + %0,00 şeklindedir. Kombine tedavi uygulanan deney grubu için CD24 antikorunun ortalama oranı %0,77 olarak hesaplanmıştır (Şekil 11).

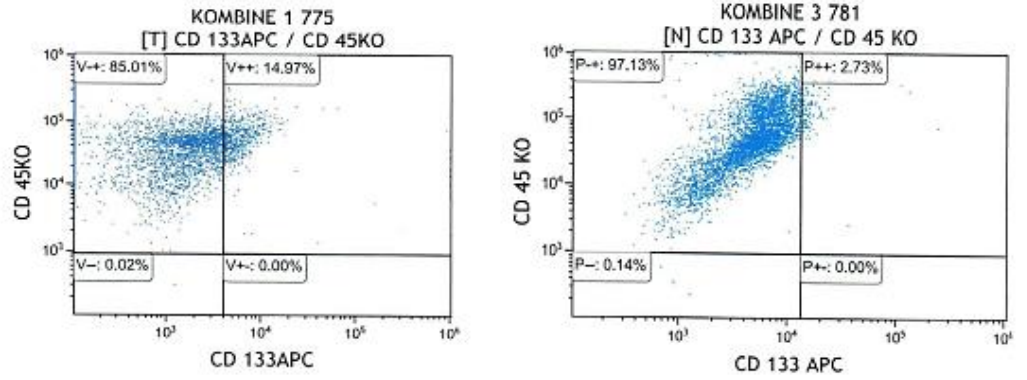


Şekil 11: Gem+PRI uygulanan grupta CD24 antikorunun akım sitometri sonuçları.

CD 133 antikoru için;

Kombine tedavi 1. Grup % 14,97 + %0,00

Kombine tedavi 3. Grup %2,73 + %0,00 şeklindedir. Kombine tedavi uygulanan deney grubu için CD133 antikorunun ortalama oranı %8,85 olarak hesaplanmıştır (Şekil 12).



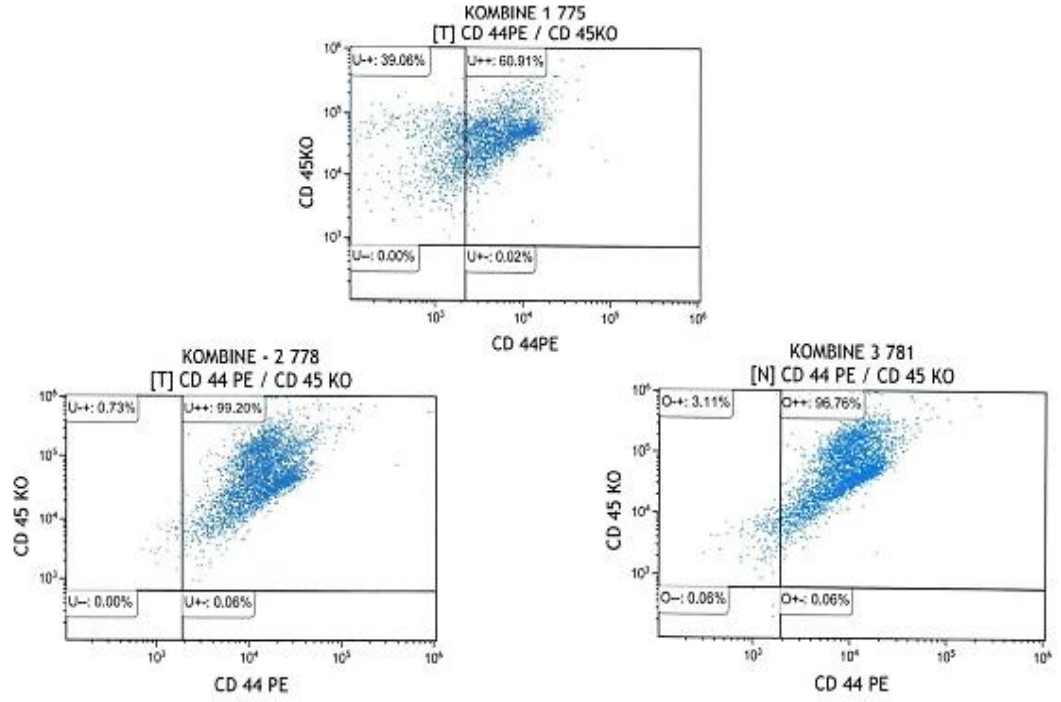
Şekil 12: Gem+PRI uygulanan grupta CD133 antikorunun akım sitometri sonuçları.

