

T.C

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON(GHRH) ÖZGÜ
APTAMERLERİN KOLON VE PANKREAS KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA TERAPÖTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlayda SÖNMEZ

1402060015

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

HAZİRAN 2021

T.C

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON(GHRH) ÖZGÜ
APTAMERLERİN KOLON VE PANKREAS KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA TERAPÖTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlayda SÖNMEZ

1402060015

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

**Asil Jüri Üyeleri: Prof Dr. Elif Damla ARISAN
Dr. Alp AYAN**

HAZİRAN 2021

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans ve laboratuvar tecrübelerimi edindiğim yıllarda, çalıştığım tüm projelerde, yürüttüğüm tezimde ve diğer tüm süreçlerde benden desteğini esirgemeyen, benimle bilgi birikimlerini ve deneyimlerini paylaşan değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr.Ajda ÇOKER-GÜRKAN'a,

Yüksek Lisans ve laboratuvar sürecimde bana daima doğru yolu gösteren, her gün yeni bir bilgi sahibi olmamı sağlayan ve bölümümü her zaman bana daha çok sevdiren hocalarım Sayın Prof.Dr.Narçın PALAVAN- ÜNSAL, Sayın Prof.Dr.Elif Damla ARISAN, Sayın Doç.Dr Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya.

Yüksek Lisansım sürecinde her açıdan desteklerini hissettiğim, aradığım cevaplara daima beni sabırla yönlendiren çok değerli hocam Araş. Gör. Burcu AYHAN-ŞAHİN'e,

Yüksek Lisans ve Laboratuvar sürecimde benden sabırlarını ve güler yüzlerini eksik etmeyen, her durumda bana destek olan sevgili hocalarım Araş.Gör Özge BERRAK-RENCÜZOĞULLARI, Araş.Gör Pelin ÖZFİLİZ-KILBAŞ'a,

Lisans ve laboratuvar hayatımı her zaman kolaylaştıran, zorlandığım her durumda bana farklı bir bakış açısı sunan, cesaretim kırıldığında tekrar cesaretlenmemi ve hep daha iyisi için çabalamamı sağlayan çok değerli Anıl Deniz BAKİ'ye

Yüksek Lisans ve laboratuvar hayatımda yaptığım tüm çalışmalarda her zaman desteğini ve güvenini benden eksik etmeyen, tüm zorluklarıma ortak olan dostlarım sevgili Kübra SELÇUK ve Tuğçe ÇELİK'e,

Lisans ve laboratuvar sürecimde bana her zaman en büyük desteği ve sevgiyi veren, her zaman daha ileriye gidebileceğimi ve asla pes etmemem gerektiğini hissettiren, haklarını asla ödeyemeyeceğim çok sevgili ve değerli ailem, annem Ebru SÖNMEZ, babam Cüneyt SÖNMEZ ve kardeşim Sevin SÖNMEZ'e en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında (Proje no:117Z254) desteklenmiştir. Verilen desteklerden dolayı TÜBİTAK'a ve bu doğrultuda yaptığım moleküler çalışmalara olanak sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi-Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü araştırma laboratuvarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ-----	i
İÇİNDEKİLER-----	iii
TABLO LİSTESİ-----	vii
ŞEKİL LİSTESİ-----	viii
KISALTMA LİSTESİ-----	xi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ-----	xiv
ÖZET-----	xv
ABSTRACT-----	xvii
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ-----	1
1.1 GİRİŞ-----	1
1.2 AMAÇ-----	3
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER-----	4
2.1 Kanser-----	4
2.2 Kolon Kanseri-----	4
2.2.1 Kolon Anatomisi-----	5
2.2.2 Kolon Kanseri Epidemiyolojisi(kolon kanseri risk faktörleri)-----	6
2.2.2.1 İnsidans-----	6
2.2.2.2 Mortalite-----	8
2.2.3 Kolon Kanseri Risk Faktörleri-----	9
2.2.3.1 Kalıtsal CRC sendromları-----	9
2.2.3.1.1 FAP-----	10
2.2.3.1.2 MUTYH ile İlişkili Polipoz (MAP)-----	10
2.2.3.1.3 Lynch Sendromu-----	11
2.2.3.2 Sporadik CRC'lerin veya Adenomatöz Poliplerin Kişisel veya Ailesel Öyküsü-----	11
2.2.5 Kolon Kanserinin Moleküler Patolojisi-----	12
2.3 Pankreas Kanseri-----	15
2.3.1 Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi-----	16
2.3.1.1 İnsidans (pankreas kanseri 3)-----	16
2.3.1.2 Mortalite-----	18
2.3.2 Pankreas Kanseri Risk Faktörleri-----	20

2.3.2.1 Değiştirilebilir Risk Faktörleri -----	20
2.3.2.1.1 Tütün Ürünü Kullanımı -----	20
2.3.2.1.2 Alkol Kullanımı-----	21
2.3.2.1.3 Obezite -----	21
2.3.2.1.4 Diyet Faktörleri -----	22
2.3.2.1.5 Mesleki Maruziyetler -----	22
2.3.2.2 Değiştirilemez Risk Faktörleri -----	23
2.3.2.2.1 Cinsiyet -----	23
2.3.2.2.2 Yaş-----	23
2.3.2.2.3. Etnik Köken -----	24
2.3.2.2.4 Diyabet-----	24
2.3.2.2.5 Aile Öyküsü -----	25
2.3.3. Pankreas Kanseri Tedavisi -----	25
2.3.3.1 Kemoterapi -----	25
2.3.3.1.1 Adjuvan Ayarı -----	26
2.3.3.1.2 Çıkarılamayan / Metastatik Hastalık -----	26
2.3.3.4 İmmünoterapi-----	26
2.3.4 Pankreas Kanserinin Moleküler Patolojisi-----	27
2.4 GHRH-----	29
2.4.1 GHRH Proteini -----	29
2.4.2 GHRH Reseptörü -----	30
2.4.3 GHRH ve Kanseri İlişkisi-----	30
2.4.4 GHRH Özgü Peptid Antagonistleri -----	31
2.4.5 GHRH Özgü Peptid Antagonistlerinin İn Vitro ve İn Vivo Mekanizmaları-----	33
2.5.Aptamer-----	36
2.5.1 Aptamer Sentezi-----	37
2.5.2 X-Aptamer -----	41
2.5.3 Aptamer Modifikasyonları ve Tipleri -----	41
2.5.4 Aptamerlerin Kullanım Alanları -----	44
2.5.6 Tedavide Aptamerlerin Rolü -----	45
2.6 EMT -----	47
2.7 ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES -----	48
2.8 OTOFAJİ -----	50
2.9 APOPTOZ-----	51
BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD -----	52

3.1 KULLANILAN MATERYALLER-----	52
3.1.1 Kullanılan Cihazlar -----	52
2.1.2 Kullanılan Kimyasallar-----	52
2.1.3 Hücre Kültürü Aparatları-----	52
2.2 KULLANILAN YÖNTEMLER -----	52
2.2.1 Hücre Kültürü -----	52
2.2.1.1 MiaPaca-1 Pankreas Kanseri Hücre Hattı -----	52
2.2.1.2 HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattı -----	53
2.2.2 Hücre Hatlarının Dondurulması-----	53
2.2.3 Hücre Hatlarının Açılması -----	54
2.2.4 Hücre Hatlarının Pasajlanması -----	54
2.2.5 Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)-----	55
2.2.6 Hücre Hatlarının Sağkalım Kapasitelerinin Belirlenmesi -----	55
2.2.7 Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitelerinin İncelenmesi-----	56
2.2.8 Yara Kapanma Deneyi -----	56
2.2.9 Asılı Damla Hücre Modeli-----	57
2.2.10 Mikroskop Aracılı Yöntemler-----	57
2.2.10.1 Işık Mikroskobu Aracılı Yöntemler-----	57
2.2.10.2 Floresan Mikroskobu Aracılı Yöntemler-----	58
2.2.10.2.1 3,3' Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) Boyama -----	58
2.2.10.2.2 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama -----	58
2.2.10.2.3 Propidyum İyodür (PI) Boyama-----	59
2.2.10.2.4 DCFDA Boyama -----	59
2.2.10.2.5 Fura2 Boyama -----	59
2.2.10.3 İmmünofloresan -----	59
2.2.11 Hücre Akış Sitometrisi-----	61
2.2.11.1 PI Analizi -----	61
2.2.11.2 Annexin V/PI Analizi-----	61
2.2.12 Protein İfadesinin Belirlenmesi -----	62
2.2.12.1 Toplam Protein İzolasyonu -----	62
2.2.12.2 Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini -----	62
2.2.13 İmmünoablamlama-----	62
2.2.13.1 SDS-PAGE Jel Hazırlanması -----	62
2.2.13.2 Protein Örneklerinin Hazırlanması-----	63
2.2.13.3 Transfer ve Bloklama -----	63

2.2.13.4 Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemesi -----	63
2.2.13.5 Görüntü Alınması -----	64
BÖLÜM 4. SONUÇLAR-----	65
4.1 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Doza ve Zamana Bağımlı Olarak HT29 Kolon Kanseri ve MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi -----	65
4.2 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının MIA Paca-2 ve HT-29 hücreleri üzerine etkisinin Yara Kapanma Deneyi ile gösterilmesi -----	67
4.3 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin HT-29 Kolon Kanseri ve MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında hücre ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisinin gösterilmesi-----	70
4.4 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Koloni oluşumu Üzerine etkisinin Asılı Damla Modeli ile Belirlenmesi -----	74
4.5 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının GHRH sinyalini bloke etmesinin GH ve GHRHR anlatımı üzerinden immunofloresan boyama ile Mia Paca-2 hücrelerinde gösterilmesi -----	78
TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının GHRH sinyaline bloke edip etmediğini kontrol edebilmek için GHRH aşağı sinyal yolak elemanları olan GH ve GHRHR anlatımının kontrol edilmesi için immunofloresan boyaması gerçekleştirilmiştir. Immunofloresan boyaması sonucuna göre kontrol hücrelerde ve pozitif kontrol olan GHRH peptit uygulanmış olan hücrelerde GH ve GHRHR anlatımının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 72 saat boyunca 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının hem GH hem de GHRHR anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi gözlemlenmiştir (Şekil 31). -----	78
4.6 MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin Hücre Akış Sitometrisi aracılı gösterilmesi -----	79
4.7 MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Hücre Akış Sitometrisi aracılı gösterilmesi -----	82
4.8 MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 Aptamer Uygulamasının ER Stres – EMT - Otofaji - Apoptotik Ölüm Üzerine Etkisinin Immunoblotlama ile Gösterilmesi-----	85
BÖLÜM 5. TARTIŞMA-----	90
EKLER -----	102
REFERANSLAR -----	109

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. SELEX yöntemi tiplerinin gösterilmesi, SELEX tiplerinin avantajları ve dezavantajlarının açıklanması (Zhang ve ark., 2019).	39
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar	103
Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar	104
Tablo 4. Kullanılan Hücre Kültürü Aparatları	105
Tablo 5. Kullanılan Tamponların İçeriği	106
Tablo 6. Kemiluminesans Görüntüleme Tamponları İçeriği	107
Tablo 7. %12 (v/v) Poliakrilamid Jel İçeriği	107

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kolon kanserinin bölgelere göre görülme sıklığı(Dekker ve ark., 2013).	5
Şekil 2. Kalın bağırsağın bölgeleri. Kalın bağırsağın bölümlerinin ayrıntılı bir şekilde gösterilmesi(Cummings ve ark., 2015).	5
Şekil 3. Yaşa özgü kolorektal kanser insidansı, tüm ırklardan kadın ve erkeklerde 2004 ile 2013 yılları arasında ölçülmüştür(Macrae ve ark., 2020).	7
Şekil 5. Anatomik alt gruplara göre risk veya koruyucu faktörler ile kolorektal kanser riski arasındaki ilişkilerin özeti. ↑↑, ikna edici risk faktörü; ↑, olası risk faktörü; ↓↓, ikna edici koruyucu faktör; ↓, olası koruyucu faktör; BMI, vücut kitle indeksi; CI, güven aralığı; CRC, kolorektal kanser; MET, görevin metabolik eşdeğeri; RR, göreceli risk; WC, bel çevresi[36].	12
Şekil 6. Kolorektal Kanser gelişim yolları.	13
Şekil 7. Kolorektal kanserin şematik sınıflandırılması ve tümör gelişim mekanizmasının gösterilmesi(Gupta ve ark., 2018).	14
Şekil 8. Harita, hem cinsiyetler hem de tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaşa göre standardize edilmiş insidans oranlarını (ASR) göstermektedir(GLOBACAN).	18
Şekil 9. Harita, hem cinsiyetler hem de tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranlarını (ASR) göstermektedir(GLOBACAN).	19
Şekil 10. Çubuk grafik, hem cinsiyetler hem de tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya genelinde pankreas kanseri için tahmini yaşa standardize edilmiş insidans ve ölüm oranlarını (ASR) göstermektedir(GLOBACAN).	19
Şekil 10. Pankreas Kanserinin Gelişim Yolu. Pankreas kanseri, iki histolojik alt tip olan PanIN ve IPMN'lerin gelişmesiyle meydana gelir. Patogenezin ilerleyen aşamalarında moleküler değişiklikler meydana gelir. Bu lezyonlarda meydana gelen genetik değişiklikler, en sık meydana geldikleri aşamalarda gösterilmiştir(Grant ve ark., 2018).	28
Şekil 11. Akuttan kronik pankreatite ve pankreas kanserine hastalığın ilerlemesi ile ilişkili yaygın yolaklar. Pankreatit, hücresel ortamdaki değişiklikler ve erken sindirim enzimi aktivasyonu ile başlar. Tripsinojen aktivasyonu / inaktivasyonu ile ilişkili gen mutasyonları, pankreası hastalık gelişimine yatkın hale getirir. Hastalık ilerledikçe otofaji, artan iltihaplanma, pankreas hücre aktivasyonu ve fibroz meydana gelir. Pankreas kanseri ve metastaza doğru ilerleme aynı zamanda otofajinin yanı sıra hücre dışı matriks degradasyonu, hücre proliferasyonu, onkogenik Kras ekspresyonu ve tümör baskılayıcıların (örneğin, P16 ve P53) kaybı ile ilişkilidir(Koledecik ve ark., 2014).	28
Şekil 12. Akuttan kronik pankreatite ve pankreas kanserine hastalığın ilerlemesi ile ilişkili yaygın yolaklar.	33
Şekil 13. GHRH Antagonistlerinin çalışma mekanizmaları.	35
Şekil 14. TAR RNA'nın Tat proteinine bağlanması. TAR aptameri bir tuzak görevi görmektedir ve Tat proteininin endojen TAR RNA'ya bağlanmasını engeller.	

Böylece HIV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu inhibe etmektedir(Nimjee ve ark., 2018).	36
Şekil 15. Temel SELEX'in şematik gösterimi (Klug & Famulok, 1994).	38
Şekil 16. Bir polinükleotid elementinin kimyasal yapısı. Belirtilen konumlardaki değişiklikler gösterilmektedir. OMe: O-metilasyon, LNA: kilitli nükleik asit, PEG: polietilen glikol.	42
Şekil 17. Aptamerlerin çeşitli uygulama alanları (Song ve ark., 2011).	44
Şekil 18 FIXa'yı hedef alarak antikoagülan olarak aptamerlerin geliştirilme mekanizması. IXa'nın anti-FIXa aptamerleri tarafından inhibe edilebildiği ve böylece kan pıhtılaşmasını önlediği kan pıhtılaşma kademelerinin kısa bir açıklaması gösterilmektedir.....	46
Şekil 19. MiaPaca Pankreas Kanseri hücre hattının morfolojisinin gösterilmesi(ATCC).	52
Şekil 20.HT29 Kolon Kanseri hücre hattının morfolojisinin gösterilmesi(ATCC)...	53
Şekil 21.MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-20 Özgü X-Aptamerlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi.	66
Şekil 22. HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-20 Özgü X-Aptamerlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi.	67
Şekil 23. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-20 Özgü X-Aptamerlerinin Yara Kapanması Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi.	68
Şekil 24.HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-20 Özgü X-Aptamerlerinin Yara Kapanması Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi.	69
Şekil 25. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DCFDA ile Reaktif Oksijen Türevlerinin floresan boyama tekniğiyle gösterilmesi.....	71
Şekil 26. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DCFDA ile Reaktif Oksijen Türevlerinin floresan boyama tekniğiyle gösterilmesi.....	72
Şekil 27. HT29 Kolon Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DAPI ile DNA Kondenzasyonun, DioC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelinin, PI ile Hücre Ölümünün Floresan Boyamalarla Gösterilmesi.	73
Şekil 28. HT29 Kolon Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DCFDA ile Reaktif Oksijen Türevlerinin floresan boyama tekniğiyle gösterilmesi.	74
Şekil 29. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin asılı damla modellerinde hücre çapları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi.....	75
Miapaca-2 pankreas kanseri hücreleri 60 mm'lik petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücrelere 0,5 μ M TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri	

uygulanmıştır. Aptamer uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saat boyunca petriler gözlemlenerek asılı damla modellerinde koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir.....	75
Şekil 30. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin asılı damla modellerinde hücre çapları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi.....	77
Şekil 31. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının GHRH sinyalini bloke etmesinin GH ve GHRHR anlatımı üzerinden immunofloresan boyama ile Mia Paca-2 hücrelerinde gösterilmesi.	78
Şekil 32. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında Anti-Proliteratif Etkisinin PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.	80
Şekil 33. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin HT29 KolonKanseri Hücre Hattında Anti-Proliteratif Etkisinin PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.	81
Şekil 34. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V/PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.	83
Şekil 35. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattında Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V/PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.....	84
Şekil 36. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Epitel-Mezenkimal Geçiş Yolağındaki Etkilerinin Immüno blotlama ile Gösterilmesi.	86
Şekil 37. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Endoplazmik Retikulum Stres Yolağındaki Etkilerinin Immüno blotlama ile Gösterilmesi.	87
Şekil 38. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Otofaji Yolağındaki Etkilerinin Immüno blotlama ile Gösterilmesi.....	88
Şekil 39. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Apoptotik Ölüm Yolağındaki Etkilerinin Immüno blotlama ile Gösterilmesi.....	89

KISALTMA LİSTESİ

5-FU	5-floroürasil
AFAP	Zayıflatılmış Ailesel Adenomatöz Polipoz
AMD	Neovasküler Yaşa Bağımlı Maküler Dejenerasyonu
APC	Adenomatöz Polipoz Koli
ASR	Yaşa Göre Standardize Edilmiş Oran
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Otofaji ile İlgili Genler
BMI	Vücut Kitle İndeksi
BSA	Bovine Serum Albumin
CAF	Kanserle İlişkili Fibroblastlar
CLB	Hücre Özütleme Tamponu
CQ	Klorokin
CRC	Kolorektal Kanser
CREB	cAMP Yanıt Elementi
DAPI	4,6-Diamidino-2-Fenilindol
DiOC6	3,3'-Diheksilokarbosiyanin İyodür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	Çift Sarmallı DNA
ECM	Hücre Dışı Matriks Bileşenleri
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	Epitel-Mezenkimal Geçiş
EPIC	Avrupa Kanser Araştırması
FAP	Ailesel Adenomatöz Polipozis
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FIXa	Faktör IXa

FOLFIRINOX	5-florourasil (5-FU) / irinotekan ve oksaliplatin
GH	Büyüme Hormonu
GHRH	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
GHRH-R	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü
GIP	Glikoza Bağımlı İnsülinotropik Polipeptit
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptit-1
GRP78	Glikozla Düzenlenmiş Protein
HCQ	Hidroksiklorokin
HIV	İnsan İmmün Yetmezliği Virüsü
HNPCC	Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
IF	İmmünoflöresan
IL-2	İnterlökin-2
IO	İmmünoterapi
IPMN	Intraduktal Papiller Müsinöz Neoplazmalar
kD	Düşük Ayrışma Sabitine
MAP	MUTYH ile İlişkili Polipoz
MMR	DNA Uyuşmazlığı Onarım Genleri
mPDAC	Metastatik PDAC
MTT	3-(4,5-Dimetiltriazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolium Bromid
MUTYH	Baz Eksizyon Onarım Geni mutY Homoloğu
NAP	NTHL ile İlişkili Polipoz
OS	Yıllık Genel Sağkalım Oranı
PACAP	Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptid
PanIN	Pankreatik Intraepitelyal Neoplaziler
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K-AKT	Fosfatidilinositol 3-kinaz-protein Kinaz B
Pit-1	Hipofize Özgü Transkripsiyon Faktörü
PKC-MAPK	Protein Kinaz C-mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Ters Transkripsiyon PCR

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SELEX	Çalışılmış Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi
TAR	Bir Trans-aktivasyon Yanıtı
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline- Tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamin
UVRAG	UV Rasyasyon Direnci ile İlişkili Gen Proteini
VIP	Vazoaktif Bağırsak Polipeptidi
XA	X-aptamer



SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%	Yüzde
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
g	Yer Çekimi Kuvveti (Gravity)
mA	Miliamper
kDa	Kilo Dalton
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
cm	Santimetre
cm²	Santimetre kare
mm	Milimetre
nm	Nanometre
V	Volt
mA	MiliAmper
μg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece

ÖZET

Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ve büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörünün (GHRH-R) birçok kanser tipinde anlatımının belirlenmiş olması, GHRH karşı antagonistlerinin anti karsinojenik etki göstermesi GHRH sinyalinin bloke edilmesinin önemini ortaya koymuştur. Aptamerler hedef molekülüye yüksek bağlanma affinitesi gösteren tek zincirli DNA veya RNA molekülleridir. Bu tez ile amacımız GHRH özgü aptamerlerin anti-karsinojenik etkisinin MiaPaca Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanserinde gösterilmesidir. GHRH (1-29) peptidine özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin doza ve zamana bağlı olarak Mia Paca-2 ve HT29 hücrelerinde hücre canlılığına ket vurduğu belirlenmiştir. Ayrıca 500 nM konsantrasyonda 72 saat boyunca TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamasının yara kapanmasını engellediği, koloni çapını düşürdüğü, hücre ölümünü tetikleyip, Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) oluşumunu indüklediği ve mitokondriyal membran potansiyeline ket vurduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Mia Paca-2 pankreas kanseri hücrelerinde her iki aptamerin etkin bir şekilde GHRH sinyali aşağı yolak elemanları olan GH ve GHRHR anlatımını engelleyerek GHRH sinyalini bloke ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca hem MiaPaca pankreas kanseri hem HT29 kolon kanseri hücre hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin hücre koloni çaplarını küçülttüğü, TKY.T2.09 aptamerinin etkisinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 aptamerlerinin hücre döngüsünü G2/M fazında tuttuğu hem de subG1 popülasyonunu indükleyerek apoptotik ölümüne neden olduğu hücre akış sitometresi analizleri ile gösterilmiştir. Hem HT29 hem MiaPaca hücre hatlarından TKY.T2.08 uygulamasının EMT sinyali üzerinde ket vurucu etkisi E-kaderin anlatımını arttırdığı, N-Kaderin anlatımını ise baskılaması ile gösterilmiştir. Ayrıca TKY.T2.08 aptamerinin MiaPaca hücre hattında Bip, PERK, ATF-6 anlatımlarını arttırarak, TKY.T2.09 aptamerinin ise HT29 hücre hattında Calnexin- CHOP, ATF-6 anlatımlarını arttırarak, MiaPaca hücre hattında IRE1 α , PERK, ATF-6 anlatımlarını arttırarak ER stresi indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca her iki aptamerin Atg5, Atg12 anlatımını indükleyip, LC3 kesilimini arttırarak otofajiyi uyardığı gösterilmiştir. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin apoptotik ölüm üzerinde indükleyici etkisi PARP kesilimi, PUMA anlatımının arttırılması, BclxL anlatımının baskılanması ile MiaPaca ve HT29 hücre hatlarında gösterilmiştir. Sonuç olarak GHRH özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin MiaPaca-2 ve HT29

hücrelerinde EMT sinyalini baskılayarak hücre proliferasyonuna ket vurduğu, hücre canlılığını mitokondri membran potansiyelini d ş rerek engellediği tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten, her iki aptamerin otofaji ve ER stresi indükleyerek apoptotik  l me yol a tıkları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: GHRH 1-29, X-Aptamer, Kolon Kanseri, Pankreas Kanseri, Apoptoz



ABSTRACT

The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) in many cancer types, and the anti-carcinogenic effect of GHRH antagonists have revealed the importance of blocking the GHRH signal. Aptamers are single-stranded DNA or RNA molecules that show high binding affinity to the target molecule. With this thesis, our aim is to demonstrate the anti-carcinogenic effect of GHRH-specific aptamers in MiaPaca Pancreatic Cancer and HT29 Colon Cancer. It has been determined that TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers specific to the GHRH (1-29) peptide inhibit cell viability in Mia Paca-2 and HT29 cells depending on the dose and time-dependent manner. In addition, it was determined that aptamer application of TKY.T2.08 and TKY.T2.09 for 72 hours at 500 nM concentration prevented wound healing, decreased colony diameter, triggered cell death, induced Reactive Oxygen Derivatives (ROS) formation, and impeded mitochondrial membrane potential. In addition, it has been determined that in Mia Paca-2 pancreatic cancer cells, both aptamers effectively block the GHRH signal by inhibiting GHRH signal downstream elements GH and GHRHR expression. In addition, it was concluded that TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers decreased the cell colony diameters and the effect of TKY.T2.09 aptamer was higher in both MiaPaca pancreatic cancer and HT29 colon cancer cell lines. It has been shown by cell flow cytometry analysis that both TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers keep the cell cycle in the G2/M phase and induce apoptotic death by inducing the subG1 population. The inhibitory effect of TKY.T2.08 application on the EMT signal from both HT29 and MiaPaca cell lines was shown to increase the expression of E-cadherin and suppress the expression of N-cadherin. In addition, TKY.T2.08 aptamer increased the expression of Bip, PERK, ATF-6 in the MiaPaca cell line and the TKY.T2.09 aptamer increased Calnexin-CHOP, ATF-6 expressions in the HT29 cell line, and IRE1 α , PERK, ATF-6 in the MiaPaca cell line. It was determined that by increasing their expressions, they induced ER stress. In addition, both aptamers have been shown to induce autophagy by inducing Atg5, Atg12 expression and increasing LC3 cleavage. Inductive effect of TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers on apoptotic death has been demonstrated in MiaPaca and HT29 cell lines by PARP cleavage, enhancement of PUMA expression, and suppression of BclxL expression. As a result, it was determined that GHRH-specific aptamers TKY.T2.08 and TKY.T2.09 inhibit cell

proliferation by suppressing EMT signal in MiaPaca-2 and HT29 cells and inhibit cell viability by preventing mitochondrial membrane potential. In addition, both aptamers were determined to cause apoptotic cell death via inducing autophagy and ER stress.

Keywords: GHRH 1-29, X-Aptamer, Colon Cancer, Pancreatic Cancer, Apoptosis



BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 GİRİŞ

Amerikan Kanser Derneği, kanseri; kontrol edilemeyen büyüme ve anormal büyüme gösteren hücrelerin yayılmasıyla karakterize edilen bir grup hastalık olarak tanımlamıştır. Kanser, tek bir hastalığı ifade etmemektedir, kanser 100'den farklı hastalık ile ilişkilendirilmiştir(SEER). Kolon Kanser Dünyada genelinde yaklaşık 900.000 ölüm ile kanserden ölüm sıralamasında dördüncü sırada bulunmaktadır[1]. Küresel olarak erkeklerde en sık görülen üçüncü, kadınlarda ise ikinci kanser tipidir[2]. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü verilerine göre koleraktal kanser tedavisi gören hastaların %61'inin 5 yıl süreyle hayatta kaldığı kaydedilmiştir[3]. Kolon Kanser risk faktörleri, ailesel faktörler ve sporadik faktörler olarak sınıflandırılmaktadır. Pankreas kanseri ise kanser ölümleri sıralamasında yedinci sırada yer almaktadır. Wong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonucunda pankreas kanseri insidansının kadınlarda erkeklere oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Pankreas Kanser risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez faktörler olarak iki başlık altında sınıflandırılmıştır[4].

Hipotalamik bir hormon olan, büyüme hormonu salgılatıcı hormon(GHRH); büyüme hormonu(GH) sentezi ve sekresyonunun temel uyarıcısıdır[5]. GHRH, merkezi sinir sisteminde, özellikle hipotalamusun arkuat ve ventromedial çekirdeklerinde sentezlenmekte ve daha sonrasında nöronel projeksiyonlardan hipofiz vasküler sistemine salınmaktadır[6]. GHRH, reseptörüne(GHRHR-R) bağlanarak büyüme hormonunun(GH) sentezini ve salınımını uyarmaktadır[7]. GHRH eksikliği hipofiz hipoplazisine ve cüceleşmeye yol açabilmektedir[8].

GHRH ve reseptörlerinin varlığı çeşitli tümörlerde gösterilmiştir ve otokrin/parakrin büyüme faktörü olarak neoplazmaların patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir[9]. Kapsamlı yapılmış çalışmalar, lenfoma, glioblastoma, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi bazı kanser tiplerinde düşük hipofiz tipi GHRH-R ekspresyonu olduğunu göstermiştir[10]. GHRH reseptörü antikanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak görülmektedir[11].

Büyüme hormonu salgılatıcı hormonun(GHRH) antagonistleri başlangıçta, GHRH'nin ve büyüme hormonunun(GH) aşırı sentezinin neden olduğu bozuklukların tedavisi amacıyla geliştirilmiştir. Robberecht ve arkadaşlarının 1985 yılında yaptıkları çalışmada; Ala aminoasidinin GHRH (1-29) NH₂'nin 2. Konumundaki D-arginin ile değiştirilmesiyle ilk GHRH antagonisti üretilmiştir. Bu ilk standart antagonistin, sıçanlarda GH salınımı baskıladığı görülmüştür[12]. İlk güçlü antagonistler (MZ serisi), N ucunda hidrofobik parçaları, C ucunda enzime dirençli olan agmantini ve 4-kloro fenilalanin, 2-aminobütirik asit, norlösin gibi moleküler yapılar içermektedir ve bu yapıların reseptör bağlanma affinitesini ve stabiliteyi arttırdığı gözlemlenmiştir[13][14]. Hem in vitro hem in vivo olarak bu serideki en güçlü antagonistler MZ-4-71 ve MZ-5-156 olarak bilinmektedir [14].

