

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMOTERAPİ ÖNCESİ HÜCRE İÇİ HOMEOSTAZININ
DEĞİŞTİRİLMESİNİN PROSTAT KANSER HÜCRE SAĞKALIMINA VE
KANSER KÖK HÜCRE PROFİLİNE ETKİSİ**

Rıza SERTTAŞ

DOKTORA TEZİ

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

EDİRNE-2023

Rıza SERTTAŞ'ın hazırladığı “Kemoterapi Öncesi Hücre İçi Homeostazının Değiştirilmesinin Prostat Kanseri Hücre Sağkalımına ve Kanseri Kök Hücre Profiline Etkisi” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

.....

Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

.....

Prof. Dr. Ebru TAŞTEKİN

.....

Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR

.....

Prof. Dr. Halit CANATAN

.....

Tez Savunma Tarihi: 15/06/2023

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

15/06/2023

Rıza SERTTAŞ

İmza

Doktora Tezi

Kemoterapi Öncesi Hücre İçi Homeostazının Değiştirilmesinin Prostat Kanseri Hücre Sağkalımına ve Kanseri Kök Hücre Profiline Etkisi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Kemoterapi, günümüzde kanser tedavisinde başvurulmuş en önemli tedavi seçeneklerinden birisidir. Bununla birlikte, kemoterapötik ajanların yan etkileri ve ilaç direnci gelişimi hastanın yaşam süresini kısıtlayan sorunların başında gelmektedir. Taksol grubu kemoterapi ajanları, androjen deprivasyon tedavisine yanıt vermeyen kastrasyon-dirençli prostat kanseri tedavisinde başvurulmuş temel bir yöntemdir. Ancak, bu hastaların önemli bir kısmında taksol tedavisine cevap oluşmayarak ilaç direnci gelişebilmekte, metastaz ve nüksle sonuçlanabilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, taksol tedavisi öncesi PCa hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını artırmaktır. Böylece daha düşük taksol dozu ile daha etkili tedavi sağlayarak ilacın yan etkilerinin azaltılması hedeflenmektedir. Tümör kütlelerinde az sayıda bulunan kanser kök hücreleri tedavi direnci gelişimi ve metastazdan sorumlu tutulur. Bu sebeple, tedavi öncesinde gerçekleştirilen uygulamaların kanser kök hücrelerini de elimine etmesi planlanmıştır. Çalışmada kanser kök hücrelerine seçicilik gösteren salinomisin hücre içi potasyum (K⁺) iyon dengesini, Wnt yolağı inhibitörü de hücresel proliferasyon işlevini bozmak amacıyla kullanılarak kanser hücrelerinin kabazitaksel tedavisine olan duyarlılığı artırılmıştır. Araştırmada insan kastrasyon-dirençli prostat kanseri PC3 hücre serisi kullanılmıştır. Hücreler 0,5 µM salinomisin ve 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü kombinasyonu ile ön uygulama (48 saat) sonrası yeni nesil taksol kabazitaksel ile (48 saat) tedavi edilmiştir. Hücre sağkalımı, apoptoz ve hücre döngüsü analizleri sırasıyla MTT testi, aneksin V kullanılarak sitometrik yöntemle belirlenmiştir. Hücre göçü, yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirilmiştir. Tedaviler sonrası kanser kök hücre pluripotensi gücü ve başlıca hücre içi sinyal yolları analizleri kantitatif PCR ve Western

blot tekniği ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, PCa tedavisinde kemoterapi etkinliğini artırması, ilaç direnci ve nüks riskini düşürmesi yönünde literatüre katkı sağlamıştır.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 132

Anahtar Kelimeler : Prostat kanseri, kök hücre, kemoterapi, apoptoz, EMT



PhD Thesis

The Effect of Altering Intracellular Homeostasis Before Chemotherapy on Prostate Cancer Cell Survival and Cancer Stem Cell Profile

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Chemotherapy is one of the most important treatment options used in cancer therapy today. However, the side effects of chemotherapeutic agents and the development of drug resistance are major problems that limit the patient's lifespan. Taxane-based chemotherapy agents are a fundamental method used in the treatment of castration-resistant prostate cancer that does not respond to androgen deprivation therapy. However, a significant portion of these patients may develop drug resistance and result in metastasis and relapse due to a lack of response to taxane treatment. The aim of this thesis is to increase the sensitivity of prostate cancer cells to chemotherapy prior to taxane treatment, aiming to provide a more effective therapy with a lower taxane dosage and reduce the side effects of the drug. Cancer stem cells (CSCs), which are found in small numbers in tumor masses, are held responsible for the development of treatment resistance and metastasis. Therefore, the interventions performed before treatment are planned to eliminate CSCs as well.

In the study, salinomycin, which exhibits selectivity towards cancer stem cells, was used to disrupt intracellular potassium (K⁺) ion balance, while a Wnt pathway inhibitor was used to disrupt cellular proliferation function, aiming to increase the sensitivity of cancer cells to cabazitaxel treatment. The human castration-resistant prostate cancer PC3 cells were used in the research. The cells were treated with a combination of 0.5 μ M salinomycin and 6.25 μ M Wnt pathway inhibitor after pre-treatment (48 hours) and then treated with the new generation taxane, cabazitaxel (48 hours). Cell survival, apoptosis, and cell cycle analyses were determined by the MTT test, flow cytometric

method using annexin V, respectively. Cell migration was evaluated using a wound healing experiment. The pluripotency of CSCs and major intracellular signaling pathway analyses were quantitatively analyzed using PCR and Western blot techniques after treatments. The obtained data have contributed to the literature by increasing the effectiveness of chemotherapy in PCa treatment and reducing drug resistance and the risk of relapse.

Year : 2023

Number of Pages : 132

Keywords : Prostate cancer, stem cell, chemotherapy, apoptosis, EMT

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin başlangıcından bu yana her aşamada danışmanlığıyla bilimsel destek açısından büyük emekleri olan, çalışmalarımdeki motivasyonumu her zaman üst düzeyde tutmamı sağlayan, sadece bir hoca değil aynı zamanda değerli bir büyüğüm olarak hayatımdaki yeri için sayın danışmanım Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a;

Meslek hayatımın çok önemli bir kısmını geçirdiğim ve halen görevime devam ettiğim Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın başkanı Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR ve tüm öğretim üyelerine;

Doğa için gerçekleştirdiği çalışmalarla bana ilham olan, gerek tez yazımında gerekse bilimsel motivasyon açısından desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, enerjisi, parlak fikirleri ve güç veren varlığıyla her zaman yanımda olan kıymetli yol arkadaşım bitki bilimci Dr. Pelin TURHAN-SERTTAŞ'a;

Doktora dönemimin tamamını bünyesinde tamamladığım Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Zeynep ERDOĞAN'a;

Tez izleme komitesi toplantılarındaki yapıcı eleştirileri ve katkıları için Prof. Dr. İlker DIBIRDIK ile Prof. Dr. Ebru TAŞTEKİN'e;

Doktora tez çalışmalarımız sırasında birlikte çalıştığım mesai arkadaşım Dr. Kader GÖNÜL'e;

Her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda duran annem Seher SERTTAŞ ve babam Muharrem SERTTAŞ ile yaşamımda son derece kıymetli yerleri olan değerli aile büyüklerim Sevil TURHAN ve Faruk TURHAN'a;

Bu tez çalışmasını 2020/01 proje koduyla destekleyen TÜBAP'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi, yetişmemde büyük emeği olan 2015 yılında vefat eden rahmetli dedem Mehmet Nuri SERTTAŞ'a; ayrıca kanser hastalığından kaybettiğimiz tüm sevdiklerimize ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVI
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Bezinin Yapısı ve İşlevi	3
2.2. Prostat Kanserinde Tanı ve Tedavi Yaklaşımları.....	4
2.3. Kemoterapi ve Kanser Kök Hücrelerinin Tedavideki Önemi.....	6
2.4. Kanser Kök Hücrelerinin Devamlılığının Moleküler Temeli	8
2.5. Kanserde Tedavi Uygulamaları ve Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	10
2.5.1. Dışsal Apoptotik Sinyal İletim Yolağı ve Kanser Tedavisindeki Önemi	12
2.5.2. İçsel Apoptotik Sinyal İletim Yolağı ve Kanser Tedavisindeki Önemi.....	15
2.6. Hücre İçi Proliferasyon Mekanizmalarının Kanserdeki Önemi.....	20
2.7. Wnt/B-Katenin Hücre İçi Sinyal İletim Yolağı	27
2.8. Kanser Hücrelerinin Göçünde Etkili Moleküler Mekanizmalar	30
MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Hücre Kültürü ve Araştırma Grupları	33
3.1.1. Primer Hücre Kültürü Hazırlama	33
3.1.2. Ön-Tedavi Ve Kemoterapi Bileşenleri	34
3.2. Hücre Pasajı	35
3.2.1. Stok Amaçlı Hücre Dondurma ve Çözdürme	36
3.3. Hücre Sağkalım Analizleri.....	36
3.4. Uygulama Etki Analizi.....	37
3.5. Apoptoz Analizi	38
3.6. CD44 ⁺ Kanser Kök Hücre İzolasyonu	38
3.7. Üç Boyutlu Hücre Kültürü	39
3.8. Hücre Göçü Deneyi.....	40
3.9. Hoechst Boyası ile Apoptoz Değerlendirme.....	40
3.10. Gen İfadesi Analizleri	41
3.10.1. Total RNA İzolasyonu	41
3.10.2. cDNA Sentezi ve RT-qPCR Analizi.....	42
3.11. Protein İfadesi Analizi.....	43

3.11.1. Protein Ekstraksiyonu	44
3.11.2. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	44
3.11.3. Proteinlerin Membrana Transferi ve Bloklama	44
3.11.4. Primer ve Sekonder Antikor Bağlanması.....	45
3.11.5. Kemilüminesans Bağlanması ve Görüntüleme	45
3.12. İstatistiksel Analiz	45
BULGULAR.....	46
4.1. Konsantrasyon ve İnkübasyona Bağlı Salinomisinin Sitotoksik Etkisi	46
4.2. Wnt Sinyal Yolak İnhibitörünün Hücre Sağkalımına Etkisi.....	48
4.3. Kabazitakselin Hücre Sağkalımına Etkisi	50
4.4. Kombinasyon Tedavisinin Farklı Prostat Kanseri Hücrelerindeki Etkisi	52
4.5. Kombinasyon Tedavide Sinerjik Etki	58
4.6. Tedavi Bileşenlerinin PC3 Hücrelerindeki Apoptotik Etkisi.....	59
4.7. Tedavi Bileşenlerinin Hücre İçi Proliferasyon Yolaklarına Etkisi	63
4.8. Nükleer Boyama ile Hücre Ölümü Analizi	69
4.9. Apoptoz ile İlişkili Proteinlerin Analizi	71
4.10. Apoptoz ile İlişkili Genlerin İfade Analizi.....	74
4.11. Tedavi Modalitesinin Kök Hücre Sayısına Etkisi	78
4.12. Üç Boyutlu Hücre Kültüründe Sferoid Çapı ve Hücre Sayısı Analizi.....	81
4.13. Tedavi Stratejilerinin PC3 Hücre Migrasyon Yeteneğine Etkisi	86
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	92
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APAF1	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1
AR	: Androjen reseptörü
ATCC	: American Type Culture Collection
BCL-2	: B-cell lymphoma 2
DISC	: Death inducing signaling complex
EMT	: Epitelyal Mezenşimal Geçiş
FSS	: Fötal sığır serumu
IAP	: İnhibitör of apoptosis/apoptoz inhibitörleri
kDa	: Kilo dalton
KDPK	: Kastrasyon dirençli prostat kanseri
KML	: Kronik myeloid lösemi
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
PARP	: Poly (ADP-riboz) polimeraz
PC3	: Prostat kanseri 3
PCa	: Prostat kanseri
pH	: Hidrojenin gücü
PI3K	: Fosfotidilinozitol-3-OH kinaz
PSA	: Prostat spesifik antijen
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
STAT3	: Sinyal artırıcı ve transkripsiyon aktivatörü-3
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFR	: Tümör nekroz faktörü reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan prostat bezinin anatomik yapısı. Prostat bezine komşu olan mesane, üretra ve seminal vesikülün konumlanması ile prostat bezinin kısımları (a). Prostat bezinin histolojik organizasyonunda görevli hücrelerin yerleşimi (b) (Rebello vd., 2021).	4
Şekil 2.2. Hücre içi ve hücre dışı kaynaklı olarak gerçekleşen apoptotik sinyal iletim yollarındaki proteinlerin etkileşimleri (Özgün şekil).	18
Şekil 2.3. Prostat kanserinde etkili olan PI3K/AKT/mTOR, AR, RAS/MAPK ve Wnt/ β -katenin hücre içi sinyal iletim yolları (Shorning, Dass & Smalley, 2020).	23
Şekil 2.4. MAPK yollarını oluşturan proteinlerin ilişkileri (Lee & Rauch, 2020).	24
Şekil 2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının WNT proteinleri ile kontrolü (Zhang & Wang, 2020).	29
Şekil 2.6. Epitel-Mezenşimal Geçiş'in hücre sinyal iletim şeması (genetex.com).	32
Şekil 3.1. Bu çalışmada kullanılan salinomisin, Wnt yolağı inhibitörü XI ve kabazitakselin moleküler yapıları.	35
Şekil 4.1. Konsantrasyon ve uygulama süresine göre salinomisin sitotoksik etki oluşturur. PC3 hücreleri salinomisinin farklı konsantrasyonlarına (0,078 μ M - 20 μ M) 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süresince maruz bırakıldı. Uygulamalar sonrası hücrelerdeki sağkalım yüzdeleri MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre.	47
Şekil 4.2. Salinomisin tedavisinin IC ₅₀ değeri. PC3 hücreleri salinomisinin farklı konsantrasyonlarına 48 saat süresince maruz bırakılıp elde edilen hücre canlılık oranları GraphPad Prism 9.4.0 programında analiz edildi. Bu hücrelerdeki salinomisinin IC ₅₀ değeri 0,5 μ M olarak saptandı.	48
Şekil 4.3. Konsantrasyon ve uygulama süresine göre iWnt sitotoksik etki oluşturur. PC3 hücreleri iWnt'nin 0,39 μ M - 100 μ M konsantrasyonlarına 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süresince maruz bırakıldı. Uygulamalar sonrası hücrelerdeki sağkalım yüzdeleri MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre.	49
Şekil 4.4. iWnt tedavisinin IC ₅₀ değeri. PC3 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki iWnt 48 saat süresince uygulandı ve elde edilen hücre canlılık oranları GraphPad Prism 9.4.0 programında analiz edildi. PC3 hücrelerinde iWnt için IC ₅₀ değeri 6,25 μ M olarak tespit edildi.	50

Şekil 4.5. Konsantrasyon ve uygulama süresine göre kabazitaksel sitotoksik etki oluşturur. PC3 hücreleri kabazitakselin 0,39 nM - 100 nM konsantrasyonlarına 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süresince maruz bırakıldı. Uygulamalar sonrası hücrelerdeki sağkalım oranları MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre.....51

Şekil 4.6. Kabazitaksel tedavisinin IC_{50} değeri. PC3 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki kabazitaksel 48 saat süresince uygulandı ve elde edilen hücre canlılık oranları GraphPad Prism 9.4.0 programında analiz edildi. PC3 hücrelerinde kabazitaksel için IC_{50} değeri 2,5 nM olarak tespit edildi. 52

Şekil 4.7. Tedavi bileşenleri farklı tip prostat kanser hücrelerinde sitotoksik etki oluşturur. PC3 (A), LNCaP (B), DU145 (C) hücrelerinin canlılık oranları MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. Cab: Kabazitaksel, Sal: Salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü. 55

Şekil 4.8. Tedavi bileşenleri sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki oluşturmaz. Tedavi modaliteleri RPE hücrelerine uygulandı, hücre sağkalımları MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. Cab: Kabazitaksel, Sal: Salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü. 56

Şekil 4.9. Ön tedavi uygulamaları kemoterapi etkinliğini artırır. Kabazitakselin 2,5 nM (A), 1,25 nM (B) ve 0,625 nM konsantrasyonları ile 0,5 μ M Sal + 6,25 μ M iWnt'nin kombinasyonunun PC3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. Tek Cab uygulamasında IC_{50} 2,5 nM, Sal + iWnt ön tedavisi 0,625 nM'e düşürdü. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 57

Şekil 4.10. Salinomisin, iWnt ve kabazitaksel kombinasyonu sinerjik etki oluşturur. MTT testinden elde edilen veriler CompuSyn yazılımında analiz edilerek CI değerleri saptandı. Ön tedavi ile desteklenmiş kemoterapiye ait CI değerinin 1'den küçük olması sinerjiyi işaret eder. S: Sal, W: iWnt, C: Cab.....58

Şekil 4.11. Salinomisin, iWnt ve kabazitaksel kombinasyonu uyumu. MTT test verilerinden CompuSyn yazılımında CI ve DRI değerleri saptandı. DRI > 1 durumu, kombinasyonlar içindeki en uygun terapi seçeneğini gösterir. CI < 1 sinerjizmi, CI > 1 antagonizmi, CI = 1 eklemeli (aditif) etkiyi işaret eder. S: Sal, W: iWnt, C: Cab. 59

Şekil 4.12. Ön tedavi ile desteklenmiş kemoterapi, PC3 hücrelerindeki apoptoz oranını artırır. Görüntüleme temelli sitometrik yöntem kullanılarak PC3 hücrelerinin 48 saat tekli veya bunu takiben yapılan 48 saat Cab tedavilerindeki canlı, ölü ve apoptotik hücre oranları tespit edildi. Tedavilerde 0,5 μ M Sal, 6,25 μ M iWnt, 2,5 nM Cab veya bunların farklı kombinasyonları kullanıldı. Cab: kabazitaksel, Sal: salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 60

Şekil 4.13. Tedavi bileşenlerinin uygulandığı hücrelerin morfolojik değişimleri. PC3 hücrelerinin 48 saat 0,5 μ M salinomisin ve 6,25 μ M iWnt ön tedavisini takiben 48 saat 2,5 nM kabazitaksel uygulaması sonunda ışık mikroskobu altında görüntülendi (10x). Cab: kabazitaksel, Sal: salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü. 61

- Şekil 4.14.** Ön tedavi, PC3 hücrelerindeki Survivin proteini sentezini düzenler. SURVIVIN proteini (16 kDa) sentezindeki değişimler Western blot yöntemi ile analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre..... 62
- Şekil 4.15.** Ön tedavi, PC3 hücrelerindeki Survivin ve Livin sentezini etkiler. *SURVIVIN* (A) ve *LIVIN* (B) mRNA düzeyindeki değişimler RT-qPCR yöntemiyle analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 63
- Şekil 4.16.** Ön tedaviyle etkinliği artırılmış kemoterapi P38 ve p-P38 proteinlerini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta P38 (38 kDa) (A) ve p-P38 (38 kDa) (B) protein seviyeleri kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 65
- Şekil 4.17.** Ön tedavi pERK protein sentezini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta pERK (42 kDa) proteininin seviyesi kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre..... 66
- Şekil 4.18.** Tedavi modalitelerinin pAKT ve AKT protein ifade düzeylerine etkisi. Ön tedavi ve kemoterapi kombinasyonu pAKT (55,7 kDa) (A) protein seviyesini azalırken, AKT'yi (55,7 kDa) (B) değiştirmedir. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 68
- Şekil 4.19.** Tedavi uygulamalarının PI3K protein ifadesine etkisi. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta PI3K (57,4 kDa) protein seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalır. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 69
- Şekil 4.20.** Hoechst ile apoptotik hücrelerin tespiti. 48 saat 0,5 μ M salinomisin ile 6,25 μ M iWnt ön tedavisinin ardından yapılan 48 saat 2,5 nM kabazitaksel tedavisi sonrasında hücreler PBS ile yıkanıp Hoechst DNA boyaması yapıldı ve flouresans mikroskopta görüntülendi (20x)..... 70
- Şekil 4.21.** Ön tedavi NF- κ B proteininin ifadesini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta NF- κ B (50 kDa) proteininin seviyesi kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre..... 72
- Şekil 4.22.** Ön tedavi BAX ve Bcl2 proteinlerinin ifadesini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta BAX (23 kDa) (A) protein seviyesi artarken, Bcl2 (25 kDa) (B) protein düzeyi tüm gruplara göre azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre..... 73
- Şekil 4.23.** Uygulama gruplarına göre BAX/Bcl2 oranı. BAX/Bcl2 oranını ön tedavi ile kemoterapi kombinasyonu, diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artırır. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre..... 74
- Şekil 4.24.** Tedavilerin *CASP8* (A), *CASP3* (B) ve *Bcl-XL* (C) mRNA ifadesine etkisi. Antiapoptotik *Bcl-XL* mRNA seviyesinde kontrol grubuna göre azalma, apoptotik genlerde artış tespit edildi. Analizlerde RT-qPCR tekniği kullanıldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre..... 76

- Şekil 4.25.** Tedavi modalitesinin *BAX* (A), *APAF1* (B) ve *CYT-C* (C) mRNA seviyesine etkisi. İçsel apoptotik sinyal iletim yolağından sorumlu *BAX*, *APAF1* ve *CYT-C* mRNA sentezi kontrol grubuna göre arttı. Analizde RT-qPCR kullanıldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.....77
- Şekil 4.26.** Tedavi bileşenlerinin CD44⁺ kök hücre sayısına etkisi. Tedavi modalitelerini takiben kolon ayırma tekniği ile CD44⁺ kök hücreler izole edildi ve hemositometrede sayıldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 78
- Şekil 4.27.** Tedavilerin PC3 hücre popülasyonundaki kanser kök hücre belirteçlerine etkisi. SOX2 (A) ve NANOG (B) transkripsiyon faktörlerinin gen ifadeleri mRNA seviyesinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.80
- Şekil 4.28.** iWnt kullanımının Wnt10 protein sentezine etkisi. *WNT10* (46 kDa) protein düzeyinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre...81
- Şekil 4.29.** Tedavi uygulamalarının sferoid çapına etkisi. PC3 hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu hücre kültürüne tedavi bileşenleri uygulanıp 0, 7 ve 10. Günlerde ışık mikroskobu altında fotoğraflandı (20x). 83
- Şekil 4.30.** Üç boyutlu hücre kültüründe sferoid çapı ve hücre sayısı analizi. Yapılan tedavilerin sferoid çapı (A) ve hücre sayısı (B) üzerine etkisi belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.....84
- Şekil 4.31.** Ön tedavi ve kemoterapinin üç boyutlu hücre kültürüne etkisi. Yetmiş beş cm² hücre kültür kaplarında PC3 hücreleri ile oluşturulan kitlesel üç boyutlu hücre kültürüne ön tedavi ve kemoterapi uygulanıp 0, 7 ve 10. günlerde ışık mikroskobu altında görüntülendi (20x).....85
- Şekil 4.32.** PC3 hücrelerinde gerçekleştirilen yara iyileşme deneyi. Tüm tedavi bileşenlerinin hücre migrasyonu üzerine etkisi mikroskop altında görüntülendi. 24 saatin sonunda hücre yığınları arasındaki mesafe grafikte gösterildi. 87
- Şekil 4.33.** Yapılan tedavi modalitesi hücre migrasyonunu düzenler. Hücre migrasyon yeteneğinde etkili *E-CAD* (135 kDa) (A) ve *ZEB-1* (170 kDa) (B) proteinleri Western blot tekniği ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.....88
- Şekil 4.34.** *SLUG* ve *VIMENTIN* ifade analizleri. Hücre migrasyon yeteneğinde etkili *SLUG* geni mRNA düzeyinde (A), *VIMENTIN* ise protein düzeyinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. 90
- Şekil 4.35.** *SNAIL* ifade oranı analizi. Hücre migrasyon yeteneğinde etkili *SNAIL* hem mRNA (A), hem protein (30 kDa) (B) düzeyinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.....91
- Şekil 5.1.** Tez çalışmasında kullanılan terapi yöntemindeki bileşenlerin hücresel sinyal iletim yolları üzerindeki genel etkinliği.....100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. RT-qPCR analizinde kullanılan primerler.	43
--	----



BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünya genelindeki morbidite ve mortalite yüzdesi yüksek önemli sağlık sorunlarından birisidir. Meme, akciğer, kolorektum ve prostat kanserleri en sık görülen kanser türleridir. Kemoterapi, günümüzde kanser tedavisinde başvuru en önemli tedavi seçeneklerindendir. Ancak, anemi, mide bulantısı, kusma ve hemoraji gibi yan etkileri ve kemoterapötik ajanlara karşı gelişen ilaç direnci, hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. İlaç direnci, kanser tedavisinde hastalığın nüksüne neden olabilecek başarısızlığın başlıca sorumlusudur. İlaç direncinden ve kanserin nüksetmesinden büyük oranda kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu kabul edilir. Taksol grubu kemoterapi ajanları, androjen deprivasyon tedavisine yanıt vermeyen kastrasyona dirençli prostat kanseri (PCa) hastalarında başvuru birincil seçenektir. Ancak, hastaların önemli bir kısmında gelişen ilaç direnci, tedaviyi güçleştirmekte ve hastalığın nüksüne neden olabilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, taksol tedavisi öncesi kanser kök hücrelerine yapılacak seçici uygulama ile PCa hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını artırmaya çalışmaktır. Böylece daha düşük dozlarda taksol kullanılarak yan etkisi düşük ancak tedavi etkinliği yüksek sonuç alınması amaçlanmıştır.

Bu araştırmada, PCa hücreleri kemoterapi ajanı ile tedavi edilmeden önce kanser kök hücrelerine seçicilik gösteren salinomisin ve bu hücrelerin yenilenmesinden sorumlu Wnt/ β -katenin sinyal yolu inhibitörü ile ön tedavi edilerek kabazitaksele olan duyarlılığı artırılmaya çalışıldı. İnsanlardan elde edilen kastrasyona dirençli PC3 ve DU145 hücre serisi ile kastrasyona duyarlı prostat kanser hücrelerinden LNCaP hücreleri çalışmaya dahil edildi. Testlerin büyük kısmı PC3 hücreleri kullanılarak

yürütüldü. Yapılan tedavi modalitesinin normal hücelere olası sitotoksik etkisi sıgırlardan elde edilen normal primer retinal pigment epitel hücelerinde analiz edildi. Prostat kanser hüceleri, 0,5 μ M salinomisin ve 6,25 μ M Wnt inhibitörü kombinasyonu ile 48 saat ön uygulamaya tabi tutulduktan sonra yeni nesil taksan ilaçlarından kabazitaksel ile 48 saat daha tedavi edildi. Tedaviler sonrası hücre canlılıkları ve apoptoz analizleri sırasıyla MTT testi ve anneksin V kullanılarak sitometrik yöntemle belirlendi. Tedavi uygulamasının hücelerin göçü üzerine etkisi yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirildi. Tedavi uygulamalarının hücre popülasyonları içinde bulunan kanser kök hücre sayısı ve pluripotensine yaptığı olası etkilerin sonuçları manyetik kolon ayırma, gerçek zamanlı kantitatif PCR ve Western blot teknikleri ile belirlendi.

Salinomisin ve Wnt sinyal yoluna spesifik inhibitör ile kemoterapi uygulamasından önce yapılan ve kanser kök hücelerini hedefleyen tedavi modalitesinin, kemoterapi etkinliğini artırarak kanser hastalarının terapi süreçlerine destek oluşturması beklenmektedir. İlaç etkinliğinin güçlendirilmesinin yanı sıra kanser kök hücre hedefli tedavinin, ilerleyen dönemde artan nüks riskini engelleyebileceği araştırma hipotezinin temel dayanağıdır. Bu yolla prostat kanseri hastalarının morbidite hızı ve mortalite oranlarının düşürölüp sağkalım sürelerinin uzatılabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

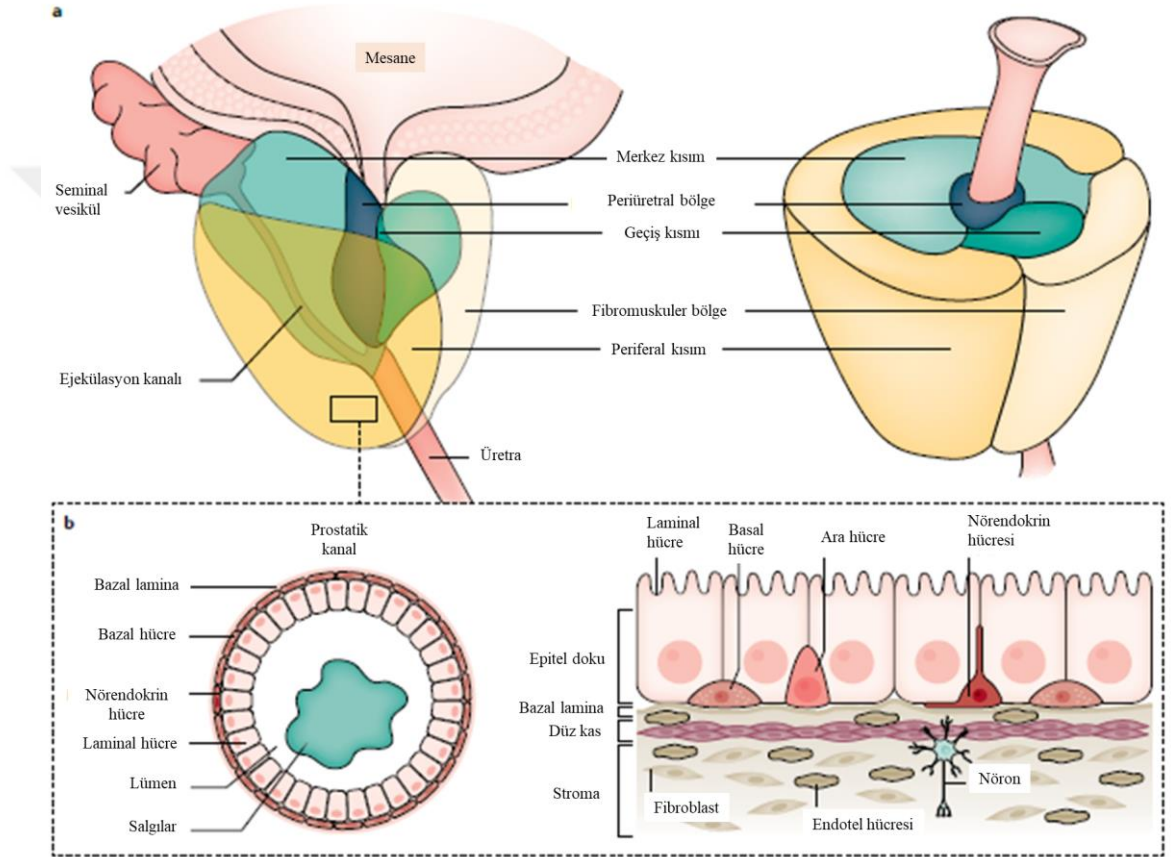
GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Bezinin Yapısı ve İşlevi

Mesanein alt kısmında bulunan ve üretrayı çevreleyen prostat, ürettiği salgı sayesinde meni içerisindeki sperm hücrelerine canlılıklarını koruyucu ortam sağlar. Prostat bezi, anatomik olarak fibromuskuler ve periüretral bölgelerin de bulunduğu merkez, geçiş ve periferik kısımlardan oluşur (Şekil 2.1) (Rebello vd., 2021). Prostat tümörlerinin çoğunun kökenlendiği periferik kısım, salgılanan prostat sıvılarının tamamının üretiminden de sorumludur. Periferik kısmın stroma bölümünde epitelyal transformasyon yoluyla tümör oluşturabilen fibroblast hücreleri bulunur. Bu hücreler, prostat kanseri tanısında belirteç olarak kullanılan prostat spesifik antijen (PSA) üretiminden sorumludur. Ayrıca prostat kanserlerinin hormon bağımlı tiplerine köken oluşturan fibroblastlarda yüksek seviyede androjen reseptör (AR) proteini de sentezlenir (Laversanne, Soerjomataram, Jemal, & Bray).

Androjen Reseptörü, normal şartlarda, testis kaynaklı androjenler tarafından uyarılarak prostat dokusundaki epitel hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında rol alır. Prostat hücrelerinin yenilenmesinde önemli bir yeri olan mezenşimal-epitelyal geçiş (MET) yeteneği de yine AR tarafından kontrol edilir. Androjen reseptörünün aktivasyonunda ligand olarak görevli androjenlerden biri de steroid yapılı 5 α -dihidrotestosteron (DHT) hormonudur. Testislerde üretilip 5 α -redüktaz enzimi ile

aktifleştirilen DHT, normal prostat dokusunun gelişimi ve devamlılığını sağlar (Hayward & Cunha, 2000). Androjen reseptörü ya da DHT'nin normalden fazla üretilmesi, prostat bezinin stroma kısmında bulunan epitel hücrelerdeki MET durumunun EMT'ye dönüşmesine ve prostat tümörlerinin oluşmasına yol açar (Toivanen & Shen, 2017).



Şekil 2.1. İnsan prostat bezinin anatomik yapısı. Prostat bezine komşu olan mesane, uretra ve seminal vesikülün konumlanışı ile prostat bezinin kısımları (a). Prostat bezinin histolojik organizasyonunda görevli hücrelerin yerleşimi (b) (Rebello vd., 2021).

2.2. Prostat Kanserinde Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Kanser türlerinin hemen hepsinde erken aşamada konulan doğru tanı ve devamında yapılan etkin tedavi, hastaların yaşam kalitesini artırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO; World Health Organization) bünyesinde faaliyet gösteren ve belirli

periyotlarda dünya genelindeki kanser istatistik verilerini oluşturup değerlendiren GLOBOCAN (Küresel Kanser Gözlemevi; Global Cancer Observatory) kuruluşunun verilerine göre; tüm kanser türleri içerisinde prostat kanseri kaynaklı ölüm oranı 2020 yılında % 7,3 ve 1.414.259 vaka ile meme (2.261.419 vaka, % 11,7), akciğer (2.206.771 vaka, % 11,4) ve kolon (1.931.590 vaka, % 10) kanserlerinden sonra dördüncü sırada gelmektedir. (Sung, Ferlay & Siegel, 2021).

Prostat kanseri tanısında fiziksel muayene yanı sıra kantitatif plazma PSA analizi yapılır (Albertsen, 2020). Klinikte uygulanan bir diğer biyokimyasal tanı yöntemi ise prostat spesifik membran antijen (PSMA) taraması olup, bu tarama sayesinde prostat kanser lezyonlarının varlığı etkin bir şekilde tespit edilebilmektedir (Tian vd., 2018). Bu yöntem kullanılarak ileri evredeki, metastatik ve kastrasyon dirençli prostat kanser hücreleri belirlenebilir (Bostwick vd., 1998). El ile muayene ve PSA taramasının pozitif çıkması durumunda biyopsi ve ultrasonografi gibi tespit ve görüntüleme yöntemleri kullanılarak tümör için evreleme yapılır.

Prostat kanser tanısı alan hastalara çeşitli tedavi yöntemleriyle müdahale edilebilmektedir. Bunların başlıcaları cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapidir. Cerrahi operasyon kapsamında prostat bezi, seminal veziküller ve bu kısmı çevreleyen dokular ameliyat ile alınmaktadır. Bu işleme radikal prostatektomi denir. Radyoterapi uygulamasında prostat bezindeki tümör hücreleri radyoaktif ışın yardımıyla öldürülür. Bu yöntem aynı zamanda perkutan radyoterapi olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca prostat bezinin içerisine radyoaktif parçacık yerleştirilerek tümör hücrelerine daha yakından ışın gönderildiği brakiterapi yöntemi de kullanılmaktadır (Nguyen-Nielsen & Borre, 2016).

Prostat kanserinde erken evrelerde başvuru alan cerrahi işlemler ve radyoterapi uygulamalarının ardından ilerleyen süreçte kanserin nüksetmesi durumunda ya da ileri evredeki kanser vakalarında kemoterapi seçeneğine başvurulur. Bu aşamada kullanılan kemoterapötik ajanların kanser hücrelerini apoptoz ya da diğer yollarla ölüme yönlendirmesinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de istenmeyen etkileri gelişmektedir. Kemoterapötik ajanların yan etkilerinin azaltılması, hastaların yaşam kalitesini artırıp tedavi sürecinin daha rahat geçmesini sağlar (Komura vd., 2018).

Prostat dokusundaki hücrelerin androjen varlığında proliferasyon yetenekleri arttığından, kemoterapi kapsamında, androjen deprivasyon tedavisi ile tümör büyümesi durdurulabilir (Ingrosso vd., 2018). Bu aşamada kullanılan etkin ajanlardan biri enzalutamiddir. Enzalutamid, androjen reseptörüne bağlanıp testosteronun aktivitesini engeller (Beer vd., 2014). Androjen reseptörünün bloklanması yanında androjen sentezinin engellenmesi de bir başka yöntemdir. Abirateron asetat, testosteron ile östrojen hormonlarının sentezinde görevli olan sitokrom P450 17A1 enzimini seçici ve geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek androjen deprivasyon tedavisini gerçekleştiren bir başka farmakolojik ajandır (Ryan vd., 2010).

Prostat kanseri, erken evrede androjen deprivasyon tedavisine yanıt verirken ileri evrelerde tümör büyümesi androjen bağımsız olarak gerçekleşebilir (Oudard vd., 2017). Androjen deprivasyon tedavisinin ardından bir kaç yıl içinde nüks gelişip tümör büyümesinin androjen bağımsız duruma geçmesiyle oluşan tablo, kastrasyon dirençli prostat kanseri olarak adlandırılır (James vd., 2016). Bu durumda, AR hedefli kemoterapotik ajanların kullanımı tedavide etkisiz kalmaktadır. Bu aşamaya kadar kullanılabilen abirateron asetat ve enzalutamidin yerini dosetaksel ve kabazitaksel gibi taksol türevi kemoterapi ajanlara bırakır. Radyum-223 gibi radyoaktif özellikte bir izotop veya bu tedavilerden fayda göremeyecek ileri evre prostat kanserli hastalara sipuleucel-T adlı otolog immünoterapi sağlayan bir aşı kullanılabilir (Kawalec vd., 2012).

2.3. Kemoterapi ve Kanser Kök Hücrelerinin Tedavideki Önemi

Prostat kanseri gelişiminde androjene ihtiyaç duymaksızın çoğalma yeteneği kazanan kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesi, AR hedefli terapiler yerine kemoterapotiklerin kullanıldığı tedavilerle mümkündür. Bu aşamada, kastrasyon dirençli prostat kanseri olarak tanımlanan vakalarda kabazitaksel yaygın olarak kullanılmaktadır. Kabazitaksel kemoterapotik ajanı, mitoksantron ve dosetaksele göre daha etkili olduğu gösterilmiş ikinci nesil bir taksandır (Bono vd., 2010). Klinik uygulamalarda dosetaksel kullanılarak gerçekleştirilen kemoterapinin ardından her üç haftada bir defa olacak şekilde 25 mg/m² doz kabazitaksel, kastrasyon direnci gelişmiş hastalarda kullanılır (Nakouzi vd., 2015). Taksan sınıfı kemoterapotikler gibi

kabazitaksel de bölünen hücrelerde mikrotübüllerin kararlı yapıda kalmasını sağlayarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleyebilme özelliğine sahiptir (Mahira vd., 2019). Kabazitaksel, bu işlevini β -tubulin polimerizasyonunu uyararak gerçekleştirir (Qu vd., 2016).

Kanser tedavisinde kemoterapi etkinliği yüksek seviyede olsa da ilerleyen zaman içinde hastalarda nüks gözlenebilir. Bunun temel sebebi, kemoterapi uygulamasında devamlılığını sürdürebilmiş kanser kök hücreleri olabilir (Cackowski & Taichman, 2019; Kim vd., 2011; Wolf, Gratzke & Wolf, 2022). Kanser kök hücrelerinin, mezenşimal hücrelerin sahip olduğu moleküler özelliklerden bir çoğunu barındırmasından dolayı, metastaz gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Najafi, Mortezaee, & Majidpoor, 2019). Bu hücreler, farklılaşıp tümör dokusunu oluşturan hücrelerle karşılaştırılınca, kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarına karşı yüksek oranda direnç geliştirmektedir (Takebe vd., 2015). Bu sebeple, kanser kök hücrelerinin hedeflendiği terapi yöntemlerinin tedavi etkinliğini artırabileceği kabul edilmektedir (Harris & Kerr, 2017). Ancak, normal kök hücrelere zarar vermeksizin yalnızca kanser ve kanser kök hücrelerini hedefleyen terapi stratejilerinin geliştirilmesinde uygun deneysel modellerin tasarlanması bazı zorlukları da beraberinde getirir.

Salinomisin, kanser kök hücrelerindeki etkinliği kanıtlanmış ve üzerinde araştırmaların devam ettiği farmakolojik ajanlardan biridir (Ketola vd., 2012; Qi vd., 2022). Doğal bir antibiyotik olan salinomisin, *Streptomyces albus* bakteri türünden izole edilmektedir (Zhang vd., 2017). Monokarboksilik polieter iyonofor olarak tanımlanan salinomisin, bu özelliği sayesinde membran potansiyeli üzerinde etkilidir (Gupta vd., 2009). Salinomisinin moleküler etkinlikleri arasında kaspaz, Ca^{2+} ve sitokrom C aktivasyonunda artış da bulunur (Jangamreddy vd., 2013). Bu etkileri ile salinomisin, kanser hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini düşürür, Bax'ın mitokondriye translokasyonu, sitokrom C'nin sitoplazmaya geçişi, kaspaz-3 ile PARP aktivasyonu ve Bcl-2 sentez oranını düşürerek apoptotik yolları aktifleştirir (Kim vd., 2011).

Salinomisin, son yıllarda kanser alanında yeni terapi stratejilerinin geliştirilmesinde sıklıkla başvurulmuş potansiyel bir tedavi bileşenidir. Salinomisinin Wnt/ β -katenin yolağı işlevinin engellenmesinde kilit rol oynadığı bir çok araştırmada

ortaya konulmuştur (Lu & Li, 2014). Skeberdyt  ve ark. kolon kanseri ile yaptıkları çalışmada, salinomisinin otofajik hücrede ölüm indükleyicisi, STAT3 aktivatörü, Wnt sinyal yolağı inhibitörü, ATP-bağlı kaset (ABC) inhibitörü ve mitokondriyal fonksiyon bozucu gibi bir çok görevinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (Skeberdyt  vd., 2018). Salinomisin, mitokondri membran geçirgenliğini artırıcı etkisinin yanı sıra (Sheng vd., 2018), endoplazmik retikulum stresini de tetikleyebilir (Zhang vd., 2019).

Salinomisin, özellikle kanser kök hücrelerinin hedef olarak belirlendiği terapi seçeneklerinin oluşturulması için kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinde apoptoz sinyal iletim yolaklarının tetiklenmesiyle birlikte hücre g   yeteneği üzerinde de negatif etkiye sahiptir (Ketola vd., 2012). Kanser kök hücrelerindeki etkinliğini büyük oranda bu hücrelere kendilerini yenileme yeteneği sağlayan Wnt/ -katenin sinyal yolağının inhibisyonu ile gösterir (Lu vd., 2011). Salinomisin ayrıca, ALDH aktivitesini inhibe ederek CD44 kanser kök hücre fraksiyonunu azaltır. Kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşturabilme yeteneği ile reaktif oksijen türleri (ROS)  retimini uyaran salinomisin, kanser hücreleri karşısında avantaja sahiptir. Klinik uygulamalarda salinomisinin taşikardi ve hafif derecede titreme gibi yan etkileri gözlenmesine rağmen, kemoterapitik ajanların oluşturduğu sa  dökülmesi, bulantı, kemik iliğinin üretim etkinliğinin düşmesi ve gastrointestinal sistem hasarı gibi yan etkiler oluşurmamaktadır (Naujokat & Steinhart, 2012).