CD 44 antikorü için;

Kombine tedavi 1. Grup %60,91 + %0,02

Kombine tedavi 2. Grup %99,20 + %0,06

Kombine tedavi 3. Grup %96,76 + %0,06 şeklindedir. Kombine tedavi uygulanan deney grubu için CD44 antikorunun ortalama oranı %85,67 olarak hesaplanmıştır (Şekil 13).



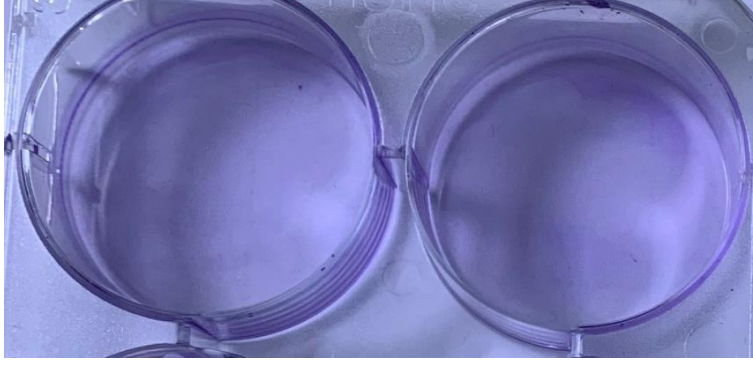
Şekil 13: Gem+PRI uygulanan grupta CD44 antikorunun akım sitometri sonuçları.

4.4.Klonojenik Test

Klonojenik deneyde, 4 deney grubu oluşturuldu. Bunlar, kontrol grubu, gemcitabine grubu, PRI-724 grubu ve PRI-724+Gemcitabine grubudur. Deney sonucunda, kontrol grubunda hücre kolonileri gözlemlenirken, Gemcitabine, PRI-724 ve kombine (PRI-724+Gemcitabine) gruplarında hücre kolonileri oluşturmadığı gözlemlenmiştir.



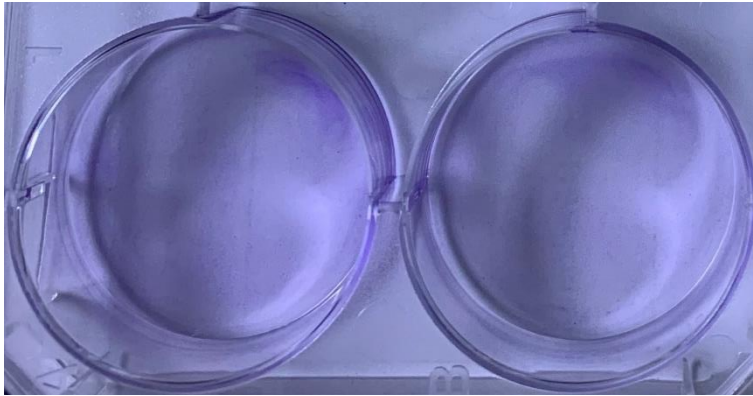
Resim 1: Kontrol grubu klonojenik deney sonucu.



Resim 2: Gemcitabine grubunun klonojenik deney sonucu.



Resim 3: PRI-724 grubunun klonojenik deney sonucu.



Resim 4: Kombine (Gem+PRI-724) grubunun klonojenik deney sonucu.

Klonojenik deney gruplarımızın koloni yoğunlukları ise Image J programında elde edildi. Elde edilen verilerin her bir deney grubu için ortalama ve standart sapması hesaplanıp tablo haline getirilmiştir (Tablo 4). Kontrol grubundaki koloni yoğunluğu oldukça yoğun iken gemcitabine, PRI-724 ve kombine tedavi gruplarındaki koloni yoğunluklarında anlamlı bir azalma görülmüştür.