Aptamerler, antikorlara benzer yapıları bulunan ve üç boyutlu bir yapıya katlanarak protein hedeflerine bağlanan tek sarmallı deoksiribonükleik asit (DNA) ya da ribonükleik asit (RNA) molekülleridir. Aptamerler çoğunlukla ilk olarak 25 yıl önce çalışılmış üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi (SELEX) adı verilen bir yöntem ile izole edilmektedir. Gözün maküler dejenerasyonunu tedavi etmek için tasarlanan bir aptamer (Macugen), ABD Gıda ve İlaç Dairesinden (FDA) onay almıştır ve diğer aptamerle için preklinik veya klinik aşamalarda araştırmalar devam etmektedir [15].

RNA ve DNA aptamerlerinin konformasyonel çeşitliliği ve hedefleme özgüllüğü, protein-protein etkileşimlerinin inhibitörleri olarak terapötik alanda umut verici gözükmektedir. Bu potansiyelin sağlanabilmesi amacıyla, tasarlanan aptamerlerin çeşitli özellikleri sağlaması gerekmektedir. Bu özelliklere bakıldığında; ilk olarak terapötik aptamerlerin vücutta stabil halde olmaları gerekmektedir. Doğal RNA ve DNA, endojen nükleazlara duyarlı olduğundan şeker ve/veya fosfodiester omurgasında meydana gelen kimyasal modifikasyonlara dikkat edilmelidir. İkincisi, nükleotid dizisinin uzunluğu olabildiğince kısa olmalıdır çünkü aptamer dizisinin kısa olması üretimde maliyeti düşürerek malzeme kalite güvencesini kolaylaştıracak ve toksisiteyi önleyecektir. Üçüncü olarak ise terapötik aptamerlerin diğer ilaçlarda da olduğu gibi iyi farmakokinetikleri olmalıdır [16].

1.2 AMAÇ

Bu tez ile literatürde anti-karsinojenik etkileri çalışılmış GHRH peptit antagonistlerine alternatif olarak GHRH sinyalini bloke edecek aptamerlerin kolon kanseri ve pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin EMT, Endoplasmic Reticulum stress ve otofaji yolları üzerinden apoptotik ölüm üzerine etkisinin irdelenmesi amaçlanmaktadır.



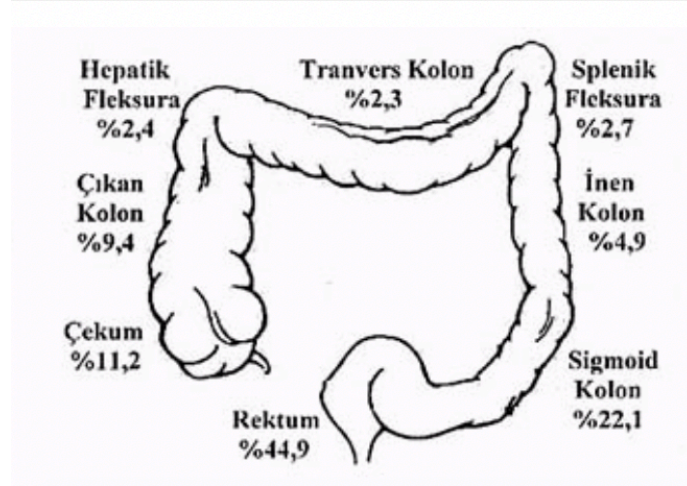
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser kendiliğinden, düzensiz olarak bölünerek ve çoğalarak bulundukları bölge dışına yayılabilen ve doğal gelişimi ölüme yol açan tüm doku bozukluklarını kapsayan ortak bir ifadedir. Tüm kanser türlerinde, vücudun bazı hücreleri dokulara yayılmadan bölünmeye başlar. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudun herhangi bir yerinde başlayabilmektedir. Normal şartlarda insan hücreleri büyür ve vücudun ihtiyaç durumlarına göre yeni hücreler meydana getirmek için bölünür. Hücreler yaşlandıkça ya da hasar görme durumunda ölürlere ve bu yeni hücreler yerlerini alır. Kanser geliştiğinde ise bu düzenli süreç bozulur. Yaşlanmış ya da hasar görmüş hücreler ölmeleri gerektiğinde hayatta kalmaya devam eder ve ihtiyaç duyulmadığı halde yeni hücreler meydana gelir. Bu hücreler kontrolsüz bölünebilir ve tümör adı verilen büyümeleri meydana getirebilir(Verweij., 2017).

2.2 Kolon Kanseri

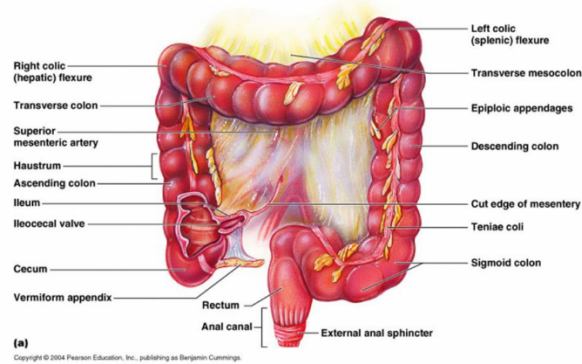
Kolorektal kanser, günümüzde yılda yaklaşık 900.000 ölümle dünya sıralamasında dördüncü en ölümcül kanser tipidir. Yüksek gelirli ülkelerin yaşlanan nüfusu ve beslenme alışkanlıklarına ek olarak obezite, fiziksel egzersiz eksiklikleri ve sigara kullanımı gibi faktörler kolorektal kanser riskini arttırmaktadır[17]. Son yıllarda, tedaviye yönelik ilginin büyük çoğunluğu kolon kanserinden çok rektum kanserine odaklanmıştır[18]. Kolon kanseri en sık bağırsağın sol tarafında inen kolonda ve kalın bağırsağın son bölümü olan rektum kısmında görülmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Kolon kanserinin bölgelere göre görülme sıklığı(Dekker ve ark., 2013).

2.2.1 Kolon Anatomisi

Kalın bağırsak sindirim sisteminin büyük bir kısmını oluşturur. Kalın bağırsak çeşitli bölgelerden oluşur. İnce bağırsak ile kalın bağırsağın birleştiği bölgeye çekum adı verilir. Çekumdan sonra kalın bağırsak yukarıya doğru çıkar, bu kısma çıkan kolon denir. Daha sonra karın içerisinde sağdan sola doğru uzanır ve bu bölüme transvers(enine) kolon denir. Karnın sol tarafına ulaşınca aşağıya doğru yön değiştirir ve bu bölüm inen kolon adını alır. İnen kolonun devamı “S” şeklindedir ve Sigmoid kolon adını alır. Son kısım ise rektumdur [17](Şekil 2).



Şekil 2. Kalın bağırsağın bölgeleri. Kalın bağırsağın bölümlerinin ayrıntılı bir şekilde gösterilmesi (Cummings ve ark., 2015).

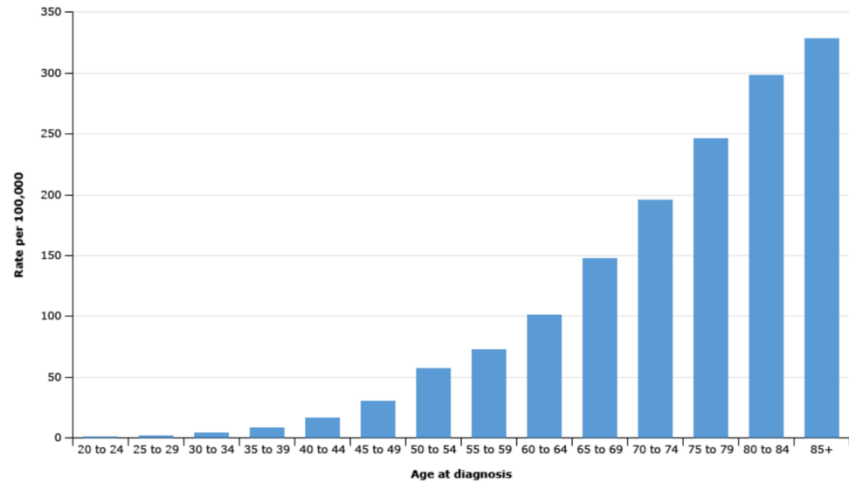
2.2.2 Kolon Kanseri Epidemiyolojisi(kolon kanseri risk faktörleri)

Kolon kanserinin insidans ve mortalite oranları dünya çapında önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü GLOBOCAN veri tabanına göre, CRC 2018 yılında 1.8 milyon yeni vaka ve yaklaşık 861.000 ölümle küresel olarak erkeklerde en sık görülen üçüncü kadınlarda ise ikinci kanser tipidir[19]. Yılda yaklaşık olarak 147.950 yeni CRC hastası teşhis edilmektedir. Bunların 104.610'u kolon kanseri ve kalanı rektal kanseri hastalarıdır[1].

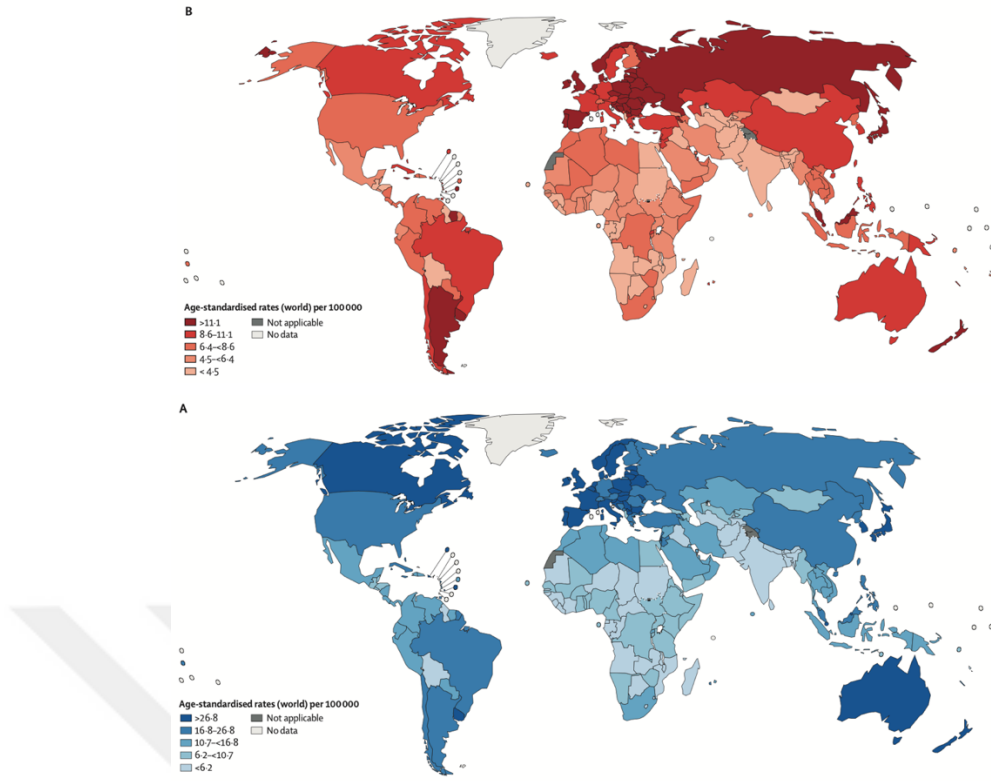
2.2.2.1 İnsidans

Küresel olarak, CRC insidansı bölgesel olarak değişmektedir. En yüksek insidans oranları Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'dadır. En düşük insidans oranları ise Afrika ve Güney-Orta Asya'da görülmektedir[2]. Bu coğrafi farklılıkların genetik, beslenme ve çevresel maruziyet gibi faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir. Kolorektal kanser için yaş önemli bir risk faktörüdür. Kalın bağırsak kanseri 40 yaşından önce nadir görülmektedir, 40 ve 50 yaşlar arasında insidans önemli ölçüde artmaktadır (Şekil 3). Yaşa özgü insidans oranları her on yılda artış göstermektedir. 50 yaşın altında kolorektal kanser teşhisi konanların %86'sından fazlası semptomik olmaktadır ve hastalık daha sonraki aşamalarda tespit edilebilmektedir[20][21]. Bu oran artan insidansın gerçek olduğunu göstermektedir. Artan insidans eğiliminin altında yatan nedenler halen belirsizdir. Elde edilen bazı veriler uzun süreli hareketsizliğin(egzersiz ve obeziteden bağımsız olarak) özellikle rektumda meydana gelen genç başlangıçlı kolorektal kanser riskindeki artışla ilişkilendirilmiştir. Şu an çoğu kılavuz, pozitif bir aile öyküsü veya yatkın bir kalıtsal sendrom olmadığı sürece 50 yaşın altındaki asemptomatik bireylerin taranmasını önermemektedir[22][3].

Increasing incidence of colorectal cancer in the United States with age, SEER 2004 to 2013



Şekil 3. Yaşa özgü kolorektal kanser insidansı, tüm ırklardan kadın ve erkeklerde 2004 ile 2013 yılları arasında ölçülmüştür(Macrae ve ark., 2020).



Şekil 4. WHO Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının rakamlarına göre beş kıtadaki ülkeler için yaşa göre sınıflandırılmış (A) Kanser insidansı ve (B) Ölüm oranları. Bu oranlar yaşa göre standardize edilmiş verilerdir. Yaşa göre farklılık gösteren birden popülasyon karşılaştırılırken standardizasyon gereklidir çünkü yaş, kanserde teşhisin koyulması veya kanserden ölme riski üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Haritadaki noktalı ve kesikli çizgiler, üzerinde tam bir anlaşma sağlanamamış yaklaşık sınır çizgilerini temsil etmektedir(Dekker ve ark., 2018).

2.2.2.2 Mortalite

Kolorektal kanser kaynaklı ölüm oranları, 1980 yıllarından bu yana Amerika Birleşik Devletleri ve birçok batı ülkesinde giderek azalmıştır[19][1]. Bu gelişme, kısmen de olsa kolon poliplerinin saptanabilmesi, çıkarılabilmesi ve CRC'lerin daha erken bir evrede saptanarak etkili birincil ve adjuvan tedavilerin uygulanabilmesine atfedilmektedir[23]. Ulusal Kanser Enstitüsü Veritabanından elde edilen verilerde, 20 ila 54 yaşları arasındaki bireyler arasında 100.000 nüfus başına CRC ölüm oranları 1970'de 6.3'ten 2004'te 3.9'a düşmüş ve ardından yıllık %1 artışla 2014'te 4.3'e yükselmiştir[24]. Global olarak, Birleşik Devletler CRC'den en yüksek hayatta kalma oranlarından birine sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü Programı tarafından toplanan veriler, CRC tedavisi gören hastaların %61'inin(tüm aşamalar ve görülen bölgeler dahil) 5 yıl süreyle hayatta kaldığını göstermektedir[25].

2.2.3 Kolon Kanseri Risk Faktörleri

Çevresel ve genetik faktörler, CRC gelişme olasılığını arttırabilmektedir[26]. Kalıtsal duyarlılık riskte en çarpıcı artışlarla sonuçlansa da, CRC'lerin çoğu ailesel olmaktan çok sporadiktir. Bu risk faktörleri , CRC taranmasına yönelik önerileri değiştirmek için yeterince yüksek risk sağlayanlar, tarama önerilerini değiştirebilen faktörler ve küçük ya da belirsiz bir risk boyutu sayladığı düşünüldüğünden tarama önerilerini değiştirmeyen risk faktörleri olarak ayrılabilir[27].

Şu anda tarama önerilerini etkileyen faktörler - CRC tarama önerileri, enflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda kişisel veya ailede CRC veya adenom öyküsü temelinde kalıtsal kolon kanseri sendromları olan ailelerin üyeleri için ve abdominal hastalığa maruz kalanlarla sınıflandırılmıştır[27].

2.2.3.1 Kalıtsal CRC sendromları

Çoğu otozomal dominant bir şekilde alınan birkaç spesifik genetik bozukluk, kolon kanseri gelişme riskinin çok yüksek olmasıyla ilişkilidir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve Lynch sendromu (kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser [HNPCC]), ailesel kolon kanseri sendromlarının en yaygın olanlarıdır, ancak bu iki durum birlikte, CRC vakalarının yalnızca %5'ini oluşturmaktadır ve bunların çoğu Lynch sendromu olarak görülmektedir[28][29][30][31].

2.2.3.1.1 FAP

Ailesel adenomatöz polipoz (FAP) ve varyantları (Gardner sendromu, Turcot sendromu ve zayıflatılmış ailesel adenomatöz polipoz [AFAP]), CRC'lerin yüzde 1'inden azını oluşturmaktadır. FAP'ta, çocukluk döneminde çok sayıda kolon adenomu görülmektedir. Belirtiler ortalama 16 yaşında ortaya çıkar ve 45 yaşına kadar tedavi edilmeyen bireylerin yüzde 90'ında kolon kanseri meydana gelmektedir. AFAP, kolon kanseri için yüksek risk taşımaktadır, ancak daha az adenom ve daha yaşlı teşhis yaşı ile karakterizedir. FAP, kromozom 5'te yer alan adenomatöz polipoz koli (APC) genindeki germ hattı mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Aynı gen, zayıflatılmış FAP formunda da yer alır, ancak APC gen mutasyonlarının yerleri farklıdır. Aşkenaz Yahudi nüfusunun yaklaşık %6 ila %8'inde ortaya çıkan bir APC gen varyantı, ilişkili bir polipoz olmaksızın 1,5 ila 2 kat artmış kolon kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, kendi başına, birinci derece akrabalarda aile öyküsü dışında bir risk meydana getirmemektedir ve bu nedenle sınırlı klinik faydaya sahiptir[32].

2.2.3.1.2 MUTYH ile İlişkili Polipoz (MAP)

MAP, baz eksizyon onarım geni mutY homologundaki (MUTYH) bialelik germ hattı mutasyonlarına bağlı otozomal resesif bir sendromdur. MAP fenotipi değişkendir, ancak tipik olarak 500'den az adenom ile bir polipoz fenotipi ile ortaya çıkabilir. Baz eksizyon onarım sistemi, oksidatif DNA hasarından kaynaklanan mutasyonları onarır ve APC geni bu tür hasara özellikle duyarlı görünmektedir. Bu nedenle, temel eksizyon onarım sisteminin başarısızlığı, APC'de, özellikle G: C'den T: A'ya transversiyonlarda, bir polipoz fenotipine yol açabilen somatik mutasyonlara yol açmaktadır. Artan sayıda rapor, bu MUTYH genlerindeki germ hattı mutasyonlarının, baskın olarak kalıtsal bir ailesel sendromun yokluğunda ortaya çıkan ailesel CRC'lerin önemli bir bölümünü açıklayabileceğini ve önemli sayıda bialelik taşıyıcının, ilişkili polipoz olmaksızın kanserle birlikte mevcut olduğunu ileri sürmektedir. Yeni polipoz genleri (POLE ve POLD1, MSH3 ve NTHL ile ilişkili polipoz [NAP]) artık fenotipleri geliştiren yeni nesil çalışmaların konusu olarak görülmektedir[27].

2.2.3.1.3 Lynch Sendromu

Lynch sendromu veya HNPCC, FAP'tan daha yaygın olan ve tüm kolonik adenokarsinomların yaklaşık yüzde 3'ünü oluşturan, otozomal dominant bir sendromdur. Lynch sendromu adı, Dr. Henry Lynch'in sendroma dikkat çekmedeki öncü çalışmasından alınmıştır. Lynch sendromu terimi, genetik olarak DNA uyuşmazlığı onarım (MMR) genlerinden birinde, en yaygın olarak hMLH1, hMSH2, hMSH6 veya hPMS2 genlerinde hastalığa neden olan mutasyona sahip aileler için kullanılmaktadır. Genel bir kural olarak, Lynch sendromlu hastalarda bir MMR geninin bir allelinde bir germ hattı mutasyonu vardır ve ikinci alel, CRC'lerde mutasyon, heterozigotluk kaybı veya promoter hipermetilasyon yoluyla epigenetik susturma yoluyla somatik olarak inaktive edilir. Sonuç olarak, Lynch sendromu CRC'leri bozulmuş DNA MMR'ye sahiptir, hiper değişkendir ve mikrosatellit stabil değildir[33].

Lynch sendromlu hastalarda gelişen kolorektal tümörler, erken yaşta görülmesi ve sağ taraftaki lezyonların baskınlığı ile karakterizedir. İlk lezyonların yaklaşık yüzde 70'i dalak bükülmesinin proksimalinde ortaya çıkar ve yaklaşık yüzde 10'unda eşzamanlı metakron kanserler görülmektedir. Segmental rezeksiyonu olanlarda metakron CRC geliştirme şansı daha yüksektir: 382 gen taşıyıcısı üzerinde yapılan bir çalışmada, 10 yılda %16 olan oran, primer rezeksiyondan 30 yıl sonra %62'ye yükselmiştir[34].

2.2.3.2 Sporadik CRC'lerin veya Adenomatöz Poliplerin Kişisel veya Ailesel Öyküsü

Kişisel CRC öyküsü veya kolonun adenomatöz polipleri olan hastalar, kolon kanserinin gelecekteki gelişimi için risk altındadır. Tek bir CRC rezeksiyonu yapılan hastalarda, metakron primer kanserler, postoperatif ilk beş yıl içinde hastaların %1.5 ila 3'ünde gözlemlenir. Aile öyküsü, tanımlanmış genetik yatkınlığı olan sendromların dışında bile önemli bir risk faktörüdür. CRC ile etkilenen tek bir birinci derece akrabaya (ebeveyn, kardeş veya çocuk) sahip olmak, riski genel popülasyona göre yaklaşık iki kat arttırmaktadır[35].

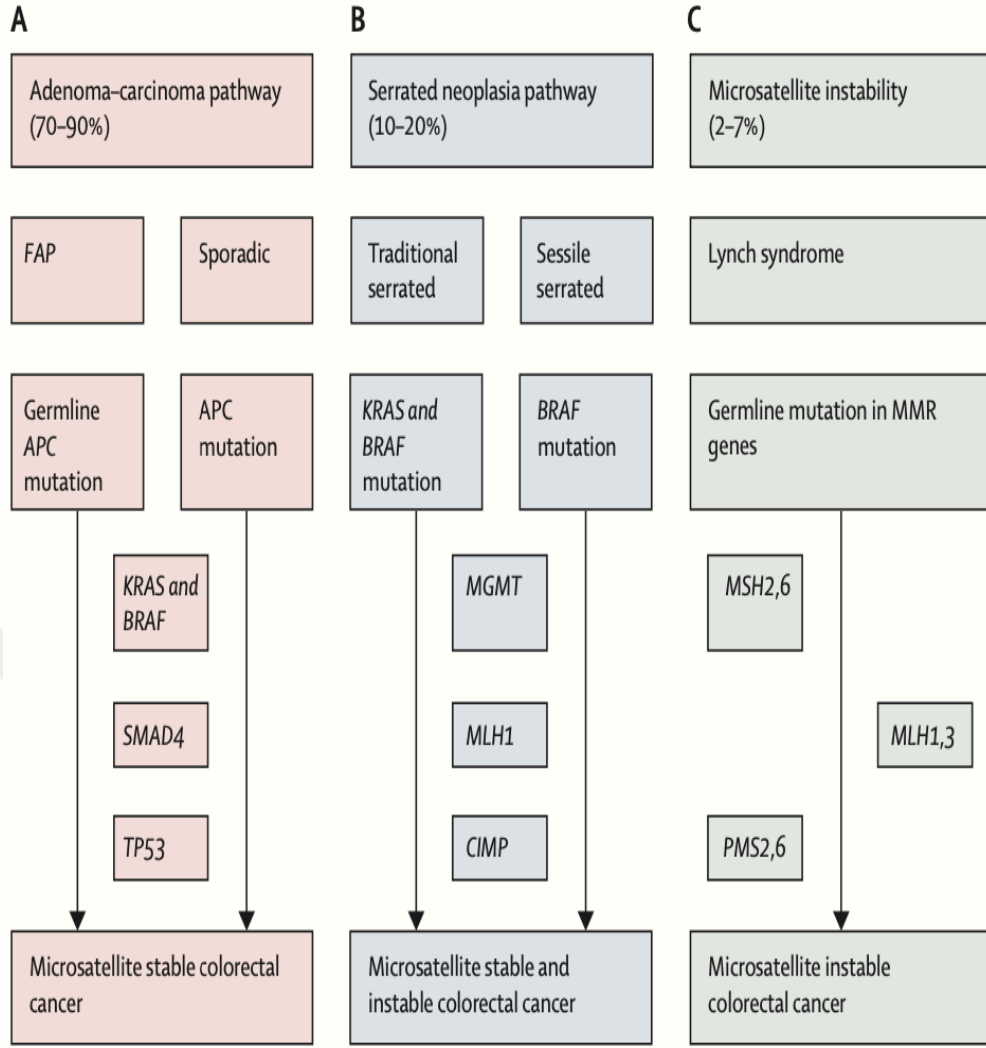
Aetiological factors	Level of evidence ^a	Unit increase	Colorectal cancer RR (95% CI)	Colon cancer RR (95% CI)	Rectal cancer RR (95% CI)	Refs
Obesity	↑↑	5 kg/m ² in BMI	1.05 (1.03–1.07)	1.07 (1.05–1.09)	1.01 (1.01–1.04)	116
	↑↑	10 cm in WC	1.02 (1.01–1.03)	1.04 (1.02–1.06)	1.02 (1.00–1.03)	
Total physical activity	↓↓	5 MET-hours per week	0.97 (0.94–0.99)	0.92 (0.86–0.99)	1.02 (0.95–1.10)	116
Western dietary pattern	↑↑	Highest versus lowest	1.12 (1.01–1.24)	1.30 (1.04–1.63)	1.09 (0.91–1.29)	133
Prudent dietary pattern	↓↓	Highest versus lowest	0.89 (0.84–0.95)	0.89 (0.80–0.99)	0.96 (0.83–1.10)	133
Processed meat	↑↑	50 g per day	1.16 (1.08–1.26)	1.23 (1.11–1.35)	1.08 (1.00–1.18)	116
Red meat	↑	100 g per day	1.12 (1.00–1.25)	1.22 (1.06–1.39)	1.13 (0.96–1.34)	116
Total fibre	↓	10 g per day	0.93 (0.87–1.00)	0.91 (0.84–1.00)	0.93 (0.85–1.01)	116
Whole grain	↓	90 g per day	0.83 (0.79–0.89)	0.82 (0.73–0.92)	0.82 (0.57–1.16)	116
Alcohol (as ethanol)	↑↑	10 g per day	1.07 (1.05–1.09)	1.07 (1.05–1.09)	1.08 (1.07–1.10)	116
Smoking ^b	↑	Current versus never smokers	1.15 (1.00–1.32)	1.10 (0.89–1.36)	1.19 (0.94–1.54)	101
Aspirin ^b	↑↑	75–1200 mg per day versus control	0.76 (0.63–0.94)	0.76 (0.60–0.96)	0.90 (0.63–1.30)	185
Total calcium ^b	↓	300 mg per day	0.92 (0.89–0.95)	0.91 (0.87–0.96)	0.95 (0.83–1.08)	194

Şekil 5. Anatomik alt gruplara göre risk veya koruyucu faktörler ile kolorektal kanser riski arasındaki ilişkilerin özeti. ↑↑, ikna edici risk faktörü; ↑, olası risk faktörü; ↓↓, ikna edici koruyucu faktör; ↓, olası koruyucu faktör; BMI, vücut kitle indeksi; CI, güven aralığı; CRC, kolorektal kanser; MET, görevin metabolik eşdeğeri; RR, göreceli risk; WC, bel çevresi[36].

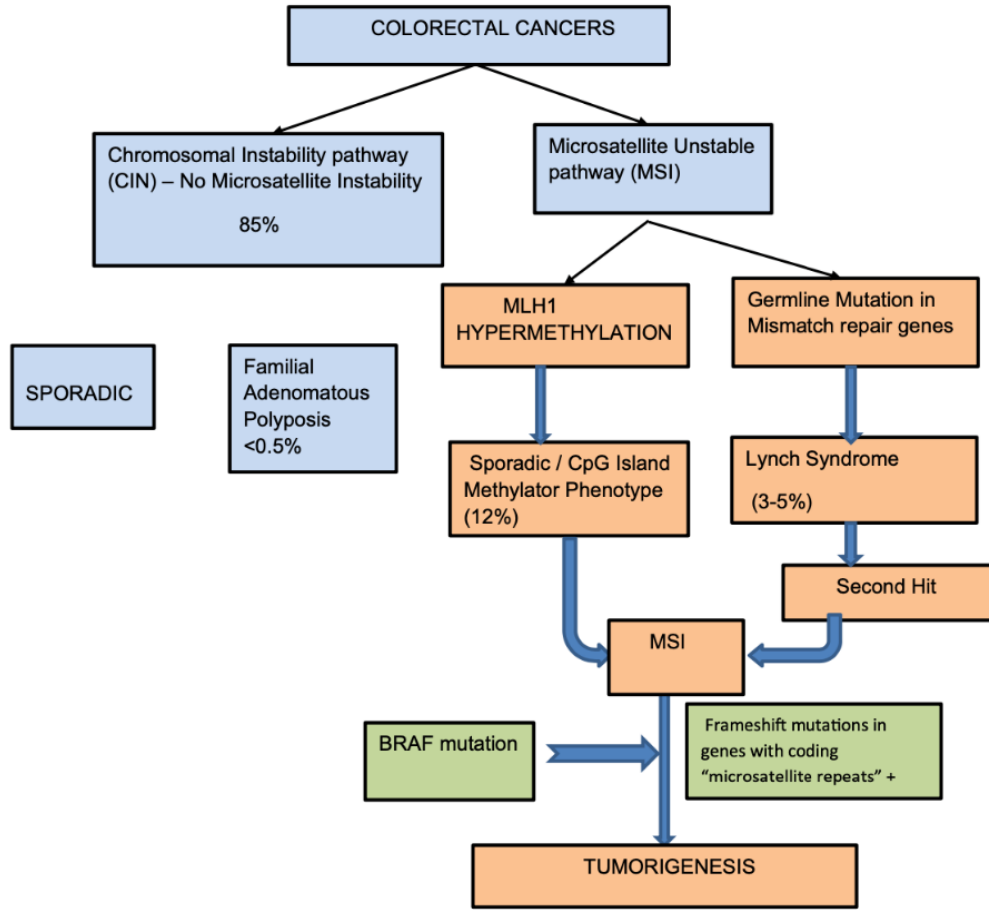
2.2.5 Kolon Kanserinin Moleküler Patolojisi

Çoğu kanser polipten kaynaklanmaktadır. Bu süreç, neoplastik öncü bir lezyona(polip) dönüşen ve sonunda tahmini 10-15 yıllık bir süre içinde kolorektal kansere ilerleyen bir anomali ile başlar. Kolorektal kanserlerin çoğunun başlangıç hücresinin kök hücreler veya kök hücre benzeri bir hücre olduğu varsayılmaktadır[37]. Bu kanser kök hücreleri, tümör baskılayıcı genleri inaktive eden ve onkojenleri aktive eden genetik ve epigenetik değişiklikleri sonucu meydana gelmektedir. Kanser kök hücreleri, kolonik kriptlerin tabanında bulunur ve bir tümörün başlatılması ve sürdürülmesi için gerekli olduğu görülmektedir. Kanser kök hücrelerinin büyümesini kontrol eden düzenleyici mekanizmaların araştırılması, olası terapötik ajanlar ve önleyici tedaviler için umut verici bir araştırma alanıdır[1].