2.4. Kanser Kök Hücrelerinin Devamlılığının Moleküler Temeli

Kanser tedavi yöntemlerindeki temel sorun, tedaviye karşı zaman içinde gelişen hücresel direnç ve bunun sonucunda ortaya çıkabilen n kst r. Pek çok kanser türü başlangıçta kemoterapiye duyarlı olsa da zamanla DNA mutasyonları, ilaç inhibisyonu ve bozunmasını destekleyen metabolik değişiklikler ile diğer mekanizmalar sonucu direnç geliştirebilirler (Housman vd., 2014). Tedavi direnci ve hastalığın nüksünün temelinde kanser kök hücreleri olduğu yönünde güçlü kanıtlar vardır (Barbato & Bocchetti, 2019; Huldani vd., 2022; Miller vd., 2019). Kanser kök hücreleri, prostat kanseri de başta olmak üzere, bir çok kanser türünde tedavi esnasında hücresel ölüm yolaklarının aktivasyonunu engelleyip tedavi sonrası dönemde yeni kanser hücreleri üretebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Tümör kitlesi içerisinde nadir sayıda pluripotent

özellikte kanser kök hücreleri mevcuttur. Bu oran katı tümörlerde % 0,05 – % 0,1 arasında bulunur. Metastatik evrede ise kanser kök hücrelerinin bulunma oranı % 30 seviyelerine kadar çıkabilir. Bu hücreler sınırsız çoğalma, kendini yenileyebilme ve yıkıcı düzeyde karsinogenez oluşturabilme karakteristik özelliklerini barındırmaktadır (Agliano, Calvo & Box, 2017). Kanser kök hücrelerinin CD44, CD133 ve ALDH1 gibi proteinleri yüksek düzeyde sentezlemesi bunları diğer kanser hücrelerinden ayırır. Prostat kanseri kök hücrelerinin ayırt edilmesinde genellikle CD44 ve CD133 hücre yüzey belirteçleri kullanılır (Zhang vd., 2021). Kanser kök hücrelerinin devamlılığının sağlanmasında *NANOG*, *OCT3/4* (oktomer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 3/4) ve *SOX2* (cinsiyet belirleyici bölge Y (*SRY*)-box 2) transkripsiyon faktörleri etkilidir (Maria vd., 2014).

Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin çoğalma yeteneğini etkilediği kadar kanser kök hücrelerinin pluripotent özelliklerinin devamlılığında da rol oynar (Chang & Lai, 2019). Tümör mikroçevresi kaynaklı sinyal molekülleri, kanser kök hücrelerinde transmembran şekilde yerleşik olan reseptör proteinleri uyararak kök hücre devamlılığını düzenler. Bu süreçte görevli olan önemli sinyal iletim yollarından birisi de NOTCH sinyal mekanizmasıdır. Bu hücre içi sinyal iletim yolağının başlangıcında hücre dışı altbirim, transmembran altbirim ve hücre içi altbirim şeklinde üç kısımdan oluşan NOTCH reseptör proteinleri mevcuttur. Memelilerdeki bu sinyal iletim mekanizmasında NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 ve NOTCH4 şeklinde dört grup reseptör protein bulunur. Bu reseptörler DLL1 (Delta-benzeri 1), DLL3, DLL4, Jagged1 ve Jagged2 olmak üzere beş grup ligand tarafından uyarılabilmektedir. Bir kanser kök hücresinin membranına, NOTCH reseptör proteininin hücre dışı altbirimine tamamlayıcı ve uyarıcı özellikte bir ligand molekül bağlandığında hücre içi NOTCH altbirimi, transmembran NOTCH altbiriminden ayrılır. Ayrılan altbirim, hücre nükleusuna göç ederek burada kök hücre özellikleriyle ilgili olan *NANOG*, *OCT3/4* ve *SOX2* transkripsiyon faktörü ve protein sentezinde görevli olan genlerin anlatım yapmasını tetikler (Cheng vd., 2021). Üretilen gen ürünleri hücre çoğalması, EMT, hücre göçü, metastaz ve kanser tedavilerinin apoptotik sinyal iletim yollarını tetiklemelerine karşı direnç gelişimine katkı sağlar (Lee vd., 2021). Epitelyal-

mezenşimal geçiş sinyal iletim mekanizmasında E-kaderin sentez oranının artması kanser kök hücre devamlılığını da uyarır (Derakhshani vd., 2020).

2.5. Kanserde Tedavi Uygulamaları ve Hücre Ölüm Mekanizmaları

Kemoterapötik ajanların başlıca etki şekli tümör hücrelerindeki ölüm mekanizmalarını aktiveleştirmektir (Debatin, 2004). Hücresel ölüm mekanizmalarından biri olan apoptoz bu tür tedavilerde tercih edilen bir yöntemdir. Normal şartlar altında, hücresel yaşlanmanın bir sonucu olarak, işlevlerini yerine getiremeyen hücreler, apoptoz ile ilişkili hücresel sinyal iletim yollarının uyarılması sonucu ölüme yönelirler. Apoptoz dışında nekroz ve otofaji de hücresel ölüm şekilleri arasında yer alır (Mukhopadhyay vd., 2014).

Nekrotik ölümden ortaya çıkan hücre kalıntıları, komşu hücrelerde yangı (inflamasyon) etkisi oluşturur. Endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellerde şişkinlik, plazma membranının bütünlüğünün kaybolması sonucunda hücre içeriğinin serbest kalması ve hücrenin parçalanması nekrotik ölüm şeklinin karakteristik özelliklerindendir. Nekroz sonucu gelişen yangı, tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasına sebep olur (Lotze & Demarco, 2004). Nekrozun programlı biçimde işlenmesi durumu nekroptoz olarak adlandırılır. Nekroptoz ölüm yolağı fiziksel travma, enfeksiyon ve nörodejenerasyon durumlarında aktivite göstermektedir. Nekrozda ve nekroptozda reseptör ilişkili protein kinaz enzimlerinden RIPK1, RIPK2 ve RIPK3 proteinleri düzenleyici etkiye sahiptir. Bu proteinlerin kaspaz-8 ve kaspaz-3 enzimleriyle etkileşim kurarak hücre ölümüne yol açması; FAS ve TNFR ölüm reseptörlerinin (DRs) uyarılması sayesinde gerçekleşir. FAS ve TNFR apoptoz ve nekroptoz olaylarında başlatıcı etkiye sahiptir (Galluzzi & Kroemer, 2008).

Otofaji aracılığıyla gerçekleşen hücresel ölümden, hücredeki organellerin yıkılmasıyla birlikte komşu hücrelerde herhangi bir biyokimyasal hasar meydana gelmez. Otofaji, hücre içinde sindirim vakuollerinin oluşumuyla birlikte hücrenin kendisini sindirmesine dayanır. *ATG3* ve *BECLIN1* gibi genlerin anlatımıyla sentezlenen proteinler, otofagozom yapılarını oluşturur. Otofajiye özgü olarak oluşan bu yapılar, artık görevini yerine getiremez duruma gelmiş olan organellerin lizozomlara

taşınmalarını sağlar (Mandal vd., 2020). ATG3 ve BECLIN1 proteinlerinin aktivite kazanmaları ise kaspaz-8 enziminin bu proteinleri etkinleştirmesine bağlıdır. Apoptoz ve otofaji sonucunda ortaya çıkan hücrel içerik, komşu hücrelere zarar vermeyecek şekilde yıkımlanır ve artıklar yine komşu hücreler tarafından kullanılır (Glick, Barth & Macleod, 2010).

Hücre büyüme faktörleri eksikliği, hormon eksikliği, glukokortikoidlere maruziyet ve hücre dışı matris yapısıyla olan bağlantının kaybı gibi içsel dinamiklerin dengesizlikleri apoptozu tetikler. Apoptozun karakteristik bazı belirtileri vardır ve bu sayede diğer hücrel ölüm mekanizmalarından ayırtedilir. Bu belirtiler; kromatin yapının kararsız hale geçmesi, DNA'nın parçalara ayrılması, hücrenin büzülmesi, hücre membranının bölünmesi ve komşu hücrelerle olan adezyon durumunun kaybolmasıdır (Yu, Zhang & Hou, 2022). Bunlarla birlikte fosfatidilserinin hücre dışına uzanması, sistein aspartat spesifik proteaz enzimleri olan kaspazların aktivasyonu gibi biyokimyasal değişiklikler de apoptozu başlatıcı karakteristik özelliklerdendir. Kaspaz enzimlerinin işlevinden bağımsız şekilde gerçekleşen hücrel ölüm şekline ise apoptoz benzeri programlanmış hücre ölümü denir (Jamalzadeh vd., 2017).

Apoptoz ile ilişkili sinyal iletim yolları temelde iki grup olarak tanımlanır. Bunlar, içsel apoptotik sinyal iletim yolağı ve dışsal apoptotik sinyal iletim yolağıdır. İçsel apoptotik sinyal iletim yolağında mitokondri kaynaklı uyarılar söz konusu iken dışsal apoptotik sinyal iletim yolağında hücre membranında yerleşik olan ölüm reseptörlerinin hücre dışındaki uzantılarına bağlanabilen özel ligandların uyarımı rol oynamaktadır (Goldar vd., 2015). Dışsal apoptotik sinyal iletim yolağının aktivite kazanması fiziksel ve enfeksiyöz uyarılar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Fiziksel uyarılar radyasyon, fiziksel travma ve kemoterapotik ajanlar olarak sıralanırken enfeksiyöz uyarılar ise virüs ve bakteri kaynaklı toksin moleküllerdir. Kanser tedavi stratejilerinin oluşturulmasında tümör hücrelerinin apoptoz mekanizmalarının tetiklenmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda son yıllarda başvuru gen terapi ve immünoterapi seçenekleri de yine apoptozu uyarmak için apoptotik gen anlatımını tetikleme üzerine kuruludur (Gerl & Vaux, 2005).

2.5.1. Dışsal Apoptotik Sinyal İletim Yolağı ve Kanser Tedavisindeki Önemi

Dışsal apoptotik sinyal iletim yolağının uyarımı hücre dışı kaynaklı uyarıcı moleküllerin etkisiyle gerçekleşir. Klinik onkoloji alanında kullanılan kemoterapotik ajanlar tümör hücrelerinin ölümünü genellikle bu sistemler üzerinden başlatır. TNF (tümör nekroz faktörü), Fas-L (Fas ligandı) ve TRAIL (TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand) isimli ligand moleküller, taksan sınıfı kemoterapotikler tarafından etkilenen tümör dokusundaki hücrelerce üretilip diğer kanser hücrelerindeki tip 1 TNF reseptörü (TNFR1), Fas (CD95/Apo-1 olarak da tanımlanır) ve TRAIL reseptörlerinin hücre dışındaki altbirimlerine bağlanarak dışsal apoptoz mekanizmasını aktifleştirirler (Jinesh, 2017).

FasL/FasR ile TNF- α /TNFR1 birliktelikleri DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) olarak adlandırılan sistemin oluşmasını sağlar. DISC yapısı; bir adaptör molekül olarak Fas-ilişkili ölüm altbirimi (DD: death domain), prokaspaz-8, prokaspaz-10 ve hücrel FLICE inhibitör proteinlerini (c-FLIPs) içermektedir. Kaspaz-8 enziminin aktif hale geçmesi, DISC yapısından apoptoz ile ilişkili diğer sinyal yolaklarına ard arda başlatıcı sinyallerin iletilmesine sebep olur. Bu sinyaller ilerleyen aşamalarda kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 tarafından da alınıp hücrenin yıkımlanması gerçekleşir. Kaspaz enzimleri apoptoz mekanizmalarının işleyişinin kontrolünde çok büyük bir öneme sahiptir. Bazı kaspazlar ölüm efektör altbirimi (DED: death effector domain) ve kaspaz takviye altbirimi (CARD: caspase recruitment domain) yapılarını taşımaktadır. CARD ve DED altbirimleri, kaspazların diğer sinyal iletim yolakları ve proteinlerle temas edip etkileşmelerini sağlar. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 enzimleri DED altbirimi bulundururken kaspaz-1, kaspaz-2, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-9, kaspaz-11 ve kaspaz-12 enzimleri CARD altbirimini içermektedir. Kaspazlar, sinyal iletim yolağındaki durumlarına göre başlatıcı ve efektör olarak sınıflandırılmışlardır. Kemoterapotik ajanlar burada ayrıntılı şekilde belirtilen etkileşimlerin gerçekleşmesini sağlayarak kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturur (Nikoletopoulou vd., 2013).

Dışsal apoptotik sinyal iletim yolağının kontrolünde görevli olan ölüm reseptörleri (DRs; death receptors), normal şartlarda hücre membranının dışındaki uzantılarına komformasyonel yapıları bağlanmaya uygun olan ligand moleküller

tarafından fiziksel temas yoluyla uyarılmaktadır. Bu reseptör proteinler ve ligand çiftleri; TNFR1/TNF, CD95L-Fas/FasL, TRAMP/TWEAK (Apo3L), TRAIL-R1/TRAIL (Apo2L) ve DR6/TRADD olarak eşleşmektedir. Ölüm reseptörlerinin hücre membranının hücre dışı kısmındaki uzantı veren altbirimleri sistein aminoasidince zengindir. Bu reseptörlerin hücre membranından hücre içine uzanan altbirimleri, ölüm altbirimi (DD) olarak tanımlanır (Green, 2017). Reseptör ile ligand moleküllerin etkileşimi, yukarıda da açıklandığı şekilde, hücre içi kısımdaki ölüm altbirimlerinin adaptör proteinlerle temas kurmasına ve bunun sonucunda da kaspaz-8 ile kaspaz-10 enzimlerinin aktifleşmesine sebep olur. Bu şekilde de dışsal apoptoz sinyal iletim yolağı aktivite kazanır. Dışsal apoptoz mekanizmasının aktifleşmesi amacıyla ölüm reseptörleri, kemoterapotik ajanların birincil potansiyel hedeflerindendir (Ward vd., 2018).

Kanser tedavisi amacıyla kullanılan DNA hasarı oluşturunca kemoterapotik ajanlar, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, proteazom inhibitörleri, siklooksijenaz-2 inhibitörleri ve antikorlar ölüm reseptörleri hedeflenerek kullanılmaktadır. Klinik uygulamalarda kullanımı yaygın olan sisplatin, mitomisin, metotreksat, mitoksantron, doksorubisin ve bleomisin kemoterapotik ajanlarına Fas (DR2) reseptörünün sentezinin uyarılması amacıyla başvurulur. TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5) reseptörlerinin üretilmesinin tetiklenmesi için de etoposid, Ara-C ve CPT-11 ajanları kullanılır. Süberoilanilid hidroksumik asid (SAHA), trikostatin-A (TSA), LAQ824 (bir tür sinnamik asid hidroksumat), m-karboksinnamik asid bishidroksumid (CBHA) ve MS-275 isimli histon deasetilaz inhibitörleri yine TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerinin sentezini artırıcı etki göstermektedir (Wagner vd., 2018).

Kanser hücrelerinde hatalı üretilmiş proteinlerin sitoplazmada birikmesini sağlayarak hücre ölüm mekanizmasının çalışmasını tetiklemek amacıyla proteazom inhibitörleri kullanılır. Normal şartlarda hücre içindeki doğru sentezlenmemiş proteinlerin ubiquitin ile işaretlenip proteoliz sürecinden geçirilerek geri dönüşüme kazandırılmasında çok önemli bir rolü olan proteazom biriminin inhibisyonu MG132 ve PS341 gibi proteazom inhibitörlerince gerçekleştirilir. MG132 sadece TRAIL-R2 sentezini artırıcı etki oluştururken PS341 ise Bcl-2 ailesi proteinlerini, kaspazları ve cFLIP proteinlerinin miktarını etkilemeden her iki TRAIL reseptörünün de sentezini

artırmaktadır. TRAIL reseptörlerinin uyarılması aracılığıyla dışsal apoptoz sinyal iletim yolağının tetiklenmesinde çeşitli antikörler kullanılmaktadır. Kolon kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde her iki çeşit TRAIL reseptörünün uyarılması amacıyla dulanermin antikoru kullanılırken mapatumumab ise küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde sadece TRAIL-R1 reseptörünün uyarılması için kullanılır. Lexatumumab (HGS-ETR2) ve conatumumab (AMG-655) antikörleri bazı solid tümörlerin tedavisinde TRAIL-R2 reseptörünü hedefleyerek kullanılan antikörlerdir. Burada isimleri belirtilen kemoterapötik ajanlara karşı, kanser tedavisi süresince TRAIL direnci geliştiğinden bir süre sonra kemoterapi etkinliği azalma göstermektedir (Singh & Lim, 2022).

Apoptotik sinyal iletim yollarının kontrolü apoptotik ve anti-apoptotik proteinler aracılığıyla gerçekleştirilir. Fas-L, TNF- α ve TRAIL gibi ölüm reseptörleri tarafından indüklenen hücre ölüm mekanizmasının baskılanmasında cFLIP (hücreSEL FLICE benzeri) proteini görevlidir. Bu protein kaspaz-8 enziminin aktivasyonunu engelleyerek apoptozu baskılayabilmektedir. Kaspazların aktivasyonunu tetikleyerek kanser hücrelerinde apoptozu başlatabilme yeteneği barındıran bir çok kemoterapötik ajan vardır. Bunlardan biri olan apoptin kaspaz-3 ve kaspaz-7 enzimlerinin aktivasyonu üzerinden kanser hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır. Apoptotik sinyal iletim yollarının uyarılmasında mitokondriden sitoplazmaya sitokrom C salınımı ve DNA hasarı faktörlerinin önemli rolü vardır. Bu sebeple klinik uygulamalarda kullanımına başvuru alanlardan biri olan desitabin, kaspaz-8 enziminin sentezinden sorumlu olan *CASP8* geninin promotor dizisinde demetilasyon oluşmasını sağlar (Mompalao vd., 2014). Kanser hücrelerinde kaspaz-8 sentezinin çok düşük olmasının sebebi, bu enzimin üretilmesindeki genetik bilgiyi barındıran genin promotor dizisinde hipermetilasyon oluşmasıdır. Hipermetilasyon durumunu engellemek için desitabin, DNA metiltransferaz enzimine kovalent olarak bağlanabilmektedir. Desitabin aynı zamanda bir sitozin analogudur. Yani DNA replikasyonunda sitozin nükleotidi yerine geçerek DNA'da hasar oluşturur ve bu şekilde de apoptoz sinyal iletim yollarının uyarılmasını sağlar. Sisplatin, doksorubisin ve oksaliplatin kanser hücrelerinde DNA hasarı meydana getirerek apoptotik sinyal iletim yollarını aktive edebilmektedir (Baig vd., 2016).

2.5.2. İçsel Apoptotik Sinyal İletim Yolağı ve Kanser Tedavisindeki Önemi

İçsel apoptotik sinyal iletim yolağının uyarımı, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom C salınımıyla meydana gelir. Hücre içi ve dışından kaynaklanan uyarıcılardan etkilenebilen bu yolak oksidatif stres, iyonize radyasyon ve sitotoksik ilaçlar tarafından aktifleşebilmektedir. Salinomisin ajanından yararlanılarak oluşturulmak istenen terapi seçeneklerinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin içsel apoptotik sinyal yolağı elemanlarının uyarılmasını sağladığı tespit edilmiştir. ROS bu işlevini sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişini uyararak gerçekleştirir. İçsel apoptotik yolağın aktivite kazanmasının temelinde BAX ve BAK proteinlerinin mitokondri membranı içerisine yerleşimiyle birlikte ortaya çıkan, sitokrom C salınımı durumu vardır. Sitokrom C salınımının kontrolü Bcl-2 protein ailesine mensup ve anti-apoptotik özellikte olan BCL-2, MCL-1 ve BCL-XL proteinlerince gerçekleştirilir. Bu proteinler, mitokondriden sitoplazmaya olan sitokrom C salınımını engelleme yeteneğine sahiptir (Pfeffer & Singh, 2018).

BCL-2, BCL-XL ve XIAP proteinlerinin dahil olduğu Bcl-2 protein ailesi üyelerinden BAD, BAX, BIM, BID, NOXA ve PUMA proteinlerinin sentezlenmesi, tümör baskılayıcı özellikte olan P53 tarafından kontrol edilmektedir. Hücre bölünmesi sırasında G1, S ve G2 evrelerindeki DNA hasarı kontrol noktalarından herhangi bir uyarıcı sinyal alan P53, apoptotik özellikte olan *BAD*, *BAX*, *BIM*, *BID*, *NOXA* ve *PUMA* genlerinin anlatım yapmasını tetikler. Bcl-2 ailesine mensup apoptotik proteinler, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom C salınımını uyarır. BAD proteini bu noktada, anti-apoptotik özellikte olan BCL-2 ile BCL-XL proteinlerine bağlanarak bunların inaktif hale geçmelerine sebep olur. Kanser hücrelerinin apoptozdan kurtulma yeteneğinde BCL-XL proteininin rolü çok önemlidir. Bu proteinin yüksek düzeydeki sentezinin, prostat kanserinin evrenlenmesinde kullanılan Gleason skorunun yüksek tespit edilmesiyle doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir. BCL-2 proteini de prostat kanseri hücrelerinde apoptozun önlenmesinde *PTEN* gen delesyonu ve P53 protein inaktivasyonu aracılığıyla etkinlik göstermektedir. PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim mekanizmasının fosforilasyonu ve RTK/STAT3/NF-κB ile RAS/RAF/MEK/ERK sinyal iletim yolaklarının aktivasyonu olayları da BCL-2'nin prostat kanseri hücrelerindeki apoptoz inhibisyonu ile ilişkilidir. Tümör hücrelerinin apoptoz

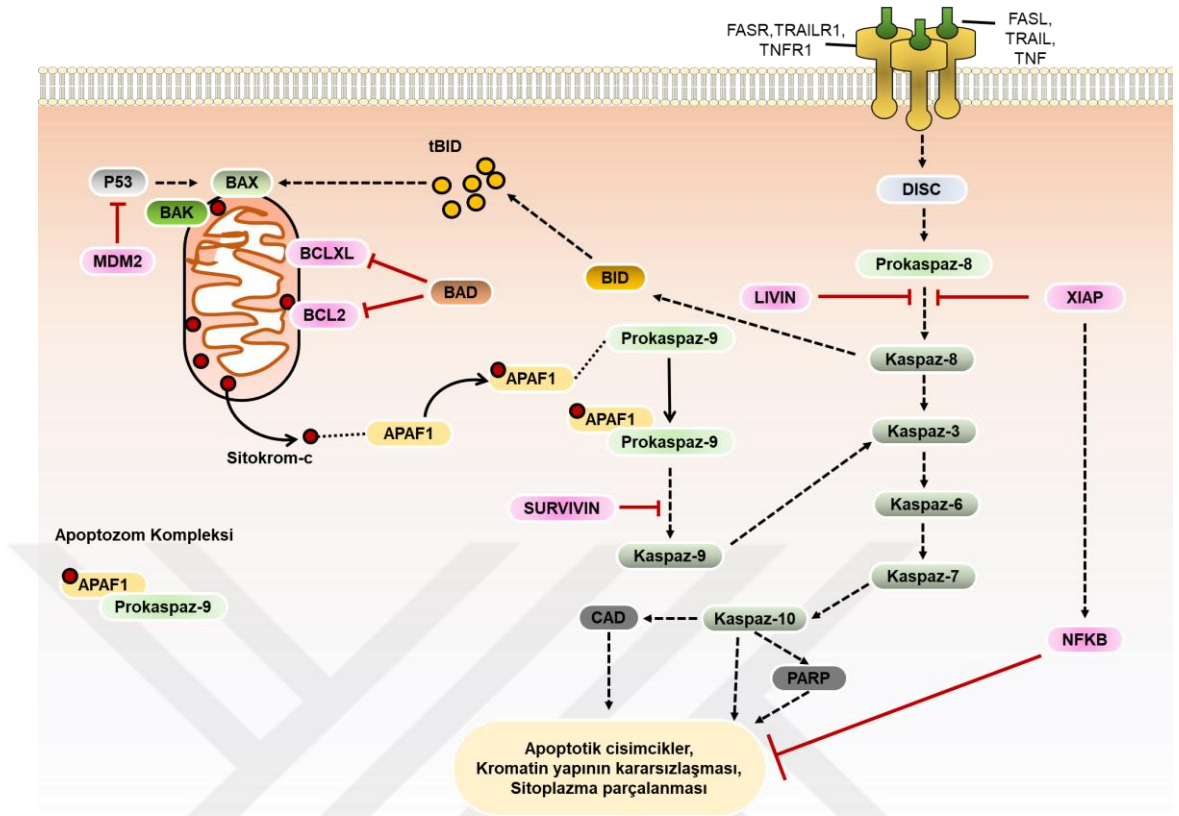
mekanizmalarının aktifleştirilmesinde, BCL-2 proteininin işlevinin engellenip BAX gibi apoptozu teşvik eden proteinlerin aktivitesinin uyarılması durumu kemoterapi başarısının belirteçlerinden birisidir. Kabazitaksel ile gerçekleştirilen terapilerde başarı sağlandığında genellikle gözlenen moleküler profil bu yönde olmaktadır (Kulik, 2014).

Bcl-2 ailesinin apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin sentez miktarlarının birbirlerine olan oranı hücrenin ölüm ve yaşam arasındaki kaderini tayin etmektedir. Bu nedenle BAX/BCL2 oranı, kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve diğer tedavi seçenekleriyle yüksek düzeylerde tutulmaya çalışılır. Anti-apoptotik proteinlerin kanser hücrelerindeki yüksek oranlardaki sentezi, bu hücrelerin immün sistem elemanlarından olan sitotoksik T lenfositleri (CTL) ile doğal öldürücü hücreler (NKC) ve kemoterapötik ajanlar karşısında direnç kazanmalarına sebep olmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde anti-apoptotik genlerin yüksek oranlarda anlatım yaptıkları literatürde mevcuttur. Bu kapsamda yapılan genetik taramalarda akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML), non-Hodgkin's lenfoma, miyeloma, melanoma, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde *BCL-2* geninin yüksek oranlarda transkripsiyon yaptığı tespit edilmiştir (Onyeagucha vd., 2017).

Hücrede içsel apoptotik sinyal iletim yolağı aktivite kazandığı durumda, BAX ve BAK proteinleri mitokondri membranına transfer olup BCL-2 ve BCL-XL proteinleri de BAD sayesinde inaktif olduğunda mitokondri çift membran yapısından sitoplazmaya sitokrom C salınımı gerçekleşir. Sitokrom C, sitoplazmada APAF-1 ve prokaspaz-9 proteinleriyle apoptozom kompleks yapısını oluştururarak kaspaz-9 enziminin aktivite kazanması sağlanır. Aktifleşen kaspaz-9 da kaspaz-3 aktivasyonuna yol açar. Bu etkileşimlerin devamında kaspaz-6 ve kaspaz-7 enzimlerinin etkinleşmelerinin ardından hücrenin yıkımı gerçekleşir (Green & Llambi, 2015). İçsel apoptoz sinyal mekanizması SMAC/DIABLO (kaspazların ikincil mitokondriyal aktivatörü/doğrudan IAP bağlayıcı protein), Nox, Aven ve Myc proteinlerini de içermektedir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu meydana geldiği durumda mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, süperoksit iyonlarının aşırı üretimi ve mitokondri biyogenezinin düzensizleşmesi ortaya çıkar. Bu durum da kanser hücrelerinin apoptoza yönelmelerine engel oluşturmaktadır. Kanser tedavisinde geliştirilmesi hedeflenen stratejiler genellikle, mitokondri membran potansiyelini

düzenleyerek apoptozun tetiklenmesini hedef almaktadır. Salinomisin kanser kök hücrelerinde apoptotik sinyal iletim yollarını aktive ederken, mitokondri membran potansiyelindeki değişim üzerinden etkisini gösterdiği bilinmektedir (Wahab vd., 2020).

İçsel apoptotik sinyal iletim yolağında kaspaz-9 aktivasyonu ile dışsal apoptotik sinyal iletim yolağında kaspaz-8 aktivasyonu olaylarından sonraki aşamada kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 enzimlerinin aktif hale geçmesiyle birlikte iki apoptoz sinyal iletim yolağı birleşir. İlerleyen süreçte kaspaz-10, CAD (Kaspaz ile aktivite kazanmış DNAz) ve PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz) enzimleri de aktive edilir. Ardından bu enzimler, sitoplazmik endonükleazların aktif hale geçerek kromatin yapısını kararsızlaştırmalarına, sitoplazmik parçacıkların oluşmasına ve apoptotik cisimciklerin meydana gelmesine sebep olur (Şekil 2.2). CAD'ın da dahil olduğu sitoplazmik endonükleaz enzimleri doğrudan nükleus DNA'sını yıkmakla kaspazlar proteaz aktivitelerinden dolayı nükleus ve hücre iskeletini oluşturan proteinlerin yıkımını katalizler (Jan & Chaudhry, 2019).



Şekil 2.2. Hücre içi ve hücre dışı kaynaklı olarak gerçekleşen apoptotik sinyal iletim yollarındaki proteinlerin etkileşimleri (Özgün şekil).

Prostat kanseri başta olmak üzere bir çok kanser tedavisi için terapötik ajanlar geliştirilmektedir. Bunlardan biri olan Oblimersen Sodyum (G3139, Genasense), 18 baz uzunluğunda oligonükleotid olup *BCL-2* geninden üretilen transkriptlerin translasyona katılmasını engellemek üzere üretilmiştir. Bcl-2 protein ailesi üyeleri α -heliks yapıda olup BH3 olarak adlandırılan bir altbirim içermektedir. Bu yapı hedef alınarak Obatoclax, Gossypol, ATB-263 ve ATB-199 terapötik ajanları geliştirilmiştir. Bcl-2 ailesine mensup olan anti-apoptotik proteinlerin mRNA'larına bağlanabilen bu ajanlar, transkripsiyon seviyesinde gen anlatımını baskılamaktadırlar. Kronik lenfoblastik lösemi tedavisinde ATB-263 ve ATB-199 ajanları kullanılırken Gossypol ise metastatik meme kanserinde umut verici sonuçlar oluşturmuştur (Naseri vd., 2015).

Bcl-2 protein ailesindeki anti-apoptotik proteinlerin hedeflenerek oluşturulduğu inhibitörlere ilave olarak apoptotik proteinlerin sentezinin artırılıp apoptozun tetiklenmesinde kullanılan bir başka inhibitör grubu da histon deasetilaz inhibitörleridir.

Normal şartlarda asetil-KoA molekülündeki asetil grupları, histon asetiltransferaz enzimlerinin katalitik etkisiyle histon proteinlerindeki lizin amino asitlerine ilave edilir. Asetil gruplarının yerleşmesi; DNA'nın paketlenip kromatin yapının oluşturulmasında ve muhafaza edilmesinde önemli derecede görev sahibi olan histon proteinleri ile DNA arasındaki bağı zayıflatmış olur. Bu durum da ökromatin yapının oluşmasını ve DNA'nın transkripsiyon işlemine elverişli hale gelmesini sağlamaktadır. Asetil gruplarının histon proteinlerindeki lizin aminoasitlerinin yapısından uzaklaştırılması da histon deasetilaz enzimlerince gerçekleştirilir. Asetil gruplarının uzaklaştırılması, heterokromatin yapının oluşmasını ve DNA'nın transkripsiyon işlemine kapalı hale gelmesini sağlar. Histon deasetilaz inhibitör özelliği barındıran terapötik ajanlar kanser hücrelerindeki apoptotik aktiviteye sahip olan genlerin anlatım yapmalarına sebep olur. Sodyum butirat, histon deasetilaz inhibitörü özelliğinde olup apoptotik genlerin anlatımını tetikleyebilen bir terapötik moleküldür. Panobinostat (LBH589) terapötik ajanı da miyeloma tedavilerinde kullanılan bir başka histon deasetilaz inhibitörüdür (Finlay vd., 2017).

Kanser hücrelerinin genom analizi yapıldığında P53 geninin çok yüksek oranlarda mutasyon içerdiği ve işlevini yerine getiremez durumda olduğu tespit edilmiştir. P53 proteini hem hücre döngüsünü durdurucu hem de apoptotik özellikte olan bir tümör baskılayıcıdır. Bu protein, normal şartlarda hücre döngüsünde bir DNA hasarı tespit ettiğinde hücre bölünmesinin duraklamasını sağlamaktadır. Ayrıca ihtiyaç dışında bir onkogen aktivasyonu sözkonusu olduğunda apoptotik sinyal iletim yolağının aktivasyonunu da sağlayabilir. P53 proteini, apoptotik proteinlerde fosforilasyon ve histonlarda asetilasyon ile anti-apoptotik genlerde metilasyon oluşturarak apoptoz üzerinde düzenleyici etki oluşturur. Bu doğrultuda Bcl-2 ailesindeki apoptotik ve anti-apoptotik genlerin transkripsiyonlarını düzenleyebilmektedir. P53 aktivasyonunu tetikleyerek kanser tedavisi gerçekleştirmek amacıyla Nultlin-3, MI-219 ve RITA isimli küçük moleküller üretilmiştir. Nultlin-3 ve MI-219, P53 inaktivasyonunu sağlayıcı özellikte olan MDM2 proteininin P53 ile etkileşimini engellemektedir (Tang vd., 2015).

Apoptotik sinyal iletim yollarının hücre içi kaynaklı (endojen) olarak kontrolünü sağlayan çok önemli bir protein ailesi mevcuttur. Bu proteinler apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) olarak adlandırılır. IAP ailesine mensup olan proteinlerin

yüksek oranlardaki üretimi tümör hücrelerine metastaz, canlılık ve büyüme özelliklerini kazandırmaktadır (Carneiro & El-Deiry, 2020). Bu proteinlerin hedef alınmasıyla oluşturulan terapi yöntemleri kanser hücrelerini kemoterapi uygulamalarına daha hassas hale getirmektedir. Apoptozdaki görevlerinin yanında IAP ailesi üyelerinin nekroptoz, immünite işlevleri, kromozomal bölünme ve sitoplazmik bölünme aşamalarında da etkileri mevcuttur. İçsel apoptotik sinyal iletim yolağı ve dışsal apoptotik sinyal iletim yolağının inhibisyonunun sağlanmasında etkili olan XIAP (X bağlantılı), cIAP1 (hücrel), cIAP2 (hücrel), NIAP (nöronal), Ts-IAP (testis), BRUCE, SURVIVIN ve LIVIN proteinleri bu ailenin üyeleri olarak sıralanırlar. IAP'lar, yaklaşık olarak yetmiş adet aminoasit içeren ve çinko parmak yapıda bulunan bir altbirim taşımaktadır. Bu altbirim, prokaspaz enzimlerinin aktivite kazanarak kaspaz haline dönüşmelerine engel olur. IAP ailesi üyelerinin aşırı miktarlarda sentezlenmesi kemoterapi direnciyle de ilişkili bulunmaktadır. Bu proteinler apoptozu engellemek üzere farklı şekillerde işlevlerini yerine getirir. XIAP, karşı-anlamli (anti-sense) olarak özgü olduğı proteinin üretimini sınırlandırabilir. XIAP proteini, içsel ve dışsal apoptotik sinyal iletim yollarındaki durdurucu etkisini, doğrudan kaspaz enzimlerinin aktivitelerinin engellenmesini sağlayarak ya da NF- κ B sinyal iletimini destekleyerek oluşturmaktadır. XIAP mRNA'sını hedefleyerek tümör hücrelerinin apoptozdan korunmalarını engelleyecek şekilde üretilen AEG351356 oligonükleotid dizisi, akut miyeloid lösemi ile pankreas kanseri tedavisinde umut verici sonuçlar göstermiştir. Normal şartlarda SMAC proteini XIAP ve SURVIVIN apoptoz inhibitör proteinlerinin işlevlerini engelleyerek apoptozu tetiklemektedir. SMAC proteininin bu özelliğinden yararlanılıp çeşitli tamamlayıcı (komplementer) oligonükleotidler sentezlenerek kemoterapi etkinliğini artırmak amacıyla kullanımı üzerinde çalışılmıştır. AZD5582, JP1201 terapötiklerinin de kronik lenfoblastik lösemi ile pankreas kanseri hücre hatlarında TRAIL ilişkili dışsal apoptotik sinyal iletim yolağının aktivasyonundaki etkinlikleri gösterilmiştir (Jiménez vd., 2020).

2.6. Hücre İçi Proliferasyon Mekanizmalarının Kanserdeki Önemi

Sağlıklı bir doku organizasyonu ve işleyişinin temelinde, dengeli yürütölen sinyal etkileşimi önem taşır. Genellikle hücrel canlılık ile ölüm arasındaki dengeyi

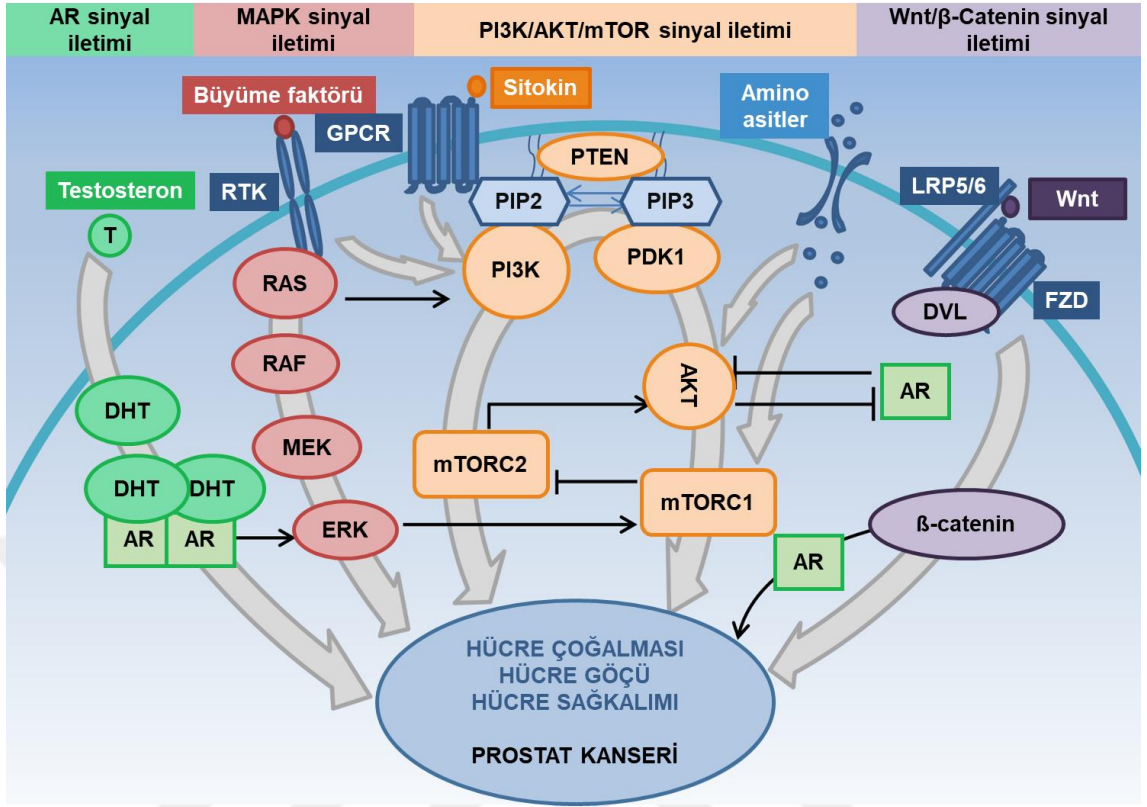
sağlayan bu yollar arasındaki iletişim ve kontrol eksikliği durumunda, kanser ile birlikte bir çok sistemik hastalık ortaya çıkabilir. PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK, JNK/MAPK ve p38 MAPK (Mitojen aktiveleştirici protein kinaz) gibi hücre içi sinyal iletim yolları hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve sağkalımında rol oynar (Shorning vd., 2020). Diğer bir çok kanserde olduğu gibi, bu sinyal iletim moleküllerindeki mutasyonlar prostat kanserinin gelişiminde de etkilidir.

Hücre çoğalmasını (proliferasyon) düzenleyen sinyal iletim yolları; kanserle ilişkili kök hücre devamlılığını, apoptozu ve hücre göçünü kontrol eden moleküler mekanizmalarla sürekli iletişim halindedir. Bu yüzden, kanser tedavisi kapsamında klinik uygulamalarda kullanılan kemoterapötik ajanlar, hücre çoğalmasının kontrolünden sorumlu olan hücre içi sinyal iletim yollarını oluşturan protein yapıları hedefleyerek geliştirilmektedir. Kanser moleküler biyolojik temellerinin aydınlatılmaya başlandığı ilk çalışmalardan günümüze kadar keşfedilen MYC, RAS, BRAF, KIT gibi onkogenler ve P53, BRCA1, BRCA2 ve PTEN tümör baskılayıcı genler, bu kapsamda sıklıkla hedeflenen yapılar arasında yer alır (Yip & Papa, 2021).

Günümüzde kanser tedavisinde hedeflenen ve kanser araştırmalarında yaygın olarak analizleri yapılan PI3K/AKT/mTOR ile MAPK yolları ve içerdikleri protein yapıları da kanserle ilişkili hedef moleküler mekanizmalara ilave edilebilir. Bu yollarda bulunan proteinlerin inhibisyonunu sağlayıcı kemoterapötik ajanların geliştirilmesi ise ilerleyen zamanlarda gelişen kemoterapi direnci yüzünden önemli bir iyileştirici etki oluşturmamıştır. Bu kapsamda geliştirilen Vemurafenib, Dabrafenib, Encorafenib ajanları BRAF mutant proteinlerinin üç boyutlu yapısına özgü olarak üretilmiştir. Trametinib ile Binimetinib MEK1 ve MEK2 mutant proteinlerinin inhibisyonu amaçlanarak tasarlanmıştır. Cobimetinib ajanı MEK1'in inhibisyonunu sağlayıcı özellikte iken Gefitinib ile Lapatinib kemoterapötikleri de sırasıyla EGFR ve HER2 tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonunu engellemek üzere oluşturulmuşlardır. Burada belirtilen kemoterapötik ajanlara karşı gelişen hücresel direnç, genellikle MAPK yollarındaki diğer proteinlerde gelişen yeni mutasyonların yollar üzerinde pozitif bir geri bildirim oluşturmalarıdır (Lee & Rauch, 2020). PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolağının yüksek oranda aktif olduğu tablo dozetaksel ve kabazitaksele karşı geliştirilmiş hücresel direnç durumunda gözlenmektedir (Yasumizu vd., 2014).

Kemoterapi etkinliğinin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda etkin bir terapi yöntemi uygulanması durumunda ise PI3K ve AKT yapılarının hücre içi sentez oranlarının azaldığı tespit edilmiştir (Hongo & Kosaka, 2018).

Reseptör tirozin kinazların hücre membranındaki aktivasyonları, sitoplazmada bulunan PI3K başta olmak üzere bir çok enzimi ardı ardına etkileyerek aktif hale getirmektedir (şekil 2.3). Lipid yapıdaki kinazlardan oluşan PI3K protein ailesi Sınıf-1 (Sınıf-1A ve Sınıf-1B), Sınıf-2 ve Sınıf-3 olarak bölünmüş geniş bir gruptur (Thorpe, Yuzugullu, & Zhao, 2015). Sınıf-1A PI3K enzimleri katalitik ve düzenleyici (regülatör) olmak üzere iki adet heterodimer yapıda alt ünite bulundurur. Katalitik alt ünite p110 α , p110 β , p110 δ birimlerini içerirken düzenleyici alt ünite p85 α /p55 α /p50 α , p85 β , p55 γ birimlerini içermektedir. Bu birimler PI3K enzimi için protein yerleşimi, reseptör bağlanması ve aktivasyonunu kontrol eder (Yang vd., 2019). Reseptör tirozin kinaz enzimleri p110 α , p110 β ve p110 δ birimlerini fosforilleyerek PI3K enzimini aktifleştirir. Fosfat grubu sayesinde katalitik alt nitesi aktif hale geçen PI3K, lipid yapıda olan PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat) ikincil haberci molekülünün sentezlenmesini katalizlerken PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfat) yapısına fosfat grubu ekler. PIP3 molekülü burada hücre büyümesi, hücre çoğalması, otofaji ve apoptoz olaylarını kontrol etmek için üretilmektedir (Papa & Pandolfi, 2019). Ancak, PIP3 yapısının, bu olayların kontrolünü sağlamak için tekrar PIP2 yapısına döndürülmesi gerekmektedir. Yani bu değişim dinamik bir durumdur. PIP3 yapısından fosfat grubunun ayrılmasını katalizleyen enzim, tümör baskılayıcı özellikte olan PTEN'dir. Prostat kanseri de dahil olmak üzere kanser türlerinin çok büyük bir kısmında PTEN proteini mutant olarak sentezlendiği için fosfataz olarak görevini yerine getirememektedir. Bunun temel sebebi 10 numaralı homolog kromozomlardan birindeki *PTEN* geninin delesyona uğramış olmasıdır. Tümör hücrelerinde mutant durumdaki PTEN proteini PI3K/AKT/mTOR yolağı üzerinde kontrol sağlayamadığından hücre içinde sürekli olarak hücre büyümesi ve bölünmesi yönünde sinyal iletimi oluşur. Kabazitaksel, kemoterapi etkinliğini önemli oranda PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını baskılayarak gerçekleştirir (Pearson & Li, 2018).