KLONOJENİK DENEY GRUPLARI	ORTALAMA VE STANDART SAPMA
KONTROL	208,0235 ± 18,80
GEMCİTABİNE	8,435 ± 6,50
PRI-724	5,8355 ± 0,23
KOMBİNE	4,0415 ± 0,058

Tablo 4: Klonojenik deney verileri.

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri, dünyada kansere bağılı meydana gelen ölümlerin başlıca sebeplerinden biri olmaya devam etmektedir. Çoğunlukla pankreas duktal adenokarsinomunu (PDAC) içeren pankreas kanseri, 2019 yılında ABD’de yaklaşık 45,750 ölümün meydana geldiği bir kanser türü olmuştur (Ho et al., 2020). ABD’de elde edilen verilere göre pankreas kanseri tanısı konulduktan sonra 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %10’dur. Hastaların yaklaşık %80-85’i cerrahi müdahale edilemeyen ve metastaza uğramış hastalık seyriyle başvurmaktadır (Mizrahi et al., 2020). Pankreas kanseri, dünyada en çok görülen 14. kanser türü iken, kansere bağılı ölüm nedenlerinde 7. kanser türü olarak sıralamada yer almaktadır. 2018 yılında yapılan GLOBOCAN tahminlerinde, dünya genelinde 458918 pankreas kanser tanısının konulacağını ve 432242 pankreas kanserine bağılı ölüm gerçekleşeceğini ileri sürmüştür. Pankreas kanserinin 2030 yılına kadar ABD’de kansere bağılı ölümlerde 4. sıradan 2. sıraya yükseleceği ön görülmektedir (McGuigan et al., 2018). Pankreas kanser türü olan pankreas duktal adenokarsinoma (PDAC), pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) olarak bilinen öncü lezyonların ilerlemesiyle oluşmaktadır. PDAC vakalarının %95’inde KRAS mutasyonları saptanmaktadır. KRAS mutasyonları PanIN ve PDAC geliştirmekte önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, INK4A, TP53 ve DPCA4 (SMAD4) tümör baskılayıcı genlerinin inaktivasyonu PanIN ve PDAC gelişimine katkı sağlamaktadır. Bu genetik değişikliklere ek olarak, PDAC gelişiminde Wnt, Notch ve Heghegog sinyal yolaklarının aktivasyonu yaygın olarak gözlemlenmektedir (Sano et al., 2016).

Wnt sinyal yolağı iki grupta incelenmektedir. Bunlardan ilki kanonik Wnt sinyal yolağı diğeri kanonik olmayan Wnt sinyal yolağıdır. Kanonik Wnt sinyal yolağı yani bir başka deyişle Wnt/ β -catenin sinyal yolağı iyi tanımlanmış bir yolaktır. Wnt sinyal yolu embriyogenezde, hücre farklılaşmasında, polarizasyon ve hücre göçünde büyük rol oynamaktadır. Fakat bununla birlikte, tümör oluşumunda da rol oynadığı gösterilmiştir. Wnt/ β -catenin sinyal yolağının hücre membranında, Wnt proteini proteinlerine özgün Fzd reseptörü bulunmaktadır. Ve bu Fzd reseptörünün yanında ko-reseptör olarak adlandırılan LRP5/6 ligandları bulunmaktadır. Wnt sinyal yolağının, sitoplazma kısmında bir parçalama kompleksi adı verilen yapı bulunmaktadır. Bu yapıyı oluşturan proteinler APC, GSK3, CK1 ve Axin’dır. Wnt proteininin Fzd-LRP5/6 reseptör kompleksine bağlanmadığı durumlarda

yani inaktif olduğu durumda parçalama kompleksi sitoplazma içinde dolaşan β -catenin moleküllerini ubiquitin ile işaretler ve daha sonrasında β -catenin degradesyonunu gerçekleştirir. Degrede olan β -catenin hedef genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirilememektedir. Wnt proteininin varlığında, Wnt proteini Fzd-LRP5/6 reseptörlerine bağlanarak sinyal iletim yolağının aşağı regülasyonunu başlatmaktadır. Bu durumda yıkım kompleksi inaktif hale gelmektedir. Yıkıma uğramayan β -catenin molekülü sitoplazmada birikerek çekirdeğe giriş sağlamaktadır. Çekirdekte CBP proteinine bağlanarak TCF/LEF hedef gen transkripsiyonunu başlatmaktadır (Taciak et al., 2018).