Küresel olarak, iki ana farklı öncü lezyon yolu bulunmaktadır (Şekil 4)[38]. Kolorektal kanserin %70-90'ına yol açan adenom-karsinom (kromozomal instabilite dizisi olarak da adlandırılmaktadır) yolu ve neoplazi yolu (Kolorektal kanser vakalarının %10-10'sini meydana getirmektedir.). Bu yollar çoklu genetik ve epigenetik olayları temsil etmektedir. Kromozomal kararsızlık fenotipleri tipik olarak bir APC mutasyonu ile başlatılan genomik olayları takiben gelişir, ardından RAS aktivasyonu veya TP53 fonksiyon kaybı gelir[38].



Şekil 6. Kolorektal Kanserin gelişim yolları.



Şekil 7. Kolorektal kanserin şematik sınıflandırılması ve tümör gelişim mekanizmasının gösterilmesi(Gupta ve ark., 2018).

2.3 Pankreas Kanseri

Dünyada her yıl teşhis edilen 277.00 pankreas kanseri hastası bulunmaktadır[39]. ABD en ön sırada gelmektedir. Avrupa da vaka sayısı ise yaklaşık olarak 49.000 dir[40]. Erken teşhise katkıda bulunabilecek yeni gelişmelere rağmen yıllık genel sağkalım(OS) oranı son 30 yılda yalnızca %5 oranından %6'ya yükselmiştir. Pankreas kanseri, ABD'de kanser ölümleri sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır ve yılda yaklaşık olarak 40.000 ölüm raporlanmaktadır. Önümüzdeki 10 yılda ise pankreas kanserinin ABD'de kansere bağlı ölümlerin ikinci nedeni olacağı öngörülmektedir[41][40]. Pankreas duktal adenokarsinomu, pankreas kanserinin en yaygın histolojik tipi olarak görülmektedir. Pankreas kanseri risk faktörleri arasında başlıca tütün kullanımı ve aşırı kilo/obezite gözlemlenmektedir. 1990'lardan beri tütün kullanımı prevalansındaki önemli düşüşün, pankreas kanseri insidansını azaltması beklenmiştir ancak pankreas kanserinde risk ve mortalite üzerinde bireylerin aşırı kilolu olması/obezite ve tip 2 diyabetteki artan prevalansla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Pankreas kanserinde görülen yüksek ölüm oranı, kanser öncesi neoplazi ve erken evre invazif pankreas kanserlerinin erken teşhisi için güvenilir tarama metodolojilerinin olmamasına ve sistemik kemoterapi tedavilerinin zayıf etkinliğiyle bağdaştırılmıştır[41][42].

Pankreas kanserlerinin %50'den fazlasında sağ kalım oranlarının 7-11 ay arasında değiştiği bilinmektedir[43][44]. %30-40'ında hastalığın lokalize olduğu bölgede cerrahi müdahalenin yapılamadığı hastalarda sağkalım oranının 11-18 ay olduğu, rezeke edilmiş pankreas kanseri hastalarında ise solid tümörlere kıyasla daha kötü sonuçlar görülmektedir ve cerrahi-adjuvan tedaviden sonra ortalama sağkalım 24 aydır[45][46]. Gemsitabin, pankreas kanseri için tercih edilen adjuvan tedavi olarak halen kullanılırken, 2011'den beri metastatik hastalar için iki farklı ikili kombine terapisi altın standart haline gelmiştir; 5-florourasil (5-FU) / irinotekan ve oksaliplatin (FOLFIRINOX) ile lökovorin ve gemsitabin ile nab-paklitaksel[43]. Bu tedavi tiplerine yanıt oranları %23 ile %31 arasında fark göstermektedir[44]. Metastatik hastalarda FOLFIRINOX ve gemsitabin / nab-paklitaksel ile elde edilmiş başarılar göz önüne alındığında, lokal olarak ilerlemiş ancak ameliyat edilemeyen pankreas kanserlerinin tedavileri için öncül görülmektedir. Kombinasyon kemoterapi tedavisiyle elde edilmiş ön veriler, tek başına gemsitabin ile geçmiş raporlara göre daha ümit verici sonuçlar göstermektedir[46].

Pankreas adenokarsinomunda en yaygın genetik mutasyonlar KRAS(%90), CDK2NA(%90), TP53(%75-%90), SMAD4/DPC4(%50) genlerinde görülmektedir ve pankreas kanseri hastalarında epigenetik değişiklikler de sık olarak gözlemlenmektedir. Tümör mikroçevresi, kemoterapiye dirençli kanser kök hücreleri ve desmoplastik stroma son klinik araştırmaların hedefidir[47].

2.3.1 Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri epidemiyolojisinin analiz edilmesi, pankreas kanseri etiyolojisini yorumlamanın anahtarı ve buna bağlı olarak etkili bir önleme stratejisi geliştirmenin temel taşı olarak öngörülmektedir[48].

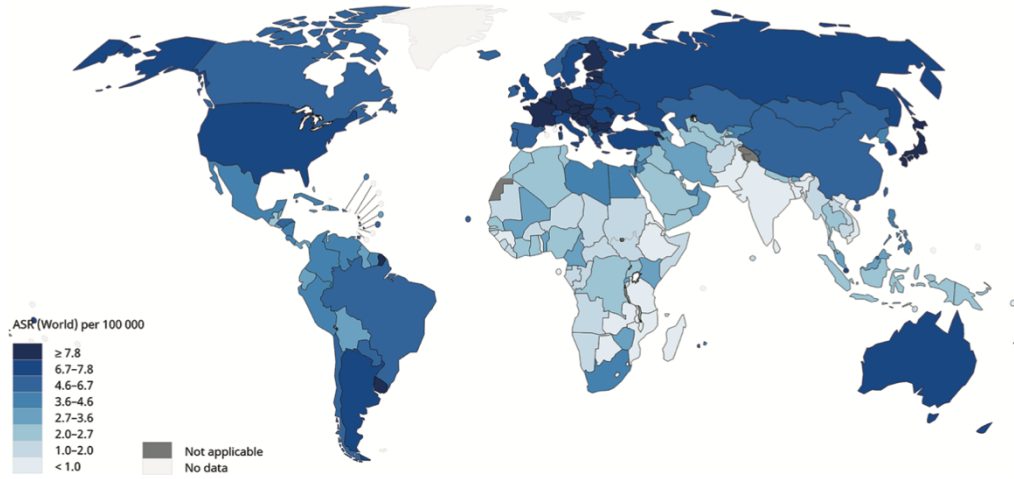
2.3.1.1 İnsidans

Pankreas kanseri görülme sıklığı bölgelere ve popülasyonlara göre değişiklik göstermektedir (Şekil 5). 2018’de dünya genelinde 458.918 yeni pankreas kanseri vakası kaydedilmiştir ve bu sayının tüm kanser yüzdesinin %2.5’ini temsil ettiği raporlanmıştır. Yaşa göre standardize edilmiş oran(ASR) insidansı en yüksek Avrupa’da(100.000 kişide 7.7), Kuzey Amerika’da(100.000 kişide 7.6) ardından Okyanusya’da(100.000 kişide 6.4) görülmektedir. En düşük oran ise 100.000 kişide 2.2 tahmini insidans ile Afrika’da gözlenmiştir. İnsidan oranlarındaki farklılıklar, en yüksek popülasyonlar(Macaristan:10.8) ile en düşük orana sahip popülasyonlar(Gine: 0.35) arasında 30 kat olmuştur[49].

Cinsiyetler arasında pankreas kanseri insidansında hafif bir farklılık ve önemli farklı coğrafi dağılım gözlenmiştir(1). Pankreas kanseri erkeklerde(100.000 başına 5.5, 243.033 vaka) kadınlardan(100.000 başına 4.0, 215.885 vaka) daha yaygındır. Erkeklerde pankreas kanseri görülme riski Orta ve Doğu Avrupa’da yüksektir. Özellikle Letonya ve Moldova Cumhuriyeti(15.3), Estonya(14.2) ve Macaristan(12.9) ardından Uruguay(12.0) ve Japonya(11.7) da görülme sıklığı yüksektir. En düşük oranlar ise Gine(0.23) ve Malavi(0.30)’de kaydedilmiştir. Kadınlarda pankreas kanseri insidansının en yüksek olduğu bölgeler Batı Avrupa(7.2), Kuzey Amerika(6.5), Kuzey Avrupa ve Avustralya/Yeni Zelanda(6.4) şeklindedir. Yakalanma riskinin en düşük olduğu bölgeler ise(100.000’de 1.0’dan daha az) Doğu Afrika ve Güneydoğu Asya’dır. Komorlar ve Sao Tome, Afrika bölgelerinde her iki cinsiyet için kaydedilmiş bir pankreas kanseri vakası yoktur[49].

Pankreas kanserinde insidans her iki cinsiyet için yaşla birlikte artmaktadır(1-10-11). Pankreas kanseri nadiren 55 yaşından önce teşhis edilebilmektedir ve yaşlı nüfusun hastalığı olarak tanımlanabilmektedir çünkü en yüksek insidans oranı 70 yaşın üzerindeki kişilerden raporlanmıştır[50][41].

Ülkeler arasında bu insidans oranlarındaki farklılıkların nedeni halen tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, çevrenin ve/veya belirli risk faktörlerine maruz kalmanın pankreas kanseri insidansında gözlenen coğrafi varyasyonla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bazı elde edilmiş veriler, tütün kullanımının tartışılan farklılıklar üzerinde bazı etkileri olabileceğini gösterirken[51], diğer veriler diyet tarzını ve obeziteyi işaret etmektedir[52][53]. Dikkate alınması gereken önemli bir nokta da teşhis araçlarının ve çeşitli teşhis yöntemlerinin kullanımındaki değişikliklerin gelişmiş ve gelişmemiş coğrafi alanlar arasında farklılık göstermesidir[54]. Erkeklerde pankreas kanserinin daha fazla görülmesinin altında yatan nedenler halen tam olarak aydınlatılamamıştır[55]. Bazı çalışmalara göre kadınlar oluşumlarından sorumlu çevreden gelen risk faktörlerine daha az maruz kalmaktadır ve bu tür malign tümörlere daha az eğilimlidirler[56][57].

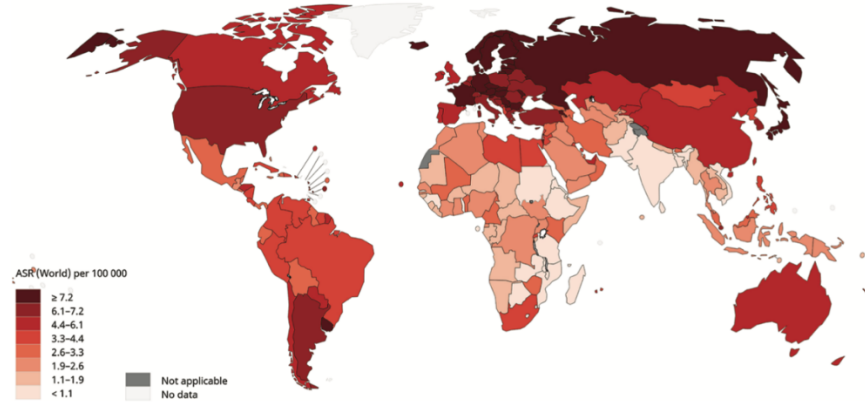


Şekil 8. Harita, hem cinsiyetler hem de tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaşa göre standardize edilmiş insidans oranlarını (ASR) göstermektedir(GLOBACAN).

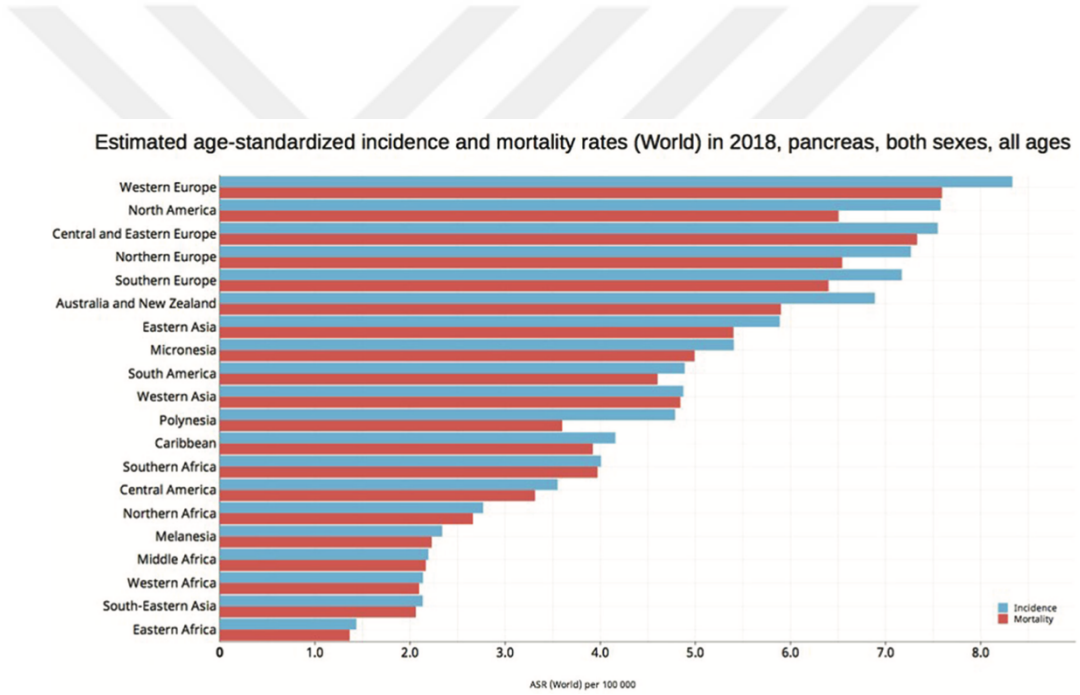
2.3.1.2 Mortalite

Dünyada pankreas kanseri için ölüm oranları önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (Şekil 9). 2018 yılında en yüksek ölüm oranları Batı Avrupa’da(100.000’de 7.6), Orta ve Doğu Avrupa’da(7.3), ardından Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika’da(6.5) kaydedilmiştir(Şekil 7-şekil 3). En düşük oranlar ise Doğu Afrika(1.4), Güneydoğu Asya ve Batı Afrika(2.1) ülkelerinde rapor edilmiştir. Ölüm oranlarındaki farklılıklar, en yüksek ve en düşük orana sahip popülasyonlar arasında 30 kat olmuştur(Uruguay’a karşı Gine: 9.9’a karşı 0.32). Pankreatik kanser nedeniyle ölümlerin %46.4’ü Asya’da, %29.6’sı Avrupa’da, %52.3’ü en gelişmiş ülkelerde meydana gelmiştir. Hem erkeklerde hem de kadınlarda pankreas kanseri ölüm oranı yaşla birlikte artmaktadır ve tüm ölümlerin neredeyse %90’ı 55 yaşından sonra görülmektedir[49].

2018 yılında erkeklerde en yüksek ölüm oranları Moldova Cumhuriyeti (12,3) ve Uruguay’da (12,1) kaydedilirken, kadınlarda ölüm oranları en yüksek Birleşik Arap Emirlikleri (10,0) ve Uruguay’da (8,1) kaydedilmiştir. Erkeklerde en az ölüm oranları ise Tanzanya (0,3) ve Malavi’de (0,32) kaydedilirken, kadınlarda Gine (0,2) ve Pakistan’da (0,3) raporlanmıştır. Pankreas kanserinde insidans ve mortalite oranları arasındaki benzerlik, bu hastalığın ölümcül doğasını göstermektedir[58](Şekil 6). Erken semptomların görülmemesi nedeniyle pankreas kanserini teşhis etmek zor olduğundan, otopsi çalışmalarında pankreas kanseri en sık saptanan kanser tipidir[59].



Şekil 9. Harita, hem cinsiyetler hem de tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranlarını (ASR) göstermektedir(GLOBACAN).



Şekil 10. Çubuk grafik, hem cinsiyetler hem de tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya genelinde pankreas kanseri için tahmini yaşa standardize edilmiş insidans ve ölüm oranlarını (ASR) göstermektedir(GLOBACAN).

2.3.2 Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanserine yol açan risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olarak 2'ye ayrılmaktadır.

2.3.2.1 Değiştirilebilir Risk Faktörleri

Değiştirilebilir risk faktörleri arasında sigara, alkol, obezite, günlük faktörler ve toksik maddeye maruziyet yer almaktadır.

2.3.2.1.1 Tütün Ürünü Kullanımı

Dünya çapında bir milyondan fazla insan tütün kullanmaktadır ve bu durum pankreas kanseri için en önemli çevresel faktörü temsil etmektedir. Ulusal Kanser Araştırma Ajansı, tütün kullanımının nedensel olarak pankreas kanseri ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır. Sigara içme süresi ve günlük içilen sigara miktarı arttıkça pankreas kanseri riski artmaktadır[51]. Bu risk sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre neredeyse iki kat daha fazladır. 82 çalışmanın yakın tarihli bir meta analizi, pankreas kanserinin göreceli riskinin(RR) sigara kullanımı sırasında $RR=1.74$ olduğunu, daha önce tütün kullananlar için $RR=1.2$ olduğunu ve riskin tütün kullanımını bıraktıktan sonra en az 10 yıl daha devam ettiğini göstermektedir[60]. 2012'de, Avrupa Kanseri Araştırması (EPIC) çalışması, günde içilen her beş sigarada pankreas kanseri riskinin arttığını ve ayrıca pasif içiciliğin pankreas kanseri riskini % 50 artırabileceğini göstermiştir[61]. Birçok gelişmiş ülkede sigara içme prevalansı düşerken, diğerlerinde yüksek olmaya devam etmekte ve kadınlar arasında ve gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır.

2.3.2.1.2 Alkol Kullanımı

Yapılmış birçok çalışma göz önüne alındığında, pankreas kanseri yüksek alkol alımıyla(günde üçten fazla içkiyle) artarken, düşük ve orta düzeyde alkol alımı ile hiçbir ilişkisi bulunmamaktadır[62]. 2010 yılında yapılmış bir vaka-kontrol çalışması, 60 g/gün veya daha fazla alkollü içki tüketiminde pankreas kanseri riskinde artış gözlemlendi ancak bira veya şarapla herhangi bir ilişki bulunmamıştır[63]. Yakın zamanda yapılan bir araştırma, ağır alkol tüketiminin, halen sigara içenler arasında pankreas kanseri riskinde önemli bir artışla ilişkili olduğunu bulmuştur ancak bu risk sigara içmeyenler arasında gözlenmemiştir. Ek olarak düşük ila orta düzeyde alkol alımı, sigara içenler arasında artmış pankreas kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum sigaranın alkol-kanser ilişkisini değiştirebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, alkollü pankreas kanseri için bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirmek zordur[64].

2.3.2.1.3 Obezite

Obezite, pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri için de artmış risk ile ilişkili bulunmuştur. Bazı çalışmalar obezitenin pankreas kanseri insidansını ve mortalitesini arttırdığını bulmuştur[65]. Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, erken yetişkinlik döneminde aşırı kilolu (vücut kitle indeksi (BMI): 25.0 - 29.9 kg / m²) veya obez (BMI $\geq$ 30 kg / m²) olmanın daha yüksek pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, daha büyük yaştaki (30-79 yaş) obezite, daha düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir[66]. Bir Amerikan Kanser Derneği (ACR) çalışmasında, her iki cinste de obezler arasında pankreas kanseri riski, sağlıklı vücut kitle indeksi (18.5 - 24.9 kg / m²) olanlara kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur(RR = 2.08). Yakın tarihli bir meta-analiz, hem genel hem de abdominal şişmanlığın artmış pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu hipotezini doğrulamıştır. Ayrıca, fiziksel hareketsizliğin (yağ birikimine ve aşırı kiloya katkıda bulunabilir), pankreas kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir[67].

2.3.2.1.4 Diyet Faktörleri

Diyetin, pankreas dahil olmak üzere farklı sindirim sistemi hastalıkları ve kanser riskini etkileyebileceği düşünülmektedir. Diyet faktörleri, pankreas kanseri üzerinde % 30-50 oranında etkiye sahiptir ve bazı yiyeceklerin daha yüksek riskle ilişkilendirildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır[68][69][70]. Kırmızı et (özellikle yüksek sıcaklıkta pişirildiğinde), işlenmiş et, kolesterol, kızarmış yiyecekler ve nitrozamin içeren diğer yiyeceklerin tüketimi pankreas kanseri riskini arttırmaktadır[71][72]. Et veya işlenmiş etleri korumak için kullanılan nitrit veya N-nitroso bileşiklerindeki kanserojenlerin pankreas kanserinde rol oynaması mümkün görülmektedir. 11 vaka-kontrol çalışmasını içeren bir meta-analiz sonuçlarında, kırmızı et alımının pankreatik kanser riskini yaklaşık %48 arttırdığı bulunmuştur. Diğer yandan özellikle narenciye ve antioksidan yönünden zenginleştirilmiş sebze ve meyvelerin yüksek alımının koruyucu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür[73]. 11 prospektif çalışmanın başka bir meta-analizi, pankreas kanseri insidansı ile yüksek kırmızı (120 g / gün) veya işlenmiş et (50 g / gün) tüketimi arasında pozitif bir ilişki bulmuştur(sırasıyla RR = 1.13 ve RR = 1.19) [74]. Ancak bazı çalışmalar bu bulguları desteklememiş ya da sadece erkekler arasındaki ilişki için doğruluğunu desteklemiştir. 2016 yılında İngiltere'deki büyük bir kohort çalışmasında, pankreas kanserindeki ölüm oranının normal et tüketenlere kıyasla düşük miktarda et tüketenlerde yaklaşık %30-45 daha az olduğu görülmüştür[75].

2.3.2.1.5 Mesleki Maruziyetler

Bir popülasyondaki mesleki maruziyetlere (metal işleme ve pestisitlere maruz kalma dahil) bağlı pankreas kanserinin etiyolojik fraksiyonunun yaklaşık %12 olduğu tahmin edilmektedir. Mesleki maruziyetler ve pankreas kanserinin ilişkisini göstermek amacıyla yapılan bir meta-analiz, nikel maruziyetinde artmış bir risk göstermiştir[76]. Bununla birlikte, mesleki ortamlarda nikel'in, yüksek konsantrasyonlarda poliklorlu bifenil ile ilişkili olabileceği ve ikinci bileşiklerin, gözlenen artan riskten sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Nikelin kanserojen mekanizmaları, artan DNA metilasyonunu, DNA onarımını inhibe etmeyi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla apoptozu indüklemeyi içermektedir[77][78].

2.3.2.2 Değiştirilemez Risk Faktörleri

Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, etnisite, diabetes mellitus, ailede pankreas kanseri öyküsü, genetik faktörler, kronik enfeksiyonlar, non-O kan grubu ve kronik pankreatit yer almaktadır.

2.3.2.2.1 Cinsiyet

Pankreas kanseri erkeklerde kadınlardan daha yaygın gözlenmektedir. Küresel olarak, pankreas kanseri insidansı erkekler için 100.000'de 5.5 ve kadınlar için 100.000'de 4.0'dır[49]. Pankreas kanseri, muhtemelen çevresel veya mesleki risk faktörlerinin yanı sıra erkeklerde aşırı sigara içme alışkanlığı ve yüksek alkol alımı gibi yaşam tarzlarına bağlı olarak daha fazla görülmektedir, ancak erkeklerde ve kadınlarda kanser insidansını ve ölüm oranını etkileyen henüz keşfedilmemiş birçok genetik faktörün olduğu öngörülmektedir[48].

2.3.2.2.2 Yaş

SEER Kanser İstatistikleri verilerinde, pankreas kanserinin ağırlıklı olarak yaşlı nüfusun bir hastalığı olduğunu ve hastaların çoğunun 50 yaşın üzerinde olduğu bildirilmektedir. Pankreas kanserinin gelişme riski yaşla birlikte artmaktadır ve en sık oranla 60 ila 80 yaşları arasında rastlanmaktadır. Nadiren 40 yaşından önce görülür ve pankreas adenokarsinomu vakalarının yarısından fazlasının yaş ortalaması 71'dir[49][1]. En çok yaşlı nüfusta görülmesinin nedenleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bir pankreas lezyonu veya enflamatuvar durum meydana geldiği zaman sonunda kötü huylu bir neoplazmaya dönüşmesi birkaç yıl alabilmektedir. Ancak bu konunun aydınlatılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır[48].

2.3.2.2.3. Etnik Köken

Birçok çalışma farklı ırkların pankreas kanseri insidansında önemli farklılıklara yol açtığını göstermektedir. Afrikalı-Amerikalılar için pankreas kanseri insidans oranları Kafkasyalılarından daha yüksek iken, insidans Asyalı-Amerikalılar ve Pasifik Adalılarda en düşük görülmektedir[79][80]. Genel olarak, siyah insanlarda pankreas kanseri riski diğer ırksal gruplara göre oldukça yüksek görülmektedir. Irklar arasında pankreas kanseri insidansındaki farklılıklar, diyet, alkol, sigara ve vitamin D yetersizliği gibi değiştirilebilir risk faktörlerine bağlanmaktadır. Çinli, Japon ve Batılı hastalar arasında onkojen mutasyonlarını ve biyobelirteç immün ekspresyonunu karşılaştıran çalışmalar, pankreas kanseri olan Asyalı hastaların Batılı hastalardan farklı KRAS ve p53 ekspresyonlarına sahip olduğunu göstermiştir[81] ve her ırkın genetik ve moleküler pankreas kanseri insidansını etkileyebilen ve aynı zamanda ırksal farklılıklarda pankreas kanseri tedavisi sonrası sağkalım oranlarındaki farklılığı açıklayabilmektedir. Genel olarak, Asyalı hastaların Asyalı olmayan hastalara göre daha iyi bir sağkalım oranına sahip oldukları görülmektedir[82].

2.3.2.2.4 Diyabet

Hem tip I hem de II diyabet ile pankreas kanseri riski arasındaki pozitif ilişki çok sayıda çalışmada bildirilmiştir[70]. İtalyan popülasyonunda yapılan pankreas kanseri çalışması, diyabetin pankreas kanserlerinin % 9,7'sine atfedilebileceğini tahmin etmiştir. Diyabet özellikle Asyalılar ve Hispanik erkeklerde Beyazlar ve Siyahlara kıyasla pankreas kanseri gelişme riskinde 1,8 kat artışla ilişkilendirilmiştir[83]. Oral anti-diyabetik ilaçlar veya insülin kullanımı, azalmış pankreas kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Diyabet ve pankreas kanseri riski arasındaki ilişkinin derinlemesine incelenmesi, iki ana nedenden ötürü temel öneme sahiptir; hastalığın bir belirteci olarak ve özellikle pankreas kanserinin spesifik bir belirteci olarak yeni başlayan diyabetin olası kullanımı ve pankreas kanseri riski taşıyan bir popülasyonun seçilmesi. Örneğin Gullo ve arkadaşları, tip II diyabette pankreas kanseri riskinin 1,5 ila 2 kat daha yüksek olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, insülin direnci ve diyabetin kanser öncesi koşullar veya tanı konulmamış pankreas kanseri tarafından indüklenebileceğini öne sürmüştür[84]. Bu nedenle, diyabetin pankreas kanserinin başlangıcını tahmin edip edemeyeceğini veya bir belirteç olup olmadığını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır[48].

2.3.2.2.5 Aile Öyküsü

Pankreas kanseri olan bireylerin yaklaşık %5-10'unun ailede pankreas kanseri öyküsü bildirdiği tahmin edilmektedir[85][86][87]. Ailevi pankreas kanseri, çoğu çalışmada, bir çift birinci derece akrabaya (ebeveyn, kardeş veya çocuk) pankreas kanseri teşhisi konulan aileler olarak tanımlanmaktadır. Bu malign hastalığı olan ailelerin ileriye dönük analizi, ailesel pankreas kanseri olan bireylerin birinci derece akrabalarının genel popülasyona göre dokuz kat artmış pankreas kanseri riskine sahip olduğunu göstermektedir[88]. Bu risk, ailedeki en az iki birinci derece akrabada pankreas kanseri olduğunda ikiye katlanır ve pankreas kanseri olan üç veya daha fazla birinci derece akrabası olan kişilerde 32 kat artmaktadır. Ailesel pankreas kanseri olan hastalarda, sporadik pankreas kanserli hastalara göre daha prekanseröz lezyonlar vardır ve ekstra pankreas kanseri gelişme riski artmıştır[89].

2.3.3. Pankreas Kanseri Tedavisi

ABD'de 2019 yılında 56.770 tanı konulduğu ve 45.750 ölüm olduğu tahmin edilmektedir[90]. Bir analiz, 2030 yılına kadar ABD'de kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olarak pankreas kanserinin meme, prostat ve kolorektal kanserleri geride bırakacağını öngörmektedir[91]. Bu tahminler, bu ölümcül hastalığa sahip hastalar için yeni ve yenilikçi tedavi seçeneklerine acil ihtiyacı vurgulamaktadır.

2.3.3.1 Kemoterapi

Kemoterapi hastalığın tüm aşamalarında PDAC için tedavilerin temel taşı olmaya devam etmektedir. Son veriler ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayları üç ana tedavi kategorisine ayrılmıştır: adjuvan, rezeke edilemeyen/metastatik ve neoadjuvan/indüksiyon tedavileri[92].

2.3.3.1.1 Adjuvan Ayarı

2018'de yayınlanan GI PRODIGE 24, adjuvan modifiye FOLFIRINOX — infüzyon 5-floroürasil (5-FU), folinik asit, irinotekan ve oksaliplatin - gemitabin6 ile karşılaştırmıştır. "Değiştirilmiş" terimi, irinotekan dozlamasının 180'den 150 mg / m²'ye düşürülmesi ve 5-FU bolusun ihmal edilmesi anlamına gelmektedir. Bu değişiklikler, protokole özgü bir güvenlik analizi sırasında üçlü rejimle ilgili endişeler ortaya çıktıktan sonra yapılmıştır. MOS oranları, modifiye edilmiş FOLFIRINOX için benzeri görülmemiş bir 54.4 ay ve gemitabin kolunda 35.0 aydır[93]. Modifiye edilmiş FOLFIRINOX için uygun olanların, ameliyattan tamamen iyileşmiş ve performans durumu 0 ila 1 olan ve yeterli hematolojik ve hepatolojik işlevi olan hastaları içerdiğine dikkat etmek önemlidir, bu da adjuvan tedavi adaylarının uygunluğunun değerlendirilmesini önemli hale getirir. Gemitabin / kapesitabin ve modifiye FOLFIRINOX, rezeke edilmiş PDAC'li uygun hastalar için adjuvan ortamında güncel bakım standartlarıdır[94].