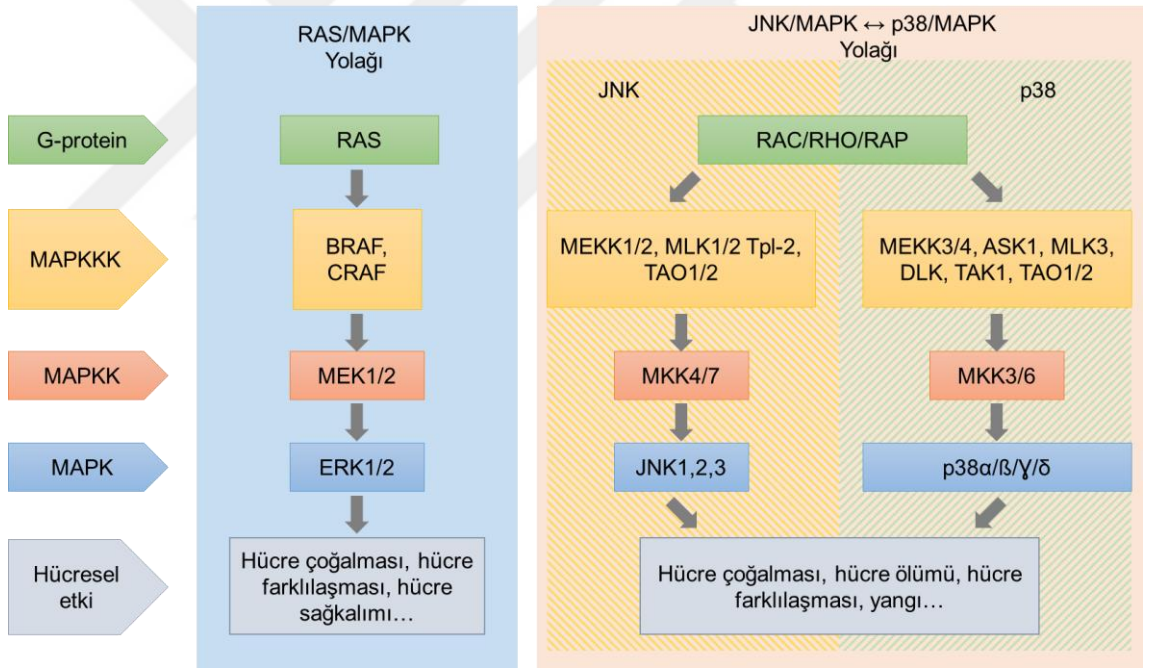


Şekil 2.3. Prostat kanserinde etkili olan PI3K/AKT/mTOR, AR, RAS/MAPK ve Wnt/β-katenin hücre içi sinyal iletim yolları (Shorning, Dass & Smalley, 2020).

Normal şartlar altında kontrollü bir şekilde sağlanan PIP2/PIP3 dengesinin bozulmasının ardından ortamda oluşan fazla miktardaki PIP3 ikincil haberci molekülü, AKT proteinine fosfat grubu eklemekle görevli olan PDK1 enzimini aktive eder. Etkinleşen bu enzim, inaktif durumda olan AKT proteinine fosfat grubu ekleyerek aktivite kazandırır. Fosforile olan AKT, pAKT olarak NF-κB ve mTORC1 gibi hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve hücre sağkalımını artırıcı yönde etkisi bulunan proteinlerin sentez oranının artmasını sağlar (Gagliardi, Puliafito & Primo, 2018). Kabazitaksel ile gerçekleştirilen kemoterapi uygulamalarında hem AKT hem de pAKT proteinlerinin sentez düzeyleri azalır (Xu vd., 2022).

Karsinogenezin gelişimine, içerdiği bir çok mutasyondan dolayı sebebiyet veren bir diğer hücre içi sinyal iletim yolağı da RAS/MAPK mekanizmasıdır. Salinomisin tedavilerinin kanser hücrelerinde MAPK ve AKT protein sentezinin negatif yönde etkilendiği bilinmektedir (Qi vd., 2022). Bu sinyal iletim yolağı ile birlikte içerdiği proteinler ve işleyiş şekli ilerleyen kısımlarda açıklanacak olan JNK/MAPK ve p38

MAPK sistemlerine tek başlık altında MAPK yolları adı verilir. Tek bir sınıfta toplanabilen bu yollarda üç adet kinaz enziminin ardı ardına birbirlerini etkilemesi söz konusudur. Şelale tarzında bir zincirleme etkileşim dizisine yol açan bu kinazları, sistemin ilk uyararı olarak hücre membranında yerleşik bulunan büyüme faktörü reseptörleri kontrol eder. Bu reseptörler de hücre dışından gelen ligand moleküllerle uyarılmaktadır. Reseptör aktivasyonundan sonra bir G-protein, MAPKKK (mitojen aktifleştirici protein kinaz kinaz kinaz) enzimini aktifleştirir. MAPKKK ise yolaktaki bir diğer kinaz olan MAPKK'nın fosforillenmesini katalizler. Fosforilasyon sayesinde aktifleşen MAPKK ise sinyal iletim yolağının bir sonraki üyesi MAPK'ı fosforile eder. Böylece aktivite kazanan MAPK, nükleustaki transkripsiyon işlemlerini düzenleyerek hücrel faaliyetlerin kontrolünü ve devamlılığını sağlayacaktır (Şekil 2.4) (Lee & Rauch, 2020).



Şekil 2.4. MAPK yollarını oluşturan proteinlerin ilişkileri (Lee & Rauch, 2020).

Tüm MAPK yollarında olduğu gibi RAS/MAPK hücre içi sinyal iletim sisteminde de hücre membranında yerleşik olup hücre dışı kaynaklı olan büyüme faktörlerinden etkilenen reseptör tirozin kinazlar kontrolü sağlamaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR), RAS/MAPK sinyal iletim yolağında ard arda meydana gelen aktivasyon değişimlerini

başlatıcı etki oluşturabilen reseptör tirozin kinazlardır (RTK). Bu sinyal iletim mekanizmasının bileşenleri olan proteinler birbirlerini enzimatik olarak uyarıp hücre çoğalması, hücre göçü, hücre farklılaşması, hücre sağkalımı, hücre yaşlanması ve hücre ölümü gibi işlevlerin kontrolünü sağlamaktadır. Prostat kanseri ve diğer kanser türlerinin hücre moleküler biyolojisi ile moleküler genetik arka planı incelendiğinde RAS/MAPK sinyal iletim yolağı bileşenlerinden olan RAS, RAF, MEK ve ERK proteinlerinin üretilmesinde kullanılan genlerin mutasyon taşıdıkları gözlenmektedir. Normal şartlarda reseptör tirozin kinazlar, büyüme faktörleriyle uyarıldıklarında, sitoplazma içerisinde bulunan kısımlarındaki tirozin aminoasitlerinde dimerizasyon ve otofosforilasyon gibi konformasyonel değişimler oluşmaktadır. Meydana gelen bu değişimler, guanozintrifosfataz (GTPaz) enzimlerini aktifleştirir. GTPaz enzimleri, inaktif durumda GDP-bağlı olarak bulunan RAS proteinlerinin RAS-GTP durumuna geçmelerini katalize eder. RAS, buradaki özelliğiyle G-protein olarak sınıflandırılır. RAS proteininin aktivite kazanması, RAF'ın uyarılmasının önünü açar. A-Raf, B-Raf ve Raf-1 kısımlarından oluşan RAF, MAPK yollarında MAPKKK grubundaki kinazlara dahil edilmektedir. RAS-GTP ile etkileşen A-Raf, B-Raf ve Raf-1 kısımlar dimerizasyon oluşturur. Aktif duruma geçen RAF da MAPKK grubuna dahil edilen MEK proteininin fosforilasyonunu katalizlemektedir. Bu durum da MAPK grubundaki ERK1/2'nin nükleusa taşınıp hücre büyümesi, hücre çoğalması ve hücre farklılaşması gibi işlevleri kontrol eden genlerin transkripsiyon yapmalarını uyarmasını tetikler (Shorning, Dass & Smalley, 2020).

RAS/MAPK sinyal iletim yolağının son üyesi olan ERK proteini, DNA üzerindeki *MYC* ve *cFOS* gibi genlerin transkripsiyon yapmalarını tetikler. Bu sinyal iletim yolağı elemanlarının mutasyon taşımadıkları durumda hücre çoğalması ve hücre ölümü kontrollü bir dengede bulunur. Ancak, RAS/MAPK sinyal iletiminde mutasyon söz konusu olduğu zaman bu yolak sürekli olarak nükleusa hücre büyümesi ve hücre bölünmesi yönünde uyarı gönderir. ERK protein düzeyinin kabazitaksele dirençli prostat kanseri hücrelerinde artma eğilimi gösterdiği rapor edilmiştir (Hongo & Kosaka, 2018). Ayrıca yine bu sinyal iletim mekanizmayla ilişkili olan pankreatik duktal adenokarsinom vakalarının % 82'sinde, kolorektal karsinomların % 41'inde ve akciğer adenokarsinomların % 32'sinde *KRAS* mutasyonu tespit edilmektedir. Mutasyon

taramalarında tespit edilen bir diğerk gen ise *BRAF*'dır. Özellikle melanom gibi kanser türlerinde *BRAF* mutasyonu % 8 oranında gözlenmektedir. *MEK* ve *ERK* genlerindeki mutasyonlar, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarına nispeten, daha seyrektr (Moore vd., 2020).

p38 MAPK sinyal iletim sistemi; kromatin yeniden düzenlenmesi, gen anlatımı, hücre farklılaşması, hücre sağkalımı, hücre çoğalması, apoptoz ve hücreseel stres ile ilişkili olarak hücre ölümünden sorumlu olan protein ve sitokinlerin büyük bir kısmının fosforilasyonunda görev alır. Bu yolak, AR ile birlikte işlevini sürdürür. Androjen hormonlarının AR'ye bağlanması, Hsp27 proteinin p38 MAPK bağımlı fosforilasyonunu tetikler. Bunun sonucunda Hsp27, nükleusa taşınarak hedefinde olan genlerin transkripsiyonunu aktifleştirir. Androjenlerin olmadığı durumda AR'nin aktivasyonu, interlökin 6 (IL6) tarafından yine p38 MAPK bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Hipoksik koşullar altında p38 MAPK'nın yüksek oranda gerçekleşen fosforilasyonunun, sağlıklı prostat doku organizasyonunu neoplazi durumuna yönelttiğı tespit edilmiştir (Cheung vd., 2021). RAC, RHO ve RAP isimli G-proteinleri MEKK3/4, ASK1, MLK3, DLK, TAK1 ve TAO1/2 MAPKKK enzimlerinin aktivasyonunu uyarmaktadır. Bu enzimler de MAPKK özellikle olan MKK3/6 enzimlerinin fosforilasyonunun katalizlenmesini sağlamaktadır. MKK3/6 enzimi ise MAPK sınıfına giren p38 proteininin p38 α , p38 β , p38 γ ve p38 δ alt ünitelerinin fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir (Park vd., 2020).

Genellikle MAPK sinyal iletim yolakları, kanser tedavisinde ortaya çıkan kemoterapi direnci ve duyarlılığını da kontrol etmektedir. Bu aşamada etkili olan RAS/MAPK ve p38 MAPK sistemlerine ilave olarak JNK (Jun T-terminal kinaz)/MAPK sinyal iletim mekanizması da belirtilmektedir (Lee & Rauch, 2020). G-protein olarak görevli olan proteinler p38 MAPK yolağında olduğu gibi JNK/MAPK yolağında da RAC, RHO ve RAP olarak gözlenmektedir. Bu proteinler, hücre membranındaki reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla aktivite kazandıklarında MAPKKK grubunda bulunan MEKK1/2, MLK1/2, Tpl-2 ve TAO1/2 isimli kinazları fosforiller. Bunlar da MAPKK grubunda bulunan MKK4/7 enzimini aktifleştirir. Ardından MKK4/7 enzimi de MAPK grubundaki JNK1, JNK2 ve JNK3 enzimlerinin fosforilasyonunu katalizler. Bu zincirleme tepkime şeklinde ilerleyen aktivasyonlar

serisinin sonunda da JNK proteinleri, p38 MAPK yolağının sonunda olduğu gibi nükleusa geçerek hücrel çöğalma, farklılaşma, hücre ölümü ve inflamasyon gibi gelişmeleri düzenleyen genlerin transkripsiyon yapmalarını tetiklemektedir (Cuadrado & Nebreda, 2010).

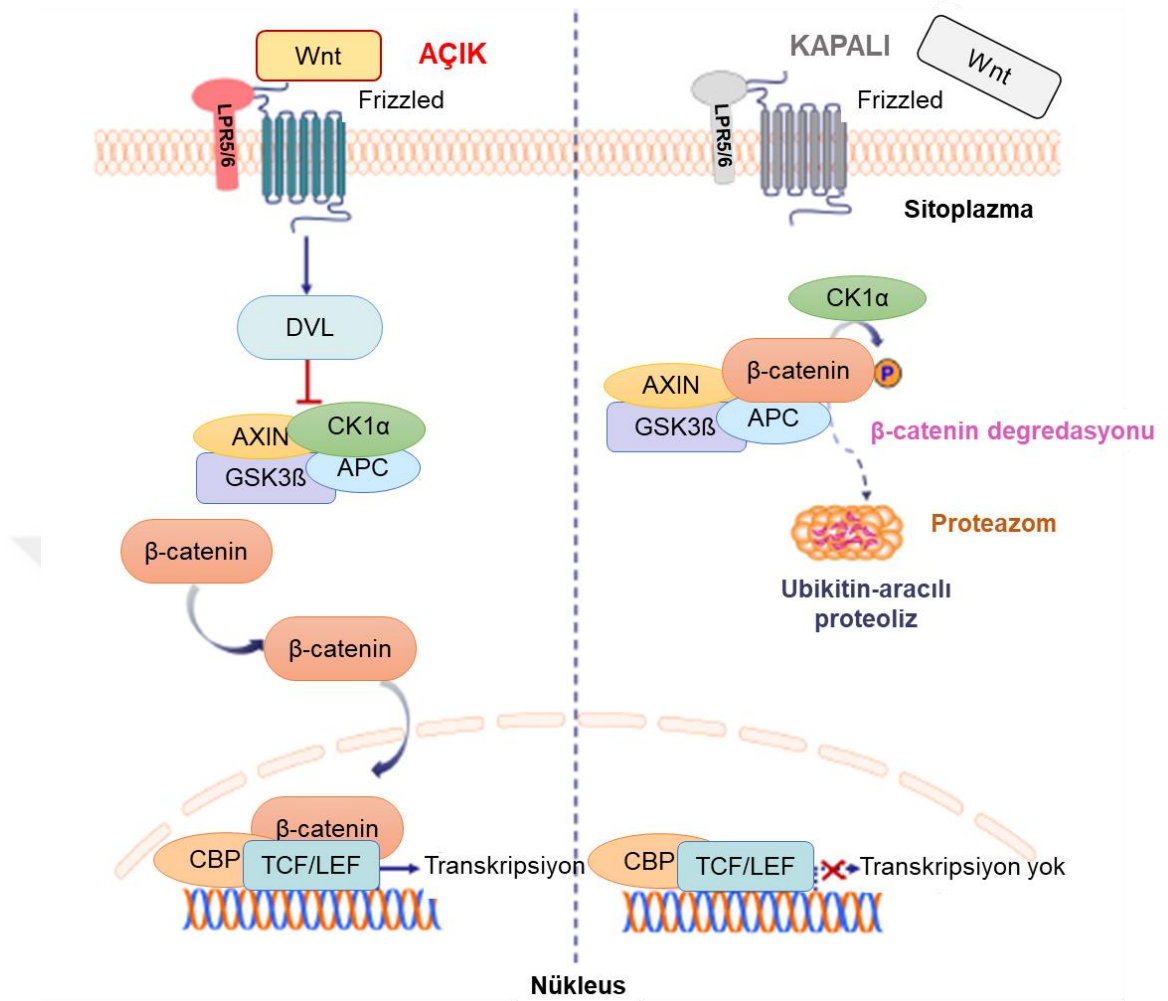
2.7. Wnt/B-katenin Hücre İçi Sinyal İletim Yolağı

Normal şartlar altında hücre içi sinyal iletim yolaklarının kontrolü, hücre döngüsü için son derece yüksek seviyede sağlanır. Karsinogenez fenomeninin gelişim göstermesi, hücre içi sinyal iletim yolaklarının kontrol mekanizmalarının işlev kaybına uğramasının bir sonucudur. Kontrolsüzce ve ihtiyaç dışında gelişen hücre çöğalması durumu, bu olayın en temel sonucudur (Hanahan & Weinberg, 2011).

Prostat kanseri gelişiminde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı çok önemli bir role sahiptir. Tümör dokusunda bulunan stroma hücreleri tarafından salgılanan WNT proteinleri, özellikle kastrasyon dirençli prostat kanserinde kemoterapi direnci gelişimi ve kanser kök hücre mikroçevresinin devamlılığını sağlamaktadır. Bu nedenle kök hücre temelli yeni terapi seçenekleri geliştirilirken bu sinyal ileti yolunun hedeflenmesi, başvurulan yöntemler arasında ilk sıralardadır (Murillo-Garzón & Kypta, 2017).

Kök hücre gelişimi ve devamlılığında önemli bir role sahip olan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının aktivite kazanması, komşu hücrelerden salgılanan WNT proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. WNT geni, *Drosophila Melanogaster* model organizmasında segment polarite geni olan “Wingless” olarak tanımlanmış olup ilk defa fare tümör hücrelerinde mürin proto-onkogen entagrasyon 1 olarak tespit edilmiştir (Reya & Clevers, 2005). WNT ligand proteinleri, endoplazmik retikulumda üretilip salgılanan 19 adet glikoproteinden oluşan bir protein ailesidir. Bu proteinler, hücre dışındaki matriks kaynaklı üretilen sinyallerin membran reseptör proteinleri aracılığıyla hücre içine ulaşmasına ön ayak olmaktadır (Komiya & Habas, 2008). Hücre membranı içerisine yerleşik halde bulunan transmembran frizzled (FZD) reseptörü ile lipoprotein reseptör (LRP5/6), tirozin-protein kinaz transmembran reseptör (ROR1, ROR2) ve tirozin-protein kinaz (RYK) bileşenlerinden oluşan koreseptör birlikteliğiyle etkileşim oluşturan WNT proteinleri, canonical (β -katenin bağımlı) ve noncanonical (β -katenin

bağımsız) olarak Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının aktivasyonunu sağlar (Niehrs, 2012). WNT proteinlerinin yokluğunda FZD reseptörü uyarılmaz ve β -katenin, sitoplazmada bir degradasyon kompleksi yardımıyla yıkılmak üzere işaretlenir (Ma & Hottiger, 2016). Adenoma poliposis coli (APC), aksin, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK3 β) ve kazein kinaz 1 α (CK1 α) yapılarından oluşan bu kompleks içerisinde GSK3 β ve CK1 α enzimleri tarafından, β -katenin molekülünün fosforillenme işlemi katalizlenir. Böylece fosforillenen β -katenin, β TrCP (β -transducing repeat-containing protein) tarafından tanınır ve ubiquitinasyon işlemine tabi tutulur. Ubikitinlenen β -katenin ise proteazom tarafından hedeflenip yıkılır. FZD reseptörü, hücre dışından gelen WNT proteinleri aracılığıyla uyarıldığında LRP5/6 koreseptörü ile birleşir ve intraselüler fosfoprotein disheveled (DVL) aktivite kazanır. Bu durum da yukarıda görevi açıklanan degradasyon kompleksinin inaktif duruma geçmesine sebep olur. Böylece β -katenin sitoplazmada birikmeye başlar. Sitoplazmada biriken β -katenin, nüklear membrandan geçip nükleusa ulaştığında burada TCF/LEF transkripsiyon faktörleriyle etkileşim oluşturur (Şekil 2.5). Bu transkripsiyon faktörleri TCF1, TCF3, TCF4 ve LEF1 olarak sıralanmaktadır (Arce, Yokoyama & Waterman, 2006).



Şekil 2.5. Wnt/β-katenin sinyal yolağının WNT proteinleri ile kontrolü (Zhang & Wang, 2020).

β-katenin sayesinde aktivite kazanan transkripsiyon faktörleri bazı genlerin promotor dizileriyle etkileşerek onların transkripsiyon yapmalarını sağlarken bazı genlerin de transkripsiyon yetenekleri üzerinde durdurucu etki oluşturur. Siklik AMP (cAMP) bağlayıcı protein (CBP) ve ADP-riboziltransferaz difterya toksin-1 (ARTD1 ya da PARP1) protein yapıları β-katenin aktivitesiyle birlikte ekspresyonları negatif yönde etkilenen moleküllerdir. Bununla birlikte Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağının aktivasyonu kök hücre yenilenmesi (NANOG ve OCT4), hücre çoğalması (MYC ve CCND1), hücre farklılaşması (SOX9 ve RUNX2) ve immün yanıtın düzenlenmesi (CTLA4 ve TNFSF9) fonksiyonlarında görevli olan proteinlerin sentezlenmesini

sağlayan genlerin transkripsiyon işlevlerini artırıcı yönde etki oluşturur (Hoverter & Waterman, 2008).

Hücre membranından başlayıp nükleus içerisine kadar uzanan ve son derece yüksek seviyede kontrolü sağlanan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının barındırdığı her bir protein yapının aktivitesi, çeşitli kanser türlerinin tedavisini sağlamak amacıyla hedeflenerek moleküler inhibitörler sentezlenmektedir. Bu inhibitörlerden biri olan porcupine DVL ve TCF/LEF proteinlerinin aktivitelerini inhibe eder. Diğer yandan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının temelini oluşturan Wnt ligand etkileşimini ya da β -katenin sentezinin de inhibisyonu söz konusu olabilmektedir. Kanser kök hücrelerinin hedeflenerek oluşturulan terapi stratejilerine alternatif sayılabilecek salinomisin, Wnt ligand molekülünün FZD reseptörü ile etkileşiminin temelini oluşturan LRP5/6 yapısına bağlanarak inhibisyon oluşturmaktadır. Wnt yolak inhibitörleri burada belirtildiği gibi Wnt ligand etkileşiminin durdurulmasında görevlidir (Anastas & Moon, 2013). Wnt yolak inhibitörü XI (iWnt) molekülü de sitoplazmada biriken β -katenin moleküllerinin nükleusa geçip transkripsiyonu etkilemelerine engel olmaktadır.

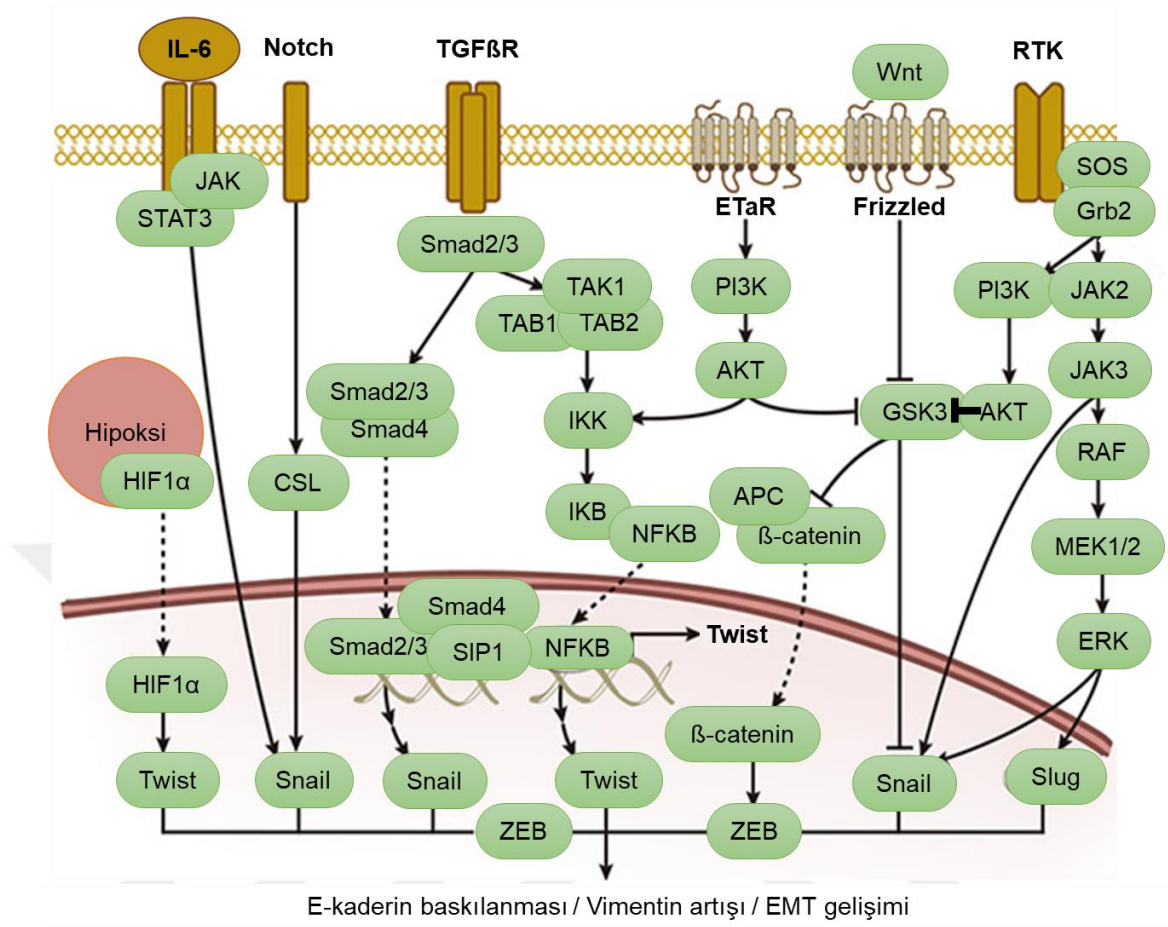
2.8. Kanser Hücrelerinin Göçünde Etkili Moleküler Mekanizmalar

Normal şartlarda birbirleriyle etkileşim halinde olan ve hücre içi sinyal iletim yollarının kontrolünde gerçekleşen hücre göçü ve bölünmesi, karsinogenezde kontrolsüz bir şekilde meydana gelir. Kontrolün ortadan kalkmasının moleküler temelinde önemli bir pay sahibi olan değişim, EMT olarak adlandırılır. EMT durumunda epitel doku hücreleri, mezenşimal hücrelerin sahip olduğu göç etme (migrasyon) yeteneğini kazanır (Shang vd., 2015b). Prostat kanseri de dahil kanser hücrelerinin primer odak dokularından komşu dokulara ya da dolaşım sistemi aracılığı ile uzaktaki dokulara göç edip metastaz yapmasının temelinde EMT vardır (Yang vd., 2004).

Epitel hücrelerinde adezyon yeteneğinin kaybı ve komşu hücrelerle olan sabit durumun kararsız hale geçmesi (hücre mobilitesi) EMT'nin sonuçlarındandır. Hücre adezyon moleküllerinden biri olan E-kaderin proteinin sentez oranının azalması ve mezenşimal belirteç olan vimentinin sentezinin artması, EMT varlığının bir göstergesi

olarak yorumlanır (Li vd., 2014). Ayrıca Wnt, Notch, Hedgehog, TGF- β gibi çeşitli ligand ve reseptör özellikteki proteinler ile Slug, Snail, Twist, Zeb1, SIP1, FoxC2, Six1 gibi transkripsiyon faktörleri de EMT belirteci olarak tanımlanır (Zhang & Ma, 2012). Epitel hücrelerin mezenşimal özellik kazanmasını sağlayan sinyal proteinlerinin çoğunun hedefi E-kaderin protein sentezinin baskılanmasıdır. Slug, Snail, Twist, Zeb1 transkripsiyon faktörleri, E-kaderin sentezini mRNA düzeyinde baskılayarak vimentin sentezini artırıcı etki gösterirler (Fornoni vd., 2012).

EMT'nin moleküler hücre biyolojisinde, E-kaderin sentezinin baskılanmasının devamında hücre iskeleti yapısının yeniden düzenlenmesi ve hücre-hücre adezyon yeteneğinin kaybolması gerçekleşir (Şekil 2.6). Tüm bu olayların arka planında Wnt ligandı ile Frizzled reseptör proteininin birlikteliği, reseptör tirozin kinazlar, hücre dışı matriksinin integrinler ile olan iletişimi ve Notch gibi proteinler tarafından başlatılıp nükleustaki gen ifadesinin etkilenmesiyle sonuçlanan hücre içi sinyal iletim mekanizmaları bulunur (Stone vd., 2016). Hücre membranında bulunan Notch'un sentez oranının artması, Snail transkripsiyon faktörünü uyarak Zeb1 sentezine ve E-kaderin'in baskılanmasına yol açar. Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görevli olan Frizzled'in uyarılması, β -katenin molekülünün APC kompleksinden ayrılıp nükleusa göçünü tetikler ve Zeb1 sentezini artırarak E-kaderin sentezinin de baskılanmasına sebep olur. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının uyarılması, aynı zamanda, Snail'in de sentezlenmesini artırıcı etki gösterir. Bu durumda yine Zeb1 ve E-kaderin sentez oranı değişimleri, EMT'ye yol açacak şekilde etkilenir. Bir Wnt inhibitörü olan "Wnt yolak inhibitör XI" (iWnt), sitoplazmada biriken β -katenin moleküllerinin nükleusa geçişini engelleyerek EMT'yi önler. PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolağı da NF- κ B proteininin I κ B tarafından engellendiği etkileşimi bozarak dolaylı yoldan EMT'nin meydana gelmesine yol açar. Bu etkisini NF- κ B, nükleusa göç edip transkripsiyon seviyesinde Twist sentezini artırarak gerçekleştirir. Böylece Twist transkripsiyon faktörü de E-kaderin sentezinin baskılanmasına katkı sağlar (Lamouille, Xu & Derynck, 2014).



Şekil 2.6. Epitel-Mezenşimal Geçiş'in hücre sinyal iletim şeması (genetex.com).

Kanser hücrelerinin bulunduğu dokulardan serbest hale geçip göç etmesinde matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin de rolü vardır. Bu enzimler hücre-hücre adezyon etkileşimlerini yıkımlayarak kanser hücrelerine hareket kabiliyeti kazandırır. MMP2 ve MMP9 enzimleri hem hücre dışı matriks yapısını oluşturan proteinlerin yıkımlanmasını hem de transmembran durumda bulunan E-kaderin proteininin yıkımlanmasını sağlayarak bu etkiyi gösterirler (Nistico, Bissell & Radisky, 2012).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü ve Araştırma Grupları

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM) bünyesindeki laboratuvarlarda gerçekleştirildi.

Araştırmada insan prostat kanser hücre serilerinden kastrasyona dirençli PC3, (ATCC CRL-1435, Manassas, ABD), DU145 (ATCC HTB-81) ve kastrasyona duyarlı LNCaP (ATCC CRL-1740) kullanıldı. Polistiren kültür kaplarının tabanına yapışarak tek katmanlı çoğalan bu hücrelerin devamlılığı % 10 FBS (fötal sığır serumu, FSS, Diagonvum, Hollanda) içeren DMEM/HAM'S F-12 (50/50 mix, 1x, Multicell, Kanada) medyumda % 5 CO₂ ve % 95 hava bulunduran 37 °C steril inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) sağlandı. Olası bakteriyel kontaminasyonları önlemek için ortama % 1 antibiyotik (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin, Gibco, ABD) ilave edildi.

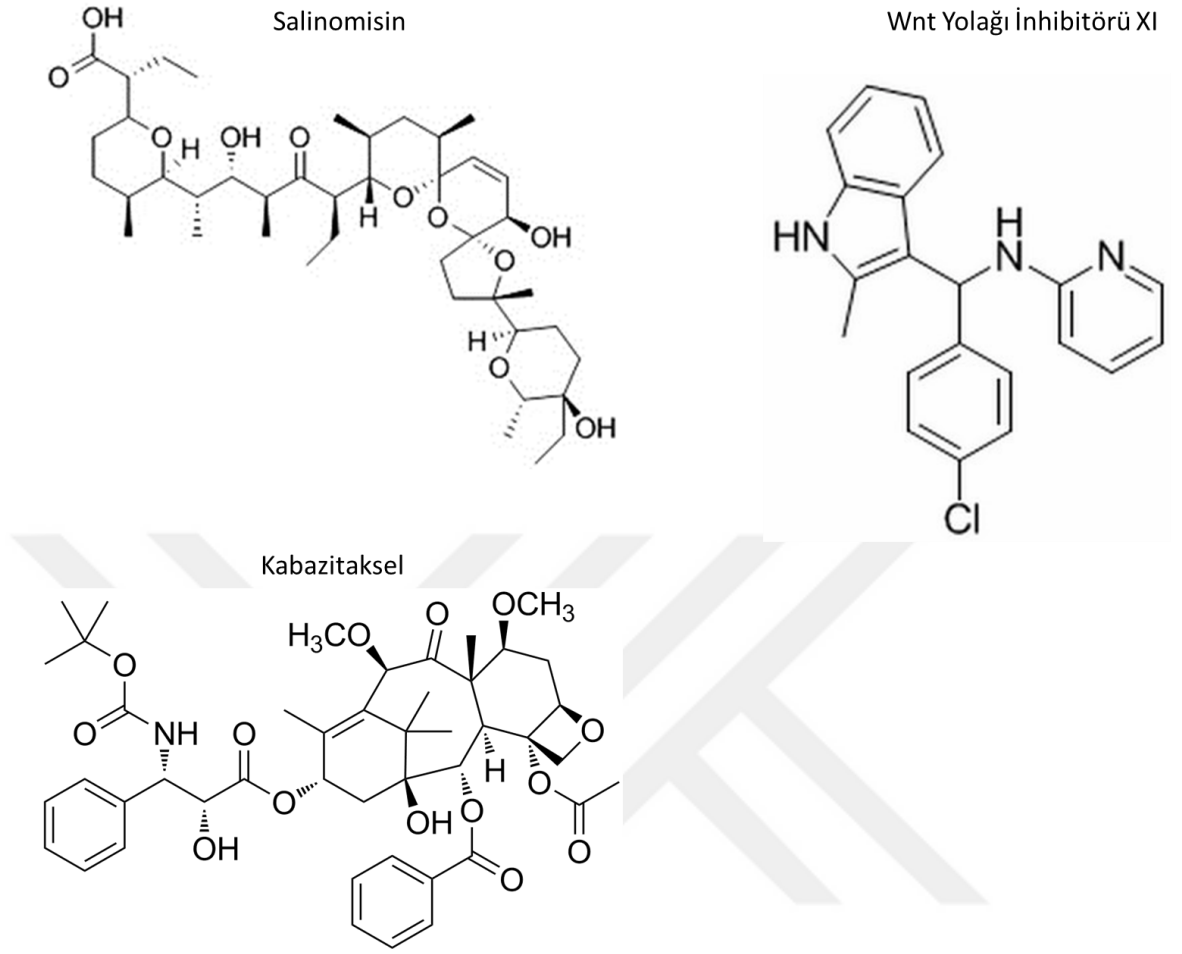
3.1.1. Primer Hücre Kültürü Hazırlama

Yapılan tedavilerin normal hücrelere olası sitotoksik etkilerini belirlemek için primer hücre kültürü yöntemiyle elde ettiğimiz sığır retinal pigment epitel (RPE) hücreleri kullanıldı. Bunun için yerel bir kesimhaneden kesim sonrası alınarak laboratuvara aseptik şartlarda getirilen ve disekte edilen sığır göz kürelerinden RPE hücrelerinin primer kültürü daha önce rapor edilen bir yöntemle elde edildi (Toops, Tan & Lakkaraju, 2014). RPE hücrelerinin elde edilmesi için göz küreleri önce 1000

U/ml Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD) içeren steril distile su içerisine yerleştirilerek 10 dakika süresince buz üzerinde bekletildi. Devamında lens ile vitröz yapıyı içeren ön segmentler bistirü yardımıyla uzaklaştırıldı ve kalan kısım 12-kuyucuklu hücre kültür kabına (Nest Biotechnology, Çin) yerleştirildi. Göz kürelerinin içi 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Almanya) içeren 37 °C’de ısıtılmış 2 ml PBS (fosfat tampon çözeltisi, Phosphate Buffer Saline, Sigma-Aldrich, Frederick, ABD) ile doldurulup 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Serbestleşen retina, vizör yuvasının merkezinde toplanıp optik sinir başından kesilerek çıkartıldı. Göz küreleri, temiz bir 12-kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilerek içleri 5,3 mM EDTA içeren, önceden ısıtılmış, 1 ml % 0,5 tripsin (Gibco, Trypsin-EDTA (0.25 %), ABD) ile dolduruldu ve 37 °C’de 30 dakika süresince inkübe edildi. Daha sonra RPE hücreleri, göz küresi içerisinden toplanarak 8 ml komple medyuma (% 10 FBS (fötal sığır serum, FSS, Diagnovum, Hollanda), 4,5 g/L glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren 1X DMEM (50/50 mix, 1x, multicell, Kanada)) alınarak 300 RCF devirde 4 dakika santrifüj edildi (Centurion Scientific, Birleşik Krallık). Hücre peletleri 1X DMEM içerisinde tekrar süspanse edilerek 25 cm² flaska (SPL Life Sciences, Gyeonggi, Güney Kore) aktarılıp % 5 CO₂ içeren 37 °C’de inkübe edildi (Thermo Scientific, ABD) ve üç günde bir kez besi yeri yenilendi. Kontaminasyonu engellemek amacıyla medyuma 10 µg/ml Ciproktan (Koçak Farma, Türkiye) ilave edildi.

3.1.2. Ön-tedavi ve Kemoterapi Bileşenleri

Araştırmada kanser kök hücrelerinde seçici olarak hücre içi iyon dengesini bozarak apoptoz yollarını tetikleme özelliğine sahip salinomisin (Cayman Chemical, Michigan, ABD) ile kanser hücrelerinin çoğalmasında rol oynayan Wnt yolak inhibitörü (İnhibitör XI, CCT036477, Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) tedavi etkinliğini artırmak amacı ile hücrelere kemoterapi öncesinde uygulandı. Ardından eski medyumlar uzaklaştırıldı ve aynı hücreler kabazitaksel (Cayman Chemical, Michigan, ABD) ile tedavi edildi (Şekil 3.1). Araştırmada kullanılan farmakolojik ajanlar DMSO (dimetil sülfoksit, Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde çözündürülerek 10 mM konsantrasyonda hazırlandı ve kullanılıncaya kadar - 20 °C’de muhafaza edildi. Kültür ortamındaki DMSO konsantrasyonu % 0,1’den düşük olacak şekilde uygulandı.



Şekil 3.1. Bu çalışmada kullanılan salinomisin, Wnt yolağı inhibitörü XI ve kabazitakselin moleküler yapıları.

3.2. Hücre Pasajı

Yetmiş beş cm^2 kültür kaplarında çoğaltılan hücreler, yapılacak analizlere göre sayıları belirlendikten sonra farklı kültür kaplarına transfer edildi. Hücre sayımı hemositometre lamında yapıldı. Bunun için kaplardaki hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı ve 4 ml steril PBS ile yıkandı. Devamında 3 ml tripsin (Gibco, Trypsin-EDTA (0.25 %), ABD) uygulanarak 5 dk 37 °C’de inkübasyona bırakıldı ve süspansiyon temiz bir falkon tüpe aktarılıp 150 Xg devirde 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 10 ml taze medyum ilave edilip hücreler pipetaj yardımıyla homojen hale getirildi (Erdogan vd., 2018).

Hücre sayısının belirlenmesi için hücre süspansiyonundan ve tripan mavisi çözeltisinden eşit hacimlerde (örneğin her birinden 10 μl) karışım elde edildikten sonra

hemositometrenin hücre sayım alanına pipetlendi. Hemositometrenin dört alanında bulunan hücrelerin sayısı belirlendi (A). Aşağıdaki formül yardımıyla hesaplama yapılarak 1 ml medyum içindeki hücre sayısı hesaplanmış oldu:

$$A \times 10\,000 \times \text{Sulandırma Faktörü} = \text{Toplam hücre sayısı}$$

3.2.1. Stok Amaçlı Hücre Dondurma ve Çözdürme

İlerleyen zamanlarda yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin erken pasajları tripsinizasyon sonrası % 5 DMSO içeren besi ortamında vida kapaklı tüplerde (cryo tüp) donduruldu. Dondurma işlemi için tüpler önce – 80 °C derin dondurucuda bir gece muhafaza edildi, ertesi gün ise sıvı azot tankına transfer edildi.

Yeni hücreye ihtiyaç olduğunda sıvı azot tankından alınan hücreler, 37 °C’de ısıtılmış su banyosuna transfer edilip 2-3 dakika içinde çözünmeleri sağlandı. Ardından 15 ml falkon tüpe alınıp üzerine besi yeri eklenerek süspansiyon duruma getirildi. Hücreler 150 Xg devirde 5 dk santrifüj yapıp süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Peleti oluşturan hücreler, 10-12 ml besi yeri ile muamele edilip yetmiş beş cm²’lik hücre kültür kabına aktararak çoğaltılıp çalışmalarda kullanıldı (Erdogan vd., 2018).

3.3. Hücre Sağkalım Analizleri

Araştırma uygulamalarının hücre canlılığı üzerine olası etkileri MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, C₁₈H₁₇N₅S, Acros Organics, Çin) (hücre sağkalım) testi ile belirlendi. Tedavi uygulamaları yapılacak hücrelerin önce kültür kaplarının yüzey alanına göre ekimleri yapıldı. MTT analizi için kullanılan 96-kuyucuklu kültür kaplarının (Nest Biotechnology, Çin) her bir kuyucuğuna 10⁴ adet hücre ekildi ve 16 saat 37 °C sıcaklık ve % 5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Devamında gruplarına göre salinomisin, iWnt ve kabazitakselin farklı konsantrasyonları uygulanarak plakalara 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sağlandı. İnkübasyon bitimlerinde kuyucuklardaki eski besi yerleri 100 µl taze besi yeri ile değiştirildi. PBS içerisinde hazırlanan MTT (1 mg/ml) çözeltisinden her bir kuyucuğa 50 µl ilave edildikten sonra plakalar 3 saat süre ile 37 °C’de bekletildi. Devamında MTT içeren besi yeri ortamdan uzaklaştırılarak oluşan formazan kristalleri, DMSO (200 µl/kuyucuk) yardımıyla çözdürüldü. Gelişen mor rengin şiddeti 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu spektrofotometrede

(Thermo Fisher Scientific Multiskan Go, Finlandiya) ölçüldü. Elde edilen absorbansa göre uygulama gruplarındaki canlı hücre oranları tespit edilerek kontrol gruplarına göre yüzde cinsinden karşılaştırmalar yapıldı (Erdogan vd., 2016).

Prostat kanser hücre tedavisinde doza ve uygulama süresine göre etkili konsantrasyonlar saptandıktan sonra oluşturulan tedavi modalitesinin etkinliği test edildi. Bunun için hücrelere önce 0,5 µM salinomisin ve 6,25 µM iWnt ile 48 saatlik ön tedavi uygulandı. Devamında medyumlar ortamdan uzaklaştırılarak aynı hücreler 48 saat süresince yalnızca 2,5 nM kabazitaksele maruz bırakıldı. Tedavi uygulamalarının sonunda MTT testi yapılarak hücrelerde sağkalım oranları belirlendi. Deneyler en az, üç kez tekrar edildi ve yapılan her uygulamada sekiz adet kuyucuk kullanıldı. Elde edilen verilerde bir örnekliğin sağlanabilmesi için 13. - 25. pasajlardaki hücreler kullanıldı. Çalışmada oluşturulan temel araştırma grupları Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kabazitaksel (Cab), Grup 3: Salinomisin (Sal), Grup 4: Wnt yolağı inhibitörü (iWnt), Grup 5: Sal + iWnt, Grup 6: Sal + Cab, Grup 7: iWnt + Cab, Grup 8: Sal + iWnt + Cab şeklinde belirlendi.

3.4. Uygulama Etki Analizi

Prostat kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksitenin araştırıldığı tedavi gruplarının birlikte uygulandığında oluşturdukları etkinin sinerji durumu Ting-Chao Chou tarafından tanımlanan Chou-Talalay yöntemi ile analiz edildi (Chou, 2010). Bu analizde kombinasyon indeksi (CI) puanı hesaplandı. CI değeri; $CI = (D)^1 / ((D_x)^1 + (D)^2 / (D_x)^2 + (D)^3 / (D_x)^3)$ formülü kullanılarak belirlendi. Buradaki (D_x) değerleri her bir ilacın dozunu temsil ederken (D) değerleri ise yalnız kullanıldıklarıdaki etki değerlerini gösterir. MTT testinden elde edilen hücre canlılık oranları kullanılarak, kombinasyon indeks grafikleri CompuSyn yazılımı yardımıyla oluşturuldu. Bu hesaplamada elde edilen CI ve DRI (doz redüksiyon indeksi) verilerine göre CI<1, sinerjik etkiyi; CI=1, eklemeli etkiyi; CI>1, antagonist etkiyi; DRI>1 durumu ise en doğru kombinasyon seçeneğini gösterir (Dewangan vd., 2017).

3.5. Apoptoz Analizi

Çalışma kapsamında uygulanan 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 µM salinomisin (Sal), 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü (iWnt), Sal + iWnt, Sal + Cab, iWnt + Cab ve Sal + iWnt + Cab tedavi bileşenlerinin apoptotik yolları tetikleme potansiyeli görüntü temelli sitometre tekniği kullanılarak belirlendi. Analizlerde ticari kit (Tali Cell Cycle Kit – Molecular Probes) ve görüntüleme cihazı (Tali Image-Based Cytometer - Ref. T10796/Invitrogen) kullanıldı.