Kanser kök hücrelerinin karakteristik özellikleri, tümör biyolojisi araştırmalarının derinleşmesiyle birlikte klinik tanı ve tedavi alanında önemli ölçüde gelişmiştir. Kanser kök hücreleri, normal kök hücrelerle pek çok ortak özelliğe sahiptir. Kanser kök hücreleri, kendi kendini yenileme yeteneği ve farklılaşmaları ile normal kök hücrelerle benzerlik göstermektedir. Fakat bu özelliklere ek olarak metastaz yapabilme özelliğine sahip olup kemoterapi, radyoterapi ve kimyasal ajanlara karşı direnç göstermektedirler. Kanser kök hücreleri ve normal hücreler kendi kendini yenilemede ortak sinyal yollarını paylaşmaktadırlar. Bu sinyal yolları Wnt/ β -catenin, Notch ve Hedgehog'tur. PTEN ve polycomb gibi sinyal yolları kanser kök hücrelerinin büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Bu sinyal yolları kanser kök hücrelerinin kendini yenilemesini ve tümör oluşumuna nasıl katkı sağladığını anlamanın iyi bir yoludur (Yang et al., 2020). Kanser kök hücrelerinin kökeni halen belli olmasa da, kanser kök hücrelerinin aynı normal kök hücreler gibi sessiz faz olarak adlandırılan G_0 fazında kaldığı bilinmektedir. Kanser kök hücreleri bu sessiz fazdayken, çoğunlukla çoğalmakta olan kanser hücrelerini hedef alan anti-kanser ilaçlarıyla kanser kök hücrelerini inhibe etmek olası değildir. Bu yüzden kanser kök hücrelerini yok etmek için hedefe yönelik tedavileri ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu hedefe yönelik tedaviler kanser kök hücrelerinin kendini yenilemesi ve farklılaşmasını engelleyip metastaz yapma riskini azaltabildiği gösterilmiştir (Chae & Kim, 2018).

Bir Wnt inhibitörü olan PRI-724, β -catenin, TCF/LEF ve CBP kompleksinin oluşmasına engel olup hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmamaktadır. Bu sayede kontrolsüz proliferasyon olmamakta ve hedef genlerde var olan onkogenlerin ekspresyonu gerçekleştirilememektedir. Wnt sinyal yolağının hem tümör gelişiminde hem de kanser kök hücrelerindeki rolü olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Bu terapötik ajanların kanser kök hücreleri üzerinde de sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Yang et al., 2020).