2.3.3.1.2 Çıkarılamayan / Metastatik Hastalık

Daha önce tartışılan sitotoksik rejimlerin çoğu ilk olarak metastatik hastalığı olan hastalarda çalışılmıştır. 2011'de yayınlanan ACCORD çalışması, FOLFIRINOX'u metastatik PDAC'de (mPDAC) gemitabin ile karşılaştırarak üçlü kolda 11.1 aylık ve monoterapi ile 6.8 aylık mOS oranları ile sonuçlanmıştır[43].

2.3.3.4 İmmünoterapi

PDAC, diğer birçok maligniteye kıyasla immünoterapiye(IO) büyük ölçüde yanıt vermemektedir. Tek ajan IO ve çift ajan IO uygulamasının yanı sıra sitotoksik kemoterapi ve radyasyon ile kombine çalışmalarda yapılmış fakat anlamlı bir klinik sonuç alınamamıştır[95]. PDAC'de IO'ya karşı direncin altında yatan mekanizmalar için bir çok hipotez üretilmiştir. Bunlar; tümör mikro ortamında bir immünosupresif infiltrat olması, efektör hücrelerin göçünü bozan yoğun stromanın oluşu ve immün kontrol noktası sinyaliyle birleştirilmiş efektör hücre eksikliğini içermektedir[96].

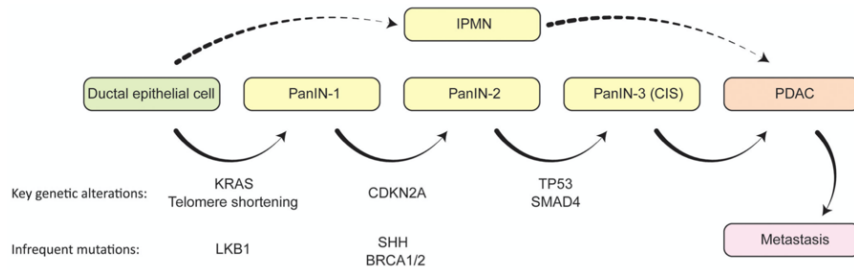
Bu durumların üstesinden gelebilmek amacıyla birçok çalışma devam etmektedir. Diğer birçok malignitede efektif rol oynamasına rağmen IO'nun klinik deneyler dışında PDAC tedavisinde kullanılamamaktadır[92].

2.3.4 Pankreas Kanserinin Moleküler Patolojisi

Pankreas kanseri, endokrin ya da ekzokrin hücrelerden kaynaklanabilmektedir. Endokrin ve ekzokrin tümörler histolojik görünümüleriyle ayırt edilebilmektedir. Endokrin tümörler pankreas kanserinin yaklaşık %5'ini oluşturmakta ve nadir görülmektedir[97]. Endokrin tümörler yaygın olarak pankreas adacık hücrelerinde üretilir. Salgıladıkları hormonlara bağlı olarak insülinomalar, glukagonomalar ve gastrinomalar olarak kategorize edilmektedirler. Pankreas endokrin tümörleri hipoglisemi gibi semptomlara yol açan aşırı hormon üretimi yoluyla teşhis edilebilmektedir[98].

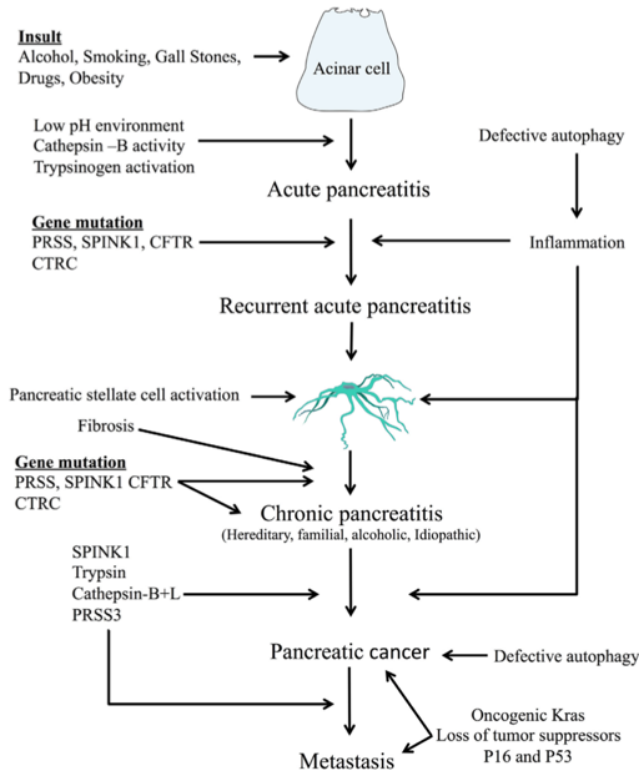
Ekzokrin hücrelerden türetilen pankreas kanseri, endokrin tümörlerden daha yaygın görülmektedir ve tipik olarak iki histolojik alt tipe ayrılmıştır. Pankreas duktal adenokarsinom(PDAC) alt tipi ekzokrin tümörlerin çoğunu oluşturmaktadır ve tüm pankreas malignitelerinin %90'dan fazlasını oluşturmaktadır. PDAC'ler, pankreas kanalı hizasında ve bez benzeri olan epitel hücrelerinden üretilmektedir[97]. Bu tipi sıklıkla karaciğere ya da lenf düğümlerine metastaz yapmaktadır[99]. Kanser gelişiminin erken aşamalarında semptomlarla karşılaşılmasından dolayı PDAC'ler genellikle geç bir aşamada, potansiyel olarak kanser metastaz yaptıktan sonra teşhis edilebilmektedir.

PDAC'lardan önce pankreatik intraepitelyal neoplaziler(PanIN'ler) ve prekanseriz olan ve kansere dönüşme eğilimi gösteren intraduktal papiller müsinöz neoplazmalar(IPMN'ler) olarak bilinen hiperplastik lezyonların gelişimi gelmektedir (Şekil 11). IPMN'ler pankreas kanalına çıkıntı yapan papilla benzeri yapılardır[89]. Müsinöz tümörler ise pankreas kanserinin %10'dan azını oluşturan en yaygın ikinci histolojik alt tipidir. Bu tümörler tanı anında genellikle adenokarsinomlardan daha az invazivdir ve karşılaştırıldığında 0,88 kat daha düşük mortalite göstermektedir[97].



Şekil 10. Pankreas Kanserinin Gelişim Yolu. Pankreas kanseri, iki histolojik alt tip olan PanIN ve IPMN'lerin gelişmesiyle meydana gelir. Patogenezin ilerleyen aşamalarında moleküler değişiklikler meydana gelir. Bu lezyonlarda meydana gelen genetik değişiklikler, en sık meydana geldikleri aşamalarda gösterilmiştir(Grant ve ark., 2018).

Diğer bir yandan sindirim zimojenlerinin erken aktivasyonu ve enflamatuvar araçları meydana gelmesi, pankreatitte anahtar başlatıcı roledir. Bu olaylar akut SP'ye ve hatta pankreas kanserine ilerlemenin temelini oluşturabilmektedir (Şekil 12)[100].



Şekil 11. Akuttan kronik pankreatite ve pankreas kanserine hastalığın ilerlemesi ile ilişkili yaygın yollar. Pankreatit, hücresel ortamdaki değişiklikler ve erken sindirim enzimi aktivasyonu ile başlar. Tripsinojen aktivasyonu / inaktivasyonu ile ilişkili gen mutasyonları, pankreası hastalık gelişimine yatkın hale getirir. Hastalık ilerledikçe otofaji, artan iltihaplanma, pankreas hücre aktivasyonu ve fibroz meydana gelir. Pankreas kanseri ve metastaza doğru ilerleme aynı zamanda otofajinin yanı sıra hücre dışı matriks degradasyonu, hücre proliferasyonu,

onkogenik Kras ekspresyonu ve tümör baskılayıcıların (örneğin, P16 ve P53) kaybı ile ilişkilidir(Kolodecik ve ark., 2014).

2.4 GHRH

Büyüme hormonu salgılayıcı faktörün varlığı ilk kez 1961'de Reichlin tarafından keşfedilmiştir ve sıçanlarda ventromedial hipotalamusun bilateral lezyonlarının büyüyen bireylerde doğrusal büyümenin bozulmasına neden olduğunu göstermiştir[101]. Birçok çabaya rağmen, büyüme hormonu salgılayan faktör 20 yıldan daha uzun bir süre sonrasına kadar belirlenememiştir. 1982'de iki grup araştırmacı, hipofiz tümörü yokluğunda akromegaliye neden olan pankreas tümörlerinden 40- ve 44- amino asit peptitlerini izole etmiş ve karakterize etmiştir[102][103]. Daha sonra keşfedilen hipotalamik büyüme hormonu salgılayan hormonun (GHRH) sonunda tümörlerden bir yıl önce izole edilenle aynı olduğu gösterilmiştir[104][105]. 44 amino asit peptidin yapısı şu şekilde tanımlanmıştır:

Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Gly-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂[9].

2.4.1 GHRH Proteini

İnsan GHRH geni kromozom 20'de lokalize haldedir[106]. Beş ekson içerir ve yaklaşık 10-18 kilobazlık genomik DNA'yı kapsamaktadır. İnsan GHRH için öncü protein, 40- veya 44-amino asit GHRH peptidine işlenebilen 108 amino asit içermektedir[107]. Tam biyolojik aktivite, N-terminal 29 amino asit fragmanı tarafından korunmaktadır. İnsan pankreas tümöründen ve hipotalamustan izole edilen GHRH'lerin, hipofiz hücrelerinden büyüme hormonu salgılanmasını uyardığı gösterilmiştir[108][109].

GHRH, hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptid (PACAP) / glukagon süper ailesine aittir. Bu aile dokuz hormon içerir: GHRH, glukagon, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1), GLP-2, glikoza bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP), peptit his-tidin-metiyonin (PHM), PACAP, sekretin ve vazoaktif bağırsak polipeptidi (VIP)[110].

2.4.2 GHRH Reseptörü

GHRH reseptörü(GHRHR); sekretin, VIP, glukagon, GLP-1, PACAP ve GIP reseptörlerini de içeren Gs-protein-bağı reseptörler ailesinin bir üyesidir. GHRHR, 423 aminoasitli bir proteindir ve yedi hidrofobik transmembran alanı bulunmaktadır. İnsan GHRHR geni kromozom 7 ile eşleştirilmiştir. 10'dan fazla ekson içermektedir ve kromozomda 8 kilobazdan fazla alanı kapsar. GHRHR geninin 5-bağlanma bölgesi, CREB(cAMP yanıt elementi), Pit-1(hipofize özgü transkripsiyon faktörü), östrojenler(östrojene yanıt veren faktörler), glukokortikoidler(glukokortikoide yanıt veren faktörler) gibi faktörler için bağlanma bölgeleri içermektedir[111][112].

GHRHR, plasenta ve böbrek gibi birkaç dokuda düşük ekspresyon göstermektedir. Baskın olarak ön hipofiz bezinde eksprese edilmektedir. GHRHR için düşük mRNA seviyeleri, mide mukozası, kolon mukozasındaki nöroendokrin hücreler, pankreas, böbrek, akciğer, karaciğer ve prostat gibi dokularda da tespit edilebilmektedir[113][10].

Yapılan çalışmalarda, lenfomalar, glioblastoma ve SCLC hücre hatları da dahil olmak üzere insan kanserlerinin bazılarında hipofiz tipi GHRHR'lerin düşük olduğu bilinmektedir[9][10].

2.4.3 GHRH ve Kanser İlişkisi

GHRH ve reseptörlerinin varlığı ve GHRH geninin plasenta, yumurtalık, testis, sindirim sistemi ve tümörlerde dahil olmak üzere çeşitli ektrahipotalamik dokularda ekspresyonu; GHRH'nin bu dokularda GH sekresyonunun düzenlenmesinden bağımsız bir rolü daha olabileceğini düşündürmektedir[114]. GHRH'nin ve reseptörlerinin karsinogenezdeki rolüne ilişkin birçok kanıt bulunmaktadır. GHRH için mRNA'nın varlığı; insan prostatı, meme, yumurtalık, endometriyal, adrenal ve pankreatik kanser dokularının cerrahi örneklerinde gösterilmiştir[115][116]. Ek olarak, birçok insan kanseri hücre hatlarında GHRH peptidi için mRNA ifade edilmektedir. Bu hücre hatları; endometriyal, yumurtalık, prostat, pankreas, mide, kolorektal, akciğer(hem küçük hücreli akciğer karsinomları(SCLC) hem de SCLC olmayan) ve beyin dokusu, kemik sarkomları, lenfomalar, böbrek karsinomlarında türetilenleri içermektedir[13][117].

İlk olarak pankreas ve karsinoid tümörlerde görülen GHRH peptidi daha sonrasında meme, yumurtalık, kolorektal, mide, pankreas ve akciğer kanserlerinde (hem SCLC hem de SCLC olmayan) ve lenfomalarda da tespit edilmiştir[115][118][119]. GHRH peptidi üreten insan kanser hatları arasında göğüs, endometriyal, SCLC, SCLC olmayan ve prostat kanserleri, osteosarkomlar ve lenfomalar bulunmaktadır[118][119][116].

In vitro testlerde, GHRH agonisti MR-409'un, NCI-H446 küçük hücreli akciğer kanseri(SCLC) ve HCC827, NCI-H460 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin yanı sıra PANC-1 pankreas kanseri, HCT-116 ve HCT-15 kolorektal kanseri, J-82 mesane kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser hattında hücre canlılığını desteklediği bilinmektedir[120]. MR-409 agonistinin aynı zamanda G1'den S fazına geçişini tetiklediği ve siklin D1-D2 ekspresyonunu uyararak hücrede apoptozu azalttığı, bunun yanı sıra GHRH antagonisti olan MIA-602'nin ise hücre canlılığını baskılayarak apoptozu uyardığı gözlenmiştir. Akciğer kanseri hücrelerinin agonist MR-409 ile inkübasyonu hücrel cAMP üretimini uyarırken, antagonist MIA-602 ile inkübasyon bu uyarıyı azaltmıştır[120].

2.4.4 GHRH Özgü Peptit Antagonistleri

Büyüme hormonu salgılatıcı hormonun(GHRH) antagonistleri başlangıçta GHRH'nin veya büyüme hormonunun(GH) aşırı sentezinin neden olduğu bozuklukların tedavisi için geliştirilmiştir. Robberecht ve arkadaşları, Ala'nın GHRH(1-29) NH₂'nin 2. Pozisyonunda D-Arginin ile değiştirilmesinin GHRH antagonistlerini ürettiğini göstermiştir[12]. Bulunan ilk standart antagonistin, sıçanlarda GH salınımı baskılayabildiği ve ektopik GHRH senteziyle akromegali hastalarında GH seviyelerinde %30-40 oranında inhibisyon oluşturduğu gözlenmiştir[121].

İlk antagonist (Ac- [Tyr¹, D-Arg²] GHRH (1- 29) NH₂), çeşitli kanserlerin tedavileri için geliştirilen GHRH'nin daha güçlü antagonistik analoglarının geliştirilmesi için bir standart olarak kullanılmıştır[122].

GHRH antagonistlerinin antikanser uygulamaları için klinik durum, neoplazmalı hastalarda somatostatin analoglarının GH ve IGF-1 düzeylerini yeterince baskılayamadığı gerekçesiyle potansiyel olarak IGF-1'e bağlı olduğu öne sürülmüştür. Bu GHRH antagonistlerinin inhibe edici etkiler, çeşitli insan kanser modellerinde deneysel olarak değerlendirilmiştir[123][124].

İlk güçlü antagonistler(MZ serisi), -N ucunda hidrofobik bölgeler, -C ucunda bulunan enzime dirençli agmatin ve 4-kloro-fenilalanin,2-aminobütirik asit ve norlösine reseptöre bağlanma afinitesini ve stabiliteyi arttırmaktadır. MZ-4-71 ve MZ-5-156 hem in vitro hem de in vivo olarak bu analog serisindeki en güçlü antagonistlerdir[14].

Pozitif yüklü aminoasitlerin erken antagonistlere dahil edilmesi, biyoaktiviteyi daha da arttıran JV serisi analoglarına yol açmıştır[125][126]. Serin aminoasidinin arginin veya homoarginin ile değiştirilmesi, hipofiz GHRH reseptörlerine artan aktivite ve bağlanma afinitesi olan antagonistlerin gelişime yol açmıştır. Analog JV-1-36, en az 30 dakika boyunca in vivo GH salınımının inhibisyonunu güçlü ve uzun süreli olarak indüklemiştir[125]. In vivo GH salgılanması için JV 1-38'in antagonistik seviyesi zayıftır ancak önceki antagonistlere kıyasla daha güçlü anti-tümör etkileri göstermiştir[126].

JV peptidlerinin N-terminalinin yağ asitleri tarafından asilasyonu ile MZ-J serisi antagonistleri geliştirilmiştir. Bu lipopeptid antagonistlerinin GHRH reseptörüne bağlanma afinitesinin standart antagonistin afinitesinden 100 kat fazla olduğu görülmüştür. Bu antagonistlerin, prostat ve pankreas dahil çeşitli kanser tiplerinde tümörün büyümesi üzerine inhibitör etkisi ve kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir[127]. En sık incelenen olan GHRH antagonistleri Şekil 12'de verilmiştir.

Standard antagonist	[Ac-Tyr ¹ , D-Arg ²] hGHRH(1-29)NH ₂
MZ-4-71	[Ibu-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷] hGHRH(1-28)Agm
MZ-5-156	[PhAc-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷] hGHRH(1-28)Agm
MZ-4-243	[Nac0-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷] hGHRH(1-28)Agm
JV-1-10	[PhAc-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Arg ⁹ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
JV-1-36	[PhAc-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Arg ⁹ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
JV-1-38	[PhAc-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Har ⁹ , Tyr(Me) ¹⁰ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
MZ-J-7-30	[HOOC-(CH ₂) ₁₂ -CO-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Arg ⁹ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
MZ-J-7-46	[CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CO-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Arg ⁹ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
MZ-J-7-110	[HOOC-(CH ₂) ₁₂ -CO-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Arg ⁹ , Tyr(Me) ¹⁰ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
MZ-J-7-114	[CH ₃ -(CH ₂) ₆ -CO-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Amp ⁹ , Tyr(Me) ¹⁰ , Abu ¹⁵ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
JMR-132	[PhAc-Tyr ¹ , D-Arg ² , Phe(4-Cl) ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Tyr(Me) ¹⁰ , His ¹¹ , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
MIA-602	[(PhAc-Ada)0-Tyr ¹ , D-Arg ² , Fpa ⁵ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Tyr(Me) ¹⁰ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹] hGHRH(1-29)NH ₂
MIA-610	[PhAc0-Tyr ¹ , D-Arg ² , Cpa ⁶ , Ala ⁸ , Har ⁹ , Fpa ⁵ , His ¹¹ , Orn ¹² , Abu ¹⁵ , His ²⁰ , Orn ²¹ , Nle ²⁷ , D-Arg ²⁸ , Har ²⁹ , Ada ³⁰] hGHRH(1-30)NH ₂

Ibu, Isobutyryl; Nac, 1-Naphthylacetyl; PhAc, Phenylacetyl; Cpa, 4-chloro-Phe; Agm, Agmatine, Decarboxy-Arg; Amp, *para*-Amidino-Phe; Har, Homo-Arg; Abu, 2-Aminobutyric acid; Tyr(Me), *O*-Methyl-Tyrosine; Orn, Ornithine; Fpa, Pentafluoro-Phenylalanine; Ada, 12-Aminododecanoyl.

Şekil 12. Akuttan kronik pankreatite ve pankreas kanserine hastalığın ilerlemesi ile ilişkili yaygın yolaklar(Siejka ve ark., 2012).

2.4.5 GHRH Özgü Peptit Antagonistlerinin İn Vitro ve İn Vivo Mekanizmaları

GHRH antagonistleri tarafından tümör büyümesinin dolaylı inhibisyon mekanizması, GH-IGF 1 etkileşimini içermektedir ve IGF-1'e bağımlı kanser tipleri(prostat, meme ve kolorektal kanser gibi) için önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir. GHRH antagonistleri, hipofiz somatotroflarında bulunan GHRH reseptörlerine bağlanır ve hücre içi cAMP sinyal iletim yolunun hipotalamik GHRH aracılı aktivasyonunu bloke etmektedir. Bu durum, GH sentez ve salınımının inhibisyonuna yol açar ve karaciğerden IGF-1 üretiminin azalmasına neden olur[128]. Sentezlenen ilk antagonist dizileri, güçlü endokrin aktivitesine sahiptir ver IGF-1 konsantrasyonunda önemli düşüş sağlamıştır. Bununla birlikte IGF'ler(IGF-1 ve IGF-2) çeşitli kanser tiplerinde tümör büyümesini sadece endokrin yolla değil aynı zamanda otokrin ve/veya parakrin mekanizmalarıyla da etkileyebilmektedir[128][123]. Birçok neoplazm, IGF ve ilgili ligandlar için reseptörleri ifade etmektedir ve in vitro olarak eksojen IGF'lere yanıt şeklinde çoğalmaktadır. Bu neoplazmlar; prostat, böbrek, pankreas gibi doku tiplerinde görülmektedir[123].

H-69 SCLC ve MDA-MB-435 meme kanseri, LNCap prostat kanseri ve HEC-1A endometriyal kanseri hücre hatlarında GHRH antagonistlerinden sonra gözlemlenen tümör inhibisyonu, IGF-1 ve IGF-2 aracılığıyla otokrin GHRH'nin uyarıcı etkisinin blokajıyla sağlanmaktadır[129][130].

MXT fare meme kanserinde, tümöral GH ve GH reseptör seviyeleri, GHRH antagonistleriyle tedavi sonrasında azalmıştır[131]. GHRH antagonistleri, in vitro kültürlenmiş fare endotel hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörünün(VEGF) proliferasyonunu ve sekresyonunu inhibe ettiği görülmüştür[132]. Yumurtalık kanseri modelinde, GHRH antagonistlerinden biri olan JMR-132, epidermal büyüme faktörü reseptörünün(EGFR) seviyesinin önemli oranda düşürmüştür ve siRNA ile EGFR ekspresyonunun azaltılmasıyla JMR-132'nin antiproliferatif etkisinin SKOV3 ve CaOV3 hücre hatlarında ortadan kalktığı gözlemlenmiştir[133]. Son sentezlenen GHRH antagonistlerinden olan MIA-313 ve MIA-602 ile yapılan bir Matrigel Plug testinde OVCAR-3 hücre hatlarında VEGF sekresyonunun azaldığı ve tümör vaskülarizasyonunun düştüğü gözlenmiştir[134].

GHRH antagonistleri için bağlanma bölgelerinin belirlenebilmesi bu peptid gruplarının tümör büyümesini doğrudan inhibe edebileceği gözlemlerini doğrulamıştır[135][136]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar SV1 reseptörü aracılığıyla etki edebilen eksojen olarak desteklenen GHRH'nin hücresel proliferasyonun uyarılmasıyla ilişkili görülen MAPK yolunu güçlü bir şekilde aktive ettiğini göstermiştir[11]. Bu çalışmalara dayanarak, GHRH reseptörünün ekspresyonunun tümör hücrelerinde tek başına pro-büyüme ve antiapoptotik yolların aktivasyonunu içeren önemli hücre içi değişikliklere yol açabileceği ileri sürülmüştür ve ayrıca tümör hücrelerini doğrudan hedef alabilen yeni antagonistlerin geliştirilmesini desteklemiştir[6].

GHRH antagonistlerinin; çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesi, SV'lerin belirlenmesi ve yeni daha güçlü analogların sentezi üzerindeki doğrudan inhibe edici etkisinin kanıtı, onkogeneizde yer alan hücre içi yolların tanımlanmasını amaçlayan çalışmaları tetiklemiştir. GHRH antagonistlerinin, PKC-MAPK(protein kinaz C-mitojen ile aktive olan protein kinaz)[137] ve PI3K-AKT (fosfatidilinositol 3-kinaz-protein kinaz B)[138] sinyal yollarını inhibe edebilmekte ve ekspresyon seviyelerini azaltabilmektedir. GHRH antagonistleriyle yapılan bir çalışmada antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunun düştüğü ve proapoptotik bir protein olan BAX'ın ve kaspazların ekspresyonlarının arttığı görülmüştür[131]. LNCaP prostat kanseri hücre hattında ise kalsiyuma bağımlı bir apoptotik mekanizmayı tetiklediği bilinmektedir[139].

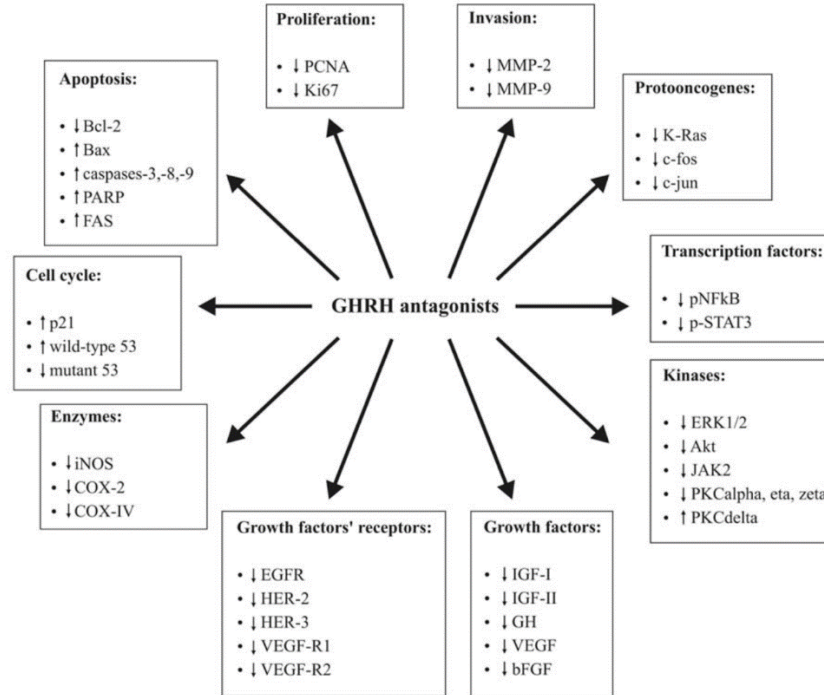


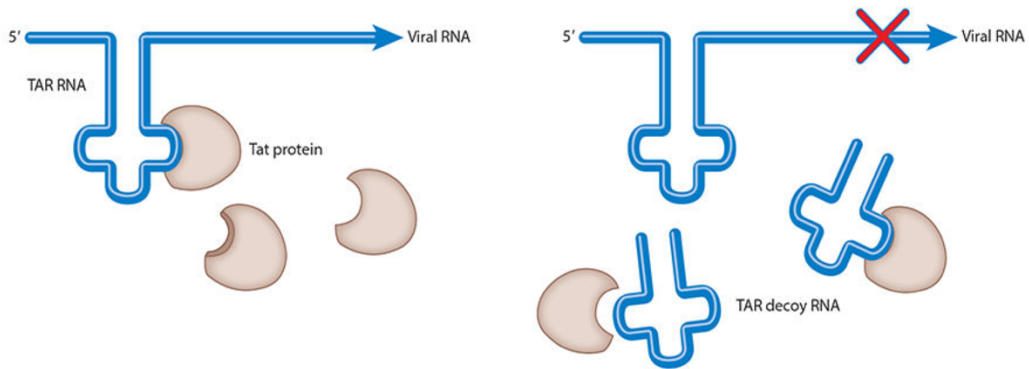
Fig. (1). Mechanism of Action of GHRH Antagonists.

Şekil 13. GHRH Antagonistlerinin çalışma mekanizmaları(Siejka ve ark., 2012).

2.5.Aptamer

Aptamerler, antikorlara benzer şekilde üç boyutlu bir yapıya katlanarak protein hedeflerine bağlanan tek sarmall deoksiribonükleik asit(DNA) veya ribonükleik asit(RNA) molekülleridir. Aptamer kelimesi, fit anlamına gelen Latince aptus'tan ve kısım veya bölge anlamına gelen Yunanca meros'tan gelmektedir. Aptamerler çoğunluklu, ilk olarak 25 yıl önce açıklanmış olan; üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi(SELEX) adı verilen yöntemle izole edilmektedir.

İster DNA ister RNA olsun nükleik asitlerin ligand olarak işlev görebileceği ve hedef alınan proteinlerin aktivitesini modüle edebileceği fikri, virüsler üzerinde yapılan bir çalışmanın sonucu olarak elde edilmiştir. Spesifik olarak, insan immün yetmezliği virüsünün(HIV) ve adenovirüsün moleküler biyolojisi üzerine yapılmış çalışmalar, bu virüslerin endojen proteinlere bağlanan küçük, yapılandırılmış RNA'yı kodladığını göstermiştir. Bu RNA ligandlarının viral replikasyonu kolaylaştırdığı ya da konakçı tarafından antiviral aktiviteyi düşürdüğü gözlemlenmiştir. Spesifik bir örnekte, HIV'in trans-aktivasyon yanıtı ya da TAR adı verilen kısa ve yapılandırılmış bir RNA dizisi geliştirmiştir. TAR RNA, her ikisi de gen ekspresyonunun ve viral replikasyonun kontrolünde bulunan hücresel ve viral proteinler olan siklin T1 ve Tat'a bağlanmaktadır (Şekil 14). Tüm bu bulgular; virologlara, protein bağlayan nükleik asit moleküllerinin terapötik ilaç ajanları olma potansiteline sahip olduğunu kanıtlamıştır[15].