Analiz gerçekleştirilmeden önce Annexin tamponu hazırlandı. Ticari kit içindeki 5x stok halde bulunan annexin tamponu 1x olacak şekilde seyreltilerek karanlık ortamda ve +4 °C’de muhafaza edildi. Besi yerinde serbest halde bulunan ölü hücrelerde de analiz yapma gerekliliği ihtimaline karşın tripsin uygulamasının öncesinde eski besi yeri ortamdan alınıp muhafaza edildi. Kültür ortamında bulunan hücreler, tripsin ile muamele edilerek ortamdan alındı. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım tamamen uzaklaştırıldı ve pellet üzerine yaklaşık olarak her 5×10^6 hücre için 100-300 µl kadar annexin tamponu ilave edildi. Her 100 µl hücre süspansiyonu için 5 µl Annexin V Alexa Flour 488 maddesi ilave edilip karıştırıldı. Yirmi dakika oda koşullarında ve karanlıkta inkübasyon sağlandı. Devamında hücreler 750 Xg’de 1 dk santrifüj yapılarak süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Pelet 100 µl annexin tamponu içerisinde süspansiyon hale getirildi. Her 100 µl hücre süspansiyonu için 1 µl propidium iodide ilave edilip karıştırıldı. TALI görüntüleme lamına 20-25 µl hacimde örnek koyulup 1-5 dk sonra cihaz (Tali® Image-Based Cytometer) yardımıyla görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (Genc vd., 2022).

3.6. CD44⁺ Kanser Kök Hücre İzolasyonu

Taban alanı 75 cm² olan hücre kültürü kaplarının her birine $1,5 \times 10^6$ adet hücre ekildi. Flaskların her birine 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 µM salinomisin + 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü (Sal + iWnt) ve Sal + iWnt + Cab araştırma grupları ayrı ayrı uygulandı. Uygulama sonunda PC3 hücrelerinden, CD44 belirtecini taşıyanlar manyetik kolon ayırma yönteminden (MACS) (Miltenyi Biotech, ABD) yararlanılarak elde edildi. İzolasyon sürecinde hücreler MACS tamponu içerisinde süspansiyon hale getirildi. MACS tamponu, % 5 albümin (BSA) ve 10 mM EDTA içerecek şekilde PBS içerisinde

hazırlandı. Tampon çözelti pH'ı 7,4 olarak ayarlanıp +4 °C'de muhafaza edildi. Hücreler tripsin yardımıyla toplanıp sayıldıktan sonra 10×10^6 hücre, 100 µl MACS tamponu ve 10 µl PE CD44 human antikoru (Miltenyi Biotech) ile süspansiyon hale getirildi. Hücre süspansiyonu +4 °C'de 15 dk muhafaza edildi. İnkübasyon bitiminde hücre süspansiyonu 10 dk süresince 300 Xg'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 100 µl MACS tamponu ile 10 µl anti-PE CD44 microbeads (Miltenyi Biotech) ilave edildi. Karışım 20 dk +4 °C'de muhafaza edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 10 dk 300 Xg'de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet 1 ml MACS tamponu içerisinde süspansiyon hale getirildi. Kolon sistemi (Miltenyi Biotech) MACS tamponu kullanılarak yıkandı ve manyetik alan oluşturulup hücre süspansiyonu kolona yüklendi. 500 µl MACS yardımıyla kolon sistemi üç defa yıkanıp kolon manyetik alandan uzaklaştırıldı. Ardından özel şırınga kullanılarak kolon içerisine tutunan CD44⁺ kök hücrelerin manyetik kolondan elde edilmesi sağlandı. Elde edilen CD44⁺ kök hücre süspansiyonu santrifüj yardımıyla MACS tamponundan ayrılıp hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Kullanılan tedavi bileşenlerinin kök hücre sayısı üzerindeki etkisi analiz edildi (Cinar & Ozal, 2021).

3.7. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Taban alanı 75 cm² olan flasklar ile 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarının taban yüzeyleri, adezyonu önlemek için agaroz (Multicell, Çin) ile kaplandıktan sonra hücre ekim işlemi yapıldı. Flasklara 10^6 , kuyucuklara ise 2×10^3 adet hücre ekildi. Bu işlem sırasında 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarında her bir kuyucuk için 50 µl, flasklar için ise 10 ml besi yeri kullanıldı (Erdogan vd., 2018). Kültür kabının tabanına yapışamayan hücreler birbirleriyle etkileşip küresel (sferoid) ya da serbest şekilli yapılar oluşturarak besi yerinde askıda kaldı. Üç boyutlu hücre kültür ortamlarına 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 µM salinomisin (Sal), 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü (iWnt), Sal + iWnt, Sal + Cab, iWnt + Cab ve Sal + iWnt + Cab araştırma grupları uygulandı. Hücreler bu deney esnasında besi yerinde askıda bulundukları ve ön tedavi içeriği ile kemoterapi içeriğini değiştirmenin mümkün olmayacağından dolayı ön tedavi ve kemoterapi uygulamaları birlikte gerçekleştirildi. Üç günde bir idame doz uygulaması için besi yerindeki son ilaç derişimini değiştirmeyecek şekilde farmakolojik ajanları taşıyan taze medyum ortama eklendi. Analizlerin sıfıncı ve onuncu günlerinde ışık mikroskobu

(Zeiss, Almanya) altında görüntüleri alınarak sferoid yapıların çapları ölçüldü. Her biri sekiz adet sferoid yapıdan oluşan gruplarda bulunan canlı hücreler 10. gün sonunda tripsin ile muamele edilerek ayrıştırıldı ve hemositometrede canlı hücre sayıları belirlendi.

3.8. Hücre Göçü Deneyi

Tedavi modalitesinin kanser hücrelerinin göç yeteneği üzerine etkisi yara iyileşme (çizik) deneyi ile belirlendi. Bu amaçla 6-kuyucuklu (her biri 9,6 cm²) hücre kültürü kaplarından her birine 9 x10⁵ adet PC3 hücresi ekilerek taban alanının tamamen kaplanması sağlandı. Daha sonra kültür kabının orta hattında pipet ucu kullanılarak bir çizik yol açıldı. Kalkan hücreler PBS ile yıkanarak kültür kabından uzaklaştırıldı. Serum içermeyen besiyeri kullanılarak 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 µM salinomisin (Sal), 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü (iWnt), Sal + iWnt, Sal + Cab, iWnt + Cab ve Sal + iWnt + Cab araştırma grupları hücrelere uygulanıp belirli zaman aralıklarında ışık mikroskobu (Zeiss, Almanya) altında fotoğrafları alındı. Kontrol gruplarında yara aralığının yaklaşık olarak kapandığı 24. saatte deney sonuçlandırılarak gruplarda kalan yara aralıklarının mesafesi belirlendi (Ayyildiz vd., 2021).

3.9. Hoechst Boyası ile Apoptoz Değerlendirme

Hücrelere salinomisin ve iWnt kombinasyonu ile 48 saat yapılan ön tedavi ve bunu takiben uygulanan 48 saat kabazitaksel sonunda olası apoptozun varlığı Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, İsviçre) DNA boyaması ile gösterildi. Bu amaçla, 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarına hücreler ekildi ve 16 saat tabana yapışmaları için inkübe edildi. Daha sonra her bir farmakolojik ajan tek veya kombine olarak hücrelere uygulandı. uygulamalarda 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 µM salinomisin (Sal), 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü (iWnt), Sal + iWnt, Sal + Cab, iWnt + Cab ve Sal + iWnt + Cab konsantrasyon ve kombinasyonları gerçekleştirildi. İnkübasyon bitiminde, görüntüleme işleminden önce, hücre kültürü kaplarından besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı. Ardından PBS içerisinde çözündürülmüş Hoechst boyası karşımı kültür kabına uygulandı ve beş dakika içinde flouresans mikroskop (Zeiss, Almanya) yardımıyla görüntülendi (Cinar & Ozal, 2021).

3.10. Gen İfadesi Analizleri

Çalışmada kullanılan 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 µM salinomisin (Sal) + 6,25 µM Wnt yolağı inhibitörü (iWnt), ve Sal + iWnt + Cab gruplarının temel bazı moleküler yollar üzerindeki etkilerini belirlemek için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaçla ilk aşamada total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonucunda elde edilen total RNA ürünleri içerisindeki mRNA moleküllerinin cDNA karşılıkları oluşturuldu. Ardından cDNA molekülleri de kalıp olarak kullanılıp gerçek zamanlı PCR analizi ile mRNA düzeyindeki gen ifade durumları analiz edildi.

3.10.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu ticari kit (GeneJET - Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kullanılarak gerçekleştirildi. İşlem öncesinde % 2 β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren lizis tamponu (1000 µl LB + 20 µl β-merkaptoetanol) ve % 70 etil alkol (Sigma-Aldrich, Almanya) hazırlandı. Kültür kaplarından besi yeri uzaklaştırıldı ve inkübasyon sonunda hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandı (75 cm² kültür kabı için 6 ml PBS, 25 cm² kültür kabı için 2 ml PBS). Daha sonra her bir 25 cm² kültür kabına 600 µl lizis tamponu eklenip 15 dk süresince oda sıcaklığında bekletildi ve homojenat 1,5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak 12.000 Xg devirde, +4 °C sıcaklıkta, 2 dk santrifüj (Heraeus, Almanya) yapıldı. Devamında süpernatant, 1,5 ml steril mikrosantrifüj tüpe alınarak üzerine eşit hacimde % 70 etil alkol eklenerek vorteks (Isolab, Almanya) yardımıyla karıştırıldıktan sonra karışım spin kolona alınarak +4 °C'de ve 12.000 Xg devirde 1 dk süresince santrifüj yapıldı. Ardından spin kolona 700 µl yıkama tamponu-1 konuldu ve 12.000 Xg'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı ve kolona iki tekrar olmak üzere 500 µl yıkama tamponu-2 eklenerek yeniden aynı hız ve sürede santrifüj yapıldı. Son aşamada spin kolon, 1,5 ml steril mikrosantrifüj tüpe yerleştirilip kolonu yıkamak amacıyla 50 µl nükleaz içermeyen su kolonun ortasına pipetlendi ve 12.000 Xg'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapılarak total RNA karışımı tüpte toplandı (Erdogan vd., 2018).

Elde edilen RNA örnekleri uzun süreli muhafaza amacıyla derin dondurucuda (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) -80 °C'de saklandı. İzolasyon

sonucunda elde edilen RNA örnekleri kalıp molekül olarak kullanılıp tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi.

3.10.2. cDNA Sentezi ve RT-qPCR Analizi

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları, spektrofotometrik okuyucu (Thermo Fisher Scientific Multiskan Go, Finlandiya) kullanılarak belirlendi ve cDNA sentezi için 1 000 ng (nanogram) RNA kullanıldı. Reaksiyon ticari kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Viktorya, Avustralya) kullanılarak 10 x RT tamponu (2,0 µl), 25 x dNTP karışımı (0,8 µl), 10 x RT random primer (2,0 µl), revers transkriptaz (1,0 µl), nükleaz içermeyen su (4,2 µl) ve 1 000 ng RNA (10,0 µl) içerecek şekilde hazırlandı. Oluşturulan reaksiyon 25 °C’de 10 dk, 37 °C’de 120 dk ve 85 °C’de 5 dk olacak şekilde termal saykılir cihazında gerçekleştirildi (Barloworld Scientific, Birleşik Krallık).

Sentezlenen cDNA molekülleri kalıp olarak kullanılıp özgül primerler (Sentegen Biotech, Ankara) (Çizelge 1) ve SYBR Green (Applied Biosystems PowerUp MasterMix, Litvanya) yardımıyla mRNA ekspresyon değişimlerini saptamak için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu oluşturuldu. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazında (Applied Biosystems StepOnePlus Real Time PCR System, Kaliforniya, ABD), ilk döngü 2 dakika 50 °C ve ilk denatürasyon 10 dakika 95 °C; 40 döngü denatürasyon (95 °C 15 saniye), yapışma ve zincir uzatma (60 °C 1 dakika) olacak şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon bitiminde elde edilen Ct (Cycle of Treshold) değerleri ile $2^{\Delta\Delta Ct}$ kullanılarak deney gruplarındaki mRNA sentez miktarları kontrol grubuna göre kıyaslandı. Analiz aşamasında GAPDH ifadesi referans olarak kullanıldı (Cinar & Ozal, 2021).

Çizelge 3.1. RT-qPCR analizinde kullanılan primerler.

APAF1	F	5'	GATATGGAATGTCTCAGATGGCC	3'
	R	5'	GGTCTGTGAGGACTCCCCA	3'
NANOG	F	5'	ATGCCTCACACGGAGACTGT	3'
	R	5'	AGGGCTGTCTGAATAAGCA	3'
BAX	F	5'	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	3'
	R	5'	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	3'
BCL-2	F	5'	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	3'
	R	5'	ACAGTTCCACAAAGGCATCC	3'
CYT-C	F	5'	TGGGCCAAATCTCCATGGTC	3'
	R	5'	AGGCAGTGGCCAATTATTACTCA	3'
CASP3	F	5'	TGGTTCATCCAGTCGCTTTG	3'
	R	5'	CATTCTGTTGCCACCTTTTCG	3'
CASP8	F	5'	CTGCTGGGGATGGCCACTGTG	3'
	R	5'	TCGCCTCGAGGACATCGCTCTC	3'
SURVIVIN	F	5'	GACGACCCCATAGAGGAACA	3'
	R	5'	GACAGAAAGGAAAGCGCAAC	3'
LIVIN	F	5'	TGGCCTCCTTCTATGACTGG	3'
	R	5'	ACCTCACCTTGTCTGATGG	3'
BCL-XL	F	5'	GTAAACTGGGGTCGCATTGT	3'
	R	5'	TGGATCCAAGGCTCTAGGTG	3'
SOX2	F	5'	GCCGAGTGGAAGCTTTTGTCG	3'
	R	5'	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTT	3'
GAPDH	F	5'	TTGGTATCGTGGAAGGACTCA	3'
	R	5'	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT	3'

F: İleri pirmer dizisi, R: Geri primer dizisi

3.11. Protein İfadesi Analizi

Yapılan 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 μ M salinomisin (Sal) + 6,25 μ M Wnt inhibitörü (iWnt) ve Sal + iWnt + Cab uygulamalarının apoptoz, hücre büyümesi, hücre çoğalması, hücre göçü ve kök hücre yenilenmesi ile ilgili olan bazı hücre içi sinyal iletim yollarında görevli olan proteinlerin sentezlenme oranına etkisi Western blot yöntemi ile analiz edildi. Bu amaçla PI3K, NF- κ B, Wnt10, AKT, E-Caderin, Snail, Kaspaz3, Bax, Bcl2, p-P38, Survivin, ZEB1, pAKT, Vimentin, pERK, P38 ve β -aktin özgün primer antikorları kullanıldı.

3.11.1. Protein Ekstraksiyonu

Yapılan tedavi uygulamaları sonrasında hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve içerisinde 10 µl PMSF, 10 µl sodyum ortovanat ve 15 µl proteaz inhibitör kokteyli bulunan 1 ml RIPA lizis tamponundan 25 cm² hücre kültür kaplarına 500 µl eklenip 15 dk süresince +4 °C’de bekletildi. Devamında homojenat mikrosantrifüj tüplerine aktararak 12.000 Xg, +4 °C’de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra homojenat yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak protein konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlendi. Örnekler kullanılıncaya kadar - 80 °C’de muhafaza edildi.

3.11.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Homojenatlardaki proteinler poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırılmadan önce denatüre edildi. Bunun için 65 µl protein içeren homojenat 25 µl LDS örnek tamponu (4X) ve 10 µl örnek indirgeyici ajan (10X) kullanılarak 100 µl hacimde reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 95 °C’de 7 dk süresince denatürasyon işlemi uygulandı. Elektroferez için hazırlanan örnekler, içerisinde yürütme tamponu bulunan 950 ml distile su ile 50 ml 20 x running buffer jel tankına dolduruldu ve % 4-12 ticari poliakrilamid jel, tanka yerleştirildi. Jel üzerinde bulunan kuyucuklara 20 µl hacimde toplam 20 µg protein yüklenerek 100 volt gerilimde 90 dk yürütme işlemi yapıldı.

3.11.3. Proteinlerin Membrana Transferi ve Bloklama

Protein elektroforezi sonrası jel kaseti blotlama cihazına (Invitrogen) yerleştirilen PVDF membran üzerine hava boşluğu bırakmayacak şekilde yerleştirildi. Filtre kağıdı suda ıslatılarak jelin üzerine serilip rulo ile kabarcıklar uzaklaştırıldı ve 25 volt gerilim, 1,3 amper akımda 7 dk süresince transfer işlemi gerçekleştirildi. Proteinlerin transfer edildiği PVDF membran temiz bir kaba alınıp üzerine 20 ml bloklama solüsyonu (14 ml ultra saf su + 4 ml bloklama bileşeni A + 2 ml bloklama bileşeni B) eklendi. Oda koşullarında 2 saat süresince çalkalamalı inkübatörde bloklama gerçekleştirildi.

3.11.4. Primer ve Sekonder Antikor Bağlanması

Bloklama işleminin ardından bloklama solüsyonu kullanılarak primer antikorlar, kullanım sertifikalarında belirtilen oranlarda seyreltilip bir gece boyunca +4 °C’de proteinlerin bulunduğu PVDF membrana uygulandı. İnkübasyon sonunda membranlar 150 ml ultra saf su ve 10 ml antikor yıkama solüsyonundan (16X) oluşan tampon ile beşer dk süre ile üç kez, bir kez de beş dk ultra saf su ile yıkandı.

Primer antikor kalıntılarının yıkanmasının ardından sekonder antikor çözeltisi membran üzerine dökülerek oda koşullarında 2 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi (Erdogan & Turkecul, 2020). İnkübasyon sonunda üstte belirtildiği gibi yıkama yapıldı.

3.11.5. Kemilüminesans Bağlanması ve Görüntüleme

Membrana bağlanmayan sekonder antikorlar da uzaklaştırıldıktan sonra her bir membran için 2,375 ml kemilüminesans substrat ve 0,125 ml enhancer solüsyonları birleştirilerek toplam 2,5 ml kemilüminesans çözeltisi hazırlandı. Kemilüminesans çözeltisi alimünyum folyo ile sarılarak karanlıkta muhafaza edildi. Membran, görüntüleme cihazının tablasına alınıp kemilüminesans çözeltisi tüm yüzeye yayılarak uygulandı. Dört dk sonra görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (Biorad ChemiDoc MP Imaging System, ABD). Daha sonra görüntülenen bant profillerinin ImageJ programında dansitometrik olarak ölçümleri yapıldı. Devamında ise elde edilen dansitometrik değerler β -aktin analizinde elde edilen değere göre oranlanıp hesaplandı.

3.12. İstatistiksel Analiz

Gerçekleştirilen analizlerde elde edilen veriler SPSS 18 (PASW Statistics) programı üniversite lisanslı (IBM, ABD) kullanılarak analiz edildi. SPSS 18 programında ise “One Way Anova” ve “Duncan” testlerinden yararlanıldı. Hücre sağkalım analizlerinden elde edilen veriler GraphPad Prism 9.4.0 (San Diego, CA, USA) yazılımı kullanılarak IC₅₀ değerleri saptandı. RT-qPCR analizlerinde 2 ^{$\Delta\Delta C_t$} metodundan yararlanıldı. İstatistiksel olarak deney grupları ile kontrol grubu arasındaki anlamlı fark durumu, p<0,05 olarak tespit edildiğinde belirtildi (Cinar & Ozal, 2021).

BÖLÜM 4

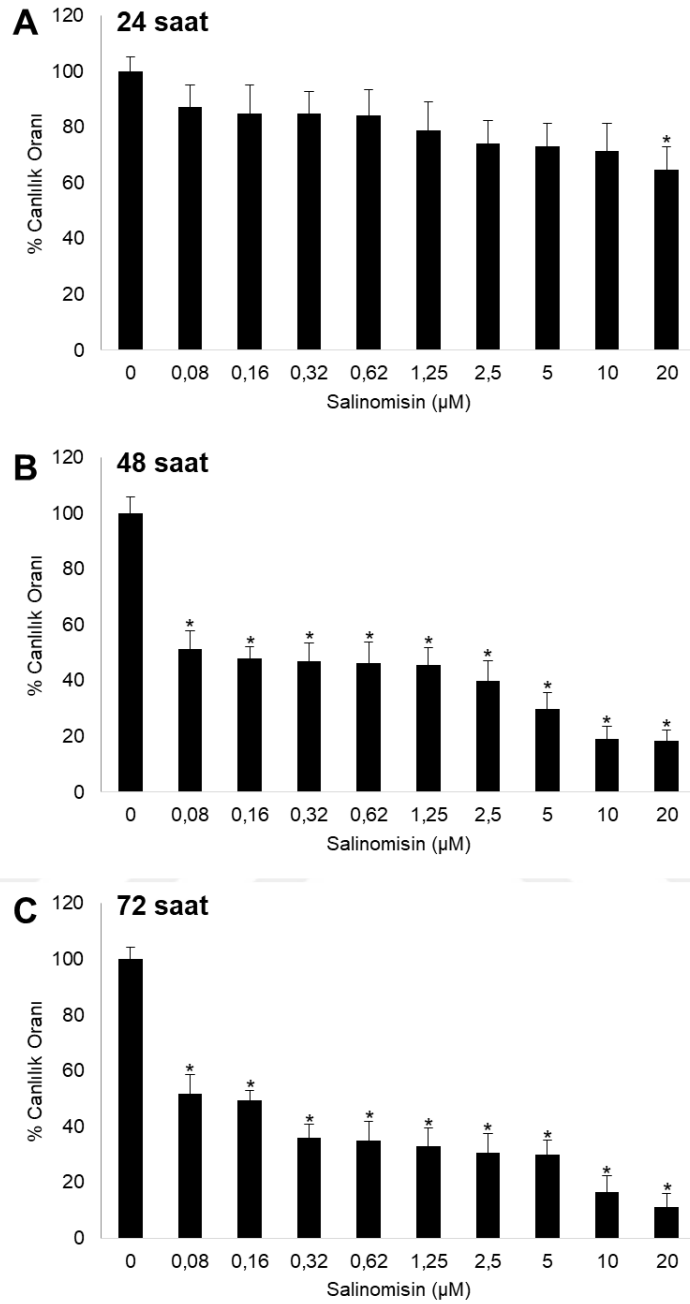
BULGULAR

4.1. Konsantrasyon ve İnkübasyona Bağlı Salinomisinin Sitotoksik Etkisi

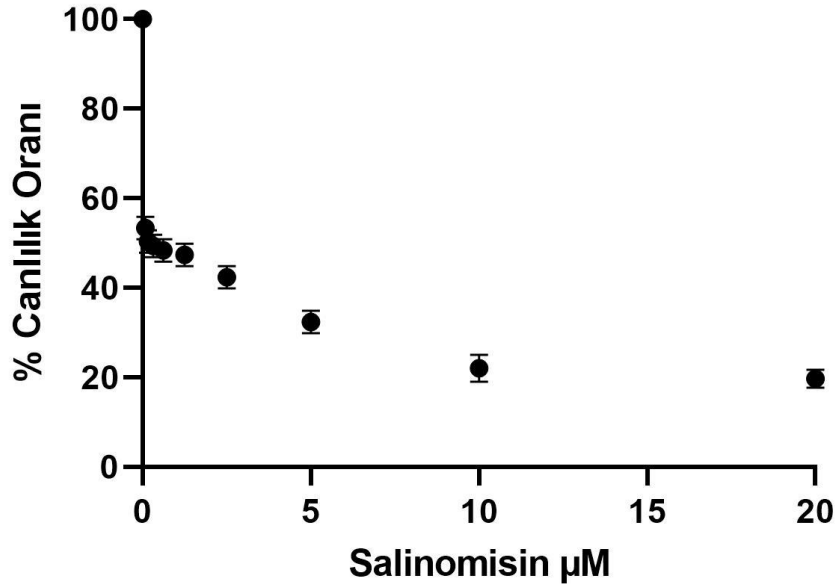
Uygulama süresi ve değişen konsantrasyonlarına göre salinomisinin PC3 hücrelerinin sağkalım yüzdesine yaptığı sitotoksik etki MTT testi ile belirlendi. Bunun için hücreler 96-kuyucuklu kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Yaklaşık 16 saat sonra her bir kuyucuğa μM konsantrasyonunda olmak üzere 0,078, 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 μM salinomisin uygulandı. Her bir grup için sekiz adet kuyucuk kullanıldı ve deneyler en az üç kez tekrar edildi. Uygulamanın 24. (Şekil 4.1.A), 48. (Şekil 4.1.B) ve 72. (Şekil 4.1.C) saatlerinde MTT testi yapılarak tedavi sonrası sağkalım oranları kantitatif olarak belirlendi.

Hücrelerin salinomisin ile 24 saat süresince tedavisinde 10 μM konsantrasyona kadar kontrol grubuna göre sitotoksik etkinin önemsiz düzeyde ($p>0.05$) kaldığı gözlemlendi. (Şekil 4.1.A). Bununla birlikte 48 (Şekil 4.1.B) ve 72 (Şekil 4.1.C) saat tedavilerin tüm konsantrasyonlarında önemli düzeyde sitotoksik etki ($p<0.05$) saptandı.

Salinomisin tedavisi sonucunda popülasyonun yarısını öldüren konsantrasyonu (IC_{50}) belirlemek için 48 saat salinomisine maruz bırakılan hücrelerde yapılan MTT testi verileri GraphPad Prism 9.4.0 yazılımında kullanıldı. Buna göre bu hücrelerde salinomisinin IC_{50} değeri 0,5 μM olarak belirlendi (Şekil 4.2). Yetmiş iki saat uygulama da benzer sitotoksik patern oluştururken ön tedavilerde 48 saatin IC_{50} konsantrasyonu tercih edildi.



Şekil 4.1. Konsantrasyon ve uygulama süresine göre salinomisin sitotoksik etki oluşturur. PC3 hücreleri salinomisinin farklı konsantrasyonlarına (0,078 µM - 20 µM) 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süresince maruz bırakıldı. Uygulamalar sonrası hücrelerdeki sağkalım yüzdeleri MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre.



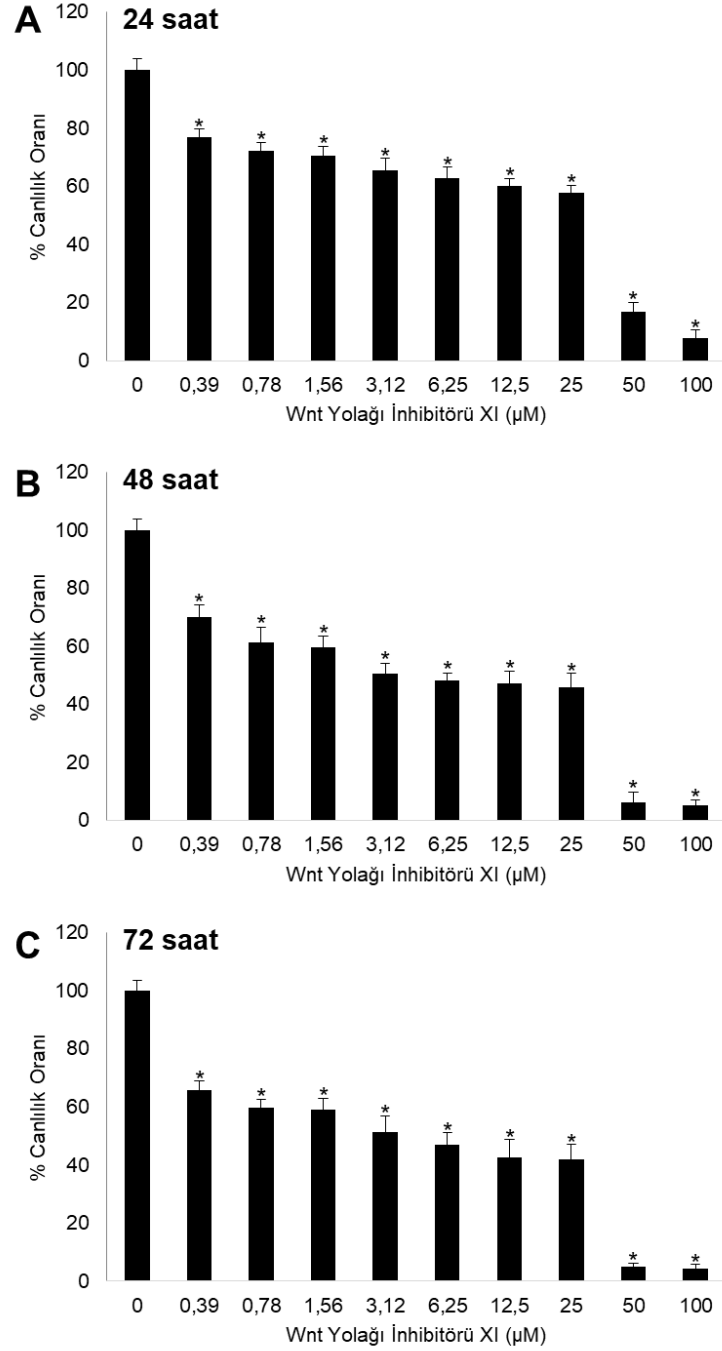
Şekil 4.2. Salinomisin tedavisinin IC_{50} değeri. PC3 hücreleri salinomisinin farklı konsantrasyonlarına 48 saat süresince maruz bırakılıp elde edilen hücre canlılık oranları GraphPad Prism 9.4.0 programında analiz edildi. Bu hücrelerdeki salinomisinin IC_{50} değeri 0,5 μM olarak saptandı.

4.2. Wnt Sinyal Yolak İnhibitörünün Hücre Sağkalımına Etkisi

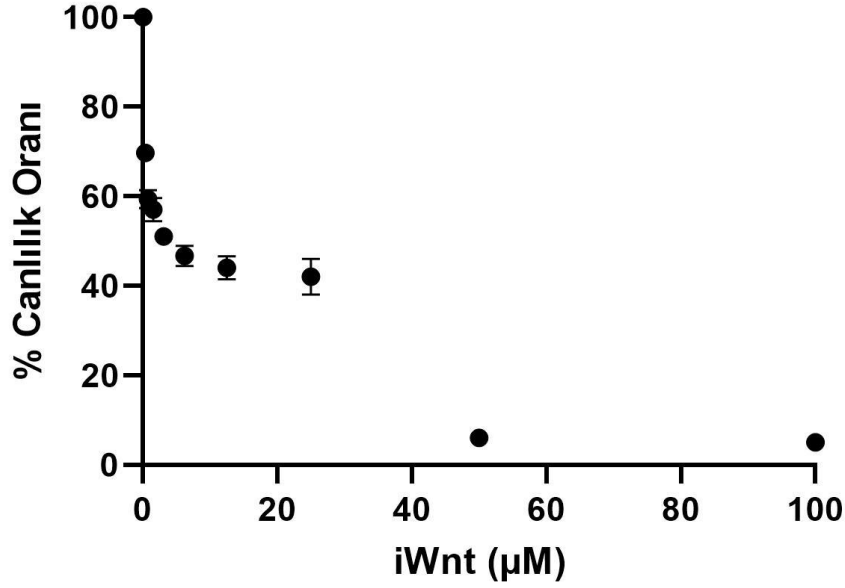
Uygulama süresi ve değişen konsantrasyonuna göre bir Wnt sinyal yolağı inhibitörü olan iWnt'nin PC3 hücrelerine yaptığı sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla 96-kuyucuklu kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde PC3 hücreleri ekildi. Yaklaşık 16 saat sonra her bir kuyucuğa 0,39 μM , 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında iWnt uygulandı. Her bir grup için bu uygulamada sekiz adet kuyucuk kullanılıp deneyler farklı zamanlarda en az üçer defa tekrarlandı. Uygulamanın 24. (Şekil 4.3.A), 48. (Şekil 4.3.B) ve 72. (Şekil 4.3.C) saatlerinde MTT testi yapılarak tedavi sonrası sağkalım oranları belirlendi.

Hücrelere iWnt kullanılarak uygulanan tedavi kapsamında 24 (Şekil 4.3.A), 48 (Şekil 4.3.B) ve 72 (Şekil 4.3.C) saatlik uygulamaların tüm konsantrasyonlarında önemli düzeyde sitotoksik etki ($p < 0.05$) saptandı. Hücrelerin 48 saatlik sürede yarısını öldüren iWnt konsantrasyonu (IC_{50}) GraphPad Prism 9.4.0 yazılımı kullanılarak 6,25 μM olarak hesaplandı (Şekil 4.4). Yetmiş iki saat uygulama da benzer sitotoksik patern

oluştururken uygulanacak ön tedaviler sonrasında da kemoterapi uygulaması yapılacağı için sadece 48. saatin IC₅₀ konsantrasyonunun kullanımı tercih edildi.



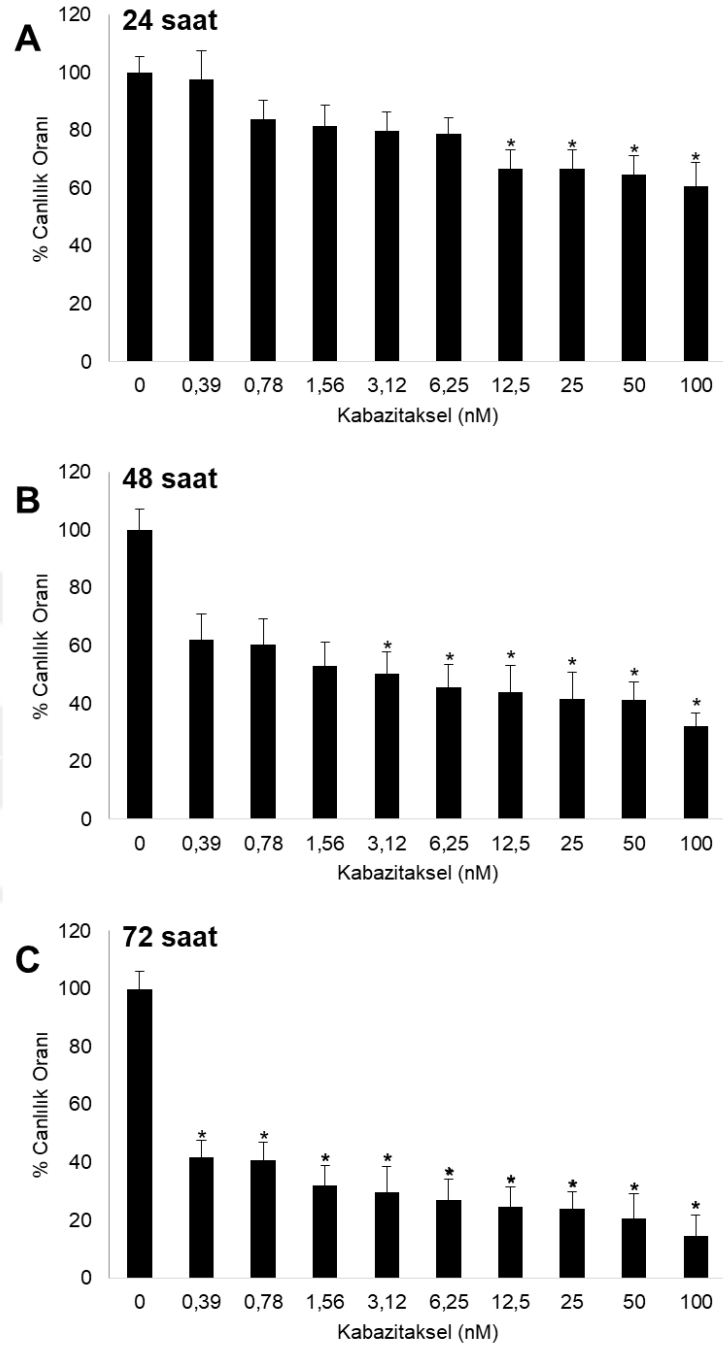
Şekil 4.3. Konsantrasyon ve uygulama süresine göre iWnt sitotoksik etki oluşturur. PC3 hücreleri iWnt'nin 0,39 µM - 100 µM konsantrasyonlarına 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süresince maruz bırakıldı. Uygulamalar sonrası hücrelerdeki sağkalım yüzdeleri MTT testi ile belirlendi. *p<0,05 kontrol (0) grubuna göre.



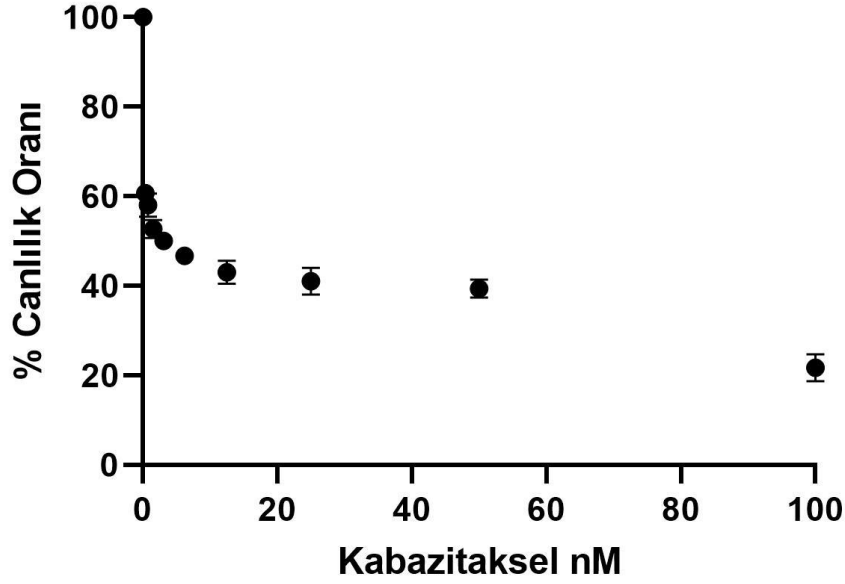
Şekil 4.4. iWnt tedavisinin IC_{50} değeri. PC3 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki iWnt 48 saat süresince uygulandı ve elde edilen hücre canlılık oranları GraphPad Prism 9.4.0 programında analiz edildi. PC3 hücrelerinde iWnt için IC_{50} değeri 6,25 µM olarak tespit edildi.

4.3. Kabazitakselin Hücre Sağkalımına Etkisi

Uygulama süresi ve değişen konsantrasyonuna göre kemoterapi ajanı kabazitakselin oluşturduğu sitotoksik etkiyi belirlemek için PC3 hücreleri 96-kuyucuklu kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve yaklaşık 16 saat tabana yapışmaları için beklendi. Daha sonra her bir kuyucuğa taze medyum içinde 0,39 nM, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 nM kabazitaksel uygulandı. Her bir grup için bu uygulamada sekiz adet kuyucuk kullanılıp deneyler en az üçer defa tekrarlandı. Uygulamanın 24. (Şekil 4.5.A), 48. (Şekil 4.5.B) ve 72. (Şekil 4.5.C) saatlerinde MTT testi yapılarak hücrelerdeki sağkalım oranları belirlendi. Kırk sekiz saat uygulamadan elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değeri 2,5 nM olarak hesaplandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Konsantrasyon ve uygulama süresine göre kabazitaksel sitotoksik etki oluşturur. PC3 hücreleri kabazitakselin 0,39 nM - 100 nM konsantrasyonlarına 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süresince maruz bırakıldı. Uygulamalar sonrası hücrelerdeki sağkalım oranları MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre.



Şekil 4.6. Kabazitaksel tedavisinin IC_{50} değeri. PC3 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki kabazitaksel 48 saat süresince uygulandı ve elde edilen hücre canlılık oranları GraphPad Prism 9.4.0 programında analiz edildi. PC3 hücrelerinde kabazitaksel için IC_{50} değeri 2,5 nM olarak tespit edildi.

4.4. Kombinasyon Tedavisinin Farklı Prostat Kanseri Hücrelerindeki Etkisi

Kastrasyona dirençli prostat kanseri tedavisinde klinikte kullanılan kabazitakselin etkinliğini artırmak veya hücreleri duyarlı hale getirerek daha düşük konsantrasyonda kemoterapi uygulama imkanı sağlayabilmek için hücrelere ön tedavi yapıldı. Bu amaçla etki mekanizmaları farklı farmakolojik ajanlardan kabazitaksel, salinomisin ve iWnt hücrelere ayrı ayrı veya birlikte uygulandı. Hücrelere önce IC_{50} değerleri olan 0,5 μ M salinomisin (Sal) ile 6,25 μ M iWnt (iWnt) ayrı ayrı veya birlikte olacak şekilde 48 saat uygulandı. Daha sonra bu gruplardan kemoterapi uygulanmayacak olanların medyumları taze medyum ile değiştirilirken, kemoterapi uygulanacak olanların medyumları ise 2,5 nM kabazitaksel (Cab) içeren medyum ile değiştirilerek uygulama 48 saat daha devam ettirildi. Ön tedavi ve kemoterapi sonrasında hücre canlılık analizi gerçekleştirildi. Belirtilen tedavi uygulamasının etkinliği PC3 (Şekil 4.7.A), LNCaP (Şekil 4.7.B) ve DU145 (Şekil 4.7.C) kanser hücrelerinde yapılan MTT testi ile belirlendi. Her bir grup için bu uygulamalarda

sekizer adet kuyucuk kullanıldı ve deneyler farklı zamanlarda en az üçer defa tekrar edildi.

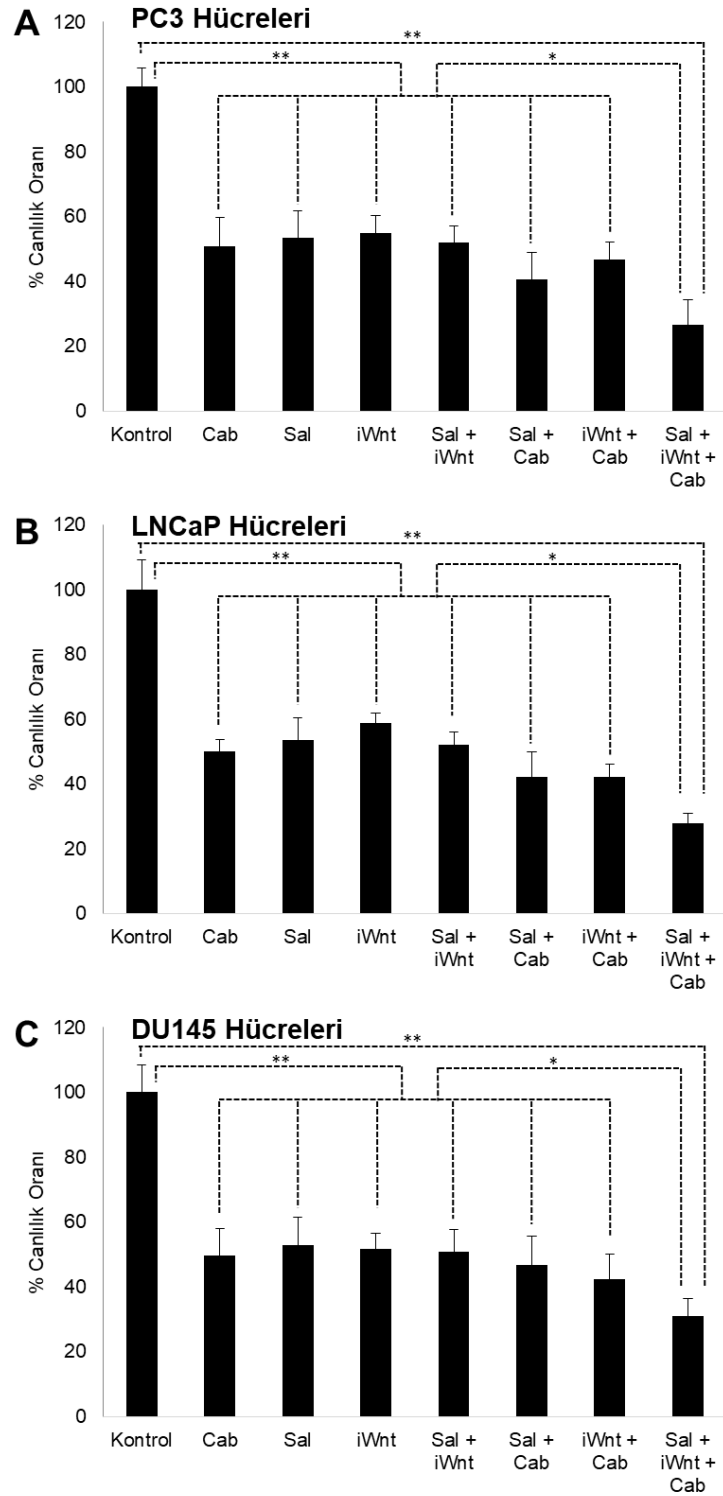
Elde edilen verilere göre PC3 hücrelerinde 48 saatlik tek Cab tedavisi, kontrol grubuna oranla canlı hücre sayısını % 49 oranında azalttı. Kırk sekiz saat yalnızca Sal uygulaması hücrelerde % 46 oranında sağ kalımı düşürdü. Aynı hücre çeşidine 48 saat süresince yapılan tek iWnt tedavisi, canlı hücre sayısını % 45 oranında azaltırken, Sal + iWnt uygulaması hücre sağ kalımını % 48 oranında azalttı. Salinomisin uygulamasını takiben 48 saat yapılan Cab tedavisi, canlı hücre sayısını % 59 oranında azalttı. Benzer şekilde 48 saat iWnt uygulamasının ardından yapılan 48 saatlik Cab tedavisi hücre sağ kalımını % 53 oranında düşürdü. Bununla birlikte PC3 hücrelerine 48 saat Sal + iWnt uygulanmasının ardından yapılan 48 saat Cab tedavisi canlı hücre sayısını % 75 oranında azalttı (Şekil 4.7.A).