PRI-724 ile yapılan çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, KHDAK hücre hatları ile normal bronşiyal epitelyal hücre hatlarındaki BCAT1 ekspresyonlarına bakıldığında KHDAK hücre hatlarındaki BCAT1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. BCAT1 proteininin aşırı ekspresyonunu incelenmiş olup bu aşırı ekspresyonunun Wnt sinyal yolağının aktive ettiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, BCAT1'in aşırı ekspresyonu hem BEAS-2B hem de H1299 hücre hatlarında hücre büyüme hızını, koloni sayısını ve invazyon kabiliyetini arttırdığını belirtmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar Wnt sinyal yolağı ile BCAT1 arasındaki ilişkiyi doğrulamak için BCAT1 plazmidi ile transfekte edilmiş BEAS-2B ve H1299 hücre hatları üzerine Wnt inhibitörü olan PRI-724 kullanmıştır. Wnt inhibitörü PRI-724, cyclin D1, MMP7 ve c-Myc seviyelerini önemli derece düşürdüğünü, bu da BCAT1 ekspresyonu üzerinde Wnt sinyal yolağının etkisi olduğunu göstermiştir (Lin et al., 2020). Başka bir çalışmada hepatoselüller karsinoma hücre (HCC) hatlarında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hatları HepG2 ve HuH6'dır. Bu çalışmada MTT analizleri sonucunda hücre hatlarında etkili olan IC₅₀ değeri 10µM olarak belirlenmiştir. Hücre döngüsü dağılımını analiz etmek için hücreler 24 saat 10µM PRI-724 ile muamele edilmiş daha sonrasında akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda PRI-724 ile muamele edilen hücre hatlarının G₀/G₁ fazının yüzdeleri önemli ölçüde artmış olduğu gösterilmiştir. Ve yine aynı çalışmada HepG2 ve HuH6 hücre hatları 24 saat boyunca 10µM PRI-724 ile muamele edildikten sonra hücre döngüsüyle ilişkili olan proteinlerin ekspresyonlarına western blot analizi ile bakılmıştır. Apoptoz ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenirken, proliferasyon ile ilişkili proteinlerin ise ekspresyonunu önemli derece azalttığı gösterilmiştir (Gabata et al., 2020). PRI-724 ile yapılan bir başka çalışma mide kanseri hücre hatları üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2)'nin aşırı ekspresyonunun kanser kök hücreleri üzerinde tümör büyümesini, kanserojenezi ve invazyonu etkilediği daha önceki çalışmalarla tespit edilmiştir. Araştırmacılar buradan yola çıkarak HER2 geninin aşırı ekspresyonunun mide kanser kök hücrelerinin aktivitelerini araştırmayı amaçlamışlardır. HER2 geni, MKN28 mide kanseri hücre hattına transfekte edilmiştir. Küre oluşumu analizi ile MKN28 kontrol grubuyla HER2 transfekte edilmiş grup karşılaştırıldığında, HER2 transfekte edilmiş grupta küre boyutları ve küre oluşum sıklığının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kanser kök hücre belirteçlerine bakıldığında HER2 transfekte edilmiş grupta OCT4, BMI1 ve EMT belirteçlerinin daha yüksek seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, E-kadherin seviyesinde önemli derecede azalma gözlemlenmiştir. HER2 aşırı ekspresyonunun,

kanser kök hücresiyle ilişkili Wnt/ β -catenin sinyal yolağıyla karakterize olduğu Lüsiferaz analizi ile gösterilmiştir. Bu veriler kapsamında araştırmacılar, bu hücelere Wnt inhibitörü PRI-724 (1 μ M) ile 24 saat muamele etmişlerdir. Bu muamele sonrasında western blot analizi ile OCT4 ve BMI1 belirteçlerinin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. İmmünfloresan boyama ile E-kadherin seviyelerinde önemli derecede iyileşme olduğu gösterilmiştir (Jung et al., 2019).

Çalışmamıza bu veriler kapsamında yola çıkararak Wnt inhibitörü PRI-724'ün pankreas kanseri kök hücreleri üzerine olan etkileri araştırıldı. Öncelikle Panc-1 hücre hattımız üzerinde en etkili sonucu alabileceğimiz dozu öğrenmek için doz belirleme çalışması yapıldı. Doz belirleme sonuçlarına göre IC₅₀ değerlerimizi PRI-724 45 μ M, gemcitabine 4mg/ml, kombine (Gem+PRI) grubumuz 4mg/ml+45 μ M olarak belirlendi.

Akım sitometri analizinde seçmiş olduğumuz üç adet pankreas kanser kök hücresi belirteçlerinin saçılım grafikleri elde edildi. Akım sitometri analizinde 3 farklı ilaç grubu oluşturuldu ve üçer tekrarlı olacak şekilde analizimiz gerçekleştirildi. Akım sitometri analizimizde CD133, CD24 ve CD44 antikorları ile çalışma yapıldı. Analiz sonucu elde ettiğimiz veriler PRI-724 uygulanan grupta CD24 için %1.32, CD133 için %12.69, CD44 için %71.16 oranında saptanmıştır. Gemcitabine uygulanan grupta CD24 için %1.22, CD133 için %34.45, CD44 için %81.32 oranında saptanmıştır. Kombine tedavinin uygulandığı grupta CD24 için %0.77, CD133 için %8.85, CD44 için %85.67 oranında saptanmıştır. Akım sitometri sonuçlarımıza göre PRI-724'ün pankreas kanser kök hücre belirteçlerinden CD24 ve CD133 markerlarını anlamlı ölçüde azalttığını gözlemlendi. Fakat CD44 yüzey belirteçinde anlamlı bir azalma görülmemiştir. Akım sitometri sonuçlarımıza göre PRI-724'ün Wnt sinyal yolağını baskılayarak pankreas kanser kök hücrelerinin fonksiyonları etkisiz hale getirdiğini ve pankreas kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu engelleyici ve apoptoza yol açan etkisinin olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda yapmış olduğumuz klonojenik deneyde de anlamlı sonuçlar gözlemlenildi. Kontrol grubu, PRI-724 grubu, gemcitabine grubu ve kombine tedavi grubu oluşturduğumuz klonojenik deneyimizde kontrol grubunda yoğun hücre kolonileri gözlemlenirken, PRI-724, gemcitabine ve kombine tedavi uygulanan gruplarda koloni oluşmadığı gözlemlendi.