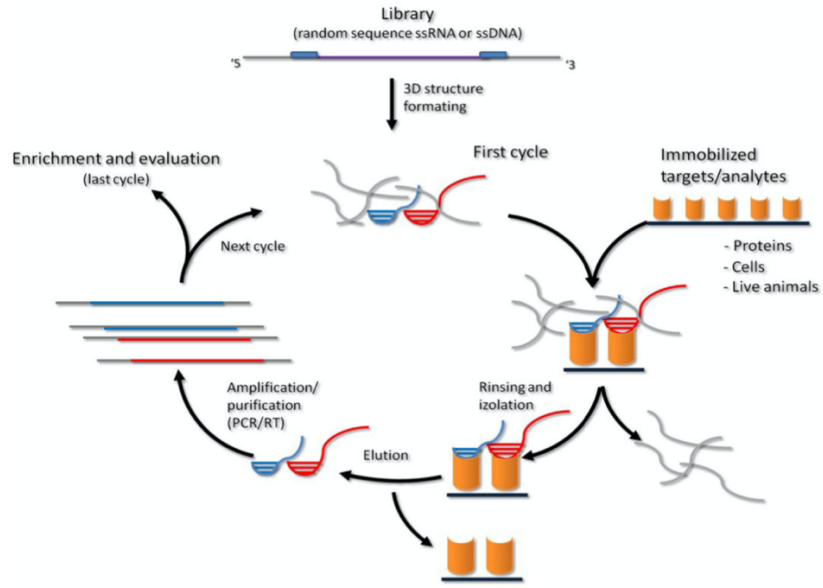


Şekil 14. TAR RNA'nın Tat proteinine bağlanması. TAR aptameri bir tuzak görevi görmektedir ve Tat proteininin endojen TAR RNA'ya bağlanmasını engeller. Böylece HIV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu inhibe etmektedir(Nimjee ve ark., 2018).

2.5.1 Aptamer Sentezi

Aptamerler, Ekspansiyel Zenginleştirme ile Ligandların SistematiK Evrimi(SELEX) adı verilen in vitro bir süreç ile sentezlenmektedirler. Bu moleküller, proteinler, peptidler, nükleotidler, antibiyotikler, toksinler ve küçük moleküller[140] gibi geniş bir hedef molekül yelpazesine yüksek afinite ve özgüllükle bağlanabilmektedir. SELEX süreci ilk olarak 1990 yılında üç bağımsız grup tarafından hedef moleküllere spesifik olarak bağlanabilen RNA dizilerini izole etmek için geliştirilmiştir[141].

Geleneksel SELEX; inkübasyon, bağlanma, bölünme ve amplifikasyon adımlarını içeren döngülerin tekrarlarından meydana gelmektedir. 10¹⁴ ila 10¹⁵ farklı sekans içeren rastgele bir oligonükleotid sekans havuzu(başlangıç kütüphanesi), hedef moleküller ile inkübe edilir. Bu inkübasyon sırasında, bazı diziler hedef moleküllere bağlanırken, diğer diziler zayıf bir şekilde bağlanır ya da hiç bağlanmaz. Bölümleme aşaması, bağlı sekansların, zayıf bir şekilde bağlı ya da bağlı olmayanlardan izole edildiği aşamadır. Ayrıştırılmış oligonükleotidler, kütüphaneyi zenginleştirmek amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) veya ters transkripsiyon PCR(RT-PCR) ile amplifiye edilmektedir[142][143](Şekil 15). Çift sarmallı DNA'dan(dsDNA) ssDNA oluşturmak için çeşitli SELEX yöntemleri vardır(Tablo 1). Elde edilen ssDNA'lar daha sonrasında bir sonraki seçim turunda kullanılmaktadır[144]. Çoğu durumda, SELEX aracılığıyla izole edilmiş aptamerler, mikromolardan nanomolara'a kadar değişen yüksek afinite ve düşük ayrışma sabitine(kD) sahiptir[145].



Şekil 15. Temel SELEX'in şematik gösterimi (Klug & Famulok, 1994).

Tablo 1. SELEX yöntemi tiplerinin gösterilmesi, SELEX tiplerinin avantajları ve dezavantajlarının açıklanması (Zhang ve ark., 2019).

Metod	Anahtar Hususlar	Avantajlar	Dezavantajlar
IP-SELEX	İmmün çöktirmeyi içermektedir.	Proteinlere karşı aptamerleri normal fizyolojik koşullar altında seçer. Artan afinite ve özgüllük.	Standart SELEX'ten daha fazla zaman alır.
Capture-SELEX	Oligonükleotid kitaplığı, küçük çözünür moleküllere karşı aptamerleri tanımlamak üzerine hedeflidir.	Küçük moleküllere karşı aptamer seçimi için uygundur. Yapı değiştirme aptamerlerinin bulunması için kullanılır.	Kütüphanedeki serbest oligonükleotidler seçilemeyebilir.
Cell-SELEX	Aptamer seçilimi için hedef olarak tüm canlı hücreleri kullanır.	Aptamerler, doğal hallerinde moleküllere karşı seçilirler. Hücre yüzeyinde birçok potansiyel hedef mevcuttur ve protein saflaştırması gerekli değildir.	Hücre yüzeyi için hedefleri uygundur.
CE-SELEX	İyonların elektroforetik hareketliliğine dayalı olarak ayrılmasına dayanır.	Hızlıdır. Yalnızca birkaç (1-4) seçim turu gereklidir. Hedef sabitleme gerekli değildir.	Yüksek düzeyde teknik uzmanlık gerektirir. Pahalıdır.
M-SELEX	SELEX yöntemini mikroakışkan bir sistem ile birleştirir.	Hızlı ve çok verimlidir(sadece az miktarda reaktif gereklidir.). Küçük moleküllere uygulanabilir.	Hedefin hareketsizleştirilmesi gerekmektedir. Saflık ve aptamer geri kazanımı düşüktür.

AFM-SELEX	Yüzeyin üç boyutlu görüntüsünü oluşturmak amacıyla AFM kullanır.	Yüksek afiniteli aptamerleri izole edebilir.	Hedef ve aptamerlerin hareketsizleştirilmesi gereklidir. Gerekli ekipmanlar pahalıdır.
AEGIS-SELEX	Yapay olarak genişletilmiş genetik kod ile kütüphaneleri kullanır.	Seçilen aptamerler yüksek özgüllüğe sahiptir.	Doğal olmayan bazlar doğa DNA polimerazlar tarafından kötü tanımlanmaktadır.

2.5.2 X-Aptamer

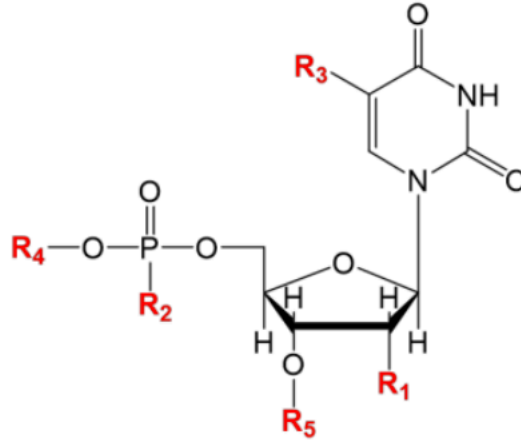
X-aptamerleri, aminoasit benzeri yaz zincirleri, foroditiyoatları ve çok çeşitli kimyasal modifikasyonları kullanarak kimyasal olarak modifiye edilmiş, afinite gösteren DNA ajanlarıdır. X-aptamerler hedef proteinlere yüksek özgüllük ve afinite ile bağlanmaktadır. Moleküler tanıma için yeni potansiyel gösteren X-aptamerleri, düşük moleküler ağırlıklı substratlar veya makromoleküller için spesifik tanıma özelliklerine sahiptir[146].

SELEX tekniği kullanılarak geliştirilen birçok aptamer, terapötik etkinlik için gerekli bağlanma affinitesine ve özgüllüğe sahip değildir[147][148]. X-aptamer(XA) tekniği ile sentezlenen aptamerler SELEX aptamerlerine karşı benzersiz alternatifler olarak görülmektedir. XA tekniği ile sentezlenen aptamerler, hedeflenen proteinlerle daha sağlam bir şekilde etkileşime girer, daha işlevseldir ve geleneksel aptamerlerin performanslarını iyileştirmek için umut vaat etmektedir[148][149].

XA'lar, boncuk bazlı seçimlerin kütüphanesinden, katı faz senteziyle tek bir turla seçilmektedir[150][151]. Bu kütüphanelerde, modifikasyonların çeşitliliği ve kombinasyonu, enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilen kütüphanelere kıyasla daha başarılı ve özgün görülmektedir[152].

2.5.3 Aptamer Modifikasyonları ve Tipleri

Aptamerlerin konformasyonel çeşitliliği ve hedefleme özgüllüğü, protein-protein etkileşimlerinin inhibitörleri olarak terapötik uygulamalar için umut verici bir potansiyel sağlamaktadır. Bu amaçla, aptamerlerin çeşitli özellikleri ve tipleri vardır. İlk olarak, terapötik aptamerler vücutta oldukça stabil bulunmalıdır. Doğal RNA ve DNAi endojen nükleazlara duyarlı olduğundan, şeker ve/veya fosfodiester omurgası üzerindeki kimyasal modifikasyonlara yeterince dikkat edilmelidir (Şekil 16). İkincisi, nükleotid uzunluğu yeterince kısa tutulmalıdır. Aptamerin kısa olması ilaç üretiminde maliyeti düşürecek ve beklenmedik toksisiteyi önlemeyecektir. Üçüncüsü, terapötik aptamerler, diğer ilaçlarda da olduğu gibi iyi farmakokinetiklere sahip olmalıdır. Aşağıdaki bölümlerde, terapötik aptamer tiplerindeki farklılıklar hakkında detaylı bahsedilmektedir.



R_1 : OMe, NH_2 , F, LNA, etc.

R_2 : S, S_2 , CH_3 , etc.

R_3 : a variety of functional side chains

R_4 : 5'-end modification, PEG, Cholesterol, etc.

R_5 : 3'-end modification, PEG, Cholesterol, inverted dT, etc.

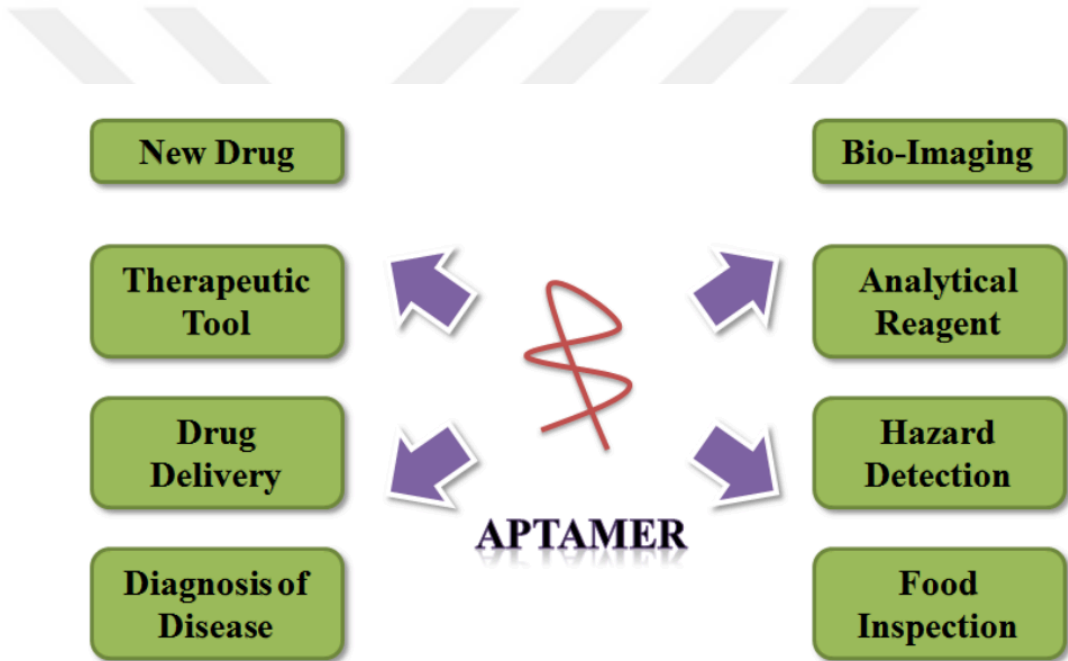
Şekil 16. Bir polinükleotid elementinin kimyasal yapısı. Belirtilen konumlardaki değişiklikler gösterilmektedir. OMe: O-metilasyon, LNA: kilitli nükleik asit, PEG: polietilen glikol.

Çeşitli nükleik asitler hemen hemen her hedef için bir aptamerin seçilimini mümkün kılmaktadır. Yapılan hesaplamalar, test edilen farklı dizilerin optimal baz sayılarının 1013 ila 1015 arasında değiştiğini göstermiştir. Hem RNA hem de DNA aptamer olarak kullanılabilir; RNA hücre içi ekspresyonu mümkün kılarken, DNA daha fazla stabilite göstermektedir(Random ve ark., 2013). DNA ve RNA kütüphaneleri, belirli bir ikincil yapı oluşturmak için hedeflenen aptamerleri çevreleyen dizileri veya olası dizilerin aralıklarını büyük ölçüde genişletebilecek oligonükleotid dizilerini içermektedir. Bu durum, in vivo stabilite veya RNaz ve DNaz'a direnç gösteren aptamerler özelliklerini de etkileyebilmektedir.

Oligonükleotidler, riboz hidroksil gruplarından birinin bir metil veya bir alkil grubuyla ikame edilmesiyle kolaylıkla modifiye edilebilmektedir(Cummins ve ark., 1995). Nükleik asitlerin alkilasyonunun, 20-0-metilpirimidin içeren aptamerleri meydana getirdiği bilinmektedir, bu tür modifiye edilmiş aptamerler daha karardır ve eksonükleaz enzimlerinin saldırılarına karşı daha dirençlidir. Seçili aptamerin dimerizasyonunun, ligandın moleküle karşı afinitesinin artmasına ve artan sayıda bağlanmayı mümkün kılan kompleksin dayanıklılığını arttırdığı görülmüştür. Buna bağlı olarak birden fazla molekül ile etkileşim kurmanın mümkün olduğu bilinmektedir(Hasegawa ve ark., 2008). Ek olarak aptamerler, aptamerin afinitesini kaybetmeden etiketlenmesini sağlayan ve boyanın flouresan özelliklerini koruyan “köprü” molekülleri olarak adlandırılan flouresan boyalar ile birleştirilebilmektedir. Moleküller arası tanıma bölgesindeki bu etiketleme, çalışmalarda aptamerlerin konformasyonel değişikliklerinin takip edilmesini sağlar ve hedef moleküle bağlandıktan sonra aptamerin kendisi bir biyosensör görevi görmektedir(Babendure ve ark., 2003).

2.5.4 Aptamerlerin Kullanım Alanları

Aptamerler, tanısal ve tedavi edici bir araç olarak yeni ilaçların ve ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla birçok çalışmada biyo materyal olarak incelenmiştir (Şekil 17). Kanser ve viral enfeksiyon gibi çeşitli hastalıklarda yer alan hedeflere özgü aptamer arama çalışmaları halen devam etmektedir. Geliştirilmiş aptamerlerin teşhis ve tedavi araçları olarak uygulama alanları incelenmiştir. 2004 yılında, neovasküler yaşa bağımlı maküler dejenerasyonun(AMD) tedavisi için endotelial büyüme faktörünü(VEGF) hedef alan spesifik bir aptamer olan Macugen'in Gıda ve İlaç Dairesi(FDA) tarafından onaylanması aptamer çalışmalarında ve uygulamalarında bir dönüm noktası olmuştur.



Şekil 17. Aptamerlerin çeşitli uygulama alanları (Song ve ark., 2011).

2.5.6 Tedavide Aptamerlerin Rolü

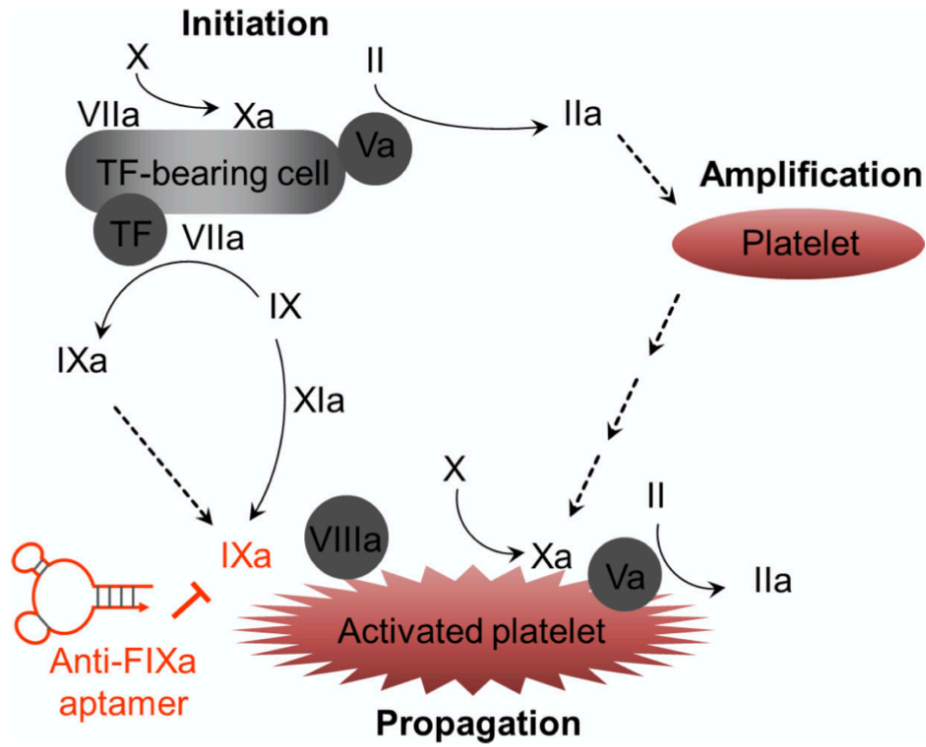
Aptamerler terapötik olarak geliştirilmiştir. Bu tür terapötik aptamerler, kanser, bulaşıcı hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalık türünün müdahalesi için biyolojik yolları modüle edebilmektedir. Bu alanda en iyi örnek AMD'yi tedavi etmek amacıyla FDA tarafından onaylanan Pegaptanib (Macugen®)'dir. Pegaptanib sodyum çözeltisi, VEGF'yi bloke ederek AMD'yi tedavi etmek için intravitreal olarak enjekte edilmektedir[153].

Antikanser terapötikleri olarak aptamerlerin geliştirilmesi için ise örnek AML dahil birçok kanser tedavisi için klinik test altında olan AS1411'dir[154]. Diğer birçok aptamerin aksine AS1411, SELEX yöntemiyle değil, antisens oligonükleotidlerinin antiproliferasyon etkisi için taranırken tesadüfen elde edilmiştir[155]. 26 nükleotidli AS1411 yalnızca guanin ve timin bazlarına sahiptir ve çözelti içerisinde guanin aracılı kuadrapleks yapıları oluşturmaktadır[156]. AS1411 aracılı antiproliferasyon etkisinin altında yatan mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır ancak Bcl-2 mRNA destabilizasyonu ve NF- κ B inhibisyonunu içeren sinyal yolları yoluyla hücre proliferasyonunun inhibisyonu aracılı olduğu gösterilmiştir[157].

Kanser tedavisinde kanser hücreleriyle doğrudan etkileşimde bulunan aptamerlerin geliştirilmesine ek olarak, bağışıklık sistemini modüle etmek ve kanser tedavisinde kanser hücre büyümesini dolaylı yolla engellemek içinde geliştirilebilmektedir. Bu aptamer sınıfının örnekleri arasında CD137'ye bağlanan multimerik aptamerler yer almaktadır. Bu aptamerler; aktif T hücrelerinde eksprese edilebilen ve T hücrelerinin proliferasyonunu, interlökin-2(IL-2) salgılanmasını ve hücrenin sitolitik aktivitesini arttırabilen bir kostimülatör faktördür[158].

Aptamer terapötikleri ayrıca enflamasyon ve bağışıklık sistemi ile ilgili proteinleri hedef alarak bulaşıcı hastalıkların inhibisyonu için geliştirilmektedir. Örneğin; HIV-1 viral enfeksiyonu, aslında aptamer olan bir trans-aktivasyon yanıtı(TAR) nükleik asit tuzağı kullanılarak ya da TAR elementine karşı seçilen spesifik bir aptamer tarafından inhibe edilmiştir[159]. Ek olarak HIV-1 Gag proteini, nükleokapsid proteini, Tat proteini ve gp120'yi[160][161] hedef alan spesifik aptamerler vardır ve tüm bu moleküler hedefler viral enfeksiyon ile yakından ilişkilendirilmiştir.

Aptamerler, kardiyovasküler hastalıkların geniş alanında da yaygın olarak araştırılmaktadır. Örneğin bir aptamer, pıhtılaşmada rol oynayan bir moleküler hedef için geliştirilmiştir. Bu aptamer, Faktör IXa(FIXa)'ya bağlanarak ve FIXa'yı inhibe ederek çalışan antikoagülan olarak geliştirilmiştir (Şekil 18)[162].



Şekil 18 FIXa'yı hedef alarak antikoagülan olarak aptamerlerin geliştirilme mekanizması. IXa'nın anti-FIXa aptamerleri tarafından inhibe edilebildiği ve böylece kan pıhtılaşmasını önlediği kan pıhtılaşma kademelerinin kısa bir açıklaması gösterilmektedir[162].

2.6 EMT

Vücut, farklı tip ve işlevlerdeki hücrelerden oluşmaktadır. Bu bölümde, iki spesifik tip olan epitel ve mezenkimal arasında meydana gelen ilişki açıklanacaktır. Epitel hücreleri, polar olmayan ve hücreler arasında hareketliliğe izin veren bağlantılara sahip mezenkimal olanlardan farklı olarak adhezyon kompleksleri tarafından oldukça yapışkandır[163]. Bu iki hücre tipi, esas olarak embriyonik aşamada meydana gelen epitel-mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinen sürece dahil olmaktadır[164]. Elizabeth Hay(1985) bu süreçle ilgili açıklamaları 40 yıldan daha uzun bir süre önce tavuklarda yapılan in vivo çalışmalarla yapmış ve epitelin mezenkimal hücrelere dönüşümünü gözlemlemiştir.

Daha sonra bu sürecin daha fazla hücre hareketliliği gerektiren ve dolayısıyla iyileşme süreci ve hatta kanserin ilerlemesi gibi artan göç kapasitesi gerektiren diğer yollarda da gözlemlenmesiyle, yalnızca embriyonik olarak değerlendirilmesine son verilmiştir[165]. Sürecin tersine çevrilebilirliği nedeniyle geçiş terimi kullanılmaya başlanmıştır(EMT-MET). EMT, ilgili sürece göre 3 tipte sınıflandırılabilir; gastrulasyon ve embriyogenez için tip1, rejenerasyon ve yara iyileşmesi için tip2, karsinogenez için tip3(Metastaz, malignite ve invazyon)[166].

Tümör mikro ortamı, enflamatuar ve bağışıklık hücreleri, hücre dışı matriks bileşenleri (ECM), kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), endotelial ve epitel hücreleri, perisitler, mezenkimal kök hücreler gibi çeşitli hücre tipleri içermektedir. Tümör ilerlemesinde, EMT indüksiyonu ve kanserin metastazı önemli bir rol oynamaktadır. Tümör hücrelerinde EMT'de meydana gelen süreçlerin değişmesi, TGF- β , NF-kB ve Wnt gibi birkaç hücre dışı sinyallemeye bağlı olarak gerçekleşmektedir[167].

2.7 ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES

Endoplazmik Retikulum (ER), hücrenin hayatta kalması ve normal hücresel aktiviteler için gerekli olan çoklu hücresel süreçlerde önemli rolleri olan bir organeldir. Bu süreçler, hücre içi kalsiyum homeostazı, protein sekresyonu ve lipid biyosentezini içermektedir[168][169][170]. ER'nin lümeni benzersiz bir hücresel ortam oluşturmaktadır. Örneğin, hücre içindeki en yüksek kalsiyum konsantrasyonu, Ca^{2+} -ATPases tarafından aktif taşınmayla ER'de bulunmaktadır. Ek olarak, protein katlanması ve salgılama yolunda taşınmasındaki rolü nedeniyle ER, glikozla düzenlenmiş protein (GRP78) gibi kalsiyuma bağımlı moleküler şaperonlar açısından da zengindir ve içerdği kalretikülin, protein katlanmasında ara maddelerin stabilize edilmesinde görev yapar.

Ek olarak, ER'de glikosilasyon ve lipidasyon dahil olmak üzere proteinlerin çeşitli post-translasyonel modifikasyonları meydana gelmektedir[170][171][172]. Biyosentetik kapasitesine ek olarak ER, protein kinazlar ve diğer modülatörlerin yanı sıra ikincil habercilere (örn. İnositol trifostat; IP) yanıt veren iyon kanalları aracılığıyla sekestre edilmiş kalsiyumu salma kabiliyeti nedeniyle bir sinyalleşme organelidir[172].

Çoklu rahatsızlıklar, ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olarak katlanmamış protein yanıtını evrimsel olarak korunmuş bir yanıtı tetikleyebilmektedir. Hipoksinin, oksidanların veya indirgeyici ajanların neden olduğu hücresel redoks regülasyonundaki bozukluklar, ER'nin lümenindeki disülfid bağlanmasına müdahale ederek proteinin açılmasına ve yanlış katlanmasına neden olmaktadır[173]. Glikoz yoksunluğu, ER'deki N-bağılantılı protein glikosilasyonuna müdahale ederek ER stresine yol açmaktadır. ER'deki kalsiyum regülasyonundaki anormallikler; GRP78, DRP94 ve kalretikülin gibi kalsiyuma bağımlı şaperoların protein açılmasındaki sorunlara katkıda bulunmaktadır.

Memeli hücrelerinde ER stres nedeniyle UPR'nin tektiklenmesinin sonuçları 3 tip efektör fonksiyona ayrılabilir: adaptasyon, alarm durumu ve apoptoz . UPR'nin amacı, homeostazı ve normal ER fonksiyonunu sağlamaktır. UPR tarafından harekete geçirilen mekanizmalar telafi edilemediğinde (örn. ER'de protein açılmasına neden olan birincil uyaran uzun süre tetiklediğinde ya da aşırı miktarda olduğunda) apoptoz ile hücre ölümü indüklenmektedir. Bununla birlikte, ER stresin neden olduğu hücre ölümü kaspaz aktivitesi olmadan da ilerleyebilir ve ER stresin bir sonucu olarak teiklenen hücre ölüm mekanizmalarının, hem kaspaz bağımlı apoptozu hem de kaspazdan bağımsız nekrozu içeren çeşitleri olduğu görülmüştür[174]. ER stresin birçok bağlamda hücrenin hayatta kalmasını destekleyen katabolik bir hücre program olan otofajiyi indüklediği de giderek daha açıklanabilir hale gelmeye başlamıştır[175].

2.8 OTOFAJİ

Otofaji, lizozoma iletilmek üzere hücresel proteinleri ve organeller yutan otofagozomlar olarak adlandırılan çift membranlı veziküllerin oluşumu içeren evrimsel olarak eski ve oldukça korunmuş bir katabolik süreçtir[176][177]. Otofaji, oldukça düzenlenmiş bir dizi sinyal olayıyla kontrol edilmektedir, tüm hücrelerde bazal seviyede meydana gelir ve çeşitli sinyaller ve hücresel stresler tarafından indüklenir[178]. Uyarıcı kaynaklı otofaji ve bazal otofaji arasında önemli farklar görülebilmektedir.

Otofagozomun oluşumu ve dönüşümü, otofaji ile ilgili (ATG) genler adı verilen evrimsel olarak korunmuş genleri içerir ve tipik olarak farklı aşamalara ayrılır; otofagozomun başlaması, çekirdeklenmesi, otofagozom zarının genişlemesi ve uzaması, lizozomla kapanma ve füzyon.

Başlatma, sınıf 3 PI3K kompleksini aktifleştiren ATG1 kompleksinin ve ATG101'in aktivasyonu ile başlar. ATG14, Beclin-1, UV rasyasyon direnci ile ilişkili gen proteini (UVRAG) ve BECN1 tarafından düzenlenen otofaji ve protein 1'deki (AMBRA1) aktive edici molekül, bunların hepsinin iskelet yapısı bir tümör baskılayıcı olduğu varsayılan Beclin-110 tarafından oluşturulmuştur. ATG5-ATG12 kompleksi, otofagozom membranını genişletmek için ATG16 ve konjugatlarıyla birlikte LC3 ve GABARAP protein ailesinin üyeleriyle konjuge edilerek membrana alınır. ATG4B, ATG7 ile birlikte LC3-1 ve PE konjügelere olan LC3-2'yi oluşturur. LC3'ün bu lipid-konjuge formu genellikle bir otofagozom markırı olarak işlev görmektedir. Sonuç olarak, otofagozom lizozom ile birleşerek içeriği bozulur ve metabolik yolları beslemek amacıyla makromolekül öncülleri geri dönüştürülür[179].

Otofaji yolağındaki bu adımların çoğu, otofajiyi hem pozitif hem de negatif olarak etkilemek için potansiye hedefleri temsil etmektedir. Klinikte otofajiyi inhibe etmeye yönelik mevcut çabalar, klorokin (CQ) veya ilgili hidroksiklorokin (HCQ) kullanarak lizozomu inhibe etmeye odaklanmış olsa da, VPS34-14, ULK1-5,16 ve ATG4B-17 gibi diğer otofaji düzenleyicilere karşı inhibitörler gösterilmiş ve rapor edilmiştir[180].

2.9 APOPTOZ

Apoptoz, normal gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır. Apoptoz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak hücrelerde hasar meydana geldiğinde ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyarıların ve koşulların olmasına rağmen, her hücre aynı uyarana karşı ölüm cevabı vermemektedir.

Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olmaktadır ve bu durum da p53'e bağımlı yolla apoptotik ölüme yol açabilmektedir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde (örn. Timositler) apoptotik ölüme yol açabilmektedir ancak diğer hücreler bu etkileşime girmemektedir. Bazı hücreler, ligand bağlanma ve proteinleri çapraz bağlama yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF reseptörlerini eksprese etmektedir. Diğer hücrelerin hormonlar ya da büyüme faktörleri gibi hayatta kalma faktörleri tarafından bloke edilmesiyle meydana gelen bir ölüm yolu da vardır, bu iki süreç birbirinden bağımsız, sırayla ya da aynı anda ortaya çıkabilmektedir.

Bazı durumlarda hücrelerin apoptoz veya nekroz nedeniyle ölüp ölmediğini belirleyen, uyarının türü ve/veya uyarının derecesidir. Düşük dozlarda ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyarılar apoptozu indükleyebilir ancak aynı uyarılar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilmektedir. Apoptoz temel anlamda "Kaspazlar" adı verilen bir grup sistein proteazının aktivasyonunu başlatan ve uyarıyı hücrenin ölümüne bağlayan karmaşık olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağımlı bir süreçtir[181].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD

3.1 KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de gösterilmiştir.

2.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde Tablo 2’de gösterilmiştir.

2.1.3 Hücre Kültürü Aparatları

Kullanılan hücre kültürü aparatları Ekler bölümünde Tablo 3’de gösterilmiştir.