Kırk sekiz saat ayrı ayrı yapılan Cab, Sal ve iWnt tedavileri LNCaP hücre sağ kalımlarını kontrol grubuna göre sırasıyla % 50, % 47 ve % 41 oranında azalttı. Aynı sürede yapılan Sal + iWnt kombine uygulamasında bu oran % 48 idi. LNCaP hücrelerine 48 saat Sal uygulamasının ardından yapılan 48 saat Cab tedavisinde, canlı hücre sayısı % 58 oranında azaldı. Hücrelerde 48 saat iWnt uygulamasının ardından aynı sürede yapılan Cab tedavisi canlı hücre oranını % 58 düşürdü. PC3 hücrelerine benzer olarak en güçlü sitotoksik etkinin elde edildiği tedavi stratejisinde ise 48 saat yapılan Sal + iWnt uygulamasının ardından 48 saat Cab tedavisi canlı hücre sayısını % 72 oranında azalttı (Şekil 4.7.B).

Kastrasyona dirençli PC3 ve kastrasyona duyarlı LNCaP hücrelerine yapılan uygulamaların etkinliği bir diğer kastrasyona dirençli prostat kanseri hücresi olan DU145 hücrelerine de uygulandı. Buna göre, 48 saat süresince yalnızca Cab, Sal ve iWnt tedavileri hücre sağ kalımını kontrol gruplarına göre sırasıyla % 50, % 47 ve % 48 oranlarında azalttı. DU145 hücrelerinin 48 saat boyunca Sal + iWnt kombinasyonuna maruz bırakılması sonucu hücre sağ kalımları % 49 düzeyinde düştü. Hücrelere 48 saat Sal uygulamasından sonra 48 saat Cab tedavisi ise canlı hücre sayısını % 53 oranında azalttı. Buna mukabil, benzer şekilde iWnt uygulamasından sonra yapılan Cab tedavisi ölüm oranını % 58 düzeyine çıkardı. En yüksek sitotoksik etkinliğin elde edildiği tedavi

şekli olan Sal + iWnt uygulamasını takiben yapılan Cab tedavisinde hücre ölüm oranı % 69 seviyesine çıktı (Şekil 4.7.C).

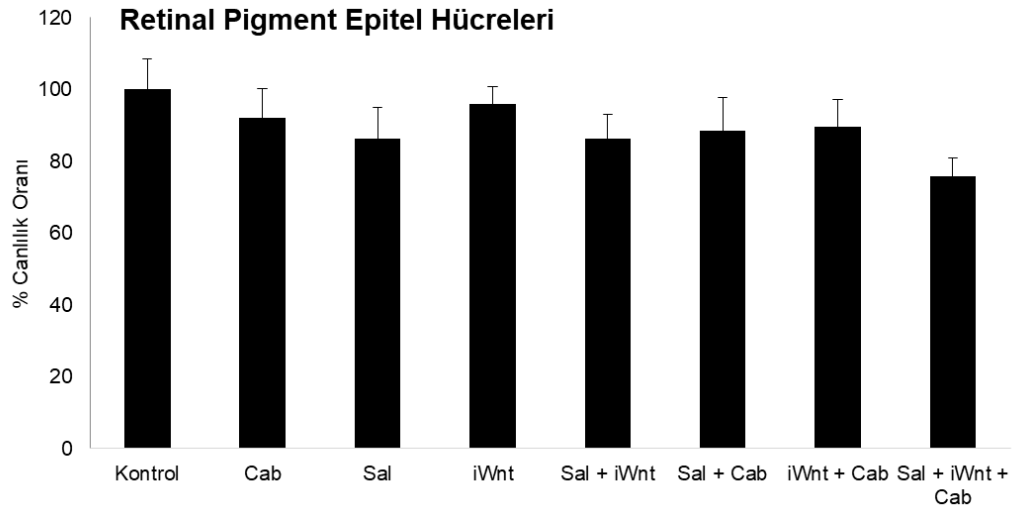




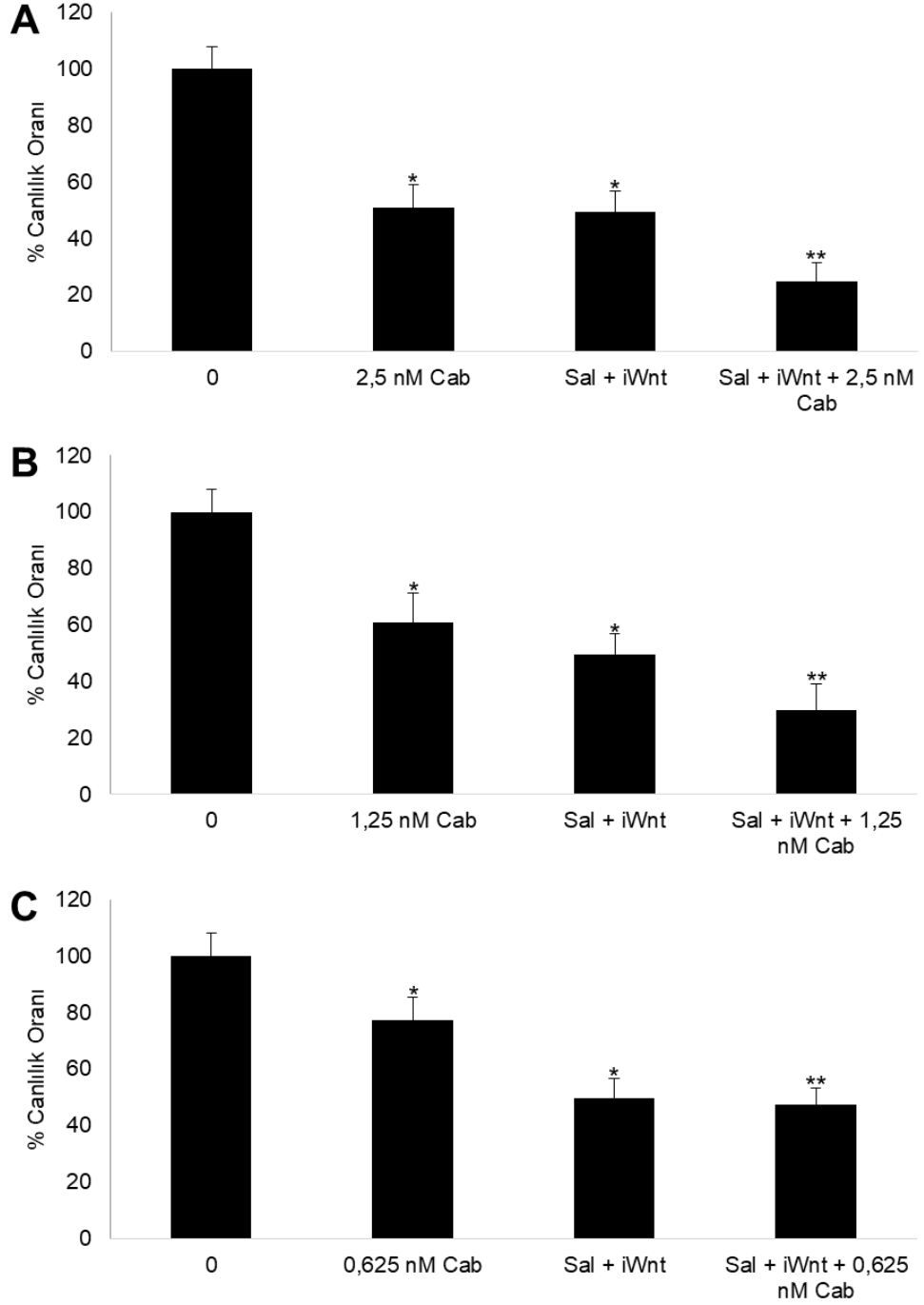
Şekil 4.7. Tedavi bileşenleri farklı tip prostat kanser hücrelerinde sitotoksik etki oluşturur. PC3 (A), LNCaP (B), DU145 (C) hücrelerinin canlılık oranları MTT testi ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre. Cab: Kabazitaksel, Sal: Salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü.

Tedavi stratejilerinin normal hücelere yapabileceği olası sitotoksik etkinin belirlenmesi amacı ile primer hücre kültürü yöntemi ile sıgır gözünden elde edilen retinal pigment epitel hücreleri (RPE) kullanıldı. RPE hücrelerine 48 saat süresince tek uygulanan Cab, kontrol grubuna oranla canlı hücre sayısını % 8 azaltırken, 48 saat süresince tek uygulanan Sal % 14 azalttı. iWnt uygulaması canlı hücre sayısını % 4 oranında azaltırken, 48 saatlik Sal + iWnt uygulaması % 14 oranında düşürdü. Sal ön tedavisinin ardından 48 saat yapılan Cab tedavisi, canlı hücre sayısını % 11 oranında azaltırken, iWnt ön tedavisinin ardından 48 saatlik Cab tedavisi % 10 oranında düşürdü. Buna karşın Sal + iWnt ön uygulamasını takiben gerçekleştirilen 48 saat Cab tedavisi ise canlı hücre sayısını % 24 oranında azalttı. Elde edilen verilere göre hem ayrı uygulamalar hem kombine tedaviler RPE hücre sağkalımında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bir sitotoksik etki oluşturmadi ($p>0.05$) (Şekil 4.8).

PC3 hücrelerine tedavi öncesinde yapılan Sal + iWnt uygulamasının kabazitakselin IC_{50} değerin 2,5 nM'dan 0,625 nM düzeyine düşmesini sağladığı MTT testi ile gösterildi (Şekil 4.9).



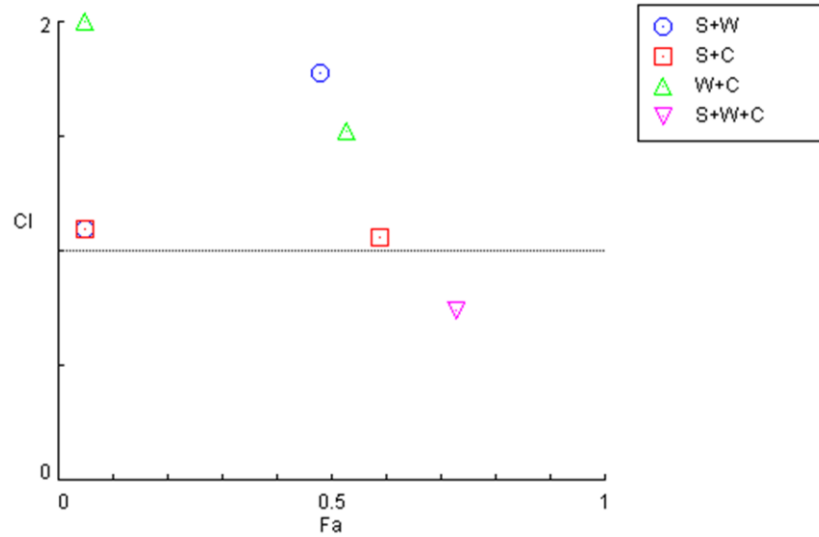
Şekil 4.8. Tedavi bileşenleri sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki oluşturmaz. Tedavi modaliteleri RPE hücrelerine uygulandı, hücre sağkalımları MTT testi ile belirlendi. * $p<0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p<0,05$ tüm gruplara göre. Cab: Kabazitaksel, Sal: Salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü.



Şekil 4.9. Ön tedavi uygulamaları kemoterapi etkinliğini artırır. Kabazitakselin 2,5 nM (A), 1,25 nM (B) ve 0,625 nM konsantrasyonları ile 0,5 μ M Sal + 6,25 μ M iWnt'nin kombinasyonunun PC3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. Tek Cab uygulamasında IC₅₀ 2,5 nM, Sal + iWnt ön tedavisi 0,625 nM'e düşürdü. *p<0,05 kontrol grubuna göre, **p<0,05 tüm gruplara göre.

4.5. Kombinasyon Tedavide Sinerjik Etki

Prostat kanseri hücrelerine yapılan kombinasyon tedavilerinden elde edilen sonuçların etki şekli, Ting-Chao Chou tarafından tanımlanan Chou-Talalay yöntemini temel alan CompuSyn yazılımı kullanılarak belirlendi. Kırk sekiz saat salinomisin + iWnt uygulamasında doz redüksiyon indeksi (DRI) değerleri sırasıyla 1,119 ve 1,129; kombinasyon indeksi (CI) ise 1,778 olarak belirlendi. 48 saat Sal ön uygulamasını takiben yapılan 48 saat Cab tedavisinde DRI değerleri sırasıyla 2,084 ve 1,723; CI değeri 1,059 olarak tespit edildi. iWnt ön tedavisinin ardından yapılan Cab tedavi grubunda DRI değerleri sırasıyla 1,383 ve 1,240 olarak gözlenirken CI değeri 1,528 olarak hesaplandı. Uygulanan Sal + iWnt ön tedavisi bitiminde yapılan Cab tedavisinde DRI değerlerinin sırasıyla 5,045, 3,348 ve 4,029 olduğu belirlendi ve CI değerinin 0,745 olduğu tespit edildi. Elde edilen CI (Şekil 4.10) ve DRI (Şekil 4.11) değerlerine göre Sal + iWnt ön uygulamasının ardından yapılan Cab tedavisi sinerjik bir etki oluşturmaktadır. Bu sebeple, prostat kanseri hücre tedavisi amaçlı çalışmalar bu modaliletede devam ettirildi.



Şekil 4.10. Salinomisin, iWnt ve kabazitaksel kombinasyonu sinerjik etki oluşturur. MTT testinden elde edilen veriler CompuSyn yazılımında analiz edilerek CI değerleri saptandı. Ön tedavi ile desteklenmiş kemoterapiye ait CI değerinin 1’den küçük olması sinerjiyi işaret eder. S: Sal, W: iWnt, C: Cab.

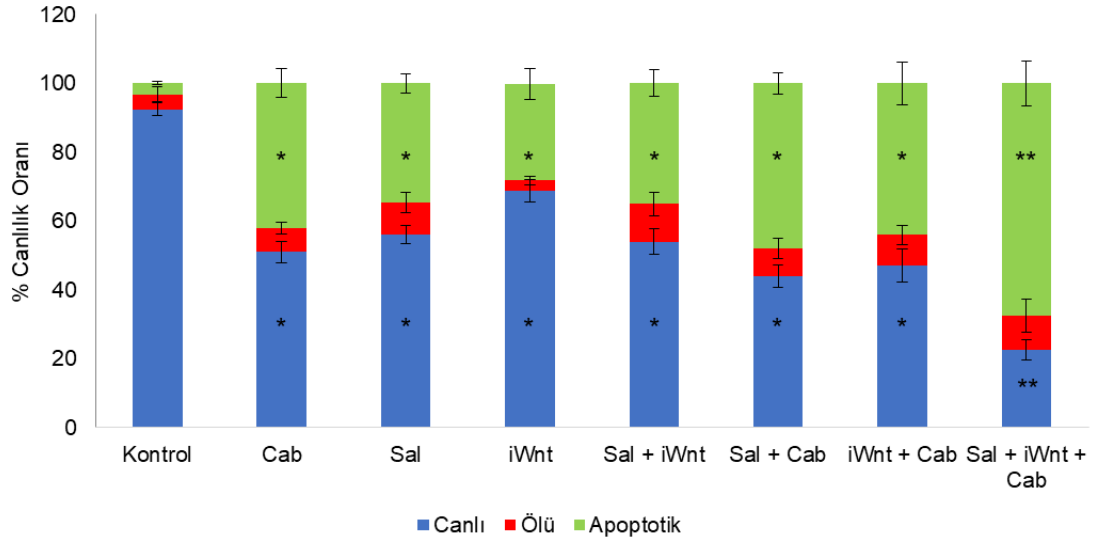
Kombinasyon Uygulama	Kombinasyon İndeksi			
	Sal + iWnt	Sal + Cab	iWnt + Cab	Sal + iWnt + Cab
CI	1,77875	1,05999	1,52895	0,74592

Doz Redüksiyon İndeksi					
Kombinasyon Uygulama	Sal + iWnt		Sal + Cab		
	Sal	iWnt	Sal	Cab	
Bileşenler					
DRI	1,11910	1,12972	2,08492	1,72308	
Kombinasyon Uygulama	iWnt + Cab		Sal + iWnt + Cab		
	iWnt	Cab	Sal	iWnt	Cab
Bileşenler					
DRI	1,38316	1,24074	5,04548	3,34861	4,02915

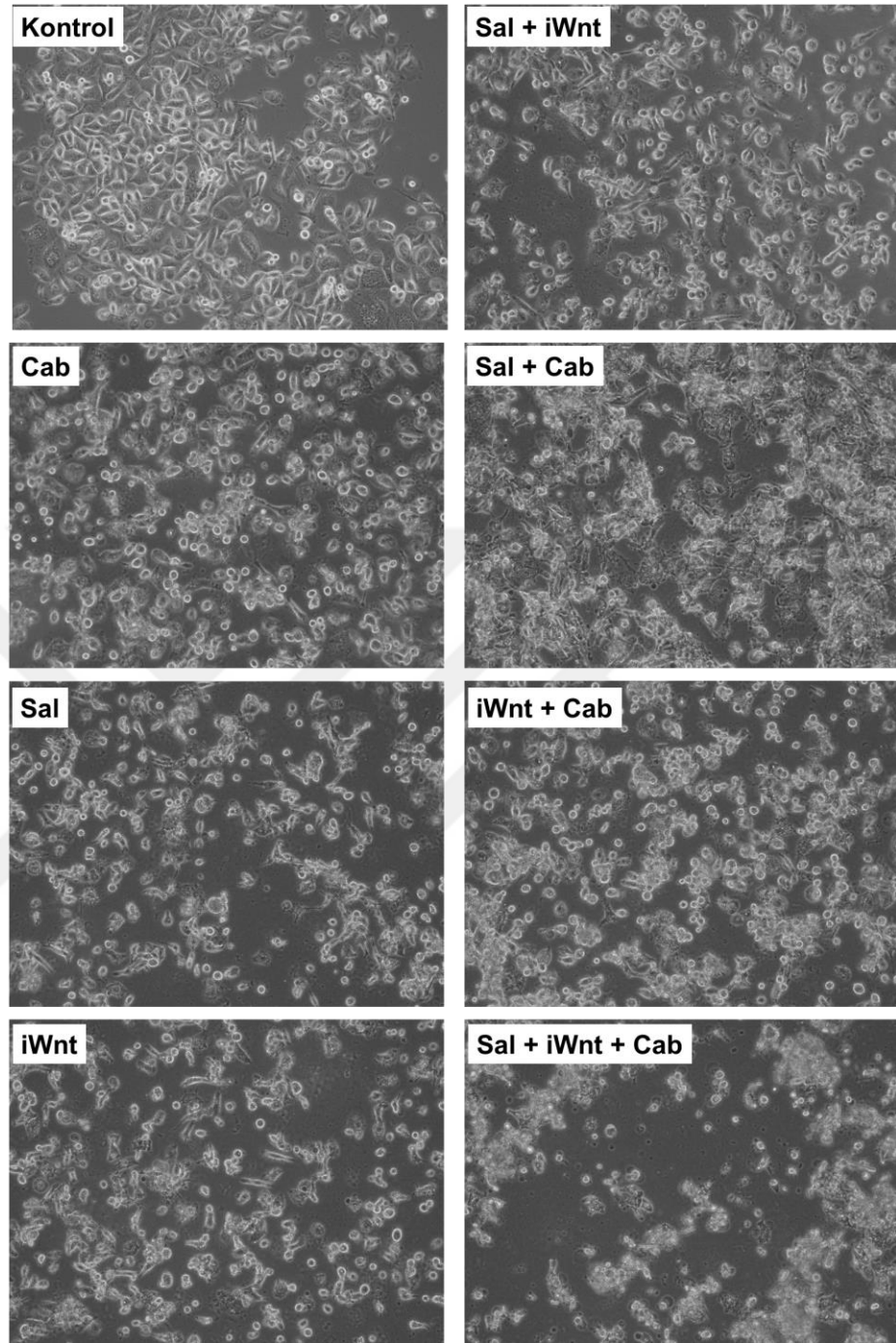
Şekil 4.11. Salinomisin, iWnt ve kabazitaksel kombinasyonu uyumu. MTT test verilerinden CompuSyn yazılımında CI ve DRI değerleri saptandı. DRI > 1 durumu, kombinasyonlar içindeki en uygun terapi seçeneğini gösterir. CI < 1 sinerjizmi, CI > 1 antagonizmi, CI = 1 eklemeli (aditif) etkiyi işaret eder. S: Sal, W: iWnt, C: Cab.

4.6. Tedavi Bileşenlerinin PC3 Hücrelerindeki Apoptotik Etkisi

Yapılan tedavi modalitelerinin kanser hücrelerinin apoptoz ile ortadan kaldırılmasındaki rolü görüntüleme temelli sitometre kullanılarak belirlendi. Apoptotik hücre oranı 48 saat Cab uygulanmasında % 42, Sal uygulanmasında % 35, iWnt uygulanmasında % 28 olduğu tespit edildi. Kırk sekiz saat süresince uygulanan Sal + iWnt kombinasyonunda apoptotik hücre oranı % 35, Sal ön uygulamasının ardından yapılan Cab tedavisinde % 48, iWnt ön uygulamasını takiben yapılan Cab tedavisinde % 44 olarak saptandı. Bununla birlikte Sal + iWnt ön tedavisinin ardından yapılan Cab tedavisinde ise bu oranın % 67 düzeyine çıktığı tespit edildi. Canlı hücre oranlarının da apoptotik hücre oranlarıyla zıt durumda değişiklik gösterdiği görüldü. Ölü hücre oranı kontrol grubunda % 4 ve diğer uygulama gruplarında sırasıyla % 7, % 9, % 13, % 11, % 8, % 9 ve % 10 olarak belirlendi. Ancak ölü hücre oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.12). Ön tedavi bileşenlerinin, kemoterapi uygulamasının ve ön tedavi ile güçlendirilmiş kemoterapinin PC3 hücrelerinin morfolojileri üzerinde oluşturduğu etkiler, 10X oranında büyütme yapılarak ışık mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. Ön tedavi ile desteklenmiş kemoterapi, PC3 hücrelerindeki apoptoz oranını artırır. Görüntüleme temelli sitometrik yöntem kullanılarak PC3 hücrelerinin 48 saat tekli veya bunu takiben yapılan 48 saat Cab tedavilerindeki canlı, ölü ve apoptotik hücre oranları tespit edildi. Tedavilerde 0,5 μ M Sal, 6,25 μ M iWnt, 2,5 nM Cab veya bunların farklı kombinasyonları kullanıldı. Cab: kabazitaksel, Sal: salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü. * $p<0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p<0,05$ tüm gruplara göre.



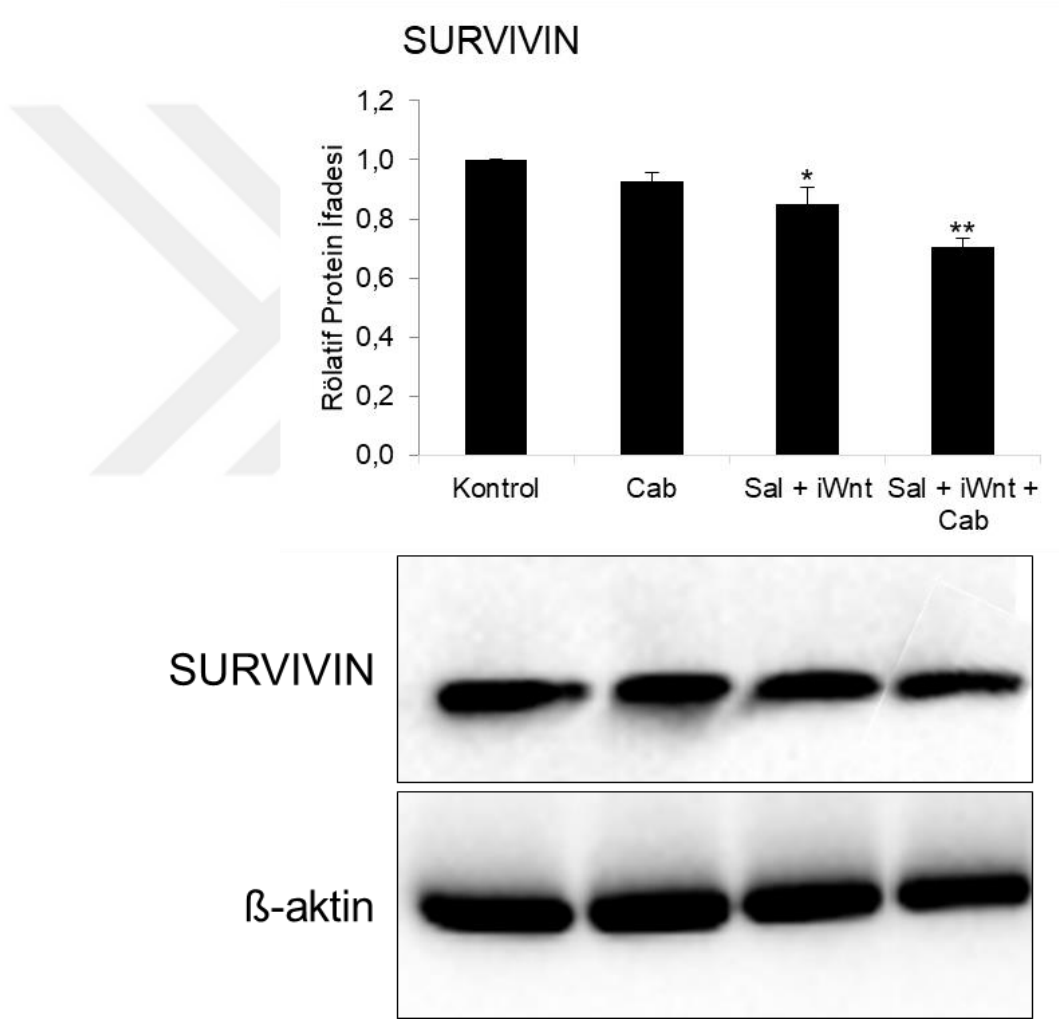
Şekil 4.13. Tedavi bileşenlerinin uygulandığı hücrelerin morfolojik değişimleri. PC3 hücrelerinin 48 saat 0,5 μ M salinomisin ve 6,25 μ M iWnt ön tedavisini takiben 48 saat 2,5 nM kabazitaksel uygulaması sonunda ışık mikroskobu altında görüntülendi (10x). Cab: kabazitaksel, Sal: salinomisin, iWnt: Wnt inhibitörü.

Hücre sağkalımında rol oynayan *SURVIVIN* ve *LIVIN* genlerinin ifade oranları çeşitli düzeylerde analiz edildi. Cab terapisi Survivin protein ifadesini kontrol grubuna

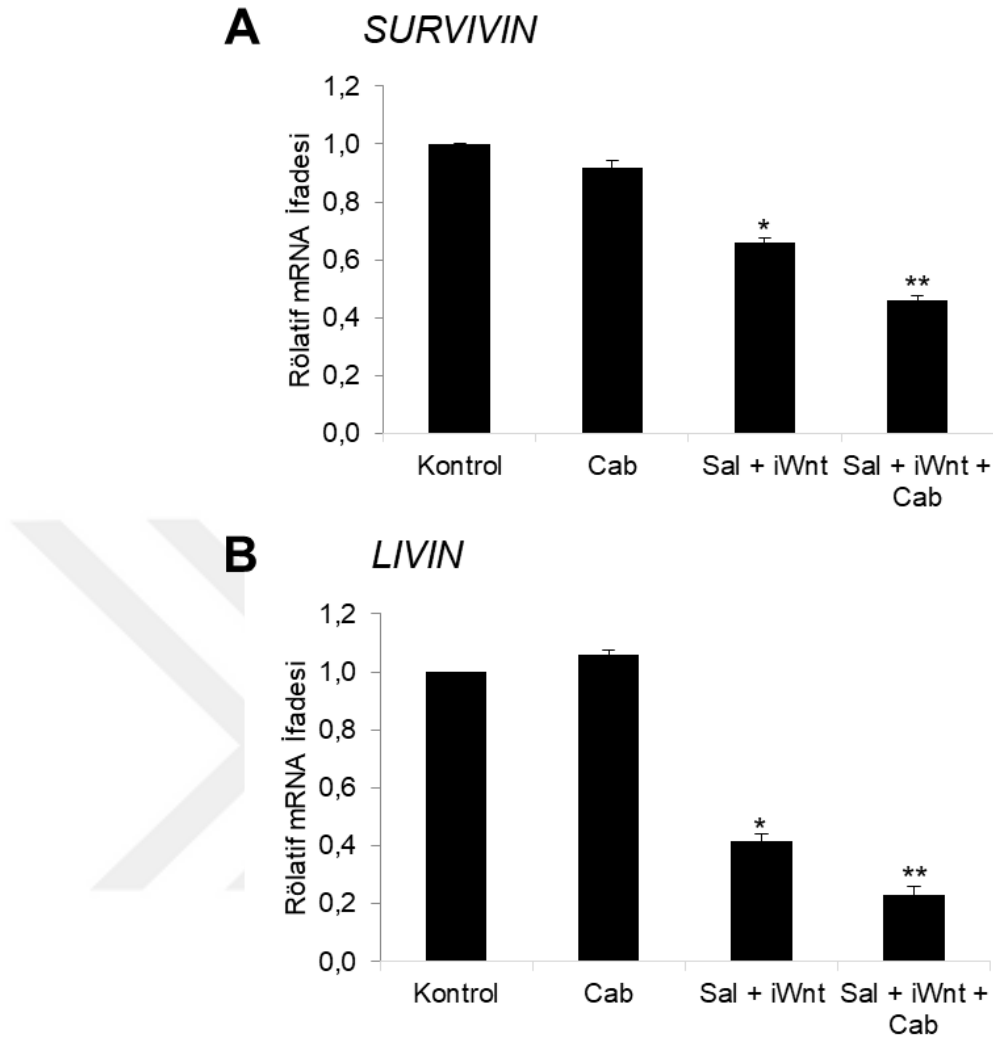
göre % 90, Sal + iWnt uygulaması % 90, Sal + iWnt + Cab tedavisi ise % 70 seviyesine düşürdü (Şekil 4.14).

Cab tedavisi *SURVIVIN* mRNA ifadesini kontrol grubuna göre % 90, Sal + iWnt % 70, Sal + iWnt + Cab kombine terapisi ise % 50 seviyesine düşürdü (Şekil 4.15.A).

LIVIN geninin mRNA düzeyindeki ifade oranını kontrol grubuna göre Cab tedavisi % 110, Sal + iWnt % 40, Sal + iWnt + Cab uygulaması ise % 20 seviyesine indirdi (Şekil 4.15.B).



Şekil 4.14. Ön tedavi, PC3 hücrelerindeki Survivin proteini sentezini düzenler. SURVIVIN proteini (16 kDa) sentezindeki değişimler Western blot yöntemi ile analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.15. Ön tedavi, PC3 hücrelerindeki Survivin ve Livin sentezini etkiler. *SURVIVIN* (A) ve *LIVIN* (B) mRNA düzeyindeki değişimler RT-qPCR yöntemiyle analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

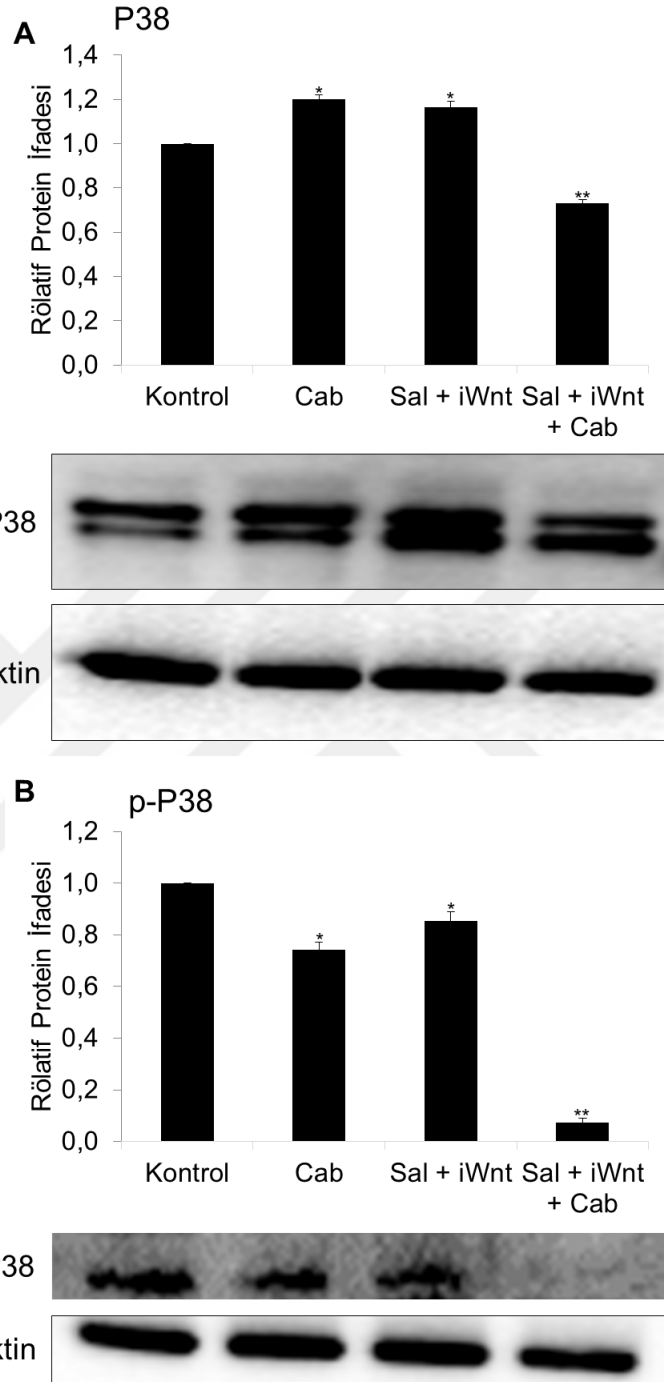
4.7. Tedavi Bileşenlerinin Hücre İçi Proliferasyon Yolaklarına Etkisi

Yapılan tedavi modaliteleri içinde sitotoksik ve apoptotik etkinliği en yüksek uygulamanın hücre içi sinyal yolaklarını düzenleyici rolü analiz edildi. Bunun için PC3 hücreleri, 48 saat 0,5 μ M Sal + 6,25 μ M iWnt ile ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra 48 saat 2,5 nM Cab ile tedavi edildi. İnkübasyon sonunda hücre proliferasyonundan sorumlu başlıca hücre içi sinyal yolaklarında görevli bazı proteinlerin ekspresyon değişimleri analiz edildi.

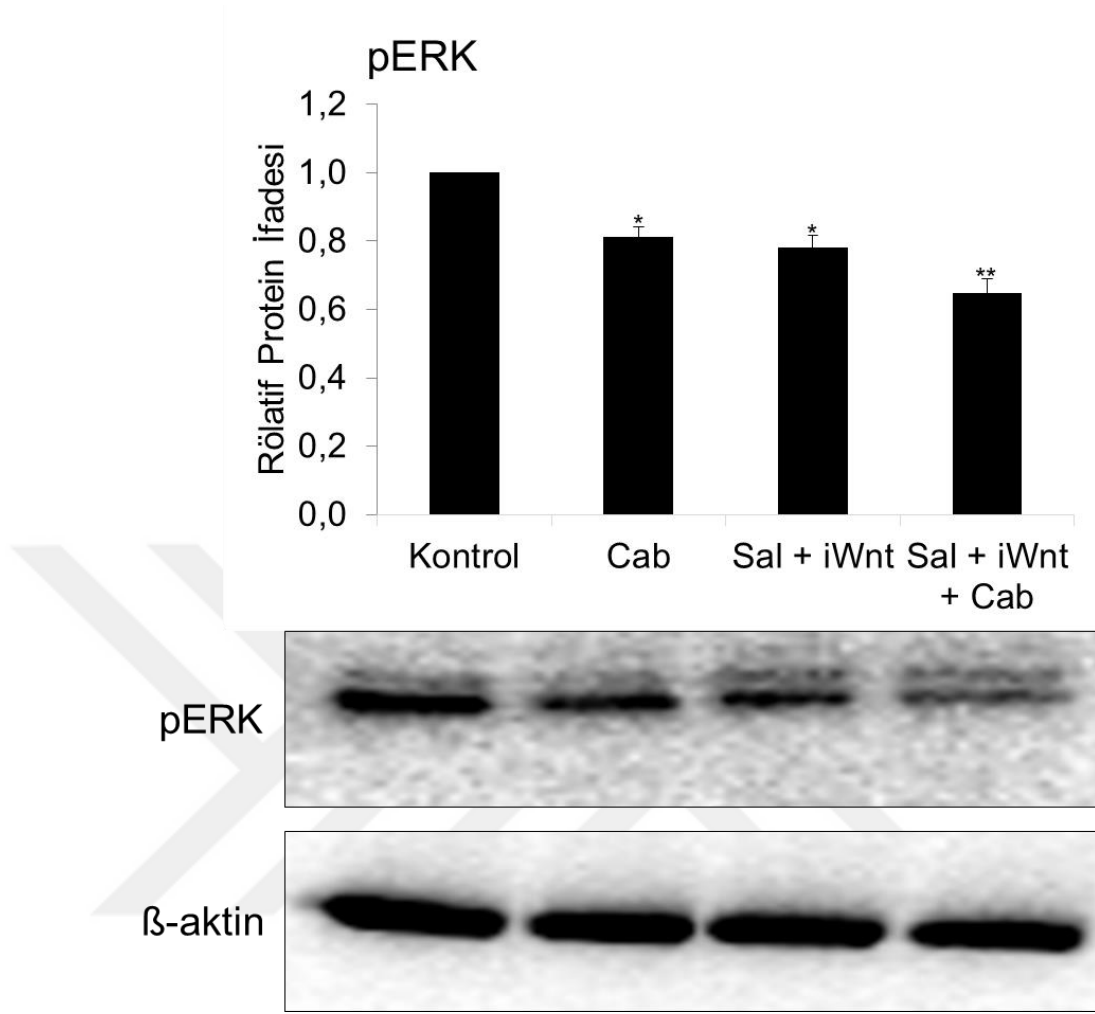
Kabazitaksel tedavisi P38 protein düzeyini kontrol grubuna göre % 120 seviyesine çıkardı. Salinomisin ile iWnt kombinasyonu da kabazitaksele benzer bir etki oluşturdu. Bununla birlikte salinomisin ve iWnt ile yapılan 48 saat ön tedavi ve sonrasındaki 48 saat kabazitaksel tedavisi P38 protein seviyesini kontrol grubuna göre % 70 seviyesine kadar düşürdü (Şekil 4.16.A).

Fosfo-P38 (p-P38) proteininin ifade oranını 48 saat kabazitaksel tedavisi, kontrol grubuna göre % 70, 48 saatlik salinomisin ve iWnt kombinasyonu % 90, salinomisin ve iWnt ön tedavisinin sonrasında uygulanan 48 saatlik kabazitaksel ise % 7 seviyesine düşürdü (Şekil 4.16.B).

Fosfo ERK (pERK) protein düzeyini kabazitaksel tedavisi, kontrol grubuna göre % 80 düzeyine düşürürken salinomisin ile iWnt kombinasyon uygulaması da benzer bir sonuç ortaya çıkardı. Salinomisin ve iWnt ön tedavisi ardından yapılan kabazitaksel tedavisi ise % 60 seviyesine kadar azalttı (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Ön tedaviyle etkinliği artırılmış kemoterapi P38 ve p-P38 proteinlerini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta P38 (38 kDa) (A) ve p-P38 (38 kDa) (B) protein seviyeleri kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.17. Ön tedavi pERK protein sentezini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta pERK (42 kDa) proteininin seviyesi kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

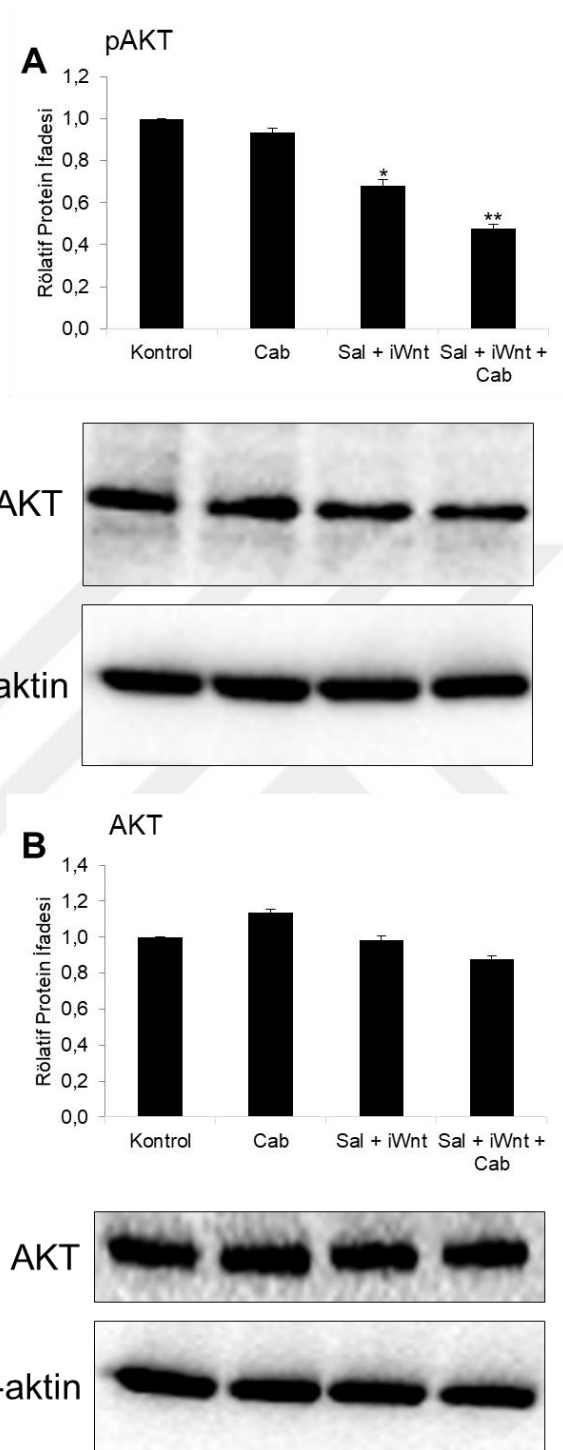
Kemoterapi amacıyla yapılan 48 saat kabazitaksel uygulaması, pAKT proteininin ifade oranını kontrol grubuna göre % 10 düşürdü. Salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü kombinasyon uygulaması, pAKT protein ifadesini kontrol grubuna göre % 30 azaltırken 48 saatlik salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü ön tedavisi ile desteklenen 48 saatlik kabazitaksel kemoterapisi ise % 50 oranında azalttı (Şekil 4.18.A).