Tüm sonuçları değerlendirdiğimizde, PRI-724'ün Wnt sinyal yolağını baskılayarak pankreas kanser kök hücrelerinin fonksiyonlarını etkisiz hale getirip pankreas kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediği düşünölmektedir.

Bu tezde elde edilmiş veriler kullanılarak PRI-724, Wnt sinyal yolağı ve pankreas kanser kök hücreleri arasındaki mekanizma daha detaylı bir şekilde aydınlatılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmanın sonucuna göre PRI-724'ün Wnt sinyal yolağını baskılayarak pankreas kanser kök hücreleri üzerinde aktivitesini engelleyici bir etkisi olduğu belirlendi. MTT doz belirleme sonuçlarına göre PRI-724'ün pankreas kanseri hücrelerine etki eden IC₅₀ değeri 45µM olarak belirlendi. Deneylerimiz belirlemiş olduğumuz IC₅₀ değerlerini dikkate alarak yapıldı. Akım sitometri analizi sonuçlarına göre PRI-724'ün ve kombine tedavinin pankreas kanser kök hücre yüzey belirteçlerini anlamlı ölçüde azalttığı saptandı. Klonojenik deney sonuçlarında ise kontrol grubunda yoğun koloni oluşumu gözlemlenirken ilaç gruplarımızda koloni oluşmadığı gözlemlendi. Yapmış olduğumuz çalışma farklı pankreas kanser hücre hatları ve farklı moleküler tekniklerle desteklenirse daha anlamlı sonuçların elde edilebileceğini ve deney hayvanları ya da klinik çalışmalara ön ayak olabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmanın pankreas kanseri tedavisi için gelecekte umut olabileceği ve klinik çalışmalara öncülük edebileceği bekleniyor.

KAYNAKLAR

- Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. In *Diabetologia* (Vol. 63, Issue 10, pp. 1966–1973). <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>
- Can, A. (2013). *Kök Hücre*.
- Chae, Y. C., & Kim, J. H. (2018). Cancer stem cell metabolism: Target for cancer therapy. *BMB Reports*, *51*(7), 319–326. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.7.112>
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, *17*(3), 313–319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Collins, M. a, Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J., Galbán, S., Galbán, C. J., Rakshit, S., Flannagan, K. S., Adsay, N. V., & Pasca, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(2), 639–653. <https://doi.org/10.1172/JCI59227DS1>
- Gabata, R., Harada, K., Mizutani, Y., Ouchi, H., Yoshimura, K., Sato, Y., Kitao, A., Kimura, K., Kouji, H., Miyashita, T., Tajima, H., & Ohta, T. (2020). Anti-tumor activity of the small molecule inhibitor PRI-724 against β -catenin-activated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, *40*(9), 5211–5219. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14524>
- Ho, W. J., Jaffee, E. M., & Zheng, L. (2020). The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *17*(9), 527–540. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0363-5>
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(44), 9694–9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>
- Javadinia, S. A., Shahidsales, S., Fanipakdel, A., Joudi-Mashhad, M., Mehramiz, M., Talebian, S., Maftouh, M., Mardani, R., Hassanian, S. M., Khazaei, M., Ferns, G. A., & Avan, A. (2019). Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin pathway in the treatment of pancreatic cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(5), 6833–6840.