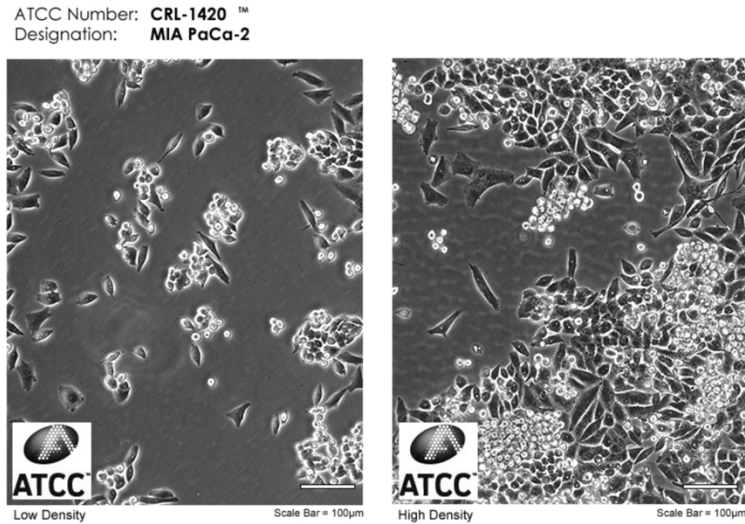
2.2 KULLANILAN YÖNTEMLER

2.2.1 Hücre Kültürü

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattı ve HT29 kolon kanseri hücre hatları(Şekil 15) kullanılmıştır. MiaPaca hücre hattı için büyüme ortamı medyası DMEM’dir. HT29 hücre hattı için büyüme ortamı medyası McCoy’s’tur.

2.2.1.1 MiaPaca-1 Pankreas Kanseri Hücre Hattı

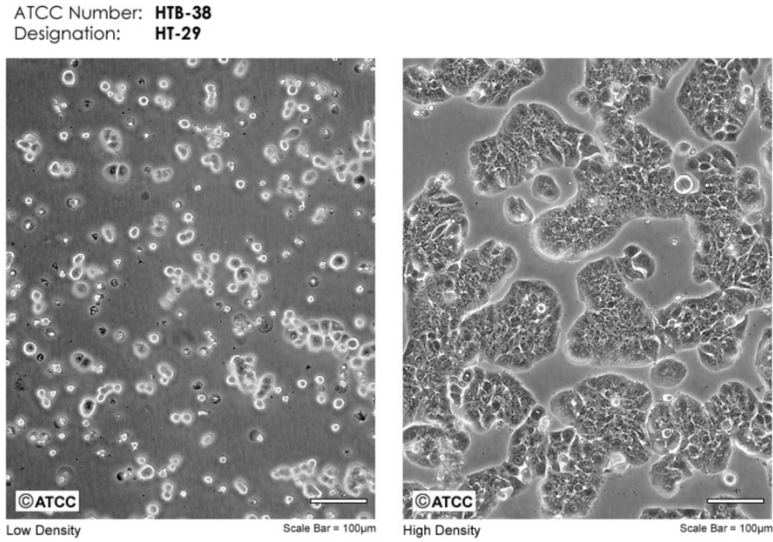
Bu hücre hattı bir hipotriploid insan hücre hattıdır. Modal kromozom sayısı 61'dir. Bir hücrede yaygın olarak on altı ila 20 işaretleyici kromozom bulunur. Birkaç normal kromozom eksiktir. MIA PaCa-2 hücre hattı(Şekil 19), A. Yunis ve diğerleri tarafından 1975'te 65 yaşındaki bir Kafkas erkekten elde edilen pankreasın tümör dokusundan ortaya çıkmıştır.



Şekil 19. MiaPaca Pankreas Kanseri hücre hattının morfolojisinin gösterilmesi(ATCC).

2.2.1.2 HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattı

Kök hattı kromozom sayısı hipertriploiddir ve 2S bileşeni% 2,4'te meydana gelir. Çoğu metafazda, genellikle kromozom başına tek kopya halinde on yedi işaretleyici kromozom bulunur. QM bant analizi ile Y kromozomu tespit edilememiştir. HT-29 hücre hattı(Şekil 20), 1964'te J. Fogh tarafından eksplant kültür yöntemi kullanılarak bir birincil tümörden izole edilmiştir.



Şekil 20.HT29 Kolon Kanseri hücre hattının morfolojisinin gösterilmesi(ATCC).

2.2.2 Hücre Hatlarının Dondurulması

Kullanılan petrilerin yüzeylerine yapışık olan hücreler 1 ml Tripsin- EDTA(etilen diamin tetra astetik asit) kullanılarak yapışık bulundukları yüzeyden enzimatik aktivite ile kaldırılmıştır. Kullanılan Tripsin-EDTA aktivitesi kullanılan Tripsin-EDTA miktarı kadar 1:1 oranda 1 ml medyanın içerisine eklenerek Tripsin-EDTA aktivitesi inhibe edilmiştir. Petrilerden toplanan hücreler 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Elde edilmiş hücre süspansiyonundan 10 µl alınmış ve Neubauer hemositometresine koyulmuş ve üzeri lamel ile kapatılarak 25 karede sayılan hücre sayısı 104 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır. Sayılan hücreler 9:1 oranında hazırlanmış olan 1 ml FBS- DMSO ile karıştırılmış ve krio tüplere aktarılmıştır. Dondurma yöntemi düşük pasaj numarasına sahip hücrelerin saklanması için gerçekleştirilen bir yöntemdir. Dondurulan hücreler önce -80C buzdolabında sonrasında daha uzun süre saklamak için -196C sıvı azot tankında saklanmıştır.

2.2.3 Hücre Hatlarının Açılması

-80C krio tüplerden dondurulmuş bir halde bulunan hücreler hızlı bir şekilde çözündürülmüştür ve besiyeri eklenerek santrifüj tüplerine alınmıştır. Hücreler 2000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet besiyeri ile çözülmüştür. Kullanılacak olan 25 cm² 'lik petrilere 3 ml besiyeri eklenmiş ve hücre sayımından sonra gerekli hücre sayısı hesaplanarak hücre ekimi işlemi gerçekleştirilmiştir. Petriler, 37C de %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüve konulmuştur. Hücreler bütün yüzeyi kaplayana kadar 2 günde bir besiyeri değiştirilmiş ve petri yüzeyi hücre ile kaplandığında canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapılmıştır.

2.2.4 Hücre Hatlarının Pasajlanması

Hücrelerin yoğunlaşması sonucunda petri kabında bulunan besiyeri uzaklaştırılmıştır. 25 cm² 'lik petri kaplarına izotonik ortam sağlayan, ölü hücre ve bu hücre atıklarının uzaklaştırılmasında aracı olan 1 mL 1 X PBS(fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanmış ve hücrelerin yüzeyden kaldırılması 1 mL Tripsin-EDTA uygulanmasıyla 5 dakika etüvde bekleterek gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin petriye yapışıklık oranı ters bakışlı mikroskop ile kontrol edilmiştir ve ardından tripsinin inhibe edilmesi amacıyla 1 mL besiyeri eklenmiştir. Petri kabında kalkmış durumda bulunan hücreler yıkama yöntemiyle 15 mL'lik falkon tüplere alınmış ve 2000 rpm de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant atılmış ve pellete 1 mL besiyeri eklenerek iyice pipetaj yapılarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına koyulmuş ve üzeri lamel ile kapatılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılacak petrilere besiyeri eklenmesinin ardından istenilen sayıda hücre ekimi gerçekleştirilerek inkübatöre kaldırılmıştır.

2.2.5 Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrilere her kuyusuna eşit şekilde dağılacak ve 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yapışması ve morfoloji alması için ekimi yapılmış hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra morfoloji almış hücreler 95 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra oda ısısına getirilmiş aptamerlerle 0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M dozlarında 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiştir. 24 saat sonrasında ekim yapılmış her kuyucuğa 10 μ l 3-(4,5- dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) ayırıcı uygulanmıştır. 4 saat sonrasında MTT ayırıcı eklenmiş besiyeri hücreler üzerinden atılmış ve her bir kuyucuğa 100 μ l DMSO eklenerek karanlıkta 5 dakika boyunca inkübe edilmesi sonrasında Bio Rad mikropłaka okuyucusunda, 570 ve 655 nm dalga boylarında absorbans değerlerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının yüzdesi her kuyucukta ölçülmüş olan optik dansite değerlerinin kontrol optik dansite değerlerine bölünmesi ve yüz ile çarpılmasıyla birlikte Excel üzerinde grafik oluşturarak belirlenmiştir.

2.2.6 Hücre Hatlarının Sağkalım Kapasitelerinin Belirlenmesi

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrilere her kuyuda 10×10^4 hücre sayısı olacak şekilde ekimi gerçekleştirilir. 24 saat sonrasında yapışmış olan hücelere belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. 24 saat sonrasında hücreler 500 μ l 1 X PBS ile yıkandıktan sonra 500 μ l Tripsin-EDTA uygulamasıyla 5 dakika hücrelerin kalkması için inkübatörde bekletilmiştir. 5 dakika sonrasında Tripsin-EDTA etkisi 500 μ l besiyeri ile inhibe edilmiş ve yıkama işlemiyle hücreler 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine toplanmıştır. 2000 rpm de 5 dakika santrifüj yapılmasının ardından süpernatant kısmı atılmış ve pellet 100 μ l besiyeri ile çözülmüştür. . Ölü hücrelerin boyanması amacıyla 50 μ l %0.4 (w/v) konsantrasyona sahip tripan mavisini hücreler muamele edilmiştir. Pipetaj ile homojenizasyon sağlandıktan sonra 10 μ l alınan hücreler Neubauer lamına aktarılmış ve lamel ile kapatılarak ters bakışlı mikroskop ile sayımı gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler 24, 48, 72 ve 96 saat için gerçekleştirilmiştir. Bu sayımların sonucunda Excel de zaman ve doza bağımlı olarak sağkalım kapasitelerini gösteren grafikler çizilmiştir.

2.2.7 Hürelerin Koloni Oluşturma Kapasitelerinin İncelenmesi

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrilere her kuyuda 10.000 hücre olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonrasında yapışmış olan hücelere belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saat sonrasında besiyeri değiştirilmiş ve aynı şekilde besiyeri değişimi 3 günde bir tekrar edilmiştir. 10 gün sonrasında koloni oluşumu gözlenmiştir. Oluşmuş koloniler boyama yöntemi ile gösterilmiştir. 10 gün sonrasında besiyeri petrilere uzaklaştırılmış ve petrilere 2 kez 1 X PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için metanol:asetik asit (3:1 oranında) solüsyonundan her kuyuya 1 mL uygulanmış ve 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonrasında metanol:asetik asit solüsyonu atılmış ve hücreler 30 dakika 500 µl kristal viyole boyası ile muamele edilmiştir. 30 dakika sonrasında boya kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve fazla boya kalıntıları 2 kez 1 X PBS yıkaması ile ortamdan kaldırılmıştır. Bu işlem sonucunda boyayı alan koloniler görünür hale gelmiştir ve Bio-rad Chemidoc cihazında görüntüleri alınmıştır.

2.2.8 Yara Kapanma Deneyi

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri hatları 6 kuyucuklu petride her kuyuda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonrasında petri yüzeyine yapışmış olan hücreler üzerinde 200 µl'lik pipet ucuyla yarıklar oluşturulmuştur. 1xPBS ile kalkmış olan hücreler ortamdan uzaklaştırılmış ve tekrar temiz besiyeri eklenmiştir. Yara oluşturulmuş hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. 0, 24, 48 ve 72. saatlerin sonlarında mikroskop yardımı ile yarıkların boyutu ölçülmüştür.

2.2.9 Asılı Damla Hücre Modeli

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri hatları 60mm²'lik petri kapaklarına her bir damla 20 ul besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde damla damla ekilmiştir. Belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri 20 ul besiyeri içerisinde hazırlanmış ve 60mm²'lik petri kapaklarına damla damla ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılmış petrilere 1 mL 1XPBS koyulmuş ve kapakları dikkatlice kapatılmıştır. Petriler hareket ettirilmeden 24, 48 ve 72 saat 37C 5% CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Her kondüsyon için belirtilen saatlerde en az 20 tekrar içerecek şekilde ters bakışlı mikroskop altında kapak çevrilmeden ve damlalar dağıtılmadan asılı damla modelleri görüntülenmiştir.

2.2.10 Mikroskop Aracılı Yöntemler

2.2.10.1 Işık Mikroskobu Aracılı Yöntemler

Ekimi gerçekleştirilmiş tüm hücrelerin kontrolleri ve ilaç muamelesinden sonraki morfolojik değişimleri SOIF XDS-1B ters bakışlı ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

2.2.10.2 Floresan Mikroskopu Aracılı Yöntemler

2.2.10.2.1 3,3' Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) Boyama

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonrasında hücreler petri yüzeyine yapıştığında hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda medya 4 nm DiOC6 içeren medya ile değiştirilmiş ve 15 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Floresan mikroskopunda sağlıklı mitokondri potansiyeline sahip olan hücreler; eksitasyon 488 nm, emisyon 525 nm de yeşil olarak gözlemlenmiştir.

2.2.10.2.2 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonrasında hücreler petri yüzeyine yapıştığında hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda medya 5mg/ml DAPI içeren medya ile değiştirilmiş ve 10 dakika boyunda etüvde inkübe edilmiştir. Floresan mikroskopunda; DNA kondensasyonuna bağlı olarak DNA kırıklarının eksitasyon 350 nm, emisyon 470 nm de mavi renk olarak gözlenmiştir.

2.2.10.2.3 Propidyum İyodür (PI) Boyama

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonrasında hücreler petri yüzeyine yapıştığında hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda her bir kuyucuğa $2 \mu\text{g/ml}$ PI uygulanarak 30 dakika etüvde bekletilmiştir. Ölü ve canlı hücrelerin ayırt edilebilmesi amacıyla floresan mikroskopunda yeşil filtrede ölü hücreler kırmızı renk olarak gözlenmiştir.

2.2.10.2.4 DCFDA Boyama

Hücreler 12 kuyucuklu petrilere 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yapışması için 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonrasında hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her kuyuya $5 \mu\text{M}$ DCFDA eklenerek 30 dakika 37°C inkübe edilmiş ve 30 dakika sonrasında reaktif oksijen türevlerine bağlanan boya eksitasyon 495 nm ve emisyon 529 nm 'de yeşil olarak gözlemlenmiştir.

2.2.10.2.5 Fura2 Boyama

Hücreler 6 kuyucuklu petrilere 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yapışması için 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonrasında hücrelere belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her kuyuya $2 \mu\text{M}$ Fura2 eklenerek 30 dakika 37°C inkübe edilmiş ve floresan mikroskopu altında serbest Ca^{2+} ların görüntülenmesi amacıyla mavi filtrede hücreler gözlemlenmiştir.

2.2.10.3 İmmüno Floresan

Hücrelerdeki GHRH ve GH anlatımını göstermek amacıyla İmmüno Floresan (IF) yöntemi kullanılmıştır. Hücreler coversliplerin üzerine 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 ile etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonrasında

medya uzaklaştırılmış ve 3 defa 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Coversliplerin üstüne -80°C 'de soğutulmuş %100 metanol yavaş bir şekilde eklenmiş ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından metanol ortamdan uzaklaştırılmış ve coverslipler kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sonrası 3 kere 1X PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. 1X PBS içinde 1 ml %0,1 Triton X-100 eklenmiş ve 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 3 kere 1X PBS ile, 3 kere 500 μl PBB solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. 1 ml bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 60 dakika inkübe edilmiştir. 3 kere 500 μl PBB solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Hazırlanan primer coverslipin üzerini kaplayacak şekilde uygulanmıştır. Kuyuların üzeri gergin bir şekilde ıslak filtre kâğıdı ile kapatılmıştır, üzeri folyo ile sarılmıştır ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de orbital çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 3 kere 500 μl PBB solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan sekonder coverslipin üzerine koyulmuştur ve kuyuların üzerine gergin bir şekilde ıslak filtre kâğıdı yerleştirilmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ çalkalayıcıda 60 dakika inkübe edilmiştir. 3 kere 500 μl PBB solüsyonu ile yıkanmıştır. İkili boyama işlemi durumunda tekrar bloklama solüsyonu eklenmiştir ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilme aşamasından sonrasında protokol diğer boyama işlemi için aynı şekilde tekrarlanmıştır. Son işlem yapıldıktan sonra 1 μl DAPI (ana stok: 1 mM) boyası (1X PBS ile 1:1000 dilüsyon) coverslipin üzerine koyulmuştur ve 10 dakika orbital çalkalayıcıda karanlıkta inkübe edilmiştir. Lam üzerine 1 damla 1X PBS damlatılmıştır ve coverslip hücreler altta kalacak şekilde lam üzerine kapatılmıştır ve floresan mikroskobu ile çekim alınmıştır. Çekim sonrası coverslip tekrar petrilere alınmıştır üzerine 1ml 1X PBS içinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.2.11 Hücre Akış Sitometrisi

2.2.11.1 PI Analizi

Aptamer uygulamasına bağılı olarak hücre popülasyonunun hücre devri fazlarındaki dağılımını DNA içeriğine göre analiz etmek için PI boyası kullanılmaktadır. MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonrasında hücreler petri yüzeyine yapıştığında hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri 1X PBS ile 2 defa yıkanmış ve ardından 500 μl %70'lik soğuk etanol ile fikse edilmiştir. 1 hafta boyunca -20°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Ardından 1X PBS ile yıkanan hücre pelletine santrifüjleme işlemi yapılmıştır ve 1X PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelletler önce 245 μl 1X PBS'de çözülüp sonrasında ise 25 μg RNaz (10 mg/ml) ve 25 μg PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir. 37°C 'de karanlıkta 30 dakika inkübe edilerek hücreler FL-2A filtresi (585/400 nm) kullanılarak 103 hücrenin hücre akış sitometresi cihazında analizi yapılmıştır.

2.2.11.2 Annexin V/PI Analizi

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri ve HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonrasında hücreler petri yüzeyine yapıştığında hücreler belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 2 defa soğuk PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (Katalog Numarası: 556547) içinde bulunan 10X bağlanma tamponu 1X bağlanma tamponuna çevrilmiştir ve 100 μl eklenerek pellet resüspanse hale getirilmiştir. Annexin V ve PI boyasından 3 μl eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra hücre akış sitometresi cihazında FL-3A ve FL-2A filtrelerinde 1×10^3 hücre okutularak analizi yapılmıştır.

2.2.12 Protein İfadesinin Belirlenmesi

2.2.12.1 Toplam Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu için pasaj sonrası hücre yoğunluğuna bağlı olarak 60 cm² veya 100cm²'lik petrilere ekim yapılmıştır. 24 saat sonrasında yapışmış olan hücrelere belirlenmiş olan dozlarda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmış ve aptamerlerle 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saat sonrasında hücreler kazıyıcılar ve 1X PBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Soğuk santifüjleme ile hücre pelleti elde edilmiştir. Protein içeriği eldesi için hücre lizis tamponu ile muamele edilmiş hücreler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 20 dakika 13200 rpm'de +4 °C'de santifüjlenen örneklerinin üst sıvısı yeni tüpe alınarak -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.12.2 Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

İzole edilen toplam protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edilmiştir. Bradford solüsyonu olarak kullandığımız Coomassie Brilliant Blue G-250 solüsyonu protone haldeyken kırmızı/kahverengi renktedir; ortamda protein varlığında proteine bağlanarak mavi renkte görülür. Bu değişiklik mikropilaya okuyucusu veya spektrofotometre ile 595 nm de absorbans ölçerek belirlenir. Standartlar BSA (Bovine Serum Albumin) ile 1,5 µg – 7,5 µg aralığında oluşturulmuş, protein örneklerden ise µl olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Son olarak her kuyucuğa 200 µl Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra belirlenen absorbans aralığında ölçüm yapılmıştır.

2.2.13 İmmünoBlotlama

2.2.13.1 SDS-PAGE Jel Hazırlanması

%12'lik yürütme jeli içeriği beherde hazırlanmıştır, 1 mm boşluk bulunan camlar arasına dökülmüş ve üzerine izopropanol eklenmiştir. Jel döküldükten sonra polimerleşme reaksiyonunun gerçekleşmesi için bir süre beklenmiştir. İzopropanol distile su yardımıyla uzaklaştırılmış ve fazla izopropanol filtre kâğıdı ile alınmıştır. Daha sonra %4'lük üst jel beherde hazırlanmıştır ve yürütme jelinin üzerine iki camın arası tamamen dolana kadar dökülmüştür. Camlara uygun tarak camlar arasına yerleştirilerek üst jelin polimerleşme reaksiyonu için belli bir süre oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2.2.13.2 Protein Örneklerinin Hazırlanması

İmmünoablottlama yöntemi için her bir örnek yükleme tamponu ile muamele edilmelidir. Yükleme tamponu içerisinde bulunan beta merkaptan etanol proteinlerin üç boyutlu yapısını bozarak denatüre eder, gliserol ortamın vizkozitesini arttırarak proteinlerin jelde kuyu boyunca yürütmesini sağlar, SDS proteinlerin ekşi yükü yükleyerek elektroforetik ortamda moleköl ağırlıklarına bağılı olarak ayrışmalarını sağlar, Tris-HCl ortamın pH'sını tamponlar, bromofenol mavisi proteinleri boyayarak görünür kılar. Bradford sonuçlarıyla oluşturulan standart eğriye göre protein örnekleri yükleme tamponu ile 5:1 oranında karıştırılmış ve 95 °C'de 5 dakika tutulmuş ve buza alınmıştır.

2.2.13.3 Transfer ve Bloklama

Yürütme işleminden sonra kalın cam ve ince cam spatula yardımıyla birbirinden ayrılarak yürütme tamponunun içeriğinde bulunan SDS'i uzaklaştırmak için distile suyla yıkanmıştır. Yükleme jeli spatulayla kesilerek uzaklaştırılmıştır ve transfer tamponu içine alınmıştır. Poliviniliden florid (PVDF) membran metanol içinde aktif hale getirilerek önce metanoldan uzaklaştırmak için distile suya daha sonra da transfer tamponu içine alınmıştır. Filtre kâğıdı ve süngerler transfer tamponu ile ıslatılmıştır. Kasetin şeffaf yüzeyinden başlayarak önce sünger-filtre kâğıdı-membran-SDS-Poliakrilamid jel-filtre kâğıdı-sünger şeklinde sandviç oluşturulmuştur ve kaset kapatılmıştır. Tankın içine transfer tampon eklenmiştir ve hazırlanan kaset siyah taraf siyah yöne bakacak şekilde yerleştirilerek 220 mA transferi gerçekleştirilecek proteinin büyüklüğüne göre dakikası ayarlanarak transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminden sonra %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween-20 içeren 1X TBS) ile hazırlanan bloklama solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

2.2.13.4 Primer ve Sekonder Antikor İşaretleme

Primer ve sekonder antikor %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween-20 içeren 1X TBS) içinde hazırlanmıştır. Primer antikor 1:1000 dilüsyon ile, Sekonder antikor ise 1:3000 dilüsyon ile hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası, primer antikor ile 2 gün boyunca +4°C sıcaklıkta rollerde inkübe edilmiştir. Primer antikorun inkübasyon süresi dolduktan sonra membran 10 dakika 3 kez TBS-Tween-20 ile yıkanmıştır ve yıkama işleminden sonra, membranlar sekonder antikora alınmıştır ve 2 gün boyunca +4°C sıcaklıkta rollerde inkübe edilmiştir.

2.2.13.5 Görüntü Alınması

Sekonder antikor uygulaması sonrası membranlar 2 defa 10 dakika TBS-Tween-20 ve 1 defa 5 dakika TBS ile yıkanmıştır. Görüntülerin çekilebilmesi için kemiluminesans tamponları hazırlanması gerekmektedir. Hazırlanan kemiluminesans tamponları Ekler bölümünde Tablo 5.6 verilmiştir. A ve B tamponu olarak isimlendirilen bu çözeltiler 1:1 oranında karıştırılıp 5 dakika karanlıkta reaksiyonların gerçekleşmesi için inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra membranlar bu çözeltiye aktarılır ve 2-3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra kemiluminesans görüntüleme sisteminde Bio-rad ChemiDoc™ MP cihazı kullanılarak CCD kamera ile çekim alınmıştır.

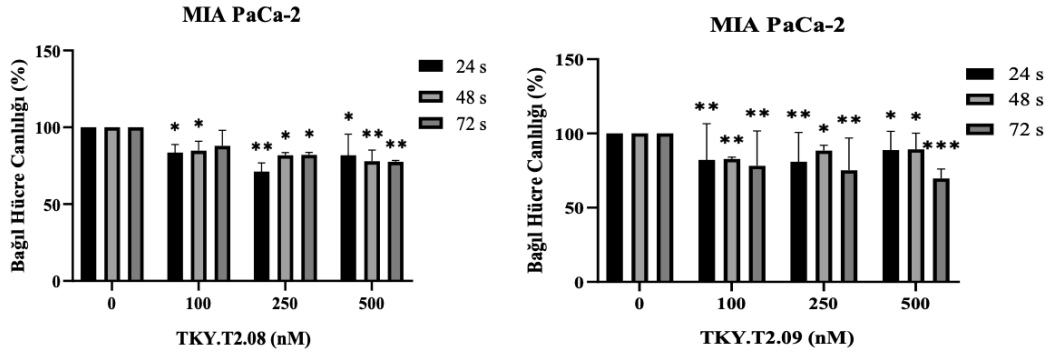


BÖLÜM 4. SONUÇLAR

4.1 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Doza ve Zamana Bağımlı Olarak HT29 Kolon Kanseri ve MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi

MTT deneyi, hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılan bir tekniktir. MTT'nin MTT-formazan'a enzimatik olarak indirgenmesiyle açığa çıkan bir reaksiyondur. Bu indirgenmenin mitokondriyal süksinat dehidrojenaz ile katalize edildiği bilinmektedir. Bu nedenle MTT tahlili mitokondriyal solunuma bağlıdır ve dolaylı olarak bir hücrenin hücresel enerji kapasitesinin değerlendirilmesini sağlar. MiaPaca-2 Pankreas ve HT29 Kolon Kanseri hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde 0-500 nM arasındaki aptamer konsantrasyonları uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

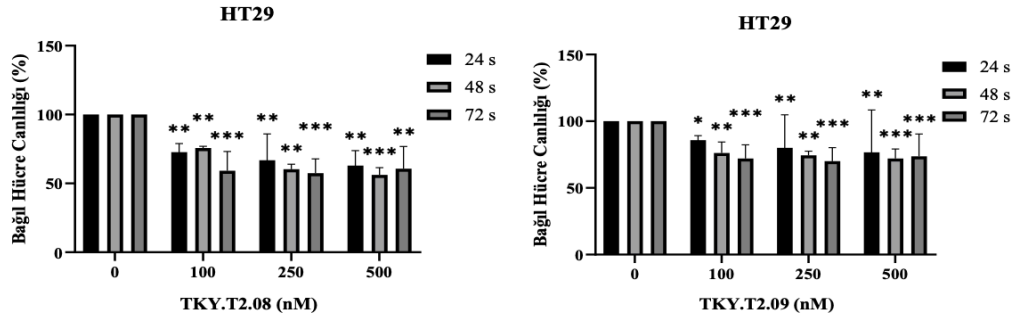
Mia Paca-2 hücrelerine 24 saat boyunca TKY.T2.08 X-aptamerin 100 nM olarak uygulaması hücre canlılığını %83 düşürmüştür, 250 nM aptamer uygulaması %71, 500 nM aptamer uygulaması ise %81 oranında hücre canlılığını düşürmüştür. 48 saat boyunca 100 nM aptamer uygulamasının hücre canlılığını MiaPaca-2 pankreas kanseri hücrelerinde %84, 250 nM aptamer uygulaması %81 ve 500 nM aptamer uygulaması ise %77 oranında hücre canlılığını düşürmüştür. 72 saat aptamer uygulaması ise doza bağlı olarak hücre canlılığını sırası ile %87, %82 Ve %77 olarak düşürmüştür (Şekil 20). Ayrıca TKY.T2.09 X-aptamerin 24 saat boyunca 100 nM olarak uygulaması hücre canlılığını %82, 250 nM uygulaması %80 Ve 500 nM aptamer uygulaması ise %88 oranlarına düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 20). 48 saat boyunca 100 nM aptamer uygulamasının hücre canlılığını MiaPaca-2 pankreas kanseri hücrelerinde %82, 250 nM aptamer uygulaması %88 ve 500 nM aptamer uygulaması ise %89 oranında hücre canlılığını düşürmüştür. 72 saat aptamer uygulaması ise doza bağlı olarak hücre canlılığını sırası ile %78, %75 Ve %69 oranında düşürmüştür ($p: ns \geq 0,05$, $* p \leq 0,05$, $** p \leq 0,01$)(Şekil 20)



Şekil 21. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi.

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca artan dozlarda (0-500 nM) TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle muamele edilmiş ve daha sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerine olan etkileri analiz edilmiştir. Deney sonuçları 3 tekrarlı uygulamanın ortalaması olarak verilmiştir.

HT-29 hücrelerine 24 saat boyunca TKY.T2.08 X-aptamerin 100 nM olarak uygulaması hücre canlılığını %72 düşürmüştür, 250 nM aptamer uygulaması %66, 500 nM aptamer uygulaması ise %62 hücre canlılığını düşürmüştür. 48 saat boyunca 100 nM aptamer uygulamasının hücre canlılığını HT29 kolon kanseri hücrelerinde %75, 250 nM aptamer uygulaması %60 ve 500 nM aptamer uygulaması ise %56 hücre canlılığını düşürmüştür. 72 saat aptamer uygulaması ise doza bağlı olarak hücre canlılığını sırası ile %59, %57 ve %60 olarak düşürmüştür (Şekil 21). Ayrıca TKY.T2.09 X-aptamerin 24 saat boyunca 100 nM olarak uygulaması hücre canlılığını %82, 250 nM uygulaması %80 ve 500 nM aptamer uygulaması ise %76 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 21). 48 saat boyunca 100 nM aptamer uygulamasının hücre canlılığını HT-29 kolon kanseri hücrelerinde %76, 250 nM aptamer uygulaması %74 ve 500 nM aptamer uygulaması ise %72 oranında hücre canlılığını düşürmüştür. 72 saat aptamer uygulaması ise doza bağlı olarak hücre canlılığını sırası ile %72, %70 ve %73 olarak düşürmüştür ($p: ns \geq 0,05$, $* p \leq 0,05$, $** p \leq 0,01$) (Şekil 21).