Kabazitaksel tedavisi AKT protein sentezini kontrol grubuna göre % 10 artırırken, salinomisin ve iWnt kombinasyonu değıştirmedii. Salinomisin ve iWnt ön

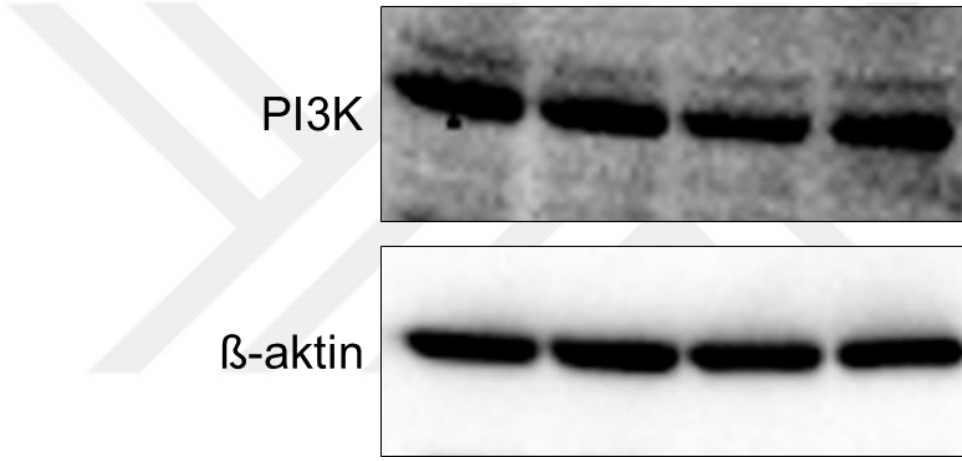
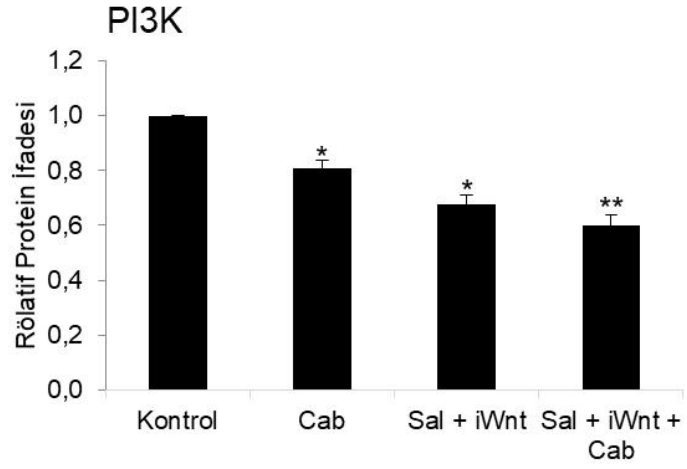
tedavisi sonrasında uygulanan 48 saatlik kabazitaksel kemoterapisi ise AKT proteininin sentez oranını % 10 düzeyinde azalttı (Şekil 4.18.B).

Hücrelerin kabazitaksel ile yapılan 48 saat tekli tedavi PI3K protein ifade oranını kontrol grubuna göre % 20, aynı süreli salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulaması % 30, salinomisin ve iWnt ön tedavisinin devamında yapılan 48 saat kabazitaksel tedavisi ise % 40 oranında azalttı (Şekil 4.19).





Şekil 4.18. Tedavi modalitelerinin pAKT ve AKT protein ifade düzeylerine etkisi. Ön tedavi ve kemoterapi kombinasyonu pAKT (55,7 kDa) (A) protein seviyesini azalırken, AKT'yi (55,7 kDa) (B) değıştirmedii. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

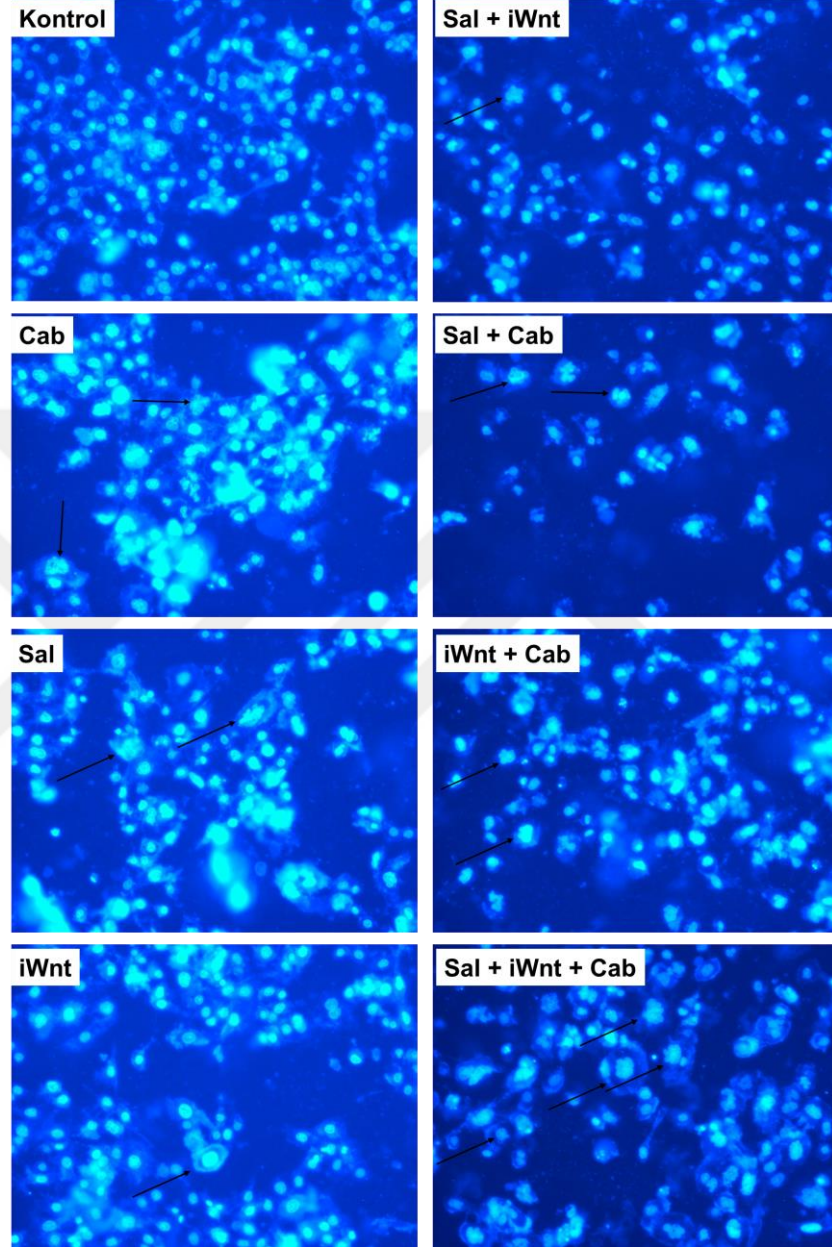


Şekil 4.19. Tedavi uygulamalarının PI3K protein ifadesine etkisi. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta PI3K (57,4 kDa) protein seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalır. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

4.8. Nükleer Boyama ile Hücre Ölümü Analizi

Yapılan tedavilerin hücre ölümüne etkisi Hoechst 33342 boyası kullanılarak değerlendirildi. PC3 hücrelerinin ayrı ayrı 48 saat süresince 2,5 nM Cab, 0,5 μ M Sal, 6,25 μ M iWnt, Sal + iWnt kombinasyon uygulaması yapıldı. Ayrıca, 48 saat Sal ön tedavisi ardından 48 saat Cab tedavisi; iWnt ön tedavisi ardından yapılan Cab tedavisi ve Sal + iWnt ön tedavisini takiben yapılan Cab tedavisi sonunda gerçekleşen olası apoptotik hücre ölümleri Hoechst 33342 boyası ile mikroskop altında belirlendi. kırk sekiz saat süresince uygulanan Sal + iWnt ön tedavisini takiben yapılan 48 saat Cab

tedavisindeki apoptotik cisimciklerin, diğer gruplara göre sayıca daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Hoechst ile apoptotik hücrelerin tespiti. 48 saat 0,5 μ M salinomisin ile 6,25 μ M iWnt ön tedavisinin ardından yapılan 48 saat 2,5 nM kabazitaksel tedavisi sonrasında hücreler PBS ile yıkanıp Hoechst DNA boyaması yapıldı ve flouresans mikroskopta görüntülendi (20x).

4.9. Apoptoz ile İlişkili Proteinlerin Analizi

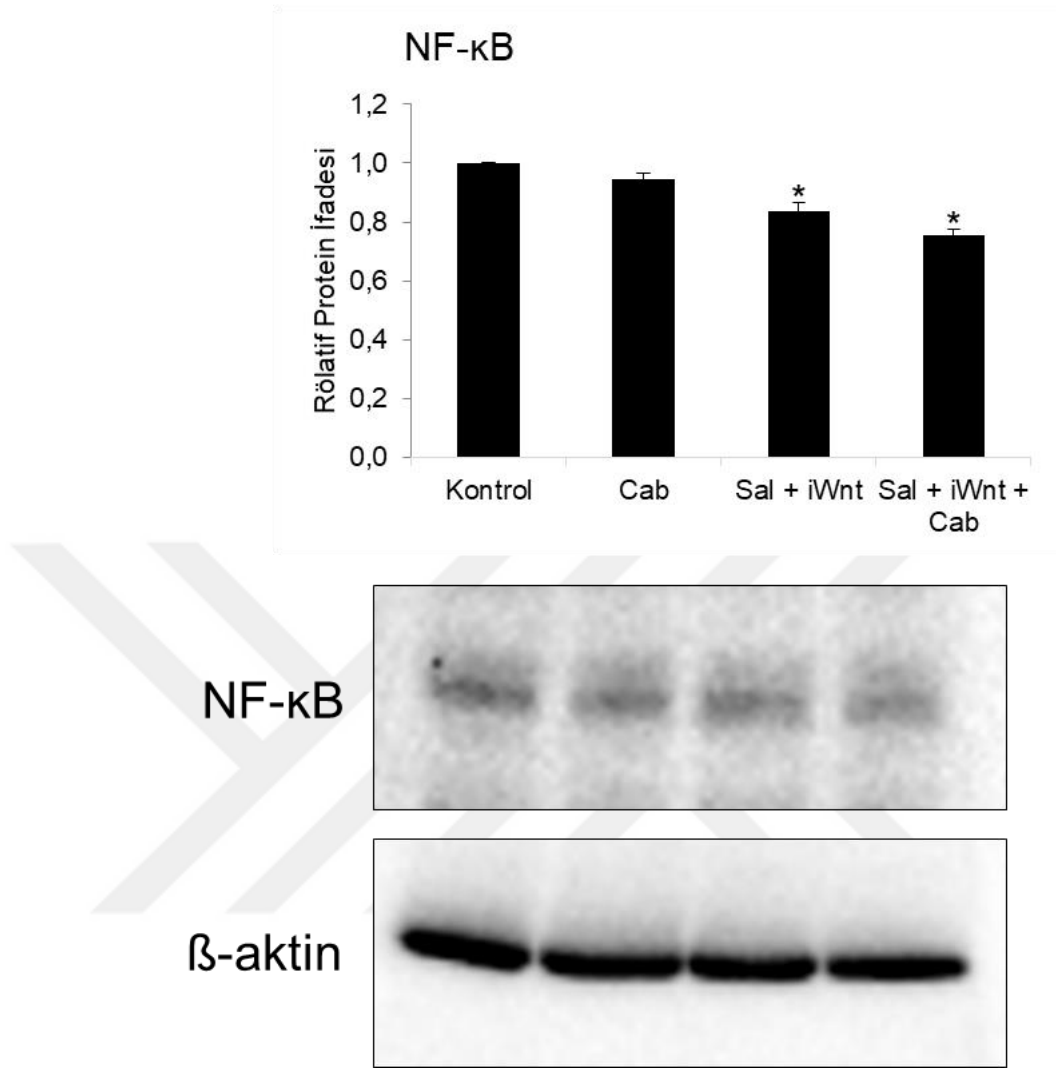
NF- κ B, Bcl2 ve BAX protein ifadelerine 48 saat 2,5 nM kabazitaksel (Cab) tedavisi, 48 saat 0,5 μ M salinomisin (Sal) ile 6,25 μ M Wnt yolağı inhibitörü (iWnt) uygulaması ve 48 saat Sal + iWnt ön tedavisinin ardından yapılan 48 saat Cab tedavisi gruplarının etkisi analiz edildi.

Kabazitaksel ile yapılan 48 saat tedavi, NF- κ B protein ifade oranını kontrol grubuna göre % 95, 48 saat salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulaması % 83, 48 saatlik salinomisin ve iWnt ön tedavisinin ardından yapılan 48 saatlik kabazitaksel tedavisi ise % 75 seviyesine düşürdü (Şekil 4.21).

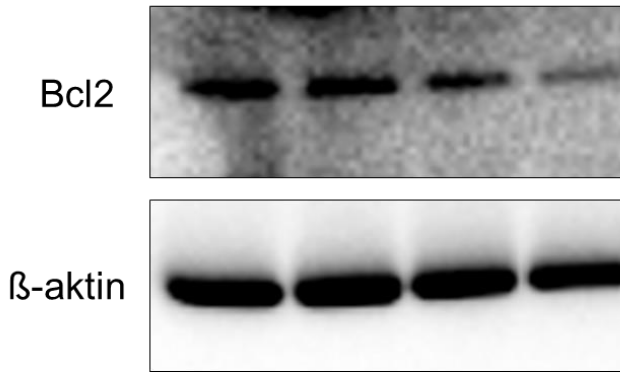
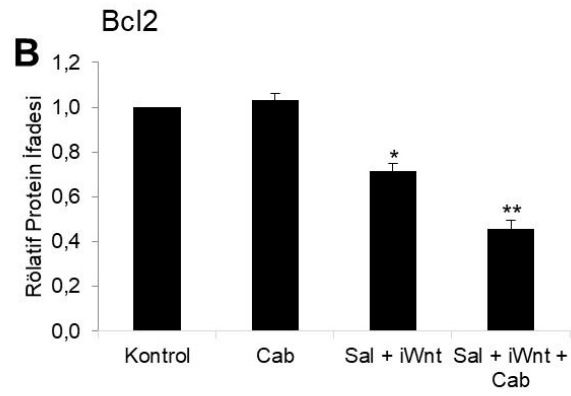
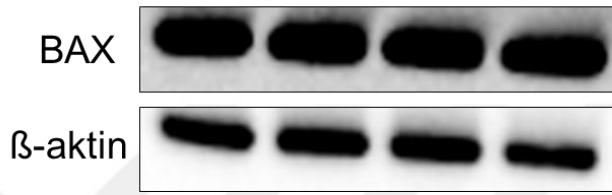
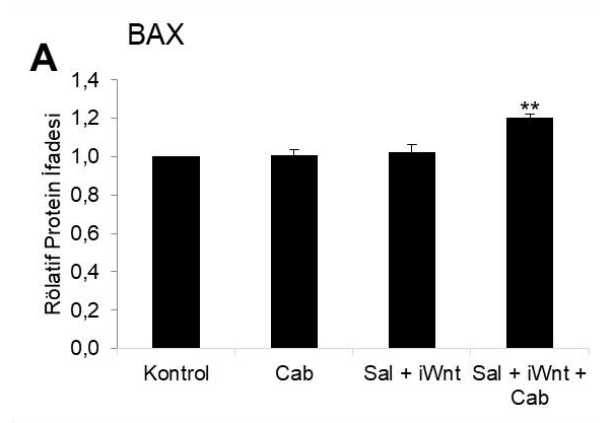
BAX protein ifadelenmesi, kontrol grubuna göre hem kabazitaksel hem de salinomisin ve iWnt kombinasyonundan etkilenmez iken salinomisin ve iWnt ön tedavisi ile desteklenen 48 saatlik kabazitaksel kemoterapisinde % 20 oranında arttı (Şekil 4.22.A).

Hücrelerin yalnızca kabazitaksel ile yapılan tedavilerinde Bcl2 protein ifade oranı değişmezken salinomisin ve iWnt kombinasyonu % 30, salinomisin ve iWnt ön tedavisini takiben yapılan 48 saat kabazitaksel kemoterapisi ise % 50 oranında azalttı (Şekil 4.22.B).

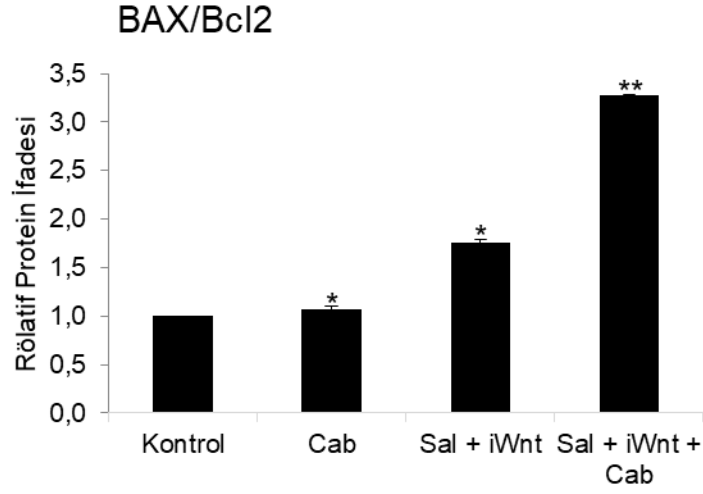
BAX ve Bcl2 proteinlerinin üretim miktarlarındaki değişim oranları kullanılarak oluşturulan BAX/Bcl2 değerleri tek kabazitaksel kemoterapisi, yalnızca sal + iWnt ön tedavisi, ön tedavi ile pekiştirilen kabazitaksel kemoterapisi deney grupları için sırasıyla; % 10, % 80 ve % 230 olarak tespit edildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.21. Ön tedavi NF-κB proteininin ifadesini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta NF-κB (50 kDa) proteininin seviyesi kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.22. Ön tedavi BAX ve Bcl2 proteinlerinin ifadesini düzenler. Ön tedavi ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı grupta BAX (23 kDa) (A) protein seviyesi artarken, Bcl2 (25 kDa) (B) protein düzeyi tüm gruplara göre azaldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.23. Uygulama gruplarına göre BAX/Bcl2 oranı. BAX/Bcl2 oranını ön tedavi ile kemoterapi kombinasyonu, diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artırır. * $p<0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p<0,05$ tüm gruplara göre.

4.10. Apoptoz ile İlişkili Genlerin İfade Analizi

Yapılan tedavi modalitelerinin apoptoz süreçlerinde rol alan Kaspaz 8 (*CASP8*), Kaspaz 3 (*CASP3*), Apaf1 (*APAF1*), Sitokrom C (*CYT-C*), Bax (*BAX*) ve Bcl-XL (*BclXL*) gibi genlerin mRNA ifade düzeylerine etkisi RT-qPCR yöntemi ile değerlendirildi. PC3 hücrelerine yapılan 2,5 nM kabazitaksel (Cab) tedavisi, *CASP8* mRNA ifade düzeyini kontrol grubuna göre % 190, salinomisin ve iWnt kombinasyonu % 110, salinomisin ve iWnt ön tedavisini takiben yapılan kabazitaksel tedavisi ise % 240 seviyesine yükseltti (Şekil 4.24.A).

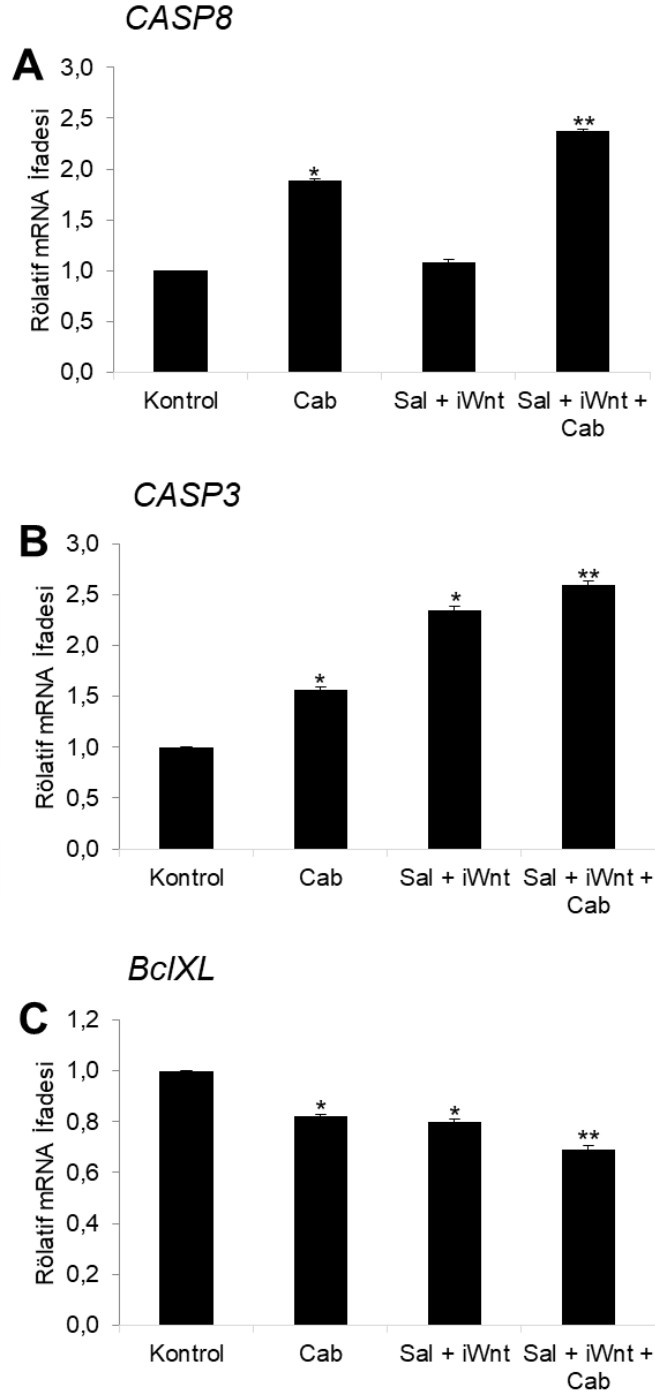
Kabazitaksel tedavisi, *CASP3* mRNA ifadesini kontrol grubuna göre % 160, salinomisin ve iWnt kombinasyonu % 230, 48 saat salinomisin ve iWnt ön uygulamasını takiben 48 saat yapılan kabazitaksel tedavisi ise % 260 seviyesine çıkardı (Şekil 4.24.B).

Antiapoptotik özellikte olan *BclXL* mRNA ifade oranını kontrol grubuna göre 48 saatlik kabazitaksel tedavisi % 80, 48 saatlik salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü kombinasyon uygulaması % 80, 48 saatlik salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü ön tedavisi ardından uygulanan kabazitaksel tedavisi ise % 70 seviyesine düşürdü (Şekil 4.24.C).

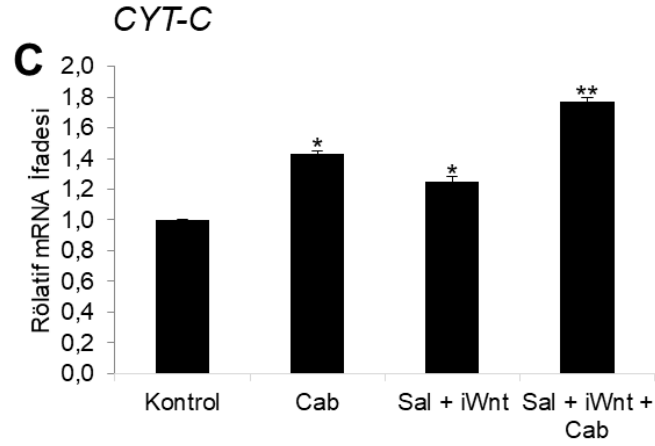
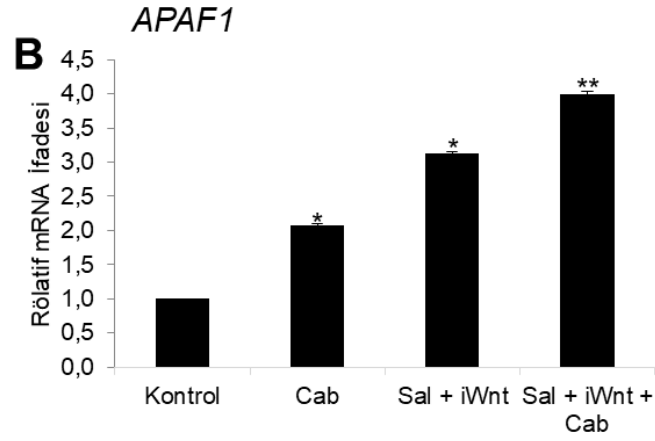
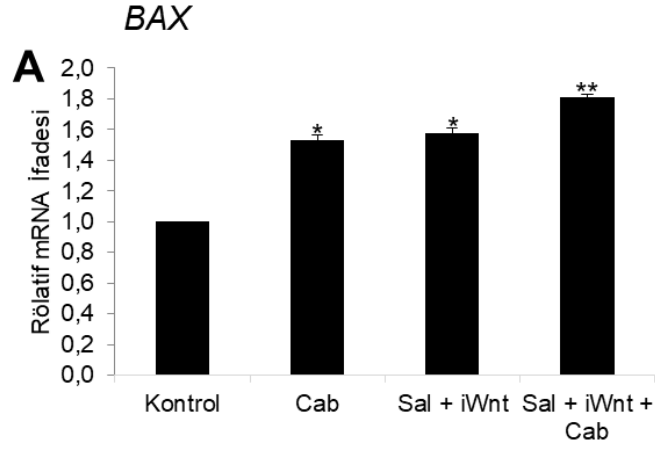
BAX mRNA ifade düzeyini kontrol grubuna göre kabazitaksel tedavisi % 150, salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulaması % 160, salinomisin ve iWnt ön tedavisi bitiminde gerçekleştirilen kabazitaksel tedavisi ise % 180 seviyesine çıkardı (Şekil 4.25.A).

APAF1 mRNA düzeyindeki ifade oranını kontrol grubuna göre 48 saat kabazitaksel tedavisi % 210, 48 saat salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü kombinasyon uygulaması % 310, 48 saat salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü ön tedavisini takiben gerçekleştirilen 48 saat kabazitaksel tedavisi ise % 400 seviyesine artırdı (Şekil 4.25.B).

CYT-C mRNA düzeyindeki ifade oranı kabazitaksel uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre % 140, salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü kombinasyonu uygulananlarda % 120, salinomisin ve iWnt ön tedavisinin ardından yapılan kabazitaksel tedavisi ise % 180 seviyesine yükseltti (Şekil 4.25.C).



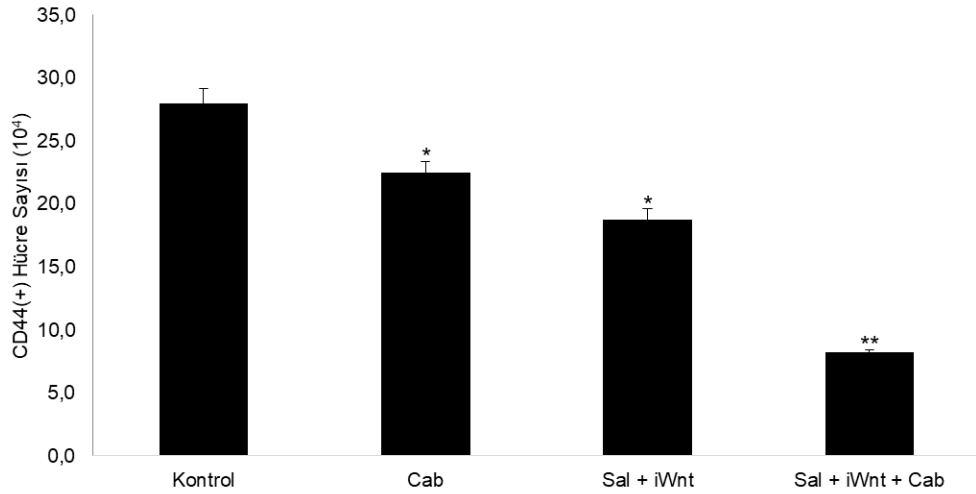
Şekil 4.24. Tedavilerin *CASP8* (A), *CASP3* (B) ve *Bcl-XL* (C) mRNA ifadesine etkisi. Antiapoptotik *Bcl-XL* mRNA seviyesinde kontrol grubuna göre azalma, apoptotik genlerde artış tespit edildi. Analizlerde RT-qPCR tekniği kullanıldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.25. Tedavi modalitesinin *BAX* (A), *APAF1* (B) ve *CYT-C* (C) mRNA seviyesine etkisi. İçsel apoptotik sinyal iletim yolağından sorumlu *BAX*, *APAF1* ve *CYT-C* mRNA sentezi kontrol grubuna göre arttı. Analizde RT-qPCR kullanıldı. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

4.11. Tedavi Modalitesinin Kök Hücre Sayısına Etkisi

Yapılan tedavilerin PC3 hücre popülasyondaki CD44⁺ kök hücre sayısına etkisi manyetik kolon ayırma tekniği ile belirlendi. Bu doğrultuda PC3 hücrelerine Cab, Sal+iWnt ve ön tedavili şekilde birlikte uygulandı. Tedavi sonrası hücre popülasyonlarından CD44⁺ kök hücreler ayrıştırıldı. Bu işlem sırasında CD44 kök hücre yüzey reseptörüne özgü antikor ile mikrokürecikler kullanılarak CD44⁺ özellikte kök hücreler elde edildi ve hücreler hemositometre üzerinde sayıldı. Buna göre kontrol grubundan 280 000 (% 100) CD44⁺ kök hücre elde edilirken, kabazitaksel tedavisinde bu sayı 225 000 (% 80), salinomisin ve iWnt kombinasyon grubunda 188 000 (% 67) olarak belirlendi. Bununla birlikte, salinomisin ve iWnt ön tedavisinin ardından yapılan kabazitaksel tedavi grubunda CD44⁺ hücre sayısı 83 000 (% 29) olarak tespit edildi (Şekil 4.26). Kabazitakselin tek başına kullanıldığı tedavi yönteminde kanser kök hücrelerinin sayısı % 20 oranında azalırken salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü ön tedavisi tek başına kanser kök hücre sayısını % 33 oranında azaldı. Ön tedavi ve kabazitaksel kemoterapi birlikte kullanıldığında ise kanser kök hücrelerinin sayısı % 71 oranında azaldığı tespit edildi.



Şekil 4.26. Tedavi bileşenlerinin CD44⁺ kök hücre sayısına etkisi. Tedavi modalitelerini takiben kolon ayırma tekniği ile CD44⁺ kök hücreler izole edildi ve hemositometrede sayıldı. *p<0,05 kontrol grubuna göre, **p<0,05 tüm gruplara göre.

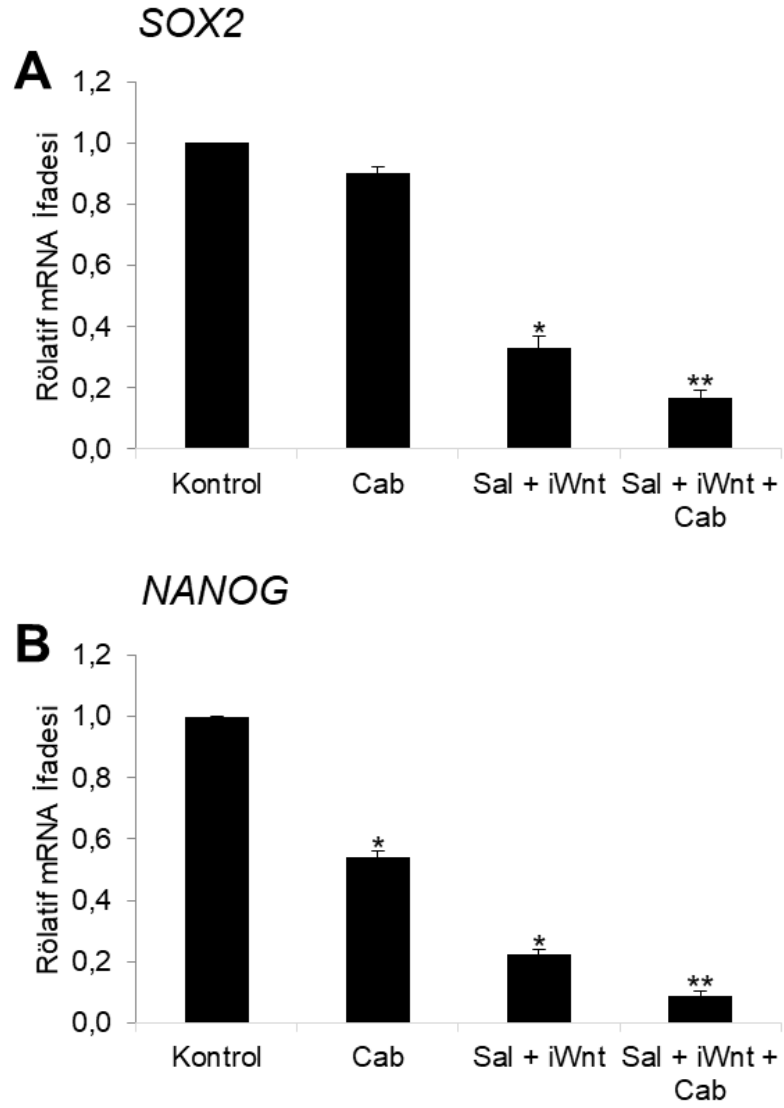
Tedavi amacıyla kullanılan bileşenlerin tümör hücre popülasyonlarında bulunan kanser kök hücre sayısına etkilerinin yanı sıra, kök hücrelere özgü bazı moleküler

belirteçler mRNA ve protein düzeyinde analiz edildi. Bu amaçla, kök hücrelerin devamlılığından sorumlu olan SOX2 ve NANOG transkripsiyon faktörleri mRNA; kök hücre farklılaşmasında görevli olan WNT10 ise protein düzeyinde analiz edildi.

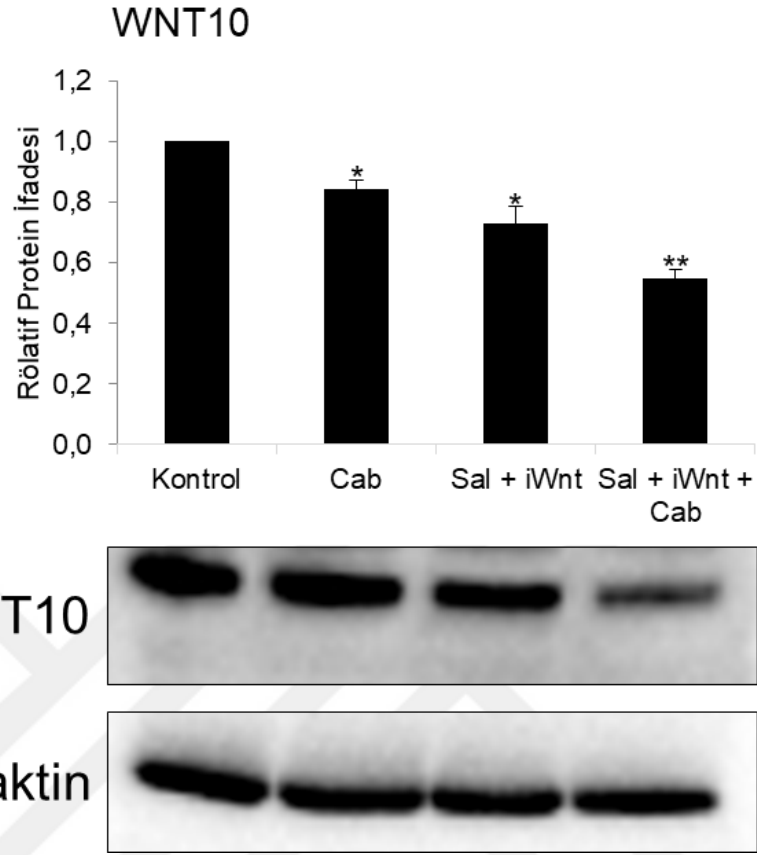
SOX2 geninin mRNA düzeyindeki ifade oranını kontrol grubuna göre 48 saatlik kabazitaksel tedavisi % 90, 48 saat salinomisin ve iWnt kombinasyonu % 30, 48 saat salinomisin ve iWnt ön tedavisi ardından yapılan 48 saatlik kabazitaksel tedavisi ise % 20 seviyesine düşürdü (Şekil 4.27.A).

NANOG geninin mRNA düzeyindeki ifade oranını kontrol grubuna göre 48 saat kabazitaksel tedavisi % 50, 48 saat salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulaması % 80, 48 saat salinomisin ve iWnt ön tedavisi sonrasında uygulanan 48 saat kabazitaksel tedavisi ise % 90 oranında azalttı (Şekil 4.27.B).

Yapılan kabazitaksel kemoterapisi, WNT10 protein sentezini kontrol grubuna göre % 80, salinomisin ve iWnt kombinasyonu % 70, salinomisin ve iWnt ön tedavisinin devamında uygulanan kabazitaksel kemoterapisi ise % 50 seviyesine düşürdü (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Tedavilerin PC3 hücre popülasyonundaki kanser kök hücre belirteçlerine etkisi. SOX2 (A) ve NANOG (B) transkripsiyon faktörlerinin gen ifadeleri mRNA seviyesinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



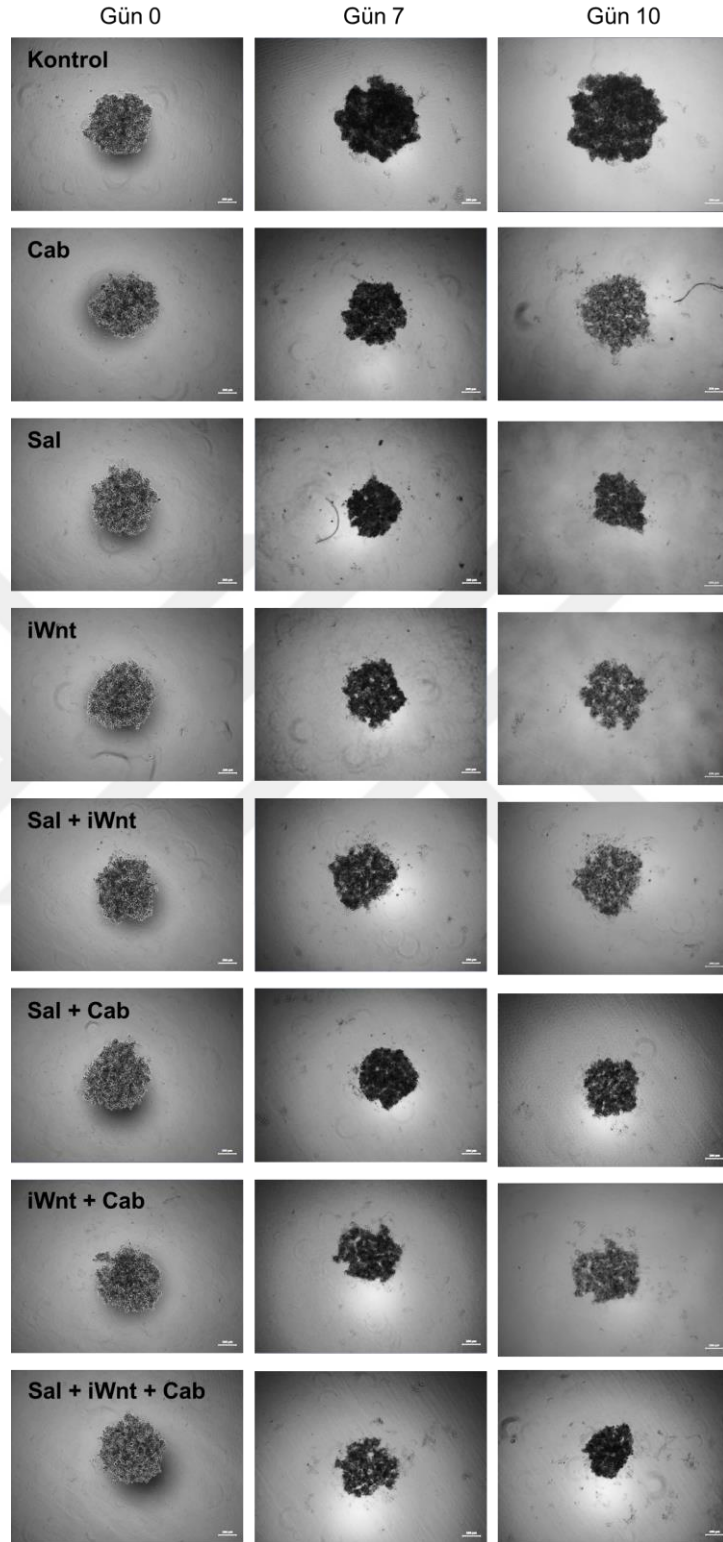
Şekil 4.28. iWnt kullanımının Wnt10 protein sentezine etkisi. *WNT10* (46 kDa) protein düzeyinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

4.12. Üç Boyutlu Hücre Kültüründe Sferoid Çapı ve Hücre Sayısı Analizi

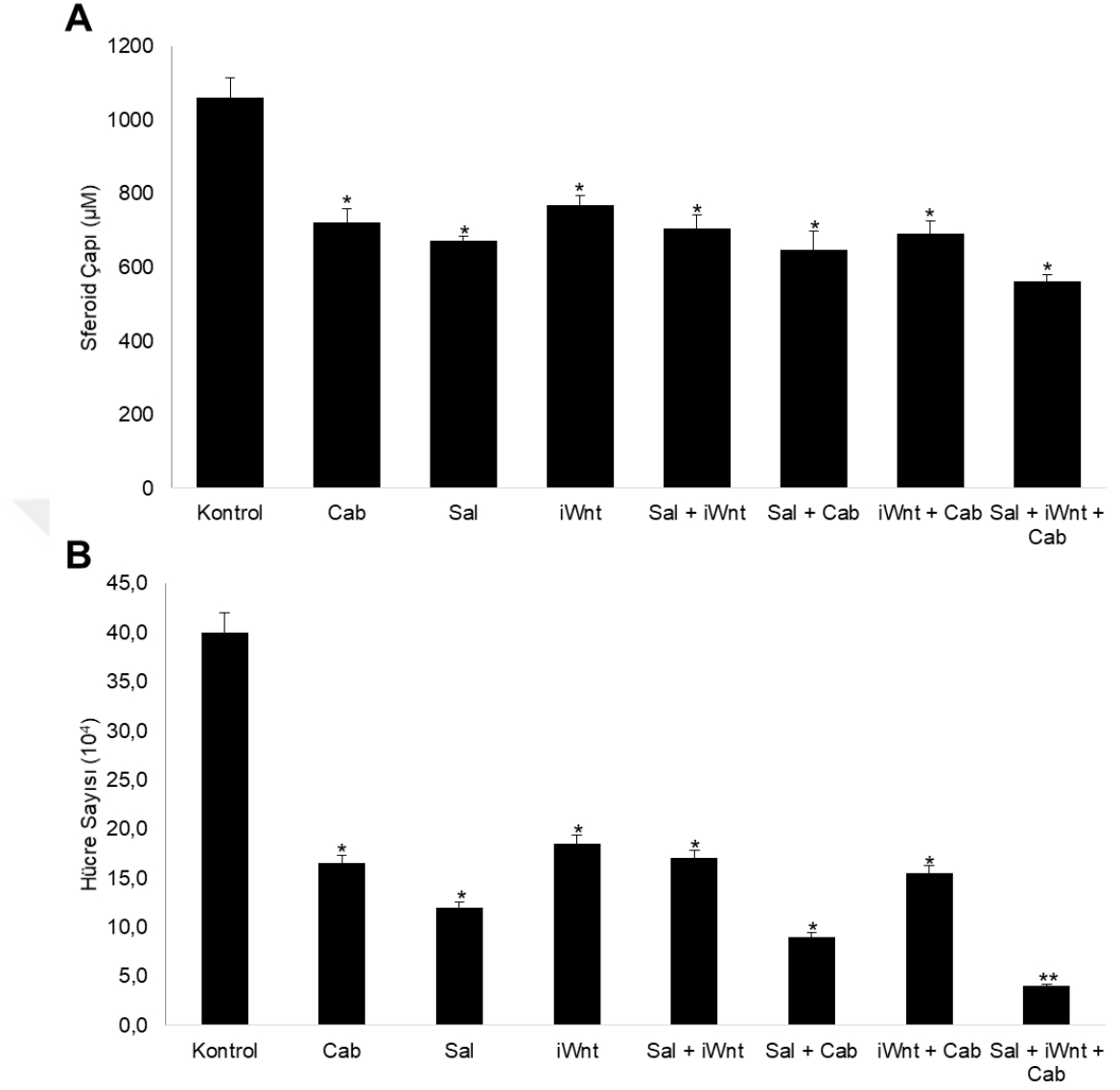
PC3 hücrelerinden 96-kuyucuklu hücre kültürü kaplarında sferoidal üç boyutlu hücre kültürü oluşturuldu. Daha sonra, iki boyutlu analizlerde yapıldığı gibi gruplarına göre 2,5 nM Cab, 0,5 μ M Sal, 6,25 μ M iWnt, Sal + iWnt, Sal + Cab, iWnt + Cab ve Sal + iWnt + Cab uygulamaları gerçekleştirildi. Sıfır, 7 ve 10. günlerin sonunda ışık mikroskobu altında görüntüleme yapılarak (Şekil 4.29) sferoid çapları ölçüldü. Onuncu günde gruplardaki sekizer adet sferoid birleştirilerek tripsin yardımı ile enzimatik olarak hücrelerine ayrıştırıldı ve hemositometrede sayımları yapıldı. Deney sonunda kontrol grubundaki sferoidlerin ortalama çapları 1062 μ m, kabazitaksel 722 μ m, Sal ve iWnt kombinasyonu 706 μ m, Sal ve iWnt ön tedavisinin ardından yapılan Cab grubundaki sferoid çapı ise 561 μ m olarak ölçüldü (Şekil 4.30.A).