<https://doi.org/10.1002/jcb.27835>

- Jung, D. H., Bae, Y. J., Kim, J. H., Shin, Y. K., & Jeung, H. C. (2019). HER2 regulates cancer stem cell activities via the wnt signaling pathway in gastric cancer cells. *Oncology (Switzerland)*, *97*(5), 311–318. <https://doi.org/10.1159/000502845>
- Kakarala, M., & Wicha, M. S. (2007). Cancer stem cells: Implications for cancer treatment and prevention. *Cancer Journal*, *13*(5), 271–275. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318156da4e>
- Ko, A. H., Chiorean, E. G., Kwak, E. L., Lenz, H.-J., Nadler, P. I., Wood, D. L., Fujimori, M., Inada, T., Kouji, H., & McWilliams, R. R. (2015). Final results of a phase Ib dose-escalation study of PRI-724, a CBP/beta-catenin modulator, plus gemcitabine (GEM) in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma (APC) as second-line therapy after FOLFIRINOX or FOLFOX. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(15). https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e15270
- KOÇATAKAN, P., & ATASEVEN, H. (2021). PankreasKanseri. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, *54*(January), 59–65. <https://doi.org/10.20492/aeahtd.806164>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, *85*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, *4*(2), 68–75. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5851>
- Krausova, M., & Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cellular Signalling*, *26*(3), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.032>
- Lin, X., Tan, S., Fu, L., & Dong, Q. (2020). BCAT1 overexpression promotes proliferation and invasion through yap signaling in non-small cell lung cancers. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 3583–3594. <https://doi.org/10.2147/OTT.S255644>
- Matsui, W. H. (2016). Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (United States)*, *95*(1), S8–S19. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004765>
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>

- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., & Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 395(10242), 2008–2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0)
- Morris IV, J. P., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 10(10), 683–695. <https://doi.org/10.1038/nrc2899>.KRAS
- Ng, L. F., Kaur, P., Bunnag, N., Suresh, J., Sung, I. C. H., Tan, Q. H., Gruber, J., & Tolwinski, N. S. (2019). WNT Signaling in Disease. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080826>
- Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., Ten Berge, D., & Kalani, Y. (2008). SIGNALING BY THE WNT PATHWAY Wnt Signaling and Stem Cell Control. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, LXXIII.
- Sano, M., Driscoll, D. R., DeJesus-Monge, W. E., Quattrochi, B., Appleman, V. A., Ou, J., Zhu, L. J., Yoshida, N., Yamazaki, S., Takayama, T., Sugitani, M., Nemoto, N., Klimstra, D. S., & Lewis, B. C. (2016). Activation of WNT/ β -Catenin Signaling Enhances Pancreatic Cancer Development and the Malignant Potential Via Up-regulation of Cyr61. *Neoplasia (United States)*, 18(12), 785–794. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.11.004>
- Sevimli, M., & Semerci Sevimli, T. (2016). *Derleme Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı*. 45–54.
- Sugimura, R., & Li, L. (2010). Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 90(4), 243–256. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20195>
- Taciak, B., Pruszyńska, I., Kiraga, L., Bialasek, M., & Krol, M. (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 69(2), 185–196. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07>
- Toledo-Guzmán, M. E., Bigoni-Ordóñez, G. D., Hernández, M. I., & Ortiz-Sánchez, E. (2018). Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World Journal of Stem Cells*, 10(12), 183–195. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i12.183>
- Wojciech, Z., Maciej, D., Maria, S., & Zbigniew, R. (2008). Fuel Cells: Past, Present and Future. *IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials*, 128(5), 329–332.

<https://doi.org/10.1541/ieejfms.128.329>

Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *63*(5), 318–348. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>

Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., & Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>

Zhang, Y., Morris IV, J. P., Yan, W., Schofield, H. K., Gurney, A., Simeone, D. M., Millar, S. E., Hoey, T., Hebrok, M., & Di Magliano, M. P. (2013). Canonical Wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis. *Cancer Research*, *73*(15), 4909–4922. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4384>

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

‘Wnt İnhibitörü PRI-724’ün Pankreas Kanseri Kök Hücreleri Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması’ başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranışlar ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

İmza

Büşra AYDINOĞLU

.../.../.....

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : AYDINOĞLU, Büşra
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : AYDIN / 30.09.1995
E-mail : bsraydngl@gmail.com
Yabancı Dil : Türkçe, İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y.Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp	2017-2021
Lisans	Uşak Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik	2013-2017