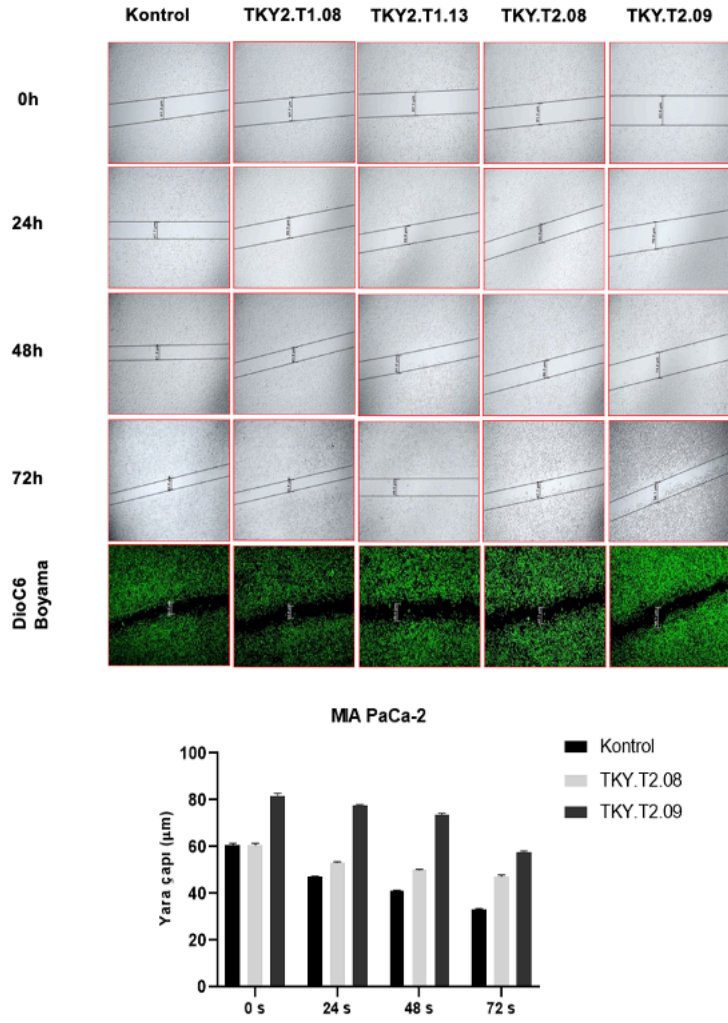
Şekil 22. HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi.

HT29 kolon kanseri hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca artan dozlarda (0-500 nM) TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle muamele edilmiş ve daha sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerine olan etkileri analiz edilmiştir. Deney sonuçları 3 tekrarlı uygulamanın ortalaması olarak verilmiştir.

MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri hücre hatlarında MTT testi ile 100, 250 ve 500 nM artan dozlarda ve zamana bağımlı olarak 24, 48 ve 72 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların baz alınması sonucunda her iki hücre hattı ve seçili olan iki X-Aptamer için en anlamlı sonuçlar 500 nM dozunda 72.saatte görülmüştür.

4.2 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının MIA Paca-2 ve HT-29 hücreleri üzerine etkisinin Yara Kapanma Deneyi ile gösterilmesi

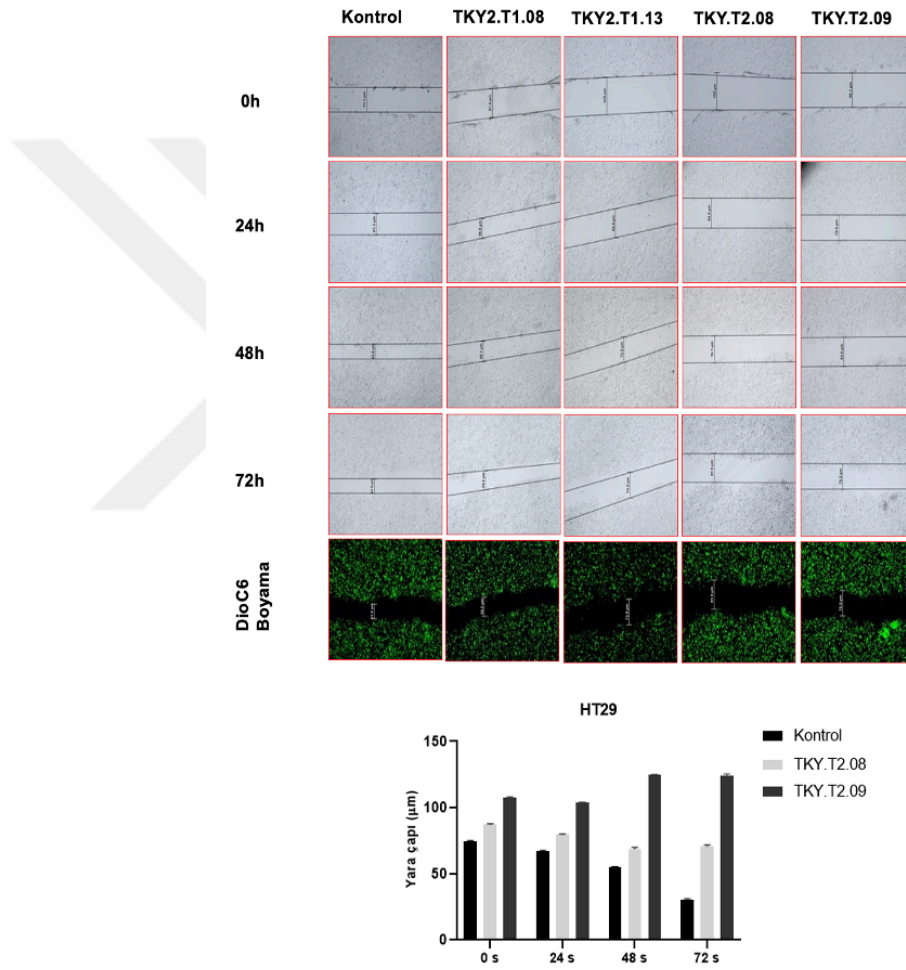
MiaPaca-2 hücrelerine mikropipet aracılı yara oluşturulmasını takiben 72 saat sonunda yara mesafesinin 33,5 um olarak tespit edilmiştir. Aynı yara kapanma sürecini takiben hücrelere TKY.T2.08 X-aptamer uygulaması 72 saat boyunca yapılırken hücrelerde yara mesafesinin 47,7 um olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Mia Paca-2 hücrelerine 72 saat boyunca TKY.T2.09 uygulamasını takiben yara mesafesinin 58,1 um olduğu ölçülmüştür. Sonuç olarak TKY.T2.09 aptamerin yara kapanmasını MiaPaca-2 hücrelerinde daha etkin engellediği gösterilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-20 Özgü X-Aptamerlerinin Yara Kapanması Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi.

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücrelerinin petriye yapışmasının ardından 200'lük mikropipet ucu ile yara açılmış ve ardından 0.saat çekiminin alınmasından sonra 24, 48 ve 72 saat boyunca 500 nM konsantrasyonunda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle muamele edilmiş ve her 24 saatlik dilimde mikroskop altında yara boyları ölçülerek grafik oluşturulmuştur.

HT-29 hücrelerine mikropipet aracılı yara oluşturulmasını takiben 72 saat sonunda yara mesafesinin 30,3 μm olarak tespit edilmiştir. Aynı yara kapanma sürecini takiben hücrelere TKY.T2.08 X-aptamer uygulaması 72 saat boyunca yapılınc hücrelerde yara mesafesinin 71,6 μm olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HT-29 hücrelerine 72 saat boyunca TKY.T2.09 uygulamasını takiben yara mesafesinin 125 μm olduğu ölçülmüştür. Sonuç olarak TKY.T2.09 aptamerin yara kapanmasını HT-29 hücrelerinde daha etkin engellediği gösterilmiştir (Şekil 24).



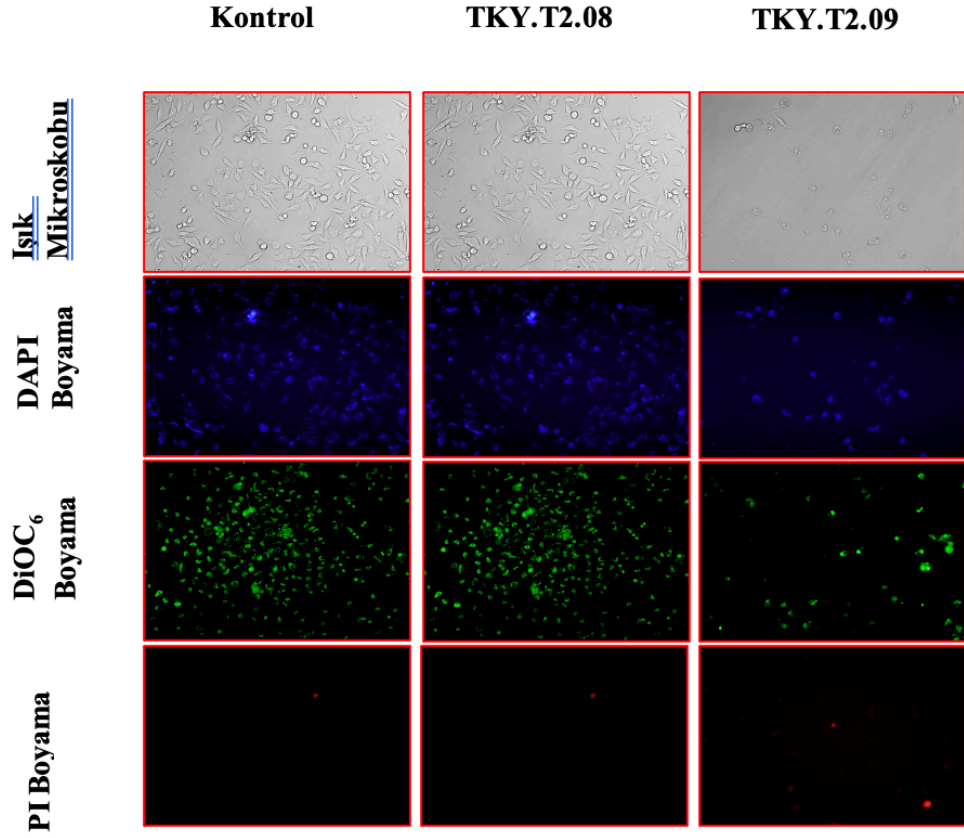
Şekil 24.HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-20 Özgü X-Aptamerlerinin Yara Kapanması Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi.

HT29 kolon kanseri hücrelerinin petriye yapışmasının ardından 200'lük mikropipet ucu ile yara açılmış ve ardından 0.saat çekiminin alınmasından sonra 24, 48 ve 72 saat boyunca 500 nM konsantrasyonunda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle muamele edilmiş ve her 24 saatlik dilimde mikroskop altında yara boyları ölçülerek grafik oluşturulmuştur.

4.3 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin HT-29 Kolon Kanseri ve MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında hücre ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisinin gösterilmesi

DiOC6 canlı hücrelerin mitokondrileri için seçici olan lipofilik bir floresan boyadır. Mitokondriyal membran potansiyeli hücre sağlığı hakkında bilgi sahibi olabilmek için kullanılan belirteçlerden biridir. DAPI hücrede DNA'ya bağlanan bir floresan boyadır. Apoptozun belirlenebilmesi amacıyla nuklesta DNA'ya bağlanarak DNA fragmentasyonunu floresan mavi ışımaya ile göstermektedir. PI boyaması hücre ölümünü göstermektedir. Ölü hücrenin membran potansiyeli bozulur ve PI boyası hücrenin içine girerek kırmızı ışımaya vermektedir.

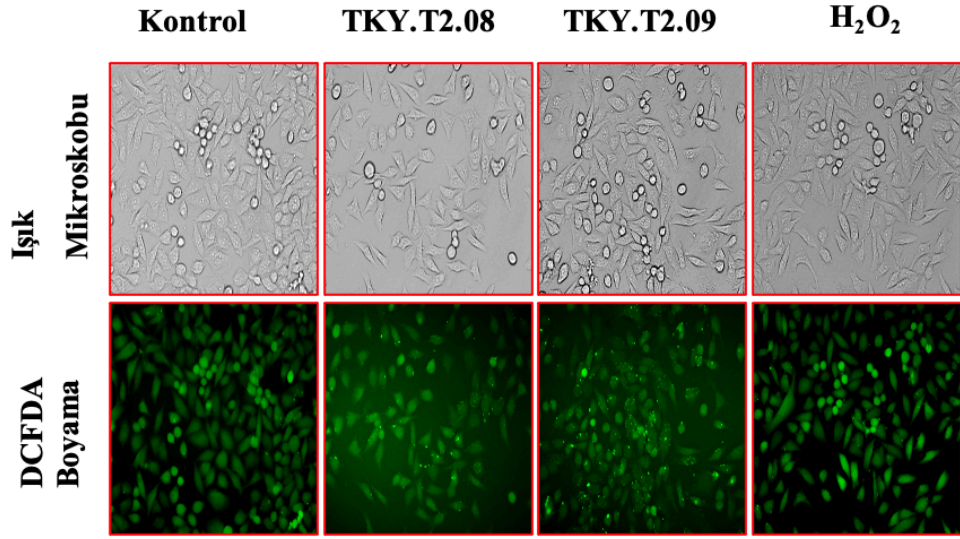
MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin uygulaması sonucunda iki aptamer için de DAPI boyaması ile kontrol grubuna kıyasla DNA fragmentasyonunda artış gözlenmiştir. PI boyaması sonucunda TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin uygulanmasının kontrol grubuna kıyasla hücre ölümünü arttırdığı gözlenmektedir. Mitokondri membran potansiyelini gösteren DioC6 boyaması sonucunda aptamer uygulanmış gruplar ve kontrol grubu arasında mitokondri membran potansiyelinde herhangi bir artış ya da azalış saptanamamıştır (Şekil 25).



Şekil 25. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DCFDA ile Reaktif Oksijen Türevlerinin floresan boyama tekniğiyle gösterilmesi.

MiaPaca Pankreas Kanseri hücreleri 24 kuyucuklu petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücrelere 72 saat $0,5 \mu\text{M}$ TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. 72 saat sonunda 1 nM DiOC₆, $2 \mu\text{g/ml}$ PI, $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI boyası uygulanmış ve floresan mikroskobu altında belirli filtrelerle çekim alınmıştır.

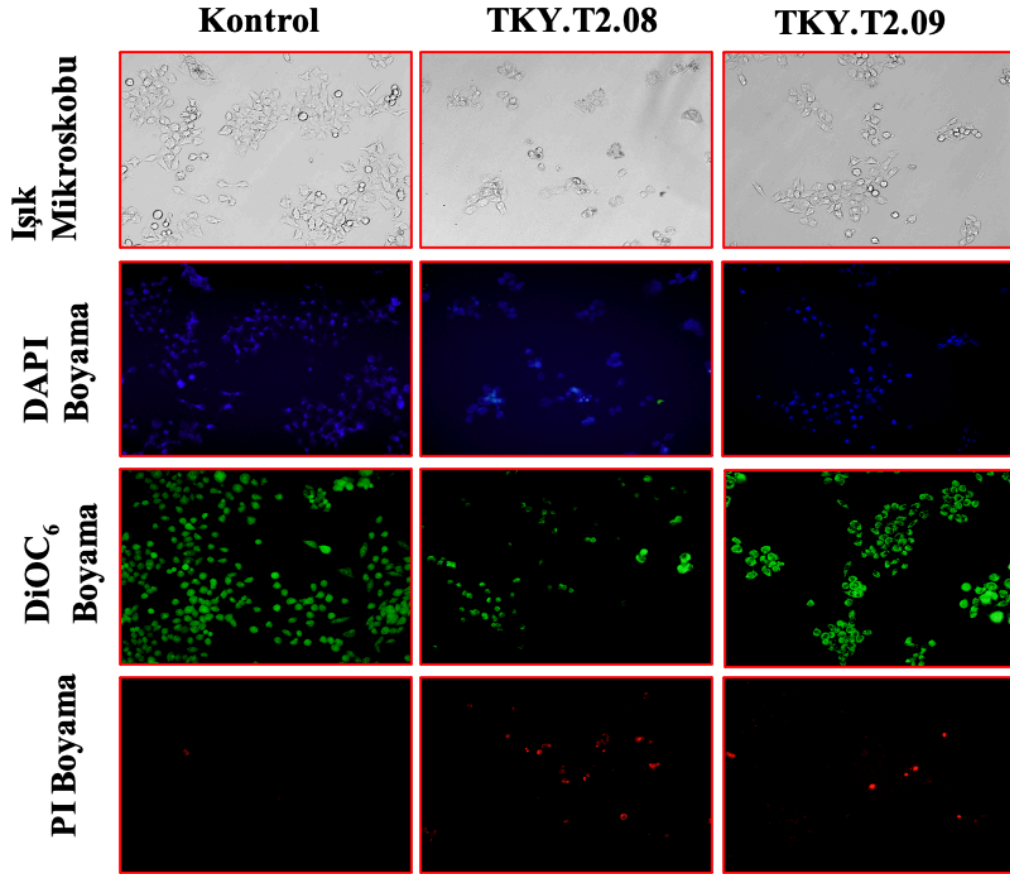
Hücredeki reaktif oksijen türevlerinin gösterilmesini sağlayan DCFDA boyaması sonuçları ele alındığında, kontrol grubuna kıyasla TKY.T2.08 aptameri uygulanmış grupta reaktif oksijen türevlerinin arttığı görülmüştür. TKY.T2.09 aptamerinin uygulaması son ucunda hem kontrol grubuna kıyasla hem de TKY.T2.08 aptameri uygulanmış gruba kıyasla reaktif oksijen türevleri miktarında artış olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 26).



Şekil 26. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DCFDA ile Reaktif Oksijen Türevlerinin floresan boyama tekniğiyle gösterilmesi.

MiaPaca Pankreas Kanseri hücreleri 24 kuyucuklu petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücrelere 72 saat $0,5 \mu\text{M}$ TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. 72 saat sonunda $5 \mu\text{M}$ DCFDA boyası uygulanmış ve floresan mikroskobu altında belirli filtreye çekim alınmıştır.

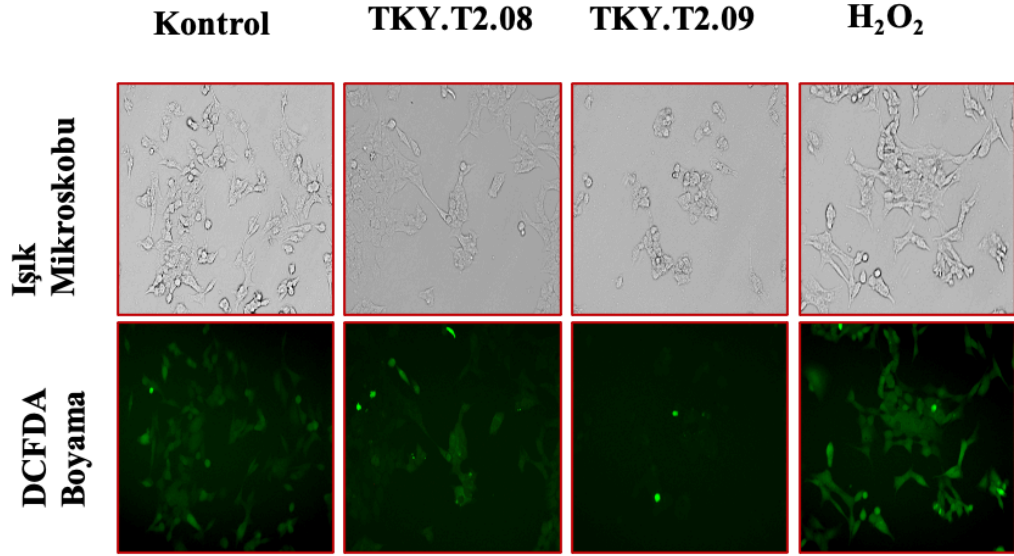
HT29 kolon kanseri hücre hattında DAPI boyamasıyla elde edilen sonuçlar incelendiğinde hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 aptamerlerinin uygulandığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla DNA fragmentasyonunda artış veya azalış gözlemlenmemiştir. Hücre ölümünü gösteren PI boyama sonuçları kontrol grubuna kıyasla hem TKY.T2.08 uygulanmış grupta hem de TKY.T2.09 aptameri uygulanmış grupta hücre ölümünün artmış olduğunu göstermiştir. DioC6 boyaması ile elde edilen sonuçlar ise kontrol grubuna kıyasla TKY.T2.08 aptamerinin mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı fakat TKY.T2.09 aptamerinin kontrol grubuna kıyasla farklı bir sonuç meydana getirmediği gözlemlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. HT29 Kolon Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DAPI ile DNA Kondenzasyonun, DioC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelinin, PI ile Hücre Ölümünün Floresan Boyamalarla Gösterilmesi.

HT29 kolon kanseri hücreleri 24 kuyucuklu petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücrelere 72 saat $0,5 \mu\text{M}$ TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. 72 saat sonunda 1 nM DiOC₆, $2 \mu\text{g/ml}$ PI, $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI boyası uygulanmış ve floresan mikroskobu altında belirli filtrelerle çekim alınmıştır.

DCFDA boyaması sonucunda TKY.T2.08 aptamer uygulamasının kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre içerisinde reaktif oksijen türevlerini arttırdığı görülmüştür. TKY.T2.09 aptamer uygulamasının da kontrol grubuna kıyasla reaktif oksijen türevlerini arttırdığı gözlenmiştir fakat pozitif etki TKY.T2.08 aptamerinde olduğu kadar efektif gözlenmemiştir (Şekil 28).

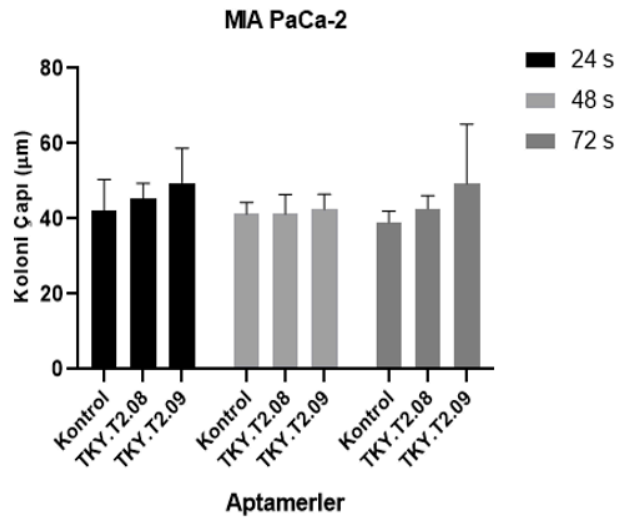
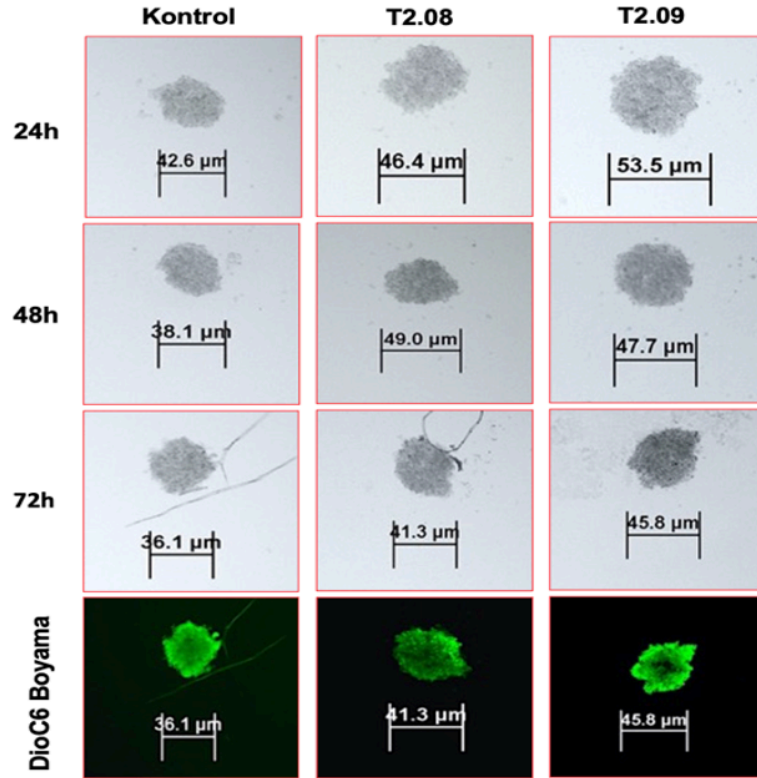


Şekil 28. HT29 Kolon Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin DCFDA ile Reaktif Oksijen Türevlerinin floresan boyama tekniğiyle gösterilmesi.

HT29 kolon kanseri hücreleri 24 kuyucuklu petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücelere 72 saat 0,5 μ M TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. 72 saat sonunda 5 μ M DCFDA boyası uygulanmış ve floresan mikroskobu altında belirli filtreyle çekim alınmıştır.

4.4 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Koloni oluşumu Üzerine etkisinin Asılı Damla Modeli ile Belirlenmesi

Mia Paca-2 pankreas kanseri hücrelerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, kontrol grubunda koloni çapının 24 saatte 42,6 μ m iken, 48 saatte 38,1 μ m ve 72 saatte ise 36,1 μ m çapa dönüştüğü tespit edilmiştir. TKY.T2.08 uygulamasının 24 saat içinde hücre koloni çapı 46,4 μ m ölçülmüş iken, 48 saatte koloni çapı 49 μ m ve 72 saatte ise 41,3 μ m olarak tespit edilmiştir. Ayrıca TKY.T2.09 aptamer uygulamasının 24 saatte koloni çapı 53,5 μ m iken, 48 saatte 49 μ m, 72 saatte ise 45,8 μ m koloni çapı olduğu ölçülmüştür. Koloni çaplarında gözlemlenen küçülmenin her iki aptamer uygulaması ile gözlemlense de bu etkinin TKY.T2.09 aptamerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 29).

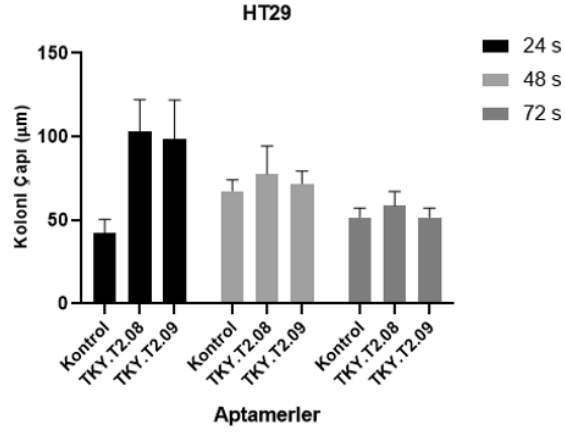
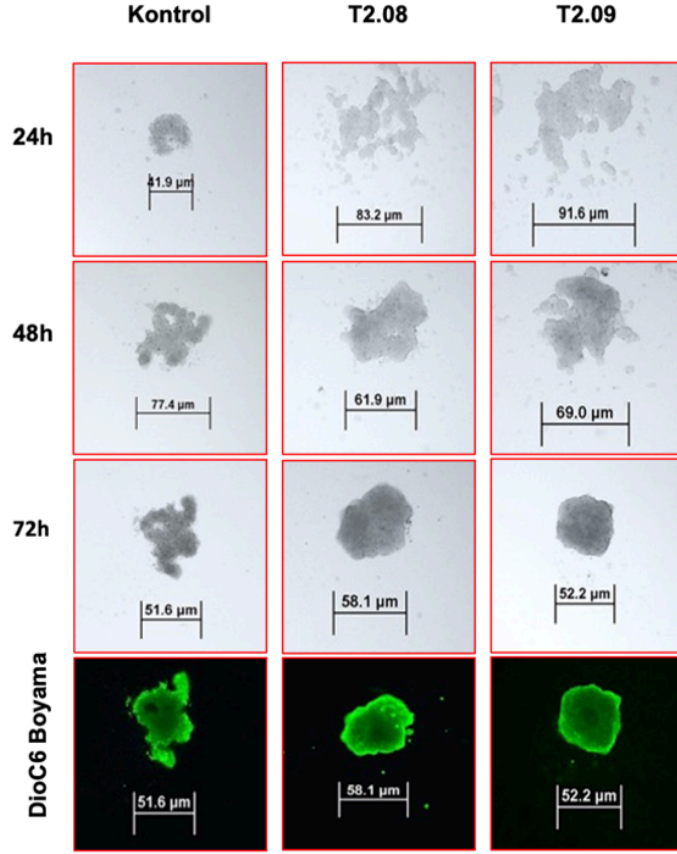


Şekil 29. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin asılı damla modellerinde hücre çapları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi.

Miapaca-2 pankreas kanseri hücreleri 60 mm'lik petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücelere 0,5 μM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. Aptamer uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saat boyunca petrilere gözlemlenerek asılı damla modellerinde koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

HT29 kolon kanseri hücrelerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, kontrol grubunda koloni çapının 24 saatte 41,9 um iken, 48 saatte 77,4 um ve 72 saatte ise 51,6 um çapa dönüştüğü tespit edilmiştir. TKY.T2.08 uygulamasının 24 saat içinde hücre koloni çapı 83,2 um ölçülmüş iken, 48 saatte koloni çapı 61,9 um ve 72 saatte ise 58,1 um olarak tespit edilmiştir. Ayrıca TKY.T2.09 aptamer uygulamasının 24 saatte koloni çapı 91,6 um iken, 48 saatte 69 um, 72 saatte ise 52,2 um koloni çapı olduğu ölçülmüştür. Koloni çaplarında gözlemlenen küçülmenin her iki aptamer uygulaması ile gözlemlense de bu etkinin TKY.T2.09 aptamerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 30).



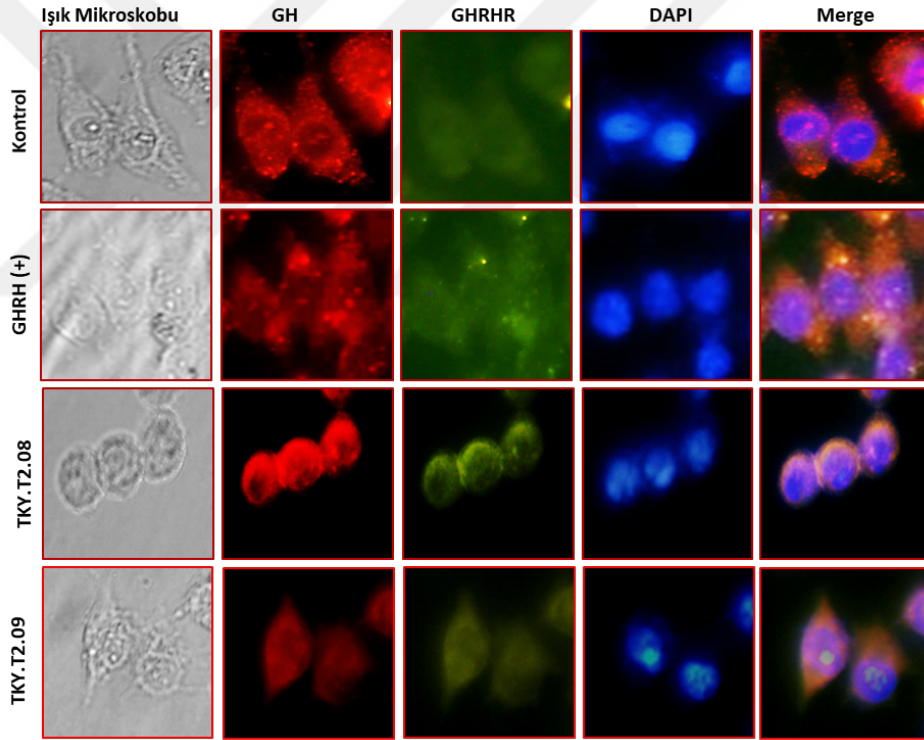


Şekil 30. MiaPaca-2 Pankreas Kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 X-Aptamerlerinin asılı damla modellerinde hücre çapları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi.