Sferoidlerin içerdikleri hücre sayıları kontrol grubunda 400 000, kabazitaksel grubunda 165 000, salinomisin ve iWnt kombinasyon grubunda 170 000, salinomisin ve iWnt ön tedavisi ardından yapılan kabazitaksel grubunda ise 40 000 olarak tespit edildi (Şekil 4.30.B). Ayrıca 75 cm² taban alanına sahip hücre kültürü flasklarında da üç boyutlu hücre kültürü oluşturulup ön tedavi ve kemoterapi uygulamaları gerçekleştirildi. Devamında yine 0, 7 ve 10. Günlerde ışık mikroskobu altında 20x oranında büyütme yapılarak görüntülendi (Şekil 4.31).

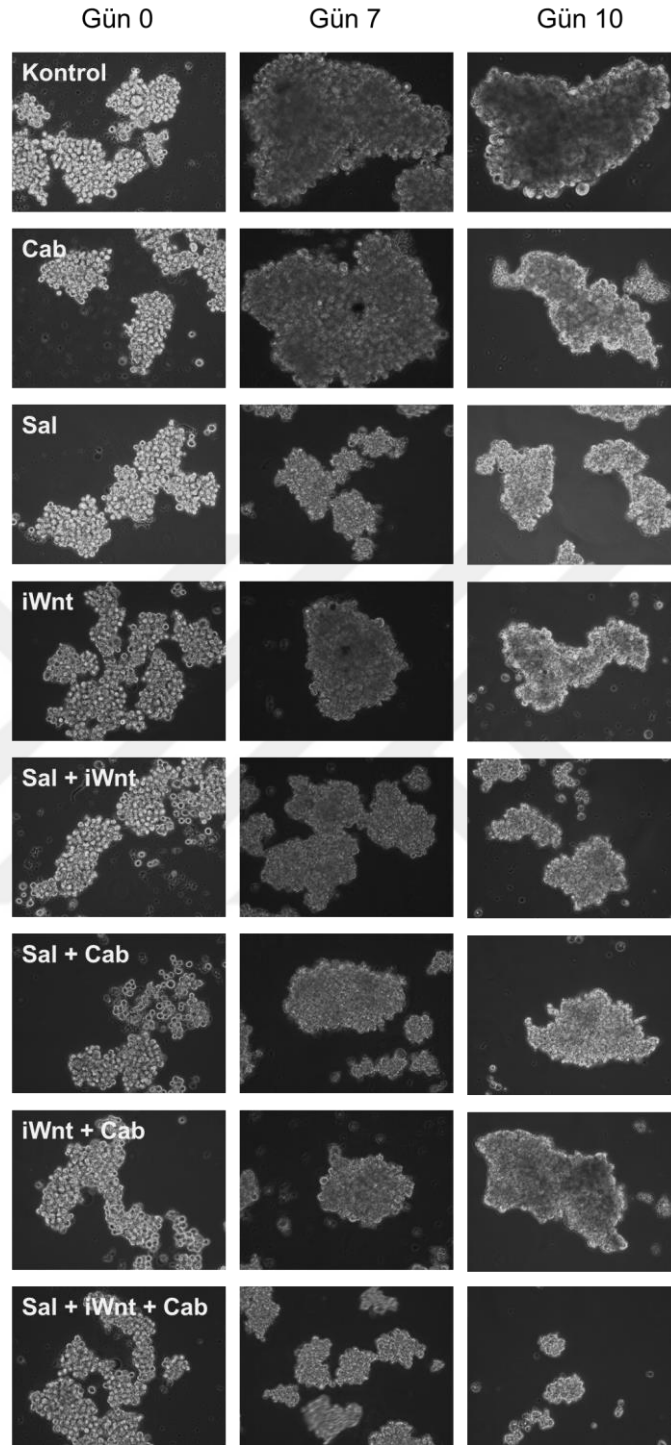
Tez çalışması kapsamında uygulanan ön tedavi ile güçlendirilmiş kemoterapi (Sal + iWnt + Cab) modalitesinin sferoid çapının boyutunu ve sferoidi oluşturan hücre sayısını azaltıp in vitro tümör kütle benzeri yapıları küçülttüğü tespit edildi.



Şekil 4.29. Tedavi uygulamalarının sferoid çapına etkisi. PC3 hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu hücre kültürüne tedavi bileşenleri uygulanıp 0, 7 ve 10. Günlerde ışık mikroskobu altında fotoğraflandı (20x).



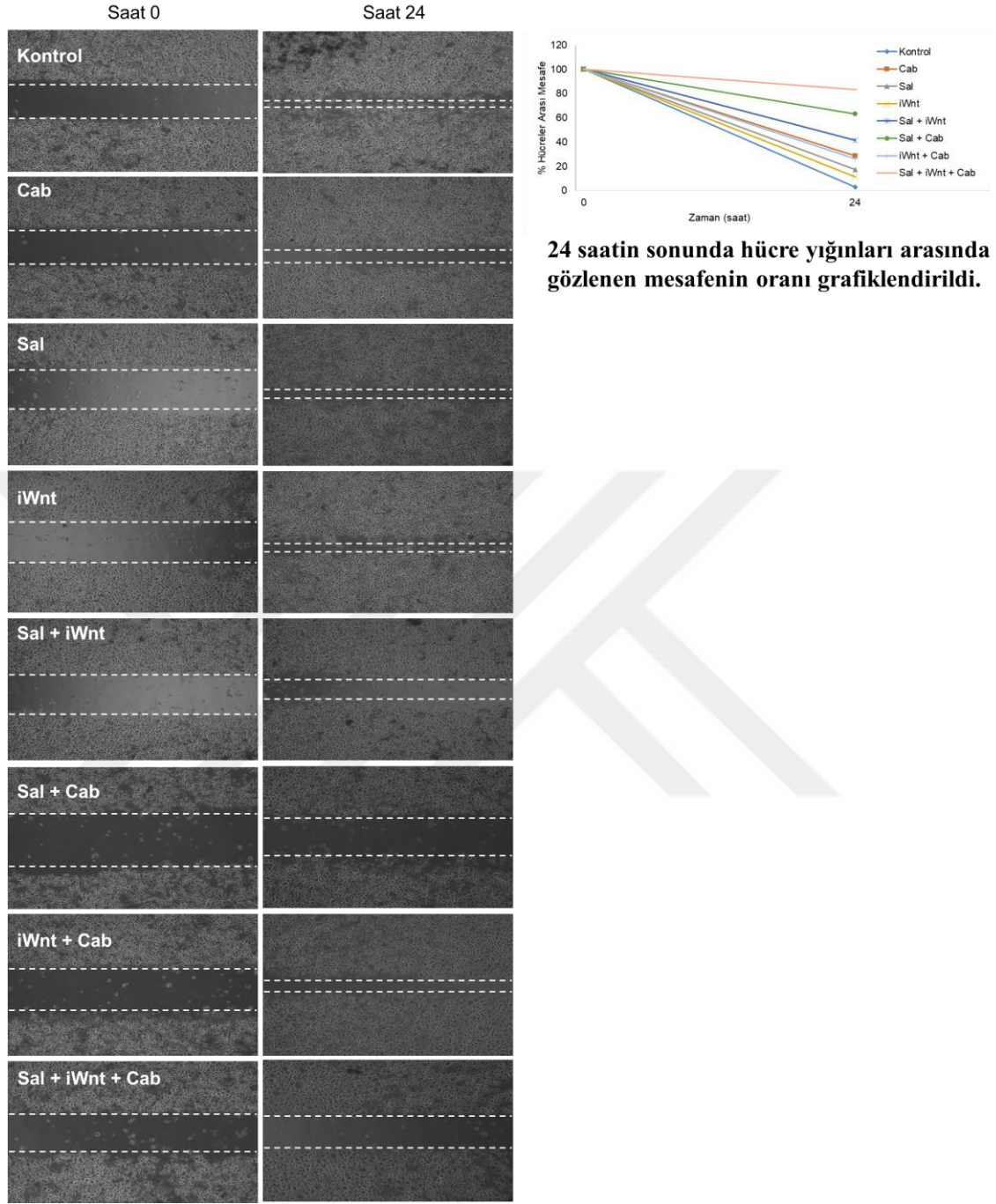
Şekil 4.30. Üç boyutlu hücre kültüründe sferoid çapı ve hücre sayısı analizi. Yapılan tedavilerin sferoid çapı (A) ve hücre sayısı (B) üzerine etkisi belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.31. Ön tedavi ve kemoterapinin üç boyutlu hücre kültürüne etkisi. Yetmiş beş cm^2 hücre kültür kaplarında PC3 hücreleri ile oluşturulan kitlesel üç boyutlu hücre kültürüne ön tedavi ve kemoterapi uygulanıp 0, 7 ve 10. günlerde ışık mikroskobu altında görüntülendi (20x).

4.13. Tedavi Stratejilerinin PC3 Hücre Migrasyon Yeteneğine Etkisi

Uygulanan tedavi stratejilerinin PC3 hücrelerinin migrasyon kabiliyetine etkileri yara iyileşmesi deneyi kullanılarak analiz edildi. Ekimi yapılan hücrelerin kültür kaplarının tabanını % 100 kaplamalarının ardından yüzeye mikropipet ucu yardımıyla çizik yapılarak yol oluşturuldu. Ardından serum içermeyen besi ortamında gruplarına göre 2,5 nM Cab, 0,5 μ M Sal, 6,25 μ M iWnt, Sal + iWnt, Sal + Cab, iWnt + Cab ve Sal + iWnt + Cab uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra görüntüleme gerçekleştirilip oluşturulan aralık mesafe cinsinden ölçüldü. Yapılan tüm tedavi uygulamalarının, kontrol grubuna göre hücrelerin migrasyon yeteneğini yüksek oranda engellediği gözlemlendi. Oluşturulan boşluk 24 saat sonra kontrol grubunda % 97, 2,5 nM Cab tedavisinde % 71, 0,5 μ M Sal uygulamasında % 83, 6,25 μ M iWnt uygulamasında % 89, Sal + iWnt grubunda % 58, Sal + Cab tedavisinde % 37, iWnt + Cab tedavisinde % 74 ve Sal + iWnt + Cab tedavisinde ise % 17 oranında kapandı (Şekil 4.32).



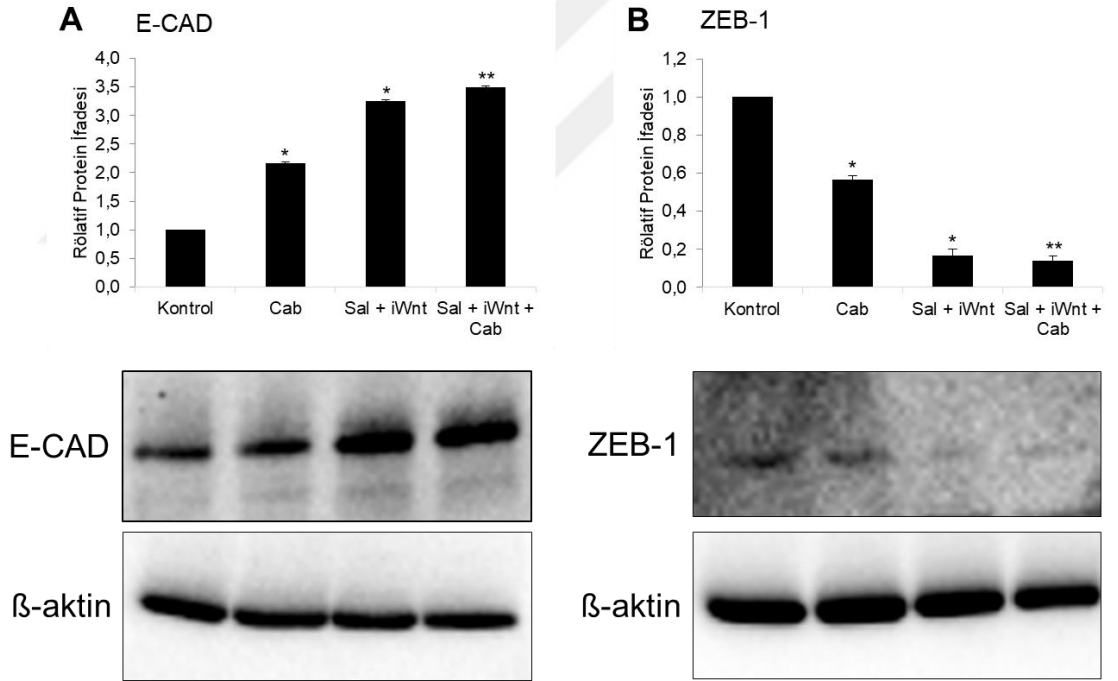
Şekil 4.32. PC3 hücrelerinde gerçekleştirilen yara iyileşme deneyi. Tüm tedavi bileşenlerinin hücre migrasyonu üzerine etkisi mikroskop altında görüntülendi. 24 saatin sonunda hücre yığınları arasındaki mesafe grafikte gösterildi.

E-CAD (E-kaderin), *ZEB-1*, *SLUG*, *VIMENTIN* ve *SNAIL* genlerinin ifade oranlarına 2,5 nM kabazitaksel (Cab), 0,5 μ M salinomisin (Sal) + 6,25 μ M Wnt yolağı

inhibitörü (iWnt) ve Sal + iWnt + Cab uygulamalarının etkisi moleküler biyolojik yöntemlerle analiz edildi.

Hücre adezyon moleküllerinden E-CAD protein ifade oranı, kontrol grubuna göre, 48 saat kabazitaksel tedavisinde % 220, 48 saat salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulamasında % 320, 48 saat salinomisin ve iWnt ön tedavisinin ardından yapılan 48 saat kabazitaksel tedavisinde ise % 350 düzeyinde yükseldi (Şekil 4.33.A).

Hücre göçünü teşvik eden ZEB-1 protein düzeyindeki ifade oranı kontrol grubuna göre kabazitaksel tedavisinde % 60, salinomisin ve iWnt kombinasyonunda % 20, salinomisin ve iWnt ön tedavisi ardından yapılan kabazitaksel tedavisinde ise % 10 seviyesine düştü (Şekil 4.33.B).



Şekil 4.33. Yapılan tedavi modalitesi hücre migrasyonunu düzenler. Hücre migrasyon yeteneğinde etkili *E-CAD* (135 kDa) (A) ve *ZEB-1* (170 kDa) (B) proteinleri Western blot tekniği ile belirlendi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

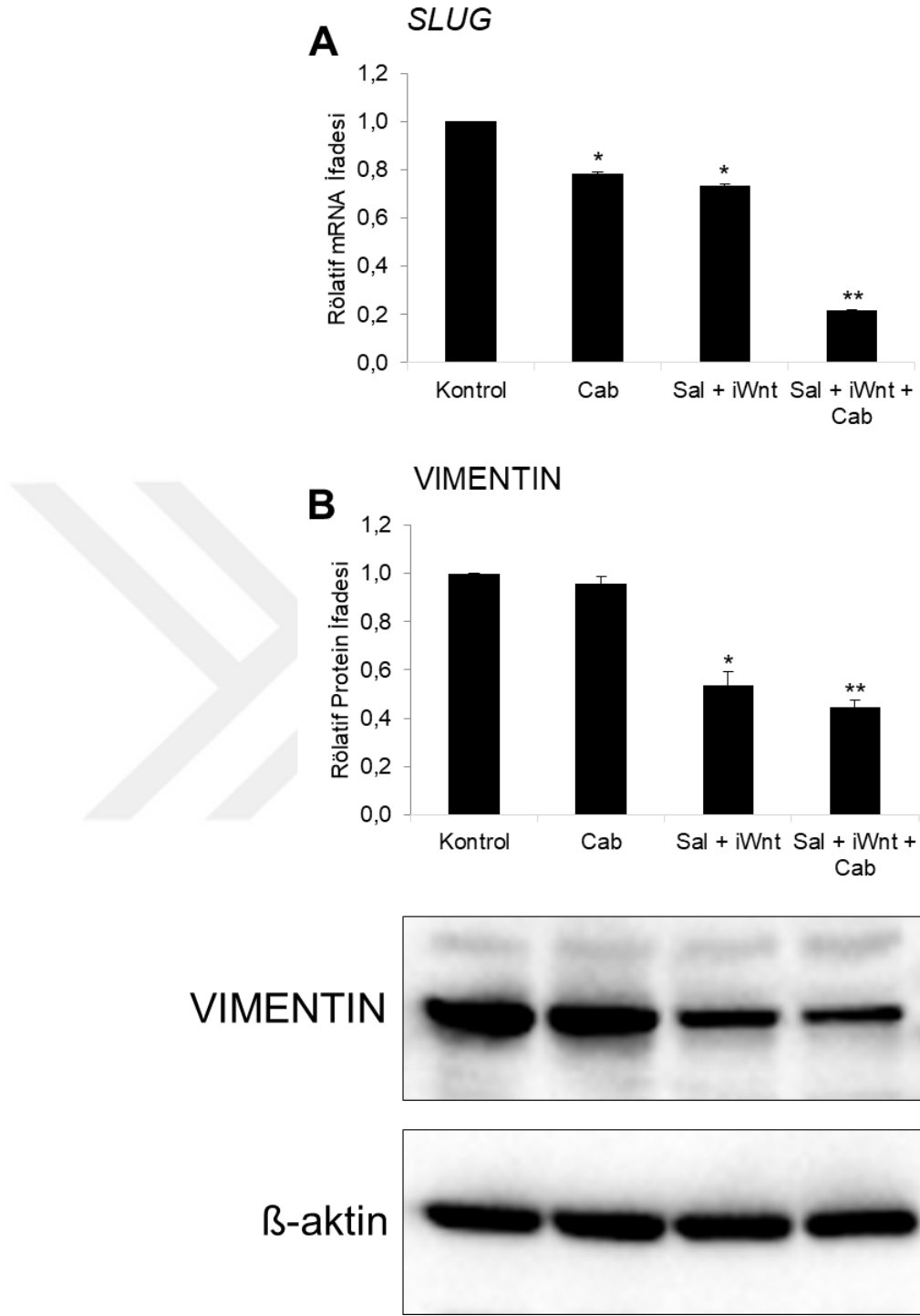
SLUG geninin mRNA düzeyindeki ifadesi kontrol grubuna göre kabazitaksel tedavisinde % 80, salinomisin ve iWnt kombinasyonunda % 70, salinomisin ve iWnt ön

tedavisini takiben yapılan 48 saat kabazitaksel tedavisi % 20 seviyesine düşürdü (Şekil 4.34.A).

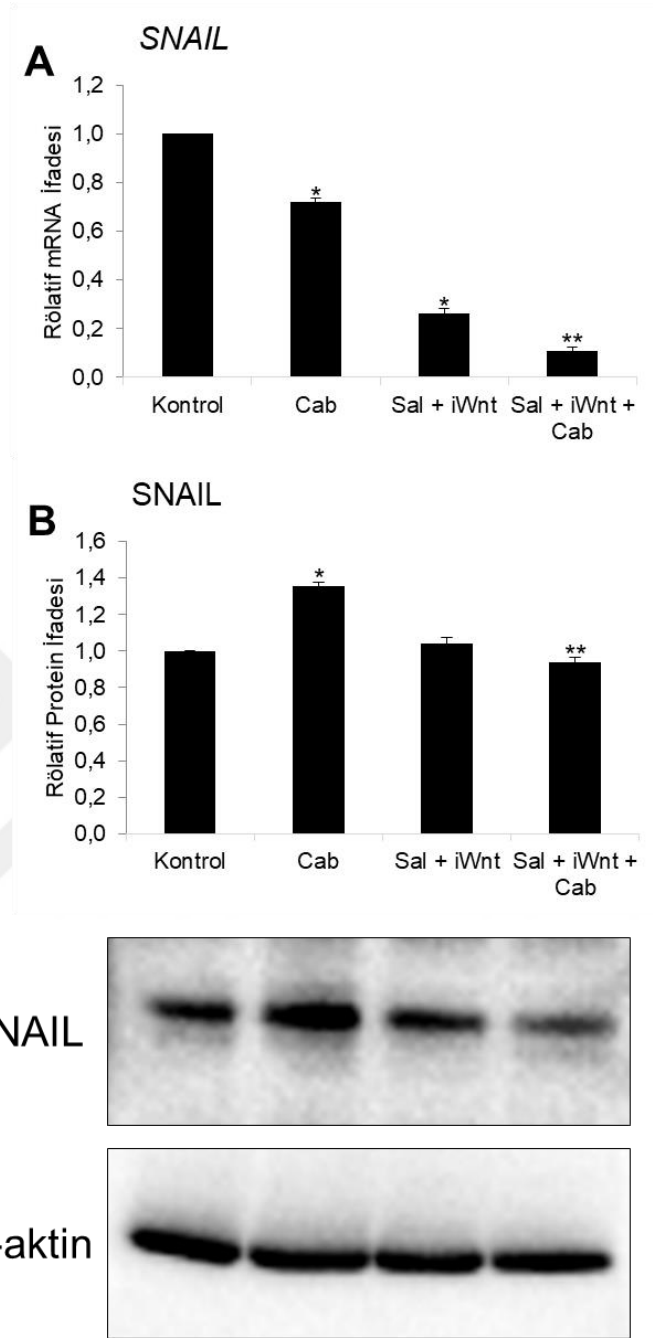
VIMENTIN protein düzeyindeki ifade oranını kontrol grubuna göre 48 saat kabazitaksel tedavisi değıştirmezen 48 saat salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulaması % 50, 48 saat salinomisin ve iWnt ön tedavisinin ardından 48 saat süresince uygulanan kabazitaksel tedavisi % 40 seviyesine indirdi (Şekil 4.34.B).

SNAIL geninin mRNA ifade oranını 48 saat uygulanan kabazitaksel tedavisi, kontrol grubuna göre % 70 seviyesine düşürdü. Salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulamasına 48 saat maruz bırakılan hücrelerde ise bu oran % 30 olarak saptandı. 48 saat salinomisin ve iWnt ön tedavisi ardından yapılan 48 saat kabazitaksel tedavisinin ise SNAIL mRNA ifade oranını % 10 seviyesine düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.35.A).

SNAIL protein miktarındaki değışim analiz edildiğinde 48 saat kabazitaksel tedavisi, kontrol grubuna göre % 40 artış meydana getirirken 48 saat salinomisin ve iWnt kombinasyon uygulaması herhangi bir değışiklik oluşturmadi. 48 saat salinomisin ve iWnt ön tedavisini takiben 48 saat kabazitaksel tedavisi ise SNAIL protein düzeyini kontrol grubuna göre % 90 seviyesine düşürdü (Şekil 4.35.B).



Şekil 4.34. *SLUG* ve *VIMENTIN* ifade analizleri. Hücre migrasyon yeteneğinde etkili *SLUG* geni mRNA düzeyinde (A), *VIMENTIN* ise protein düzeyinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.



Şekil 4.35. *SNAIL* ifade oranı analizi. Hücre migrasyon yeteneğinde etkili *SNAIL* hem mRNA (A), hem protein (30 kDa) (B) düzeyinde analiz edildi. * $p < 0,05$ kontrol (0) grubuna göre, ** $p < 0,05$ tüm gruplara göre.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Prostat kanseri akciğer kanserinden sonra erkeklerde en yüksek ortaya çıkan ikinci, ölüm oranı yüzdesinde ise altıncı sırada yer alır (Sung vd., 2021). Kastrasyona dirençli prostat kanserinin tedavisi hala sınırlıdır. Tedavide kemoterapi uygulamaları, radyoterapi ve cerrahi müdahale gibi seçenekler bulunur. Kemoterapi temelli tedavi yöntemlerinde taksan sınıfı ajanlar, androjen sentez inhibitörleri veya androjen reseptör blokerleri gibi moleküllerden yararlanılır. Kemoterapide hastaların yaşam kalitesinin dramatik bir düzeyde düşmesinin yanı sıra uygulanan kemoterapötik ajana karşı direnç geliştirme ve tedavi sonrası hastalığın nüksü gibi riskler mevcuttur. Kanser kök hücrelerinin tedaviye karşı direnç gelişmesi ve hastalığın nüksünden sorumlu olduğu yönünde güçlü bir hipotez vardır. Bilimsel çalışmalar, doğal bileşiklerin kemoterapötik ilaçlarla sinerjik etki oluşturabileceğini, hastalarda ihmal edilebilir yan etkilerinin yanı sıra ilaç direnci gelişimini önleyici potansiyellerini ortaya koymuştur.

Salinomisin, AKT, Wnt/ β -katenin, Hedgehog ve Notch gibi önemli hücre içi sinyal yollarını seçici olarak inhibe eden, kanser kök hücrelerinde ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı proteinleri inhibe ederek hücre büyümesi, proliferasyonu ve metastazı inhibe eden doğal bir antibiyotiktir (Ketola vd., 2012). Kanser kök hücreleri tümörü başlatabilir, tümör içi heterojenliğe katkıda bulunabilir, çoklu lineer farklılaşmaya yol açabilir ve ilaç direnci oluşturarak tedaviyi zorlaştırabilir. Bu çalışmada kanser kök hücrelerini farklı yollardan hedeflemenin tedavi etkinliğini artırdığı hipotezini kurduk. Böylelikle terapi etkinliğini artırırken, ilaç direnci gelişimi ve nüks potansiyelini düşürmeyi hedefledik. Prostat kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaç ile tedavi öncesi, salinomisin ve Wnt/ β -katenin inhibitörleri ile duyarlılaştırılmasının popülasyondaki

kanser kök hücre sayısını azalttığı ve tedavi etkinliğini güçlü bir şekilde arttırdığını tespit ettik.

Daha önce yayımlanan raporlara göre salinomisin, PC3 hücrelerine doz ve uygulama süresine göre sitotoksik etki oluşturur (Erdogan & Serttas, 2022; Yu vd., 2021). Salinomisinin sitotoksik etkinliği, apoptoz ve otofaji gibi hücrel ölüm yollarının aktivasyonu ile DNA hasarı tamir mekanizmalarının işlevinin engellenmesi sonucu gerçekleşir (Versini & Colombeau, 2020; Yu vd., 2021). PC3 hücrelerine uygulanan 1,13 μ M salinomisinin *BAD* ifade artışı ile içsel apoptozu uyardığı bildirilmiştir (Savaee vd., 2022). Salinomisinin düşük konsantrasyonu (0,5 μ M) tek ve 2,5 nM kabazitaksel ile birlikte kullanıldığında *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CYT-C* ve *P53* mRNA sentez oranlarını kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde artırır (Erdogan & Serttas, 2022). Bu tez çalışmasında ise 0,5 μ M salinomisin ile 6,25 μ M Wnt yolak inhibitörü kombine edilerek yapılan 48 saat ön tedavinin ardından, 48 saat 2,5 nM kabazitaksel tedavisi *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CYT-C* ve *APAF1* mRNA ekspresyonlarını kontrol, kabazitaksel ve salinomisin + Wnt yolak inhibitörüne göre anlamlı düzeyde artırdığı belirlendi. Salinomisinin PC3 hücrelerinde apoptotik proteinlerin sentezini tek kullanıldığında da yüksek oranda artırdığı kanıtlamıştır (Zhang vd., 2018). Bu sonuçlar salinomisin içeren tedavi modalitelerinin kanser terapisindeki potansiyelini göstermektedir.

Kanser kök hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi yüksek olan salinomisin, koloni formasyon analizindeki etkisi gösterilmiştir (Gruber, Handle & Culig, 2020). Bu tez kapsamında salinomisin ile desteklenmiş kabazitaksel uygulamasının üç boyutlu sferoid küreciklerin çaplarını önemli oranda küçülttüğü gösterildi. Salinomisin, Wnt inhibitörü ve kabazitakselin tek kullanıldığı diğer gruplara göre salinomisin ve Wnt yolak inhibitörü ön tedavisi ile desteklenmiş kabazitaksel kombinasyonu sferoid küreciklerdeki hücre sayısını etkin bir düzeyde azalttığı tespit edildi.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının kök hücrelerin kendilerini yenilemesi sonucu devamlılığının sağlanması, hücre farklılaşması ile embriyonik düzeyde organ gelişiminin kontrolü ve hücre proliferasyonunda etkili biçimde sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu görevlerin yanı sıra kanser kök hücrelerinin sağ kalımı ve devamlılığında son derece etkili olan bu sinyal yolağının bileşenlerinin inhibisyonu,

yeni terapi stratejilerinin oluşturulmasında kullanılan tekniklerdendir. Wnt ligand, β -katenin yıkım kompleksi ve TCF/ β -katenin transkripsiyon kompleksi, kaskadın temel bileşenleridir ve klinik tedavi hedefleri arasında yer alır (Zhang & Wang, 2020). Tez çalışmamız kapsamında kabazitaksel uygulanmasından önce salinomisin ve Wnt inhibitörü kullanarak oluşturulan n tedavinin etkinliği test edildi. Bu noktada Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinde hem salinomisin hem de Wnt inhibitörünün oluşturduğu tedavi potansiyelden yararlanıldı.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bloke edilmesi amacıyla çeşitli inhibitör moleküller sentezlenmektedir. Bunlar Wnt-reseptör kompleksi ve β -katenin yıkım kompleksi inhibitörleri olarak iki gruba ayrılır. İlk grupta Porcupine inhibitörleri ile WNT protein ailesine özgül antikorlar bulunurken, ikinci grupta Tankyrase inhibitörleri, disheveled inhibitörleri, TCF/ β -katenin transkripsiyon kompleksi inhibitörleri, WNT koaktivatör antagonisti, WNT5A komformasyonel benzeri inhibitörler, gama sekretaz inhibitörleri ve hedgehog inhibitörleri bulunur (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018). Bu tez kapsamında kullanılan Wnt yolak inhibitörü XI molekülü, β -katenin yıkım kompleksi inhibitörleri grubundaki TCF/ β -katenin transkripsiyon kompleksi inhibitörlerinden birisidir (Li vd., 2019).

Kemoterapi uygulamaları sırasında salinomisinin tek ya da 5-flurourasil, gemsitabin, kabazitaksel veya radyoterapi ile birlikte kullanımı, şimdiye kadar başvurulan kemoterapi yöntemlerinden daha yüksek düzeyde anti-tümör etkinlik göstermiştir (Erdogan & Serttas, 2022; Gehrke vd., 2018; Klose vd., 2019). Bu çalışmada; salinomisin, Wnt inhibitörü ve kabazitakselin birlikte kullanımları, hücre proliferasyonunu tek uygulamalarından daha etkin engellediği saptandı. Bu ajanların farklı kombinasyonlarda kullanımı benzer etki oluşturdu. Ancak hücrelerin, kabazitaksel tedavisinden önce salinomisin ve Wnt yolak inhibitörü ile n tedaviye maruz bırakılmaları hücre proliferasyonu, sferoid formasyonu ve hücre göçü üzerinde güçlü bir negatif etki oluşturdu. Bu etkinin tek kabazitakselin kullanıldığı uygulamalara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Yapılan bir çalışmada, androjenden bağımsız prostat kanseri fare modeli geliştirmek amacıyla oluşturulan mutasyon ile β -katenin aktivasyonunun engellenmesi, tümör kitlesinde küçülmeye neden olmuştur (Patel vd., 2020). Araştırmamızda Wnt yolak inhibitörü XI ile salinomisinin kombine

olarak ön tedavide kullanılması ve takibinde kabazitaksel terapisi, üç boyutlu sferoidal küreciklerin çap ölçüsünde kontrol grubuna göre önemli düzeyde küçülttüğü saptandı. Sferoid yapıların kontrol ve diğer test gruplarına göre daha az canlı hücre barındırdığı tespit edildi. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının sürekli aktivasyonu kastrasyon dirençli prostat kanserlerinde tümör büyümesini uyarır (Patel vd., 2020). Üç boyutlu hücre kültürlerinde gözlenen sferoidal küreciklerin çaplarındaki küçülme ve WNT10 protein ifadesinin ön tedavi ile birlikte uygulanan kemoterapi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalması, Patel ve ark.'nın sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Androjen duyarlı prostat kanserinde androjen deprivasyon terapisi uygulamaya başlandıktan sonra ilerleyen süreçte, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktifleşme eğilimindedir (Luo vd., 2020). Bu sonuç, Wnt/ β -katenin yolunun yüksek orandaki aktivitesinin kontrol altına alınmasının kanser tedavisinde potansiyel hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, Wnt/ β -katenin sinyal iletiminin kanser tedavisinde hedeflenmesinde bazı güçlükleri bulunur. Bunlar arasında, 19 farklı WNT ligand proteini ve 15 farklı WNT reseptör proteininin bulunması (Cheng vd., 2019), Wnt/ β -katenin doku kök hücrelerinde de bulunması ve bu yolda görev alan genlerin yüksek mutasyonları sayılabilir.

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar çoğunlukla tümör hücrelerinde iskelet yapılarını bozup, mitoz bölünmeyi önleyen taksan türevi ajanlardır. Kabazitaksel, abirateron asetat ve enzalutamide kıyasla klinikte, özellikle kastrasyon dirençli prostat kanseri hastalarında, daha yüksek etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Wit & Bono, 2019). Bu çalışmada kullanılan PC3 hücrelerinin % 50'sini öldüren kabazitaksel konsantrasyonunun (48 saat için 2,5 nM) düşürülüp, kemoterapinin klinik tedavide oluşturduğu yan etkilerin azaltılabilemesi amacı ile ön tedavi uygulandı. Bu kapsamda 2,5 nM kabazitaksel kemoterapisi öncesinde salinomisin ve Wnt yolağı inhibitörü kullanılarak PC3, DU145 ve LNCaP hücrelerinde ön tedavi gerçekleştirildi. Her üç hücre serisinde ön tedavi uygulamasının kemoterapi etkinliğini yüksek oranda artırdığı saptanırken, yapılan ön tedavinin kabazitaksel konsantrasyonunu 3 nM'den 0,625 nM'e düşürülmesine imkan sağladı. Bu sonuç, tedavide daha düşük kemoterapötik ajan kullanılarak yan etkilerin azaltılabileceğini gösterdi. Ayrıca, yapılan

tedavinin primer normal hücrelere sitotoksik etki oluşturmaması tedavi güvenliğine işaret etti.

Salinomisin ve Wnt inhibitörü ile yapılan ön tedavi ile desteklenmiş kabazitaksel uygulamasındaki bileşenlerin birbirlerine olan etkilerinin sinerjik veya antagonistik etkinliği, Chou-Talalay yöntemini temel alan CompuSyn yazılımı kullanılarak değerlendirildi (Chou, 2010). Bu programa, kemoterapötiklerin kombine uygulamalarında sık başvurulur. Tedavi kapsamında kullanılan bileşenlerin hücre canlılığını düşürücü yüzdeleri kullanılarak doz redüksiyon indeksi (DRI) ve kombinasyon indeksi (CI) oluşturulur. Bu çalışmada yapılan ön tedavi ve kemoterapi bileşenlerinin DRI değerleri salinomisin için 5,04; Wnt yolak inhibitörü için 3,34; kabazitaksel için 4,02 bulundu. Bu sonuç, bileşenlerin kombinasyon oluşturma uygunluğunun oldukça yüksek olduğunu gösterir. Yine bu bileşenlerin oluşturduğu CI değerinin de 0,74 olarak belirlenmesi, sinerjik bir etkiyi işaret etmektedir.

PC3 hücrelerinde salinomisin ve Wnt inhibitörü ile yapılan ön tedaviyi takiben yapılan kabazitaksel tedavi modalitesi diğer uygulamalara göre anlamlı düzeyde apoptozu uyarırken, nekrotik hücre ölümünde önemli bir artış olmadı. Hücre içi kaynaklı apoptotik sinyal iletim yolağının inhibisyonunda görevli olan *Survivin* ve hücre dışı kaynaklı apoptotik sinyal iletim yolağının inhibisyonunda görevli olan *Living* mRNA ifade oranları salinomisin ve Wnt inhibitörü ön tedavisinin kabazitakselin apoptotik etkisini artırdığı gözlemlendi. Yüksek düzeydeki *Survivin* protein sentezi, kastrasyon dirençli prostat kanseri tedavisinde üstesinden gelinmesi gereken bir sorundur (Miyao vd., 2020). Apoptoz inhibitörü (IAP) olarak adlandırılan *living* ve *survivin* proteinleri sentez oranlarında gözlenen etki, NF-κB ve BCL2 anti-apoptotik proteinlerinde ise sırasıyla % 30 ve % 50 azalma belirlendi. Pankreas kanseri hücre serilerinin kullanıldığı bir çalışmada, NF-κB sentezinin azalması, BCL2 protein seviyesinin düşmesiyle paralellik göstermektedir (Z. Li vd., 2020). Sisplatin, paklitaksel ve kabazitakselin farklı hücre serilerinde fakat burada kullandığımız konsantrasyona yakın gerçekleştirilen uygulama sonucunda, BCL2 protein seviyesindeki azalma sonuçlarımız ile uygunluk göstermektedir (Gerwing vd., 2016).

Anti-apoptotik Bcl-2 protein düzeyi kontrol grubuna göre kabazitaksel tedavisinden etkilenmezken, salinomisin ve Wnt inhibitörü uygulamasında % 30

oranında azaldı. Ön tedavi ve kemoterapi uygulaması ile birlikte de bu azalma oranı % 50 olarak tespit edildi. Bax protein sentezinin ise kabazitaksel ve ön tedavi uygulamasından etkilenmediği ancak salinomisin ve Wnt yolak inhibitörü ön tedavisi ile desteklenen kabazitaksel kemoterapisinin % 20 oranında artırdığı tespit edildi. Bax ve Bcl-2 proteinlerin kontrol gruplarına göre seviyelerindeki değişim oranında (Bax/Bcl-2) kabazitaksel kemoterapisinde % 10, salinomisin ve iWnt grubunda % 80, kabazitaksel kemoterapisi öncesinde salinomisin ve iWnt kullanılan grupta ise % 230 artış gözlemlendi. Sıçan prostat epitel dokularında elde edilen sonuçlarda da yer aldığı üzere (Perlman vd., 1999) Bax/Bcl-2 oranı, kanser hücrelerinin apoptoza geçirme durumunun belirlenmesinde önemli bir belirteçtir. Mackey ve arkadaşları da prostat kanseri hastalarında Bax/Bcl-2 oranının radyoterapi tedavisindeki yanıt derecesini yansıtması açısından önemli bulmaktadır (Mackey vd., 1998). PC3 ve DU145 hücre hatlarının kullanılarak kabazitaksel, dosataksel ve paklitaksel ile yapılan bir araştırmada bu oranın, 2,5 nM kabazitaksel kullanımıyla birlikte kontrol grubuna göre % 50 düzeyinde arttığı gösterilmiştir (Cevik & Acidereli, 2020). Bax proteininin apoptotik karakteri ve Bcl-2 proteininin de anti-apoptotik karakterinden dolayı Bax/Bcl-2 oranının yüksek olması kemoterapiye yanıtın derecesi ile doğru orantı gösterdiği literatürde belirtilmiştir (Mohammadian vd., 2016; Raisova vd., 2001).

Hücre dışı kaynaklı apoptotik sinyal iletim yolağında görevli olan *Casp 8* ve *Casp 3* mRNA düzeylerini kabazitaksel tek uygulaması sırasıyla % 90 ve % 60 artırırken ön tedaviyle desteklenmiş kemoterapi uygulaması bu oranları sırasıyla % 140 ve % 160 seviyelerine yükseltti. Hücre içi kaynaklı apoptotik sinyal iletim yolağında görevli *Apaf1*, *Cyt c*, *Bax* mRNA sentez seviyelerinde sadece kabazitaksel sırasıyla % 110, % 40 ve % 50 oranında artış meydana getirirken, ön tedavili kabazitaksel ise bu değerleri % 300, % 80 ve % 85'e yükseltti. Grayson ve arkadaşlarının prostat kanseri hücre serilerinde kemoterapotik ajanların hücre dışı kaynaklı apoptotik sinyal iletim yolaklarını uyarma yeteneklerinin yüksek olduğunu belirtmeleri bizim sonuçlarımızla da örtüşmektedir (Grayson, Hope & Wang, 2021). Ön tedavi ile desteklenen kabazitaksel tedavisi yukarıda da belirtildiği gibi *Casp 8* ve *Casp 3* mRNA düzeyindeki ifadenin önemli derecede artmasına ve Bax/Bcl-2 oranının aynı şekilde yükselmesine sebep oldu. Salinomisin anti-tümöral aktivitesi temelde NF-κB proteinlerinin nükleusa

taşımasının etkilenmesiyle oluşur (Tyagi & Patro, 2019) ve hücre dışı kaynaklı apoptoz tetiklenir (Arafat vd., 2013). Ayrıca, HIF-1 α /VEGF oranının etkilenmesi hem apoptoz hem de otofaji ile ilgili hücresel mekanizmalar uyarılır (Dewangan vd., 2019).

Normal şartlarda sağlıklı hücrelerin bölünme ve proliferasyonundaki moleküler kontrol mekanizmaları yüksek verimlilikte işlev görür. Tümör dokularını oluşturan kanser hücrelerinde ise bu sinyal iletim yollarının kontrol yeteneği kaybedilmiştir. bu çalışmada uygulanan tedavi stratejilerinin PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK ve p38 MAPK hücre içi sinyal iletim yollarına etkisi belirlendi. PI3K protein sentez oranını salinomisin ve Wnt yolak inhibitörü ile desteklenmiş kabazitaksel kemoterapisi, kontrol ve diğer deney gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azaltmıştır. Aynı etki AKT için elde edilmemiş olmasına rağmen fosforillenme ile aktivite kazanmış pAKT seviyesinde de PI3K seviyesine paralel bir azalma durumu tespit edildi. PC3 ve 22Rv1 prostat kanseri hücre serilerinden elde edilen sonuçlara göre kabazitaksel PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolunu inhibe eder (Xu vd., 2022). PI3K ve pAKT proteinlerinin seviyelerindeki değişimin benzeri pERK ve p-P38 için de gözlemlendi. P38 protein seviyesinde de p-P38 düzeyindeki dramatik derece kadar olmasa da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gösterildi. Dyshlovoy ve arkadaşlarının yayınladıkları gibi p-P38 proteininin seviyesinin azalması tedavi etkinliğinin önemli belirteçlerindendir (Dyshlovoy vd., 2020). Fosforile edilmiş P38 protein seviyesinin PC3 hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz tedavi ile birlikte dramatik olarak düşmesi, p38 MAPK hücre içi sinyal iletiminin bu çalışmada oluşturulan tedavi stratejisinden yüksek düzeyde etkilendiğini ortaya koymaktadır.

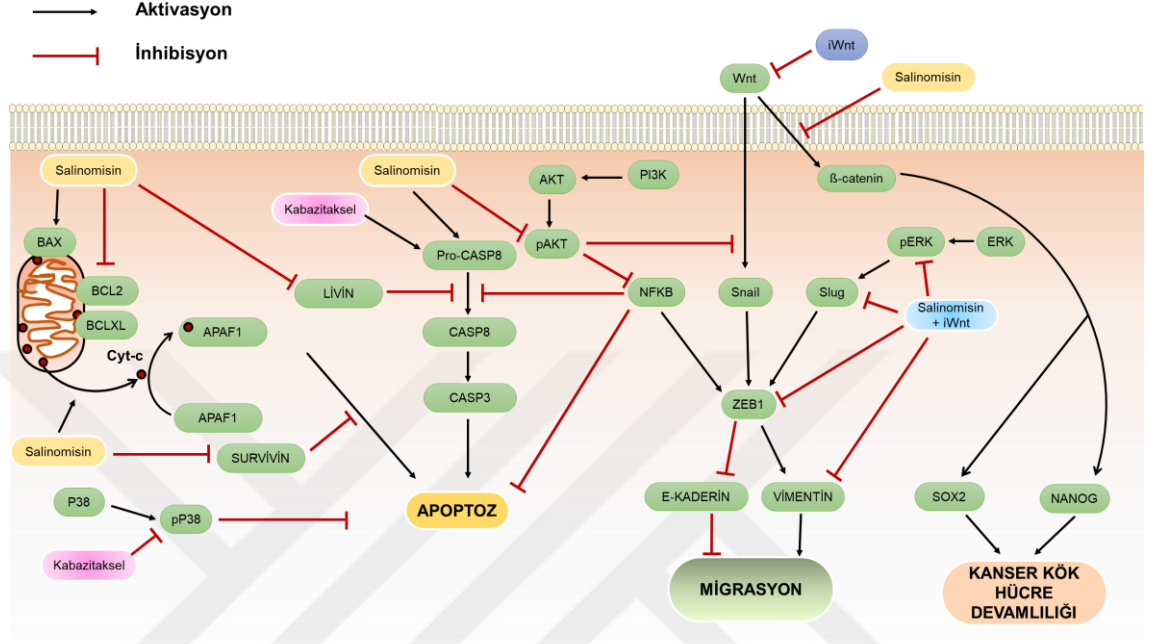
Kabazitaksel tedavisinin salinomisin ve Wnt inhibitörü ile desteklememizin altında yatan sebep, bu iki ajanın literatürde kök hücrelerin devamlılığı üzerinde engelleyici etkiye sahip olduklarının belirtilmesidir. Liu ve arkadaşları, karaciğer kanseri kök hücrelerinde salinomisinin Wnt/ β -katenin üzerine baskılayıcı etkisini göstermişlerdir (Liu vd., 2021). Kanser kök hücrelerinin hedeflenerek oluşturulan tedavide diğer seçeneklere göre daha yüksek başarı elde edildiği yaygın şekilde belirtilmektedir (Gao & Liu, 2019; Li vd., 2017; Wang & Yen, 2021). Bu çalışma kapsamında uygulanan ön tedavinin kabazitaksel etkinliğini artırarak CD44⁺ kök hücre sayısını kontrol grubuna göre % 29 oranında azalttığı gösterildi. Kök hücre

devamlılığında rolü bulunan *Sox2* ve *Nanog* transkripsiyon faktörlerinin (Yang vd., 2020) mRNA ifade oranları, ön tedavi ile desteklenen hücrelerde güçlü bir şekilde baskılandığı gözlemlendi. Benzer etki, Wnt10 protein sentez oranında da belirlendi.

Wnt/ β -katenin sinyali, EMT'nin uyarılması sonucu kanserin ilerlemesinin yanı sıra metastazı da destekler (Yu vd., 2011; Y. Zhang vd., 2021). EMT, hücrelerin dokudan ayrılmasını ve bazoapikal polaritelerini kaybederek artan hareketlilik kazanmalarını sağlar. Azalan E-kaderin seviyeleri ve artan vimentin ekspresyonu sergileyen hücreler, ilaç direnci ile ilişkilidir ve EMT'yi destekler (Mendez, Kojima & Goldman, 2010; Wang vd., 2017). Tersine, artan E-kaderin ekspresyonunun, kemorezistans sergileyen mezenkimal benzeri tümör hücreleri ile kemoterapiye duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (Witta vd., 2006). Çalışmamız, kabazitaksel tedavisinden önce Wnt/ β -katenin inhibitörü ve salinomisin kombinasyonunun, vimentin ekspresyonunu aşağı, E-kaderin ifadesini ise yukarı yönde regüle ederek prostat kanseri hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdi. Salinomisin uygulamasının, NF- κ B ekspresyonunun baskılanması ve aldehit dehidrojenaz aktivitesinin azalması ile prostat kanseri hücrelerinin göçünü engellediği daha önce gösterilmiştir (Ketola vd., 2012). Salinomisin ile CD44 hücrelerinin hedeflenmesi, prostat kanserinde CD44 ekspresyonunu azaltmanın yanı sıra vimentini aşağı regüle ederek ve E-kaderini yukarı regüle ederek EMT'yi ve in vivo metastazı azaltabilir (Shang vd., 2015a). Salinomisin'in farklı kanser türlerinde benzer bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir, örneğin, salinomisin tedavisinde yukarı regüle edilmiş E-kaderin ve aşağı regüle edilmiş vimentin ekspresyonu, metastazın baskılanması ve mesane kanseri hücrelerinin invazyonu ile ilişkilendirilmiştir (Qu vd., 2015). Çalışmamızda, bu belirteçlere ek olarak ZEB1, Slug ve Snail transkripsiyon faktörlerinin seviyeleri mRNA ve protein düzeyinde analiz edilerek ön tedavi ile desteklenmiş kemoterapi uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldıkları gösterildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada prostat kanseri hücrelerinin salinomisin ve Wnt inhibitörü ile ön tedavisinin proliferasyonu ve migrasyonu baskıladığı gösterildi. Popülasyondaki kanser kök hücre sayısındaki önemli azalma, tedavi yönteminin etkinliğine işaret etmektedir. Tedavi etkinliği kısmen AKT, ERK ve p38 MAPK yollarına atfedilebilir. Veriler, salinomisin uygulamasının ve kemoterapiden önce

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun bloke edilmesinin, prostat kanserinin etkili tedavisi ve belki de nüksünün önlenmesi için yeni ve ümit verici bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.1. Tez çalışmasında kullanılan terapi yöntemindeki bileşenlerin hücresel sinyal iletim yolları üzerindeki genel etkinliği.

KAYNAKLAR

- Wahab, N. A., Lajis, N. H., Abas, F., & Othman, I. (2020). Mechanism of Anti-Cancer Activity of Curcumin on Androgen-Dependent and Androgen-Independent Prostate Cancer. *12*(3). doi: 10.3390/nu12030679
- Agliano, A., Calvo, A., & Box, C. (2017). The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Semin Cancer Biol*, *44*, 25-42. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.003
- Nakouzi, N., Le Moulec, S., Albigès, L., Wang, C., Beuzeboc, P., Gross-Goupil, M., . . . Lorient, Y. (2015). Cabazitaxel Remains Active in Patients Progressing After Docetaxel Followed by Novel Androgen Receptor Pathway Targeted Therapies. *Eur Urol*, *68*(2), 228-235. doi: 10.1016/j.eururo.2014.04.015
- Albertsen, P. C. (2020). Prostate cancer screening and treatment: where have we come from and where are we going? *BJU Int*, *126*(2), 218-224. doi: 10.1111/bju.15153
- Anastas, J. N., & Moon, R. T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*, *13*(1), 11-26. doi: 10.1038/nrc3419
- Arafat, K., Iratni, R., Takahashi, T., Parekh, K., Al Dhaheer, Y., Adrian, T. E., & Attoub, S. (2013). Inhibitory Effects of Salinomycin on Cell Survival, Colony Growth, Migration, and Invasion of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1. *PLoS One*, *8*(6), e66931. doi: 10.1371/journal.pone.0066931
- Arce, L., Yokoyama, N. N., & Waterman, M. L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene*, *25*(57), 7492-7504. doi: 10.1038/sj.onc.1210056
- Ayyildiz, A., Koc, H., Turkekul, K., & Erdogan, S. (2021). Co-administration of apigenin with doxorubicin enhances anti-migration and antiproliferative effects via PI3K/PTEN/AKT pathway in prostate cancer cells. *Experimental Oncology*, *43*(2), 125-134. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-2.16096
- Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., Mukheem, A., Huri, H. Z., & Kamarul, T. (2016). Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death Dis*, *7*(1), e2058. doi: 10.1038/cddis.2015.275
- Barbato, L., & Bocchetti, M. (2019). Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *8*(8). doi: 10.3390/cells8080926
- Beer, T. M., Armstrong, A. J., Rathkopf, D. E., Lorient, Y., Sternberg, C. N., Higano, C. S., . . . Tombal, B. (2014). Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med*, *371*(5), 424-433. doi: 10.1056/NEJMoa1405095
- Bostwick, D. G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P., & Murphy, G. P. (1998). Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*, *82*(11), 2256-2261. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19980601)82:11<2256::aid-cnrc22>3.0.co;2-s

- Cackowski, F. C., & Taichman, R. S. (2019). Parallels between hematopoietic stem cell and prostate cancer disseminated tumor cell regulation. *Bone*, 119, 82-86. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.025
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. 17(7), 395-417. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y
- Cevik, O., & Acidereli, H. (2020). Cabazitaxel exhibits more favorable molecular changes compared to other taxanes in androgen-independent prostate cancer cells. e22542. doi: 10.1002/jbt.22542
- Chang, W. H., & Lai, A. G. (2019). Aberrations in Notch-Hedgehog signalling reveal cancer stem cells harbouring conserved oncogenic properties associated with hypoxia and immunoevasion. *Br J Cancer*, 121(8), 666-678. doi: 10.1038/s41416-019-0572-9
- Cheng, J. W., Duan, L. X., Yu, Y., Wang, P., Feng, J. L., Feng, G. Z., & Liu, Y. (2021). Bone marrow mesenchymal stem cells promote prostate cancer cell stemness via cell-cell contact to activate the Jagged1/Notch1 pathway. 11(1), 87. doi: 10.1186/s13578-021-00599-0
- Cheng, X., Xu, X., Chen, D., Zhao, F., & Wang, W. (2019). Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 110, 473-481. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.082
- Cheung, S., Jain, P., So, J., Shahidi, S., Chung, S., & Koritzinsky, M. (2021). p38 MAPK Inhibition Mitigates Hypoxia-Induced AR Signaling in Castration-Resistant Prostate Cancer. 13(4). doi: 10.3390/cancers13040831
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70(2), 440-446. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-1947
- Cinar, A. K., & Ozal, S. A. (2021). Eupatilin attenuates TGF- β 2-induced proliferation and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. 40(2), 103-114. doi: 10.1080/15569527.2021.1902343
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, 429(3), 403-417. doi: 10.1042/bj20100323
- Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J. P., Kocak, I., . . . Investigators, T. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*, 376(9747), 1147-1154. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61389-X
- Wit, R., & Bono, J. (2019). Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. 381(26), 2506-2518. doi: 10.1056/NEJMoa1911206
- Debatin, K. M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53(3), 153-159. doi: 10.1007/s00262-003-0474-8
- Derakhshani, A., Taefehshokr, S., Safarpour, H., Vaezi Astamal, R., Taefehshokr, N., Alizadeh, N., . . . Baradaran, B. (2020). *Oncogenic Signaling Pathways in Cancer: An Overview*.
- Dewangan, J., Srivastava, S., Mishra, S., Divakar, A., Kumar, S., & Rath, S. K. (2019). Salinomycin inhibits breast cancer progression via targeting HIF-1 α /VEGF mediated tumor angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*, 164, 326-335. doi: 10.1016/j.bcp.2019.04.026

- Dewangan, J., Tandon, D., Srivastava, S., Verma, A. K., Yapuri, A., & Rath, S. K. (2017). Novel combination of salinomycin and resveratrol synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human breast cancer cells. *Apoptosis*, 22(10), 1246-1259. doi: 10.1007/s10495-017-1394-y
- Dyshlovoy, S. A., Kaune, M., Hauschild, J., Kriegs, M., Hoffer, K., Busenbender, T., . . . Poverennaya, E. V. (2020). Efficacy and Mechanism of Action of Marine Alkaloid 3,10-Dibromofascaplysin in Drug-Resistant Prostate Cancer Cells. 18(12). doi: 10.3390/md18120609
- Erdogan, S., Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Serttas, R., Turkecul, K., Dibirdik, I., & Bilir, A. (2016). The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44(+) stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF- κ B signaling. *Life Sci*, 162, 77-86. doi: 10.1016/j.lfs.2016.08.019
- Erdogan, S., & Serttas, R. (2022). The synergistic anticancer effect of salinomycin combined with cabazitaxel in CD44+ prostate cancer cells by downregulating wnt, NF- κ B and AKT signaling. 49(6), 4873-4884. doi: 10.1007/s11033-022-07343-y
- Erdogan, S., & Turkecul, K. (2020). Neferine inhibits proliferation and migration of human prostate cancer stem cells through p38 MAPK/JNK activation. 44(7), e13253. doi: 10.1111/jfbc.13253
- Erdogan, S., Turkecul, K., Dibirdik, I., Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Bilir, A., & Oktem, G. (2018). Midkine downregulation increases the efficacy of quercetin on prostate cancer stem cell survival and migration through PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway. *Biomed Pharmacother*, 107, 793-805. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.061
- Finlay, D., Teriete, P., Vamos, M., Cosford, N. D. P., & Vuori, K. (2017). Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Res*, 6, 587. doi: 10.12688/f1000research.10625.1
- Foroni, C., Broggin, M., Generali, D., & Damia, G. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 689-697. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.001
- Gagliardi, P. A., Puliafito, A., & Primo, L. (2018). PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. *Semin Cancer Biol*, 48, 27-35. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.014
- Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7), 1161-1163. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.004
- Gao, J., & Liu, J. (2019). Co-Delivery of Docetaxel and Salinomycin to Target Both Breast Cancer Cells and Stem Cells by PLGA/TPGS Nanoparticles. 14, 9199-9216. doi: 10.2147/ijn.s230376
- Gehrke, T., Hackenberg, S., Polat, B., Wohlleben, G., Hagen, R., Kleinsasser, N., & Scherzad, A. (2018). Combination of salinomycin and radiation effectively eliminates head and neck squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oncol Rep*, 39(4), 1991-1998. doi: 10.3892/or.2018.6267
- Genc, F., Atabey, U. S., Serttas, R., & Erdogan, S. (2022). Abiraterone acetate in combination with apigenin attenuates survival of human castration-sensitive prostate cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem*. doi: 10.2174/1871520622666220426095257

- Gerl, R., & Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 26(2), 263-270. doi: 10.1093/carcin/bgh283
- Gerwing, M., Jacobsen, C., Dyshlovoy, S., Hauschild, J., Rohlfing, T., Oing, C., . . . Honecker, F. (2016). Cabazitaxel overcomes cisplatin resistance in germ cell tumour cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142(9), 1979-1994. doi: 10.1007/s00432-016-2204-6
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3-12. doi: 10.1002/path.2697
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2129-2144. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129
- Grayson, K. A., Hope, J. M., & Wang, W. (2021). Taxanes Sensitize Prostate Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptotic Synergy via Endoplasmic Reticulum Stress. *20(5)*, 833-845. doi: 10.1158/1535-7163.mct-20-0495
- Green, D. R. (2017). Cancer and Apoptosis: Who Is Built to Last? *Cancer Cell*, 31(1), 2-4. doi: 10.1016/j.ccell.2016.12.007
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(12). doi: 10.1101/cshperspect.a006080
- Gruber, M., Handle, F., & Culig, Z. (2020). The stem cell inhibitor salinomycin decreases colony formation potential and tumor-initiating population in docetaxel-sensitive and docetaxel-resistant prostate cancer cells. *80(3)*, 267-273. doi: 10.1002/pros.23940
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., & Lander, E. S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 138(4), 645-659. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.034
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harris, K. S., & Kerr, B. A. (2017). Prostate Cancer Stem Cell Markers Drive Progression, Therapeutic Resistance, and Bone Metastasis. *2017*, 8629234. doi: 10.1155/2017/8629234
- Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am*, 38(1), 1-14. doi: 10.1016/s0033-8389(05)70146-9
- Hongo, H., & Kosaka, T. (2018). Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *109(9)*, 2937-2945. doi: 10.1111/cas.13729
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 6(3), 1769-1792. doi: 10.3390/cancers6031769
- Hoverter, N. P., & Waterman, M. L. (2008). A Wnt-fall for gene regulation: repression. *Sci Signal*, 1(39), pe43. doi: 10.1126/scisignal.139pe43
- Huldani, H., Jasim, S. A., Sergeenva, K. N., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Turakulov, R., . . . Siahmansouri, H. (2022). Mechanisms of cancer stem cells drug resistance and the pivotal role of HMGA2. *Pathology - Research and Practice*, 234, 153906. doi: https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153906
- Ingrosso, G., Detti, B., Scartoni, D., Lancia, A., Giacomelli, I., Baki, M., . . . Santoni, R. (2018). Current therapeutic options in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Semin Oncol*, 45(5-6), 303-315. doi: 10.1053/j.seminoncol.2018.10.001

- Jamalzadeh, L., Ghafoori, H., Aghamaali, M., & Sariri, R. (2017). Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells by a Semi-Synthetic Derivative of Artemisinin: A Caspase-Related Mechanism. *Iran J Biotechnol*, 15(3), 157-165. doi: 10.15171/ijb.1567
- James, N. D., Sydes, M. R., Clarke, N. W., Mason, M. D., Dearnaley, D. P., Spears, M. R., . . . Parmar, M. K. (2016). Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet*, 387(10024), 1163-1177. doi: 10.1016/s0140-6736(15)01037-5
- Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. 9(2), 205-218. doi: 10.15171/apb.2019.024
- Jangamreddy, J. R., Ghavami, S., Grabarek, J., Kratz, G., Wiechec, E., Fredriksson, B. A., . . . Łos, M. J. (2013). Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1833(9), 2057-2069. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.011
- Jiménez, N., Reig, Ò., Montalbo, R., Milà-Guasch, M., Nadal-Dieste, L., Castellano, G., . . . Mellado, B. (2020). Cell Plasticity-Related Phenotypes and Taxanes Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol*, 10, 594023. doi: 10.3389/fonc.2020.594023
- Jinesh, G. G. (2017). Exposing the deadly dark side of apoptotic cancer stem cells. *Oncoscience*, 4(9-10), 124-125. doi: 10.18632/oncoscience.369
- Kawalec, P., Paszulewicz, A., Holko, P., & Pilc, A. (2012). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. A systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci*, 8(5), 767-775. doi: 10.5114/aoms.2012.31610
- Ketola, K., Hilvo, M., Hyötylainen, T., Vuoristo, A., Ruskeepaa, A. L., Oresic, M., . . . Iljin, K. (2012). Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. *British Journal of Cancer*, 106(1), 99-106. doi: 10.1038/bjc.2011.530
- Ketola, K., Hilvo, M., Hyötyläinen, T., Vuoristo, A., Ruskeepää, A. L., Orešič, M., . . . Iljin, K. (2012). Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. *British Journal of Cancer*, 106(1), 99-106. doi: 10.1038/bjc.2011.530
- Kim, K. Y., Yu, S. N., Lee, S. Y., Chun, S. S., Choi, Y. L., Park, Y. M., . . . Ahn, S. C. (2011). Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*, 413(1), 80-86. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.054
- Klose, J., Trefz, S., Wagner, T., Steffen, L., Preißendörfer Charrier, A., Radhakrishnan, P., . . . Schmidt, T. (2019). Salinomycin: Anti-tumor activity in a pre-clinical colorectal cancer model. 14(2), e0211916. doi: 10.1371/journal.pone.0211916
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75. doi: 10.4161/org.4.2.5851
- Komura, K., Sweeney, C. J., Inamoto, T., Ibuki, N., Azuma, H., & Kantoff, P. W. (2018). Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *Int J Urol*, 25(3), 220-231. doi: 10.1111/iju.13512

- Krishnamurthy, N., & Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev*, 62, 50-60. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.002
- Kulik, G. (2014). Precision therapy to target apoptosis in prostate cancer. *Exp Oncol*, 36(4), 226-230.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
- Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. *CA Cancer J Clin*. doi: 10.3322/caac.21660
- Lee, S., & Rauch, J. (2020). Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. 21(3). doi: 10.3390/ijms21031102
- Lee, Y., Yoon, J., Ko, D., Yu, M., Lee, S., & Kim, S. (2021). TMPRSS4 promotes cancer stem-like properties in prostate cancer cells through upregulation of SOX2 by SLUG and TWIST1. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 372. doi: 10.1186/s13046-021-02147-7
- Li, C., Liang, Y., Cao, J., Zhang, N., Wei, X., Tu, M., . . . Xu, Y. (2019). The Delivery of a Wnt Pathway Inhibitor Toward CSCs Requires Stable Liposome Encapsulation and Delayed Drug Release in Tumor Tissues. *Mol Ther*, 27(9), 1558-1567. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.06.013
- Li, L., Cui, D., Ye, L., Li, Y., Zhu, L., Yang, L., . . . Cao, Y. (2017). Codelivery of salinomycin and docetaxel using poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles to target both gastric cancer cells and cancer stem cells. *Anticancer Drugs*, 28(9), 989-1001. doi: 10.1097/cad.0000000000000541
- Li, L., Liu, C., Amato, R. J., Chang, J. T., Du, G., & Li, W. (2014). CDKL2 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Oncotarget*, 5(21), 10840-10853. doi: 10.18632/oncotarget.2535
- Li, Z., Xuan, Z., Chen, J., Song, W., Zhang, S., Jin, C., . . . Song, P. (2020). Inhibiting the NF-κB pathway enhances the antitumor effect of cabazitaxel by downregulating Bcl-2 in pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 57(1), 161-170. doi: 10.3892/ijo.2020.5053
- Liu, Q., Sun, J., Luo, Q., Ju, Y., & Song, G. (2021). Salinomycin Suppresses Tumorigenicity of Liver Cancer Stem Cells and Wnt/Beta-catenin Signaling. *Curr Stem Cell Res Ther*, 16(5), 630-637. doi: 10.2174/1574888X15666200123121225
- Lotze, M. T., & Demarco, R. A. (2004). Dying dangerously: Necrotic cell death and chronic inflammation promote tumor growth. *Discov Med*, 4(24), 448-456.
- Lu, D., Choi, M. Y., Yu, J., Castro, J. E., Kipps, T. J., & Carson, D. A. (2011). Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), 13253-13257. doi: 10.1073/pnas.1110431108
- Lu, W., & Li, Y. (2014). Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/β-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *J Cell Biochem*, 115(10), 1799-1807. doi: 10.1002/jcb.24850
- Luo, J., Wang, D., Wan, X., Xu, Y., Lu, Y., Kong, Z., . . . Xu, Y. (2020). Crosstalk Between AR and Wnt Signaling Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer Growth. *Onco Targets Ther*, 13, 9257-9267. doi: 10.2147/ott.s245861

- Ma, B., & Hottiger, M. O. (2016). Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol*, 7, 378. doi: 10.3389/fimmu.2016.00378
- Mackey, T. J., Borkowski, A., Amin, P., Jacobs, S. C., & Kyprianou, N. (1998). bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology*, 52(6), 1085-1090. doi: 10.1016/s0090-4295(98)00360-4
- Mahira, S., Kommineni, N., Husain, G. M., & Khan, W. (2019). Cabazitaxel and silibinin co-encapsulated cationic liposomes for CD44 targeted delivery: A new insight into nanomedicine based combinational chemotherapy for prostate cancer. *Biomed Pharmacother*, 110, 803-817. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.145
- Mandal, R., Barrón, J. C., Kostova, I., Becker, S., & Strebhardt, K. (2020). Caspase-8: The double-edged sword. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1873(2), 188357. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188357
- Maria, T., Panagiotis, A., Marina, C., Eleni, K., Ioanna, V., Georgia, M., & Ioannis, P. (2014). How prostate-specific membrane antigen level may be correlated with stemness in prostate cancer stem cell-like cell populations? *J Cancer Res Ther*, 10(1), 133-141. doi: 10.4103/0973-1482.131461
- Mendez, M. G., Kojima, S., & Goldman, R. D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *Faseb Journal*, 24(6), 1838-1851. doi: 10.1096/fj.09-151639
- Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., & Alfano, C. M. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. 69(5), 363-385. doi: 10.3322/caac.21565
- Miyao, T., Koike, H., Sekine, Y., Ohtsu, A., Oka, D., & Suzuki, K. (2020). YM155 Reverses Cabazitaxel Resistance in Castration-resistant Prostate Cancer by Reducing Survivin Expression. *Anticancer Res*, 40(9), 5091-5095. doi: 10.21873/anticancer.14512
- Mohammadian, J., Sabzichi, M., Molavi, O., Shanehbandi, D., & Samadi, N. (2016). Combined Treatment with Stattic and Docetaxel Alters the Bax/Bcl-2 Gene Expression Ratio in Human Prostate Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(11), 5031-5035. doi: 10.22034/apjcp.2016.17.11.5031
- Momparler, R. L., Côté, S., Momparler, L. F., & Idaghdour, Y. (2014). Epigenetic therapy of acute myeloid leukemia using 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with inhibitors of histone methylation and deacetylation. *Clin Epigenetics*, 6(1), 19. doi: 10.1186/1868-7083-6-19
- Moore, A. R., Rosenberg, S. C., McCormick, F., & Malek, S. (2020). RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat Rev Drug Discov*, 19(8), 533-552. doi: 10.1038/s41573-020-0068-6
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., & Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 19(4), 555-566. doi: 10.1007/s10495-014-0967-2
- Murillo-Garzón, V., & Kypta, R. (2017). WNT signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 14(11), 683-696. doi: 10.1038/nrurol.2017.144
- Najafi, M., Mortezaee, K., & Majidpoor, J. (2019). Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci*, 234, 116781. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116781

- Naseri, M. H., Mahdavi, M., Davoodi, J., Tackallou, S. H., Goudarzvand, M., & Neishabouri, S. H. (2015). Up regulation of Bax and down regulation of Bcl2 during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Cell Int*, 15, 55. doi: 10.1186/s12935-015-0204-2
- Naujokat, C., & Steinhart, R. (2012). Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 950658. doi: 10.1155/2012/950658
- Nguyen-Nielsen, M., & Borre, M. (2016). Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*, 46(6), 484-490. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.07.002
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(12), 767-779. doi: 10.1038/nrm3470
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
- Nistico, P., Bissell, M. J., & Radisky, D. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(2). doi: 10.1101/cshperspect.a011908
- Onyeagucha, B., Subbarayalu, P., Abdelfattah, N., Rajamanickam, S., Timilsina, S., Guzman, R., . . . Rao, M. K. (2017). Novel post-transcriptional and post-translational regulation of pro-apoptotic protein BOK and anti-apoptotic protein Mcl-1 determine the fate of breast cancer cells to survive or die. *Oncotarget*, 8(49), 85984-85996. doi: 10.18632/oncotarget.20841
- Oudard, S., Fizazi, K., Sengeløv, L., Daugaard, G., Saad, F., Hansen, S., . . . Sartor, O. (2017). Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA. *J Clin Oncol*, 35(28), 3189-3197. doi: 10.1200/jco.2016.72.1068
- Papa, A., & Pandolfi, P. P. (2019). The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*, 9(4). doi: 10.3390/biom9040153
- Park, S., Kwon, W., Park, J. K., Baek, S. M., Lee, S. W., Cho, G. J., . . . Choi, S. K. (2020). Suppression of cathepsin a inhibits growth, migration, and invasion by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in prostate cancer. *Arch Biochem Biophys*, 688, 108407. doi: 10.1016/j.abb.2020.108407
- Patel, R., Brzezinska, E. A., Repiscak, P., & Ahmad, I. (2020). Activation of β -Catenin Cooperates with Loss of Pten to Drive AR-Independent Castration-Resistant Prostate Cancer. *80*(3), 576-590. doi: 10.1158/0008-5472.can-19-1684
- Pearson, H. B., & Li, J. (2018). Identification of Pik3ca Mutation as a Genetic Driver of Prostate Cancer That Cooperates with Pten Loss to Accelerate Progression and Castration-Resistant Growth. *8*(6), 764-779. doi: 10.1158/2159-8290.cd-17-0867
- Perlman, H., Zhang, X., Chen, M. W., Walsh, K., & Buttyan, R. (1999). An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ*, 6(1), 48-54. doi: 10.1038/sj.cdd.4400453
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 19(2). doi: 10.3390/ijms19020448

- Qi, D., Liu, Y., Li, J., Huang, J. H., Hu, X., & Wu, E. (2022). Salinomycin as a potent anticancer stem cell agent: State of the art and future directions. *42*(3), 1037-1063. doi: 10.1002/med.21870
- Qu, H., Ma, B., Yuan, H. F., Wang, Z. Y., Guo, S. J., & Zhang, J. (2015). Effect of salinomycin on metastasis and invasion of bladder cancer cell line T24. *Asian Pac J Trop Med*, *8*(7), 578-582. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.06.004
- Qu, N., Lee, R. J., Sun, Y., Cai, G., Wang, J., Wang, M., . . . Teng, L. (2016). Cabazitaxel-loaded human serum albumin nanoparticles as a therapeutic agent against prostate cancer. *Int J Nanomedicine*, *11*, 3451-3459. doi: 10.2147/ijn.s105420
- Raisova, M., Hossini, A. M., Eberle, J., Riebeling, C., Wieder, T., Sturm, I., . . . Geilen, C. C. (2001). The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*, *117*(2), 333-340. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., . . . Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*, *7*(1), 9. doi: 10.1038/s41572-020-00243-0
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, *434*(7035), 843-850. doi: 10.1038/nature03319
- Ryan, C. J., Smith, M. R., Fong, L., Rosenberg, J. E., Kantoff, P., Raynaud, F., . . . Small, E. J. (2010). Phase I clinical trial of the CYP17 inhibitor abiraterone acetate demonstrating clinical activity in patients with castration-resistant prostate cancer who received prior ketoconazole therapy. *J Clin Oncol*, *28*(9), 1481-1488. doi: 10.1200/jco.2009.24.1281
- Savaee, M., Bakhshi, A., Yaghoubi, F., Pourrajab, F., & Goodarzvand Chegini, K. (2022). Evaluating the Effects of Separate and Concomitant Use of MK-2206 and Salinomycin on Prostate Cancer Cell Line. *Rep Biochem Mol Biol*, *11*(1), 157-165. doi: 10.52547/rbmb.11.1.157
- Shang, Z., Cai, Q., Zhang, M., Zhu, S., Ma, Y., Sun, L., . . . Niu, Y. (2015a). A switch from CD44(+) cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. *Oncotarget*, *6*(2), 1202-1216. doi: 10.18632/oncotarget.2841
- Shang, Z., Cai, Q., Zhang, M., Zhu, S., Ma, Y., Sun, L., . . . Niu, Y. (2015b). A switch from CD44⁺ cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. *Oncotarget*, *6*(2), 1202-1216. doi: 10.18632/oncotarget.2841
- Sheng, S., Margarida Bernardo, M., Dzinic, S. H., Chen, K., Heath, E. I., & Sakr, W. A. (2018). Tackling tumor heterogeneity and phenotypic plasticity in cancer precision medicine: our experience and a literature review. *Cancer Metastasis Rev*, *37*(4), 655-663. doi: 10.1007/s10555-018-9767-4
- Shorning, B. Y., Dass, M. S., & Smalley, M. J. (2020). The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *21*(12). doi: 10.3390/ijms21124507
- Shorning, B. Y., Dass, M. S., Smalley, M. J., & Pearson, H. B. (2020). The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12). doi: 10.3390/ijms21124507
- Singh, P., & Lim, B. (2022). Targeting Apoptosis in Cancer. *Current Oncology Reports*, *24*(3), 273-284. doi: 10.1007/s11912-022-01199-y

- Skeberdytė, A., Sarapinienė, I., Aleksander-Krasko, J., Stankevičius, V., Sužiedėlis, K., & Jarmalaitė, S. (2018). Dichloroacetate and Salinomycin Exert a Synergistic Cytotoxic Effect in Colorectal Cancer Cell Lines. *Sci Rep*, 8(1), 17744. doi: 10.1038/s41598-018-35815-4
- Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I., & Tomic-Canic, M. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*, 365(3), 495-506. doi: 10.1007/s00441-016-2464-0
- Sung, H., Ferlay, J., & Siegel, R. L. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *71*(3), 209-249. doi: 10.3322/caac.21660
- Takebe, N., Miele, L., Harris, P. J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., . . . Ivy, S. P. (2015). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(8), 445-464. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.61
- Tang, W., Xue, R., Weng, S., Wu, J., Fang, Y., Wang, Y., . . . Dong, L. (2015). BIRC6 promotes hepatocellular carcinogenesis: interaction of BIRC6 with p53 facilitating p53 degradation. *Int J Cancer*, 136(6), E475-487. doi: 10.1002/ijc.29194
- Thorpe, L. M., Yuzugullu, H., & Zhao, J. J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*, 15(1), 7-24. doi: 10.1038/nrc3860
- Tian, J. Y., Guo, F. J., Zheng, G. Y., & Ahmad, A. (2018). Prostate cancer: updates on current strategies for screening, diagnosis and clinical implications of treatment modalities. *Carcinogenesis*, 39(3), 307-317. doi: 10.1093/carcin/bgx141
- Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, 144(8), 1382-1398. doi: 10.1242/dev.148270
- Toops, K. A., Tan, L. X., & Lakkaraju, A. (2014). A detailed three-step protocol for live imaging of intracellular traffic in polarized primary porcine RPE monolayers. *Exp Eye Res*, 124, 74-85. doi: 10.1016/j.exer.2014.05.003
- Tyagi, M., & Patro, B. S. (2019). Salinomycin reduces growth, proliferation and metastasis of cisplatin resistant breast cancer cells via NF-kB deregulation. *Toxicol In Vitro*, 60, 125-133. doi: 10.1016/j.tiv.2019.05.004
- Versini, A., & Colombeau, L. (2020). Salinomycin Derivatives Kill Breast Cancer Stem Cells by Lysosomal Iron Targeting. *26*(33), 7416-7424. doi: 10.1002/chem.202000335
- Wagner, J., Kline, C. L., Zhou, L., Campbell, K. S., MacFarlane, A. W., Olszanski, A. J., . . . El-Deiry, W. S. (2018). Dose intensification of TRAIL-inducing ONC201 inhibits metastasis and promotes intratumoral NK cell recruitment. *J Clin Invest*, 128(6), 2325-2338. doi: 10.1172/jci96711
- Wang, Q., & Yen, Y. T. (2021). Combined delivery of salinomycin and docetaxel by dual-targeting gelatinase nanoparticles effectively inhibits cervical cancer cells and cancer stem cells. *28*(1), 510-519. doi: 10.1080/10717544.2021.1886378
- Wang, W., Wang, L., Mizokami, A., Shi, J., Zou, C., Dai, J., . . . Zhang, J. (2017). Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin J Cancer*, 36(1), 35. doi: 10.1186/s40880-017-0203-x

- Ward, G. A., Lewis, E. J., Ahn, J. S., Johnson, C. N., Lyons, J. F., Martins, V., . . . Chessari, G. (2018). ASTX660, a Novel Non-peptidomimetic Antagonist of cIAP1/2 and XIAP, Potently Induces TNF α -Dependent Apoptosis in Cancer Cell Lines and Inhibits Tumor Growth. *Mol Cancer Ther*, 17(7), 1381-1391. doi: 10.1158/1535-7163.mct-17-0848
- Witta, S. E., Gemmill, R. M., Hirsch, F. R., Coldren, C. D., Hedman, K., Ravdel, L., . . . Bunn, P. A., Jr. (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 66(2), 944-950. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1988
- Wolf, I., Gratzke, C., & Wolf, P. (2022). Prostate Cancer Stem Cells: Clinical Aspects and Targeted Therapies. *Front Oncol*, 12, 935715. doi: 10.3389/fonc.2022.935715
- Xu, Z., Xu, L., Ge, Y., Sun, H., Zhu, J., Dou, Q., & Jia, R. (2022). Cabazitaxel suppresses the proliferation and promotes the apoptosis and radiosensitivity of castration-resistant prostate cancer cells by inhibiting PI3K/AKT pathway. *Am J Transl Res*, 14(1), 166-181.
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., . . . Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7), 927-939. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.006
- Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., & Wei, X. (2019). Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*, 18(1), 26. doi: 10.1186/s12943-019-0954-x
- Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., . . . Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 8. doi: 10.1038/s41392-020-0110-5
- Yasumizu, Y., Miyajima, A., Kosaka, T., Miyazaki, Y., Kikuchi, E., & Oya, M. (2014). Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 sensitizes docetaxel in castration resistant prostate cancer. *J Urol*, 191(1), 227-234. doi: 10.1016/j.juro.2013.07.101
- Yip, H. Y. K., & Papa, A. (2021). Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. 10(3). doi: 10.3390/cells10030659
- Yu, J., Yang, Y., Li, S., & Meng, P. (2021). Salinomycin triggers prostate cancer cell apoptosis by inducing oxidative and endoplasmic reticulum stress via suppressing Nrf2 signaling. *Exp Ther Med*, 22(3), 946. doi: 10.3892/etm.2021.10378
- Yu, L., Zhang, M. M., & Hou, J. G. (2022). Molecular and cellular pathways in colorectal cancer: apoptosis, autophagy and inflammation as key players. *Scand J Gastroenterol*, 57(11), 1279-1290. doi: 10.1080/00365521.2022.2088247
- Yu, X., Wang, Y., DeGraff, D. J., Wills, M. L., & Matusik, R. J. (2011). Wnt/beta-catenin activation promotes prostate tumor progression in a mouse model. *Oncogene*, 30(16), 1868-1879. doi: 10.1038/onc.2010.560
- Zhang, J., & Ma, L. (2012). MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 653-662. doi: 10.1007/s10555-012-9368-6

- Zhang, W., Bado, I. L., Hu, J., Wan, Y. W., Wu, L., Wang, H., . . . Zhang, X. H. (2021). The bone microenvironment invigorates metastatic seeds for further dissemination. *Cell*, 184(9), 2471-2486.e2420. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.011
- Zhang, Y., Li, F., Liu, L., Jiang, H., Hu, H., Du, X., . . . Wang, Y. (2019). Salinomycin triggers endoplasmic reticulum stress through ATP2A3 upregulation in PC-3 cells. *BMC Cancer*, 19(1), 381. doi: 10.1186/s12885-019-5590-8
- Zhang, Y., Li, F., Liu, L., Jiang, H., Jiang, X., Ge, X., . . . Wang, Y. (2018). Salinomycin-induced autophagy blocks apoptosis via the ATG3/AKT/mTOR signaling axis in PC-3 cells. *Life Sci*, 207, 451-460. doi: 10.1016/j.lfs.2018.06.034
- Zhang, Y., Liu, L., Li, F., Wu, T., Jiang, H., Jiang, X., . . . Wang, Y. (2017). Salinomycin Exerts Anticancer Effects on PC-3 Cells and PC-3-Derived Cancer Stem Cells In Vitro and In Vivo. 2017, 4101653. doi: 10.1155/2017/4101653
- Zhang, Y., Liu, Q. Z., Wei, W., Zhang, G. A., Yan, S. Y., Dai, R. R., . . . Li, C. L. (2021). Bortezomib potentiates antitumor activity of mitoxantrone through dampening Wnt/beta-catenin signal pathway in prostate cancer cells. *Bmc Cancer*, 21(1). doi: ARTN 1101 10.1186/s12885-021-08841-1
- Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 165. doi: 10.1186/s13045-020-00990-3

ÖZGEÇMİŞ

Rıza Serttaş ilk ve orta öğrenimini 1997-2005 yıllarında, lise öğrenimini ise Ko-caeli Fen Lisesi’nde 2009 yılında tamamladı. İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyolo-ji ve Genetik Bölümü’ne başladı. Lisans öğrenimi boyunca çeşitli yerlerde staj yaptı: biyoteknoloji, mikrobiyal genetik, moleküler biyoloji ve sitogenetik konusunda teknikler öğrendi. Son yıl bitirme tezi kapsamında “Gebelikte Endotel Disfonksi-yonuna Bağlı Genetik Komplikasyonlar” isimli araştırmasını gerçekleştirdi. Lisans eğitiminden Haziran 2013’de mezun olduktan sonra İstanbul Üniversitesi Cerrah-paşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. Burada sitogenetik üzeri-ne çalışmalar gerçekleştiren Serttaş, 2015 yılında Trakya Üniversitesi-Tıbbi Bi-yoloji Anabilim Dalı’na atanarak Edirne’ye yerleşti. Aynı üniversitede yüksek lisans eğitimine yeniden başladı ve 2017 yılında mezun oldu. Ardından Trakya Üniversitesi-Biyoteknoloji ve Genetik programına başvurup doktora öğrenimine başladı. Kurumda çalışmaya başladığı süreç boyunca 11 SCI, 7 uluslararası bildiri ve 3 ulusal bildiride yazar oldu. Ekim 2016’dan beri evli olan Serttaş, araştırmalarına Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde öğretim elemanı olarak devam etmektedir.

TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

Serttas, R., Erdogan, S., (2023). Pretreatment of prostate cancer cells with salinomycin and Wnt inhibitor increases the efficacy of cabazitaxel by inducing apoptosis and decreasing cancer stem cells. Medical Oncology. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02062-1>

Serttas R., Erdogan S. (2021). Pretreatment of Salinomycin and Wnt Pathway Inhibitor Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells. XVII. Congress of Medical Biology and Genetics, 28th - 31st of October 2021, İstanbul University.

DİĞER BİLİMSEL FAALİYETLER

A. YAYINLAR

Cevik, D., Erdogan, S., **Serttas, R.**, Kan, Y. & Kırmızıbekmez, H. (2022), Cytotoxic and antimigratory activity of retrochalcones from Glycyrrhiza echinata L. on human cancer cells. Chem. Biodiversity. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200589>

Erdogan, S., **Serttas, R.**, Turkekul, K., & Dibirdik, I. (2022). The synergistic anticancer effect of salinomycin combined with cabazitaxel in CD44+ prostate cancer cells by downregulating wnt, NF-κB and AKT signaling. Molecular biology reports. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07343-y>

Genc, F., Atabey, U.S., **Serttas, R.** & Erdogan, S. (2022). Abiraterone acetate in combination with apigenin attenuates survival of human castration-sensitive prostate cancer cells. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 22. <https://dx.doi.org/10.2174/1871520622666220426095257>

Cinar, A. K., Ozal, S. A., **Serttas, R.**, & Erdogan, S. (2021). Eupatilin attenuates TGF-β2-induced proliferation and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. Cutaneous and Ocular Toxicology, 1-12. <https://doi.org/10.1080/15569527.2021.1902343>

Serttas, R., Koroglu, C., & Erdogan, S. (2021). Eupatilin Inhibits the Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells through Modulation of PTEN and NF-KB Signaling. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 21(3), 372-382. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200811113549>

Ince, T., **Serttas, R.**, Demir, B., Atabey, H., Seferoglu, N., Erdogan, S., Sahin, E., Erat, S. & Nural, Y. (2020). Polysubstituted pyrrolidines linked to 1, 2, 3-triazoles: Synthesis, crystal structure, DFT studies, acid dissociation constant, drug-likeness, and anti-proliferative activity. *Journal of Molecular Structure*, 1217, 128400. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128400>

Beken, B., **Serttas, R.**, Yazicioglu, M., Turkecul, K., & Erdogan, S. (2020). Quercetin Improves Inflammation, Oxidative Stress, and Impaired Wound Healing in Atopic Dermatitis Model of Human Keratinocytes. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*. <https://doi.org/10.1089/ped.2019.1137>

Erdogan, S., Doganlar, ZB., Doganlar, O., Turkecul, K., **Serttas, R.** (2017). Inhibition of midkine suppresses prostate cancer CD133+ stem cell growth and migration. *Am J Med Sci.*, 354, 299-309, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjms.2017.04.019>

Erdogan, S. Turkecul, K., **Serttas, R.**, Erdogan, Z. The natural flavonoid apigenin sensitizes human CD44+ prostate cancer stem cells to cisplatin therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 88, 210-217.

Erdogan, S., Doganlar O., Doganlar, ZB, **Serttas, R.**, Turkecul, K., Dibirdik, I., Bilir, A. The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44+ stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF-κB signaling, *Life Sciences*. 162, 77-86.

B. BİLDİRİLER

Çevik D., Erdogan S., **Serttas R.**, Kan Y., Kırmızıbekmez H. (2022) Bioassay-guided isolation of cytotoxic retrochalcones from *Glycyrrhiza echinata* L. roots and elucidation of their cell death mechanisms. *Planta Med.* 88(15): 1480-1481 doi: 10.1055/s-0042-1759113.

Küpelı Çınar, A., Özal, S.A., **Serttaş R.**, Çınar, A.C., Erdoğan S. (2021). Eupatilin attenuates TGF- β 2-induced proliferation and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. EURETINA 2021 Virtual, 9-12 September 2021, County Dublin, Ireland.

Koroglu Ç., **Serttas R.**, Erdogan S. (2019). Eupatilin Inhibits Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration Through Inducing Apoptosis. 2nd International Conference on Veterinary Biochemistry & Clinical Biochemistry, October 24th-26th 2019, Ankara University.

Erdogan S., Turkecul K., **Serttas R.**, Doganlar Z.B., Doganlar O., Dibirdik I., & Bilir A. (2018, July). Downregulation of midkine enhances the efficacy of quercetin on androgen-sensitive prostate cancer stem cell survival through arresting cell cycle and inducing apoptosis. In FEBS OPEN BIO (Vol. 8, pp. 327-327). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.

Serttas R., Erdogan S. (2017). Triapine Induces Apoptosis Of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Through Endoplasmic Reticulum Stress, VI. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul University.

Erdogan S., Turkecul K., **Serttas R.**, Doganlar O., Doganlar Z.B., Dibirdik I., Bilir A. (2017). Inhibition of Growth Factor Midkine By siRNA Enhances The Effects of Quercetin on CD133/44 Prostate Cancer Stem Cells, VI. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul University.

Erdogan, S., Doganlar O., Doganlar, Z.B., **Serttas, R.**, Turkecul, K., Dibirdik, I., Bilir, A. (2016). The flavonoid apigenin reduces survival and migration of CD44+ prostate cancer stem cells. FEBS J, 283: P-05.03.3-006. doi:10.1111/febs.13806.

Doganlar O., Doganlar Z.B., Merakli M.A., **Serttas R.**, Ustunol E. Ferulik asidin insan meme ve prostat kanseri hücrelerinde oksidatif stres ilişkili apoptotik ve antikanserojen etkileri. XIV. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ, 2015/10.

Doganlar Z.B., Tabakcioglu K., Ongoren G., **Serttas R.**, Erdogan S. Kan Dokusunda Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Potansiyel Karsinojen Etkisi. Deneyisel Hematoloji Kongresi, 2015/4.