HT29 kolon kanseri hücreleri 60 mm'lik petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yapışan hücelere $0,5 \mu$ M TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. Aptamer uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saat boyunca petrilere gözlemlenerek asılı damla modellerinde koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

4.5 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının GHRH sinyalini bloke etmesinin GH ve GHRHR anlatımı üzerinden immunofloresan boyama ile Mia Paca-2 hücrelerinde gösterilmesi

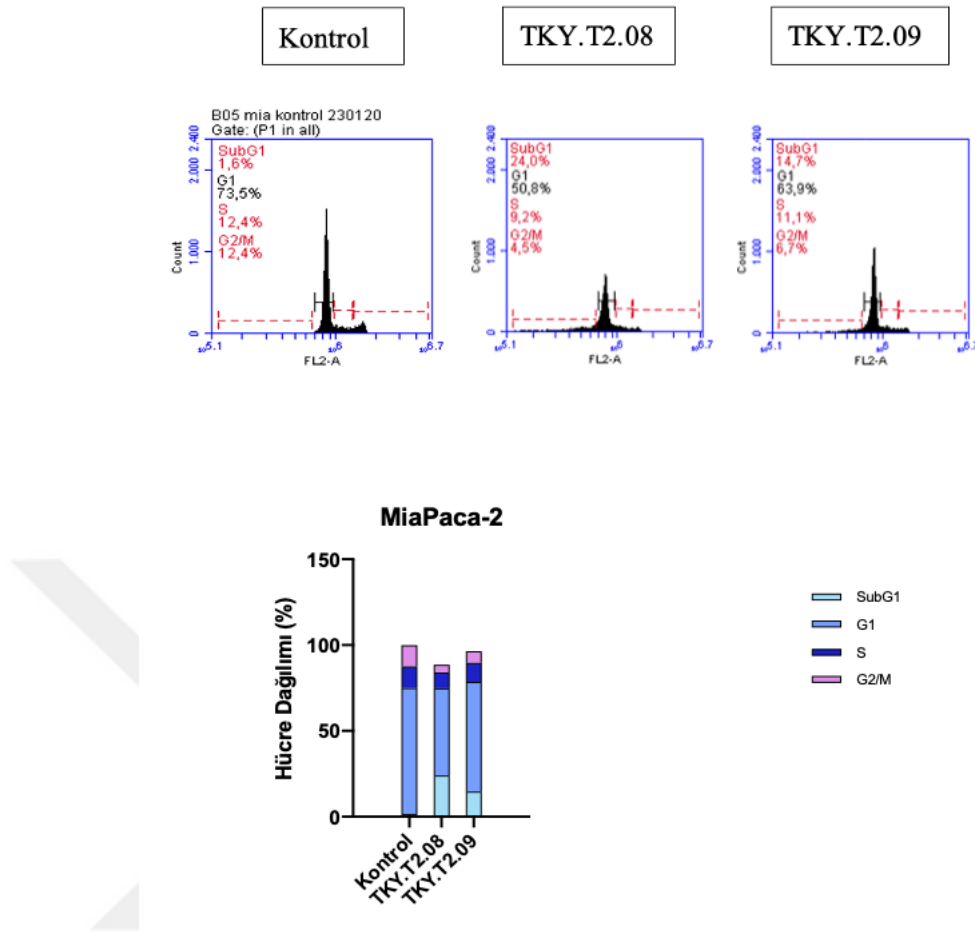
TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının GHRH sinyaline bloke edip etmediğini kontrol edebilmek için GHRH aşağı sinyal yolak elemanları olan GH ve GHRHR anlatımının kontrol edilmesi için immunofloresan boyaması gerçekleştirilmiştir. Immunofloresan boyaması sonucuna göre kontrol hücrelerde ve pozitif kontrol olan GHRH peptit uygulanmış olan hücrelerde GH ve GHRHR anlatımının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 72 saat boyunca 500 nM TKY.T2.08 ve TKY. T2.09 uygulamasının hem GH hem de GHRHR anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi gözlemlenmiştir (Şekil 31).



Şekil 31. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 uygulamasının GHRH sinyalini bloke etmesinin GH ve GHRHR anlatımı üzerinden immunofloresan boyama ile Mia Paca-2 hücrelerinde gösterilmesi.

4.6 MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin Hücre Akış Sitometrisi aracılı gösterilmesi

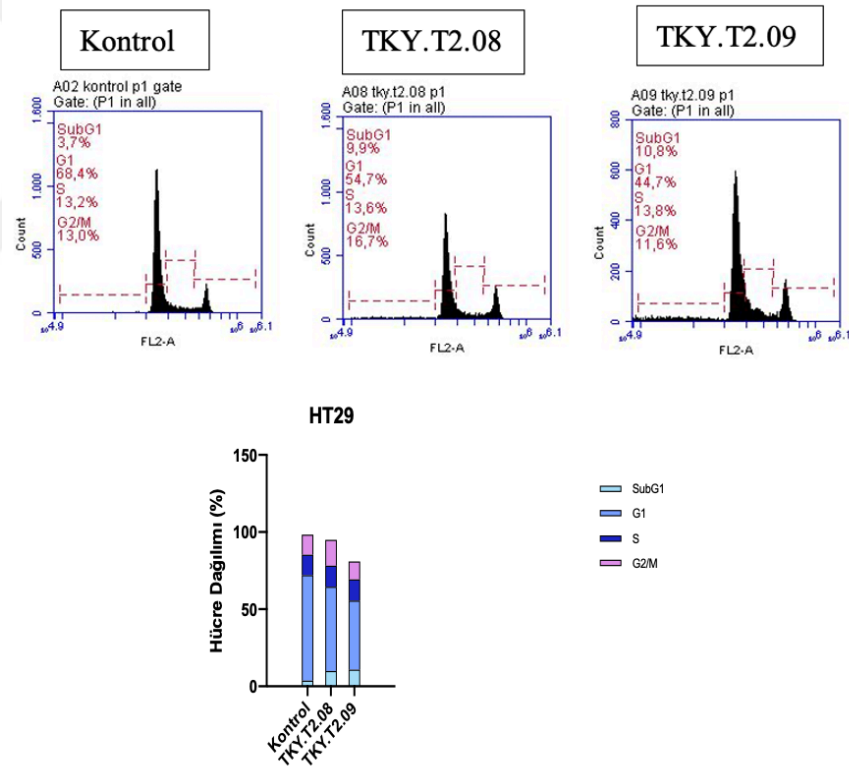
MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında yapılan çalışma sonucu kontrol grubunda elde edilen verilerde SubG1 fazının yüzdesinin %1.6, G1 fazının yüzdesinin %73.5, S fazının yüzdesinin %12.4, G2/M fazının yüzdesinin ise %12.4 olduğu görülmüştür. TKY.T2.08 aptamerinin uygulanması sonucunda elde edilen yüzdelere ise SubG1 fazının yüzdesinin %24.0, G1 fazının yüzdesinin %50.8, S fazının yüzdesinin %9.2, G2/M fazının yüzdesinin ise %4.5 şeklinde değişmiştir. TKY.T2.09 aptamer uygulanmasıyla elde edilen sonuçlarda ise SubG1 fazının yüzdesinin %14.7, G1 fazının yüzdesinin %63.9, S fazının yüzdesinin %11.1, G2/M fazının yüzdesinin ise %6.7 olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ele alındığında 2 aptamer uygulamasında kontrol grubuna kıyasla SubG1 popülasyonunu arttırdığı, MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında SubG1 popülasyonunu en efektif şekilde arttıran aptamerin TKY.T2.08 olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında Anti-Proliteratif Etkisinin PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.

MiaPaca-2 Pankreas kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petriye ekilmiştir. 72 saat 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleriyle muamele edilmiştir. 72 saat sonrasında hücreler fikse edilmiş ve -200C’de 1 hafta inkübasyonu yapılmıştır. 2,5 µg RNaz (10 mg/ml) ve 2,5 µg PI boyası (10 mg/ml) uygulanmış ve FL-2A filtresi (585/400 nm) kullanılarak hücre akış sitometresi cihazında okutularak analizi yapılmıştır.

HT29 kolon kanseri hücre hattında yapılan çalışma sonucu kontrol grubunda elde edilen verilerde SubG1 fazının yüzdesinin %3.7, G1 fazının yüzdesinin %68.4, S fazının yüzdesinin %13.2, G2/M fazının yüzdesinin ise %13.0 olduğu görülmüştür. TKY.T2.08 aptamerinin uygulanması sonucunda elde edilen yüzdelere ise SubG1 fazının yüzdesinin %9.9, G1 fazının yüzdesinin %54.7, S fazının yüzdesinin %13.6, G2/M fazının yüzdesinin ise %16.7 şeklinde değişmiştir. TKY.T2.09 aptamer uygulanmasıyla elde edilen sonuçlarda ise SubG1 fazının yüzdesinin %10.8, G1 fazının yüzdesinin %44.7, S fazının yüzdesinin %13.8, G2/M fazının yüzdesinin ise %11.6 olarak değiştiği gözlemlenmiştir. 2 aptamer uygulamasında kontrol grubunun verileriyle kıyaslandığında SubG1 popülasyonunu arttırmıştır. 2 aptamer arasında MiaPaca-2 pankreas kanserinde görüldüğü gibi SubG1 yüzdesini arttırma da anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 33).

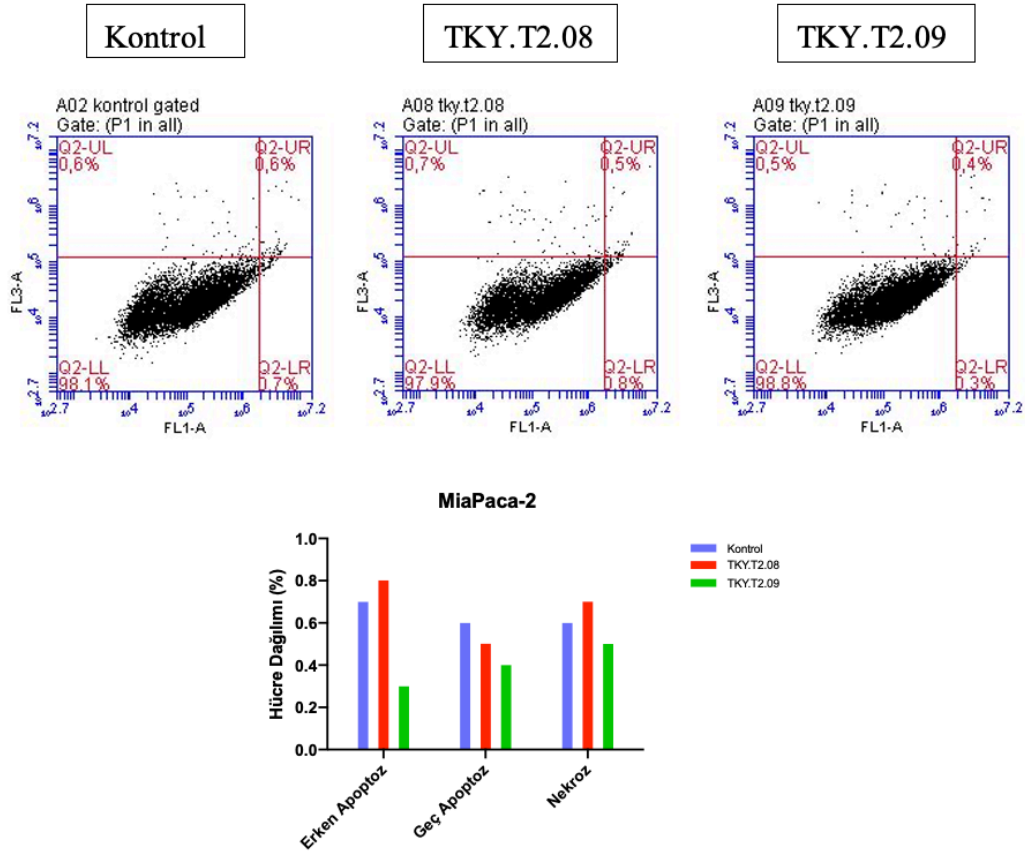


Şekil 33. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin HT29 KolonKanseri Hücre Hattında Anti-Proliteratif Etkisinin PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.

HT29 Kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petriye ekilmiştir. 72 saat 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleriyle muamele edilmiştir. 72 saat sonrasında hücreler fikse edilmiş ve -200C'de 1 hafta inkübasyonu yapılmıştır. 25 µg RNaz (10 mg/ml) ve 25 µg PI boyası (10 mg/ml) uygulanmış ve FL-2A filtresi (585/400 nm) kullanılarak hücre akış sitometresi cihazında okutularak analizi yapılmıştır.

4.7 MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Hücre Akış Sitometrisi aracılı gösterilmesi

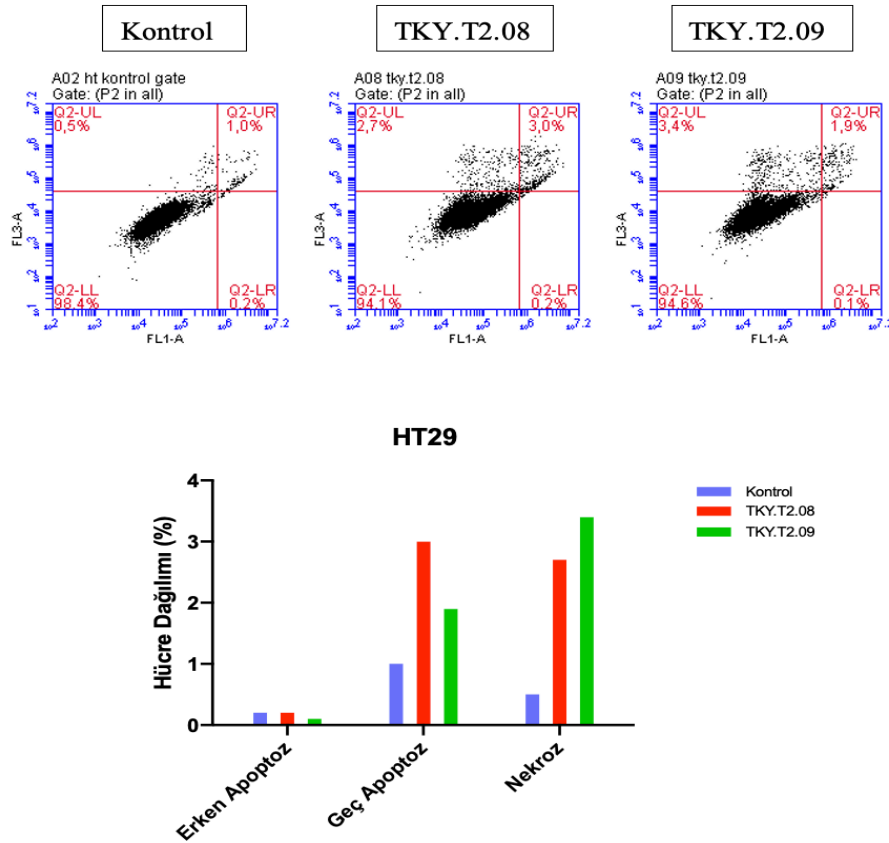
MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubunda %0.7 oranında erken apoptoz, %0.6 oranında geç apoptoz ve %0.6 oranında nekroz gözlemlenmiştir. TKY.T2.08 X-aptameri uygulanmış grupta elde edilen sonuçlarda %0.8 oranında erken apoptoz, %0.5 oranında geç apoptoz ve %0.7 oranında nekroz görülmüştür. TKY.T2.09 X-aptameri uygulanmış grupta elde edilen sonuçlarda ise %0.3 oranında erken apoptoz, %0.4 oranında geç apoptoz ve %0.5 oranında nekroz görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla TKY.T2.08 aptameri uygulanmış grupta nekrozun %0.01 oranında arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 Pankreas Kanseri Hücre Hattında Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V/PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.

MiaPaca-2 pankreas kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle muamele edilmiştir. 72 saat sonrasında BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılarak örnekler hazırlanmıştır ve hücre akış sitometresi cihazında FL-3A ve FL-2A filtrelerinde 1×10^3 hücre okutularak analizi yapılmıştır.

HT29 kolon kanseri hücre hattında kontrol grubunda %0.2 oranında erken apoptoz, %1.0 oranında geç apoptoz ve %0.5 oranında nekroz gözlemlenmiştir. TKY.T2.08 X-aptameri uygulanmış grupta elde edilen sonuçlarda %0.2 oranında erken apoptoz, %3.0 oranında geç apoptoz ve %2.7 oranında nekroz görülmüştür. TKY.T2.09 X-aptameri uygulanmış grupta elde edilen sonuçlarda ise %0.1 oranında erken apoptoz, %1.9 oranında geç apoptoz ve %3.4 oranında nekroz görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla TKY.T2.08 aptameri uygulanmış grupta geç apoptoz tetiklenirken, TKY.T2.08 aptameri uygulanmış grupta nekrozun tetiklendiği sonucuna varılmıştır (Şekil 35).

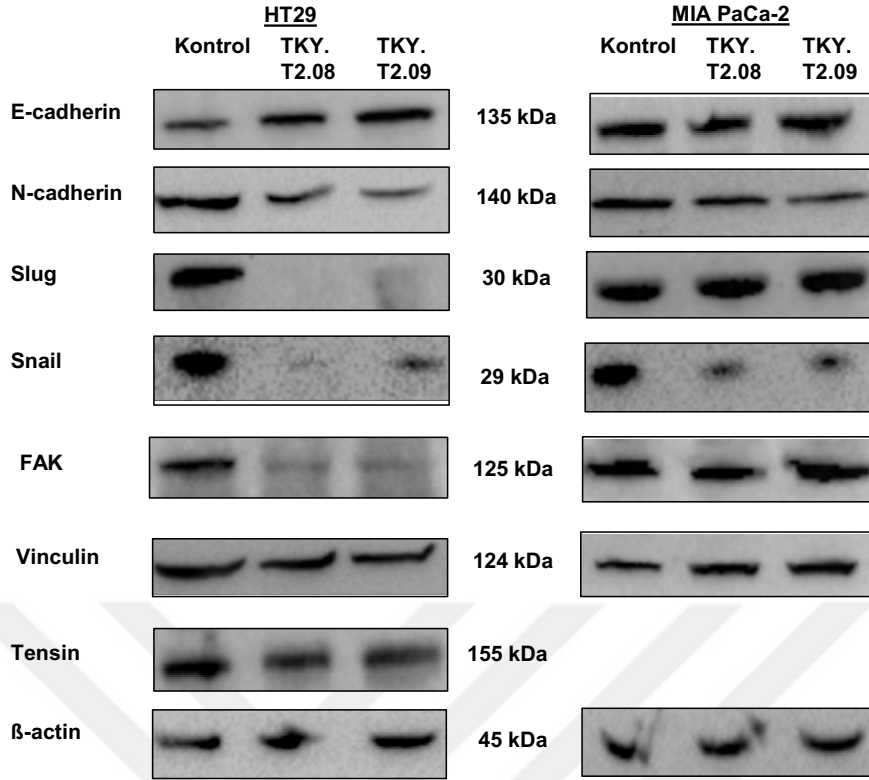


Şekil 35. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin HT29 Kolon Kanseri Hücre Hattında Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V/PI Boyama ile Hücre Akış Sitometrisinde Gösterilmesi.

HT29 kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyusuna 1x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle muamele edilmiştir. 72 saat sonrasında BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılarak örnekler hazırlanmıştır ve hücre akış sitometresi cihazında FL-3A ve FL-2A filtrelerinde 1x10³ hücre okutulmuş analiz yapılmıştır.

4.8 MiaPaca-2 Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 Aptamer Uygulamasının ER Stres – EMT - Otofaji - Apoptotik Ölüm Üzerine Etkisinin Immunoblotlama ile Gösterilmesi

HT-29 kolon kanseri hücrelerine TKY.T2.08 aptamer uygulamasının E-kadherin anlatımını arttırdığı tespit edilmişken, N-kaderin, Slug, Snail, FAK, vinkulin ile tensin anlatımlarını aptamer uygulanmayan kontrollere kıyasla azalttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde HT-29 hücrelerine TKY.T2.09 aptamer uygulamasının E-kadherin anlatımını artırırken, N-kaderin, Slug, Snail, FAK, vinkulin anlatımlarını azalttığı belirlenmiştir (Şekil 35). Mia Paca-2 hücrelerine TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamalarının E-kadherin anlatımını arttırdığı ve N-kaderin anlatımını baskıladığı tespit edilmiştir. Özellikle bu etkinin TKY.T2.09 uygulaması ile daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HT-29 hücrelerine hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 uygulamalarının Snail anlatımını baskıladığı ama vinculin anlatımını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca her iki aptamer uygulamasının Slug ve FAK anlatımları üzerinde anlamlı bir anlatım değişikliği olmadığı belirlenmiştir (Şekil 36).

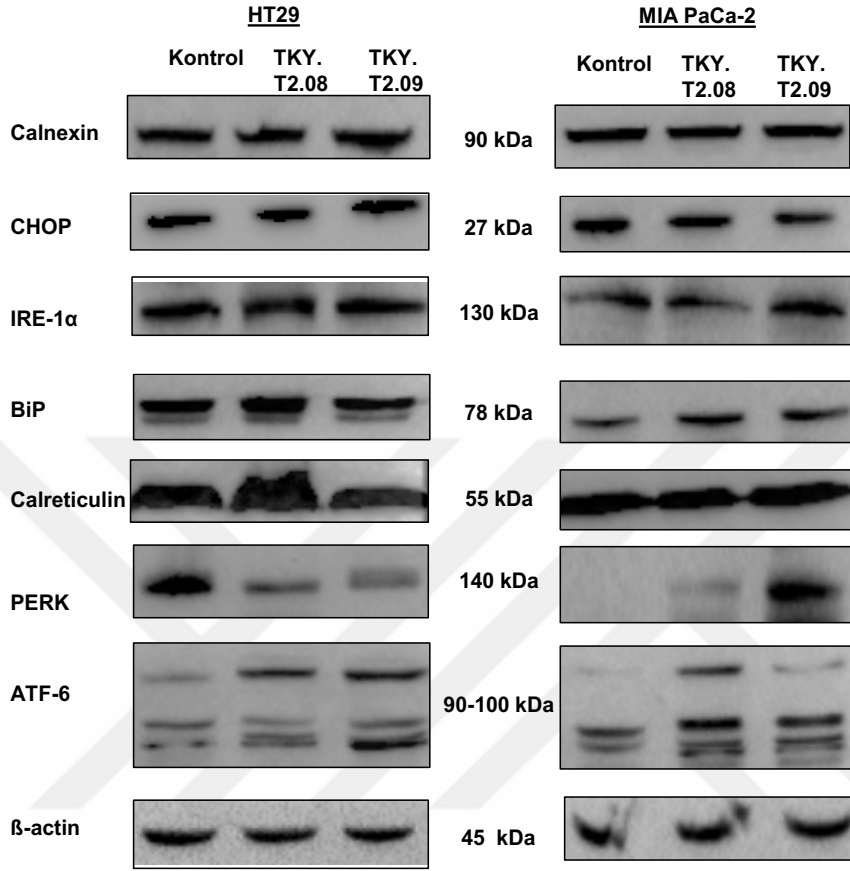


Şekil 36. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Epitel-Mezenkimal Geçiş Yolağındaki Etkilerinin İmmünoiblottama ile Gösterilmesi.

İzole edilmiş HT29 ve MiaPaca-2 total proteinleri 40 ug konsantrasyonda hazırlanmış, 5Xlaemmli ile işaretlenmiş ve %12'lik SDS Page'de 80 V 140 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonrasında 70 kDa altı antikorlar 30 dakika-300A, 70 kDa üstü antikorlar 45 dakika-300A ıslak transfer ile jelden membrana aktarılmıştır. Membranlar gerekli primer ve sekonder antikorlarla muamele edildikten sonra Chemidoc cihazı ile çekimleri alınmıştır.

HT-29 hücrelerine TKY.T2.08 uygulamasının BiP, calretikulin ve ATF-6 anlatımlarını arttırdığı, PERK anlatımını baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca 72 saat boyunca TKY.T2.08 aptamer uygulamasının CHOP, IRE1α ve calnexin anlatımı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. 72 saat boyunca TKY.T2.09 uygulamasının kontrol hücrelere kıyasla Calnexin, CHOP, ATF-6 anlatımlarını arttırdığı, IRE1α, BiP, calretikulin anlatımları üzerinde TKY.T2.09 anlatımının belirgin etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Mia Paca-2 hücrelerine TKY.T2.08 aptamer uygulamasının BiP, PERK, ATF-6 anlatımlarını kontrole kıyasla arttırdığı, Calnexin, CHOP, IRE1α üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca Mia Paca-2 hücrelerine TKY.T2.09 aptamer uygulamasının IRE1α, PERK, ATF-6

anlatımlarını arttırdığı Calnexin, CHOP, BiP, Calretikulin anlatımları üzerinde belirgin bir fark yaratmadığı tespit edilmiştir (Şekil 37).

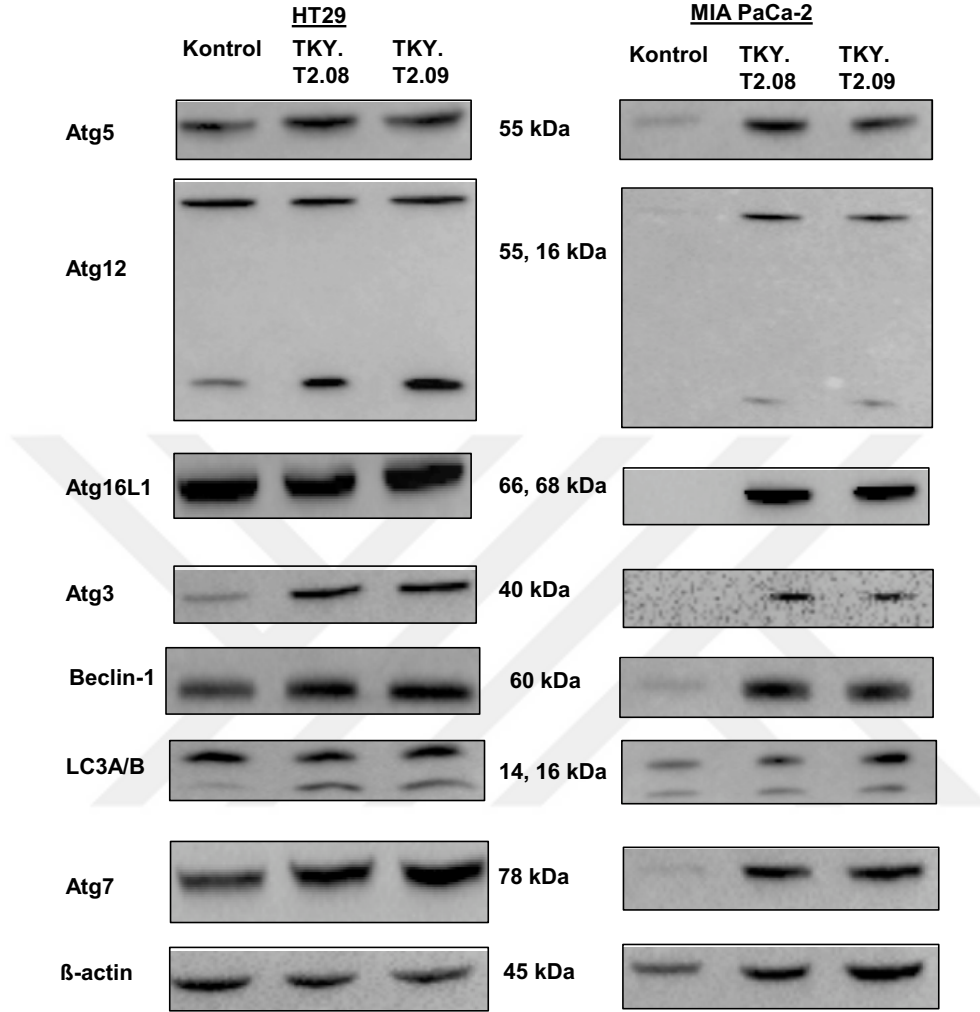


Şekil 37. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Endoplazmik Retikulum Stres Yolağındaki Etkilerinin Immünoblotlama ile Gösterilmesi.

İzole edilmiş HT29 ve MiaPaca-2 total proteinleri 40 ug konsantrasyonda hazırlanmış, 5Xlaemmli ile işaretlenmiş ve %12'lik SDS Page'de 80 V 140 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonrasında 70 kDa altı antikorlar 30 dakika-300A, 70 kDa üstü antikorlar 45 dakika-300A ıslak transfer ile jelden membrana aktarılmıştır. Membranlar gerekli primer ve sekonder antikorlarla muamele edildikten sonra Chemidoc cihazı ile çekimleri alınmıştır.

HT-29 kolon kanseri hücrelerine TKY.T2.08 aptamer uygulamasının Atg5, Atg12, Atg3, Beclin-1, Atg7 anlatımını arttırdığı LC3 kesilimine neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca TKY.T2.09 uygulamasının Atg3, Beclin-1, Atg-7 anlatımlarını indüklediği, LC3 kesilimine yol açtığı gösterilmiştir. Mia Paca-2 hücrelerine TKY.T2.08 aptamer uygulamasının Atg-5, Atg-12, Atg16, Beclin-1, Atg7 anlatımlarını indüklediği LC3 kesilimini arttırdığı tespit edilmiştir. TKY.T2.09 aptamer uygulamasının ise Mia Paca-

2 hücreleri üzerinde Atg12, Atg16, Atg3, Beclin-1, Atg-7 anlatımlarını arttırdığı ve LC3 kesilimini indüklediği belirlenmiştir (Şekil 38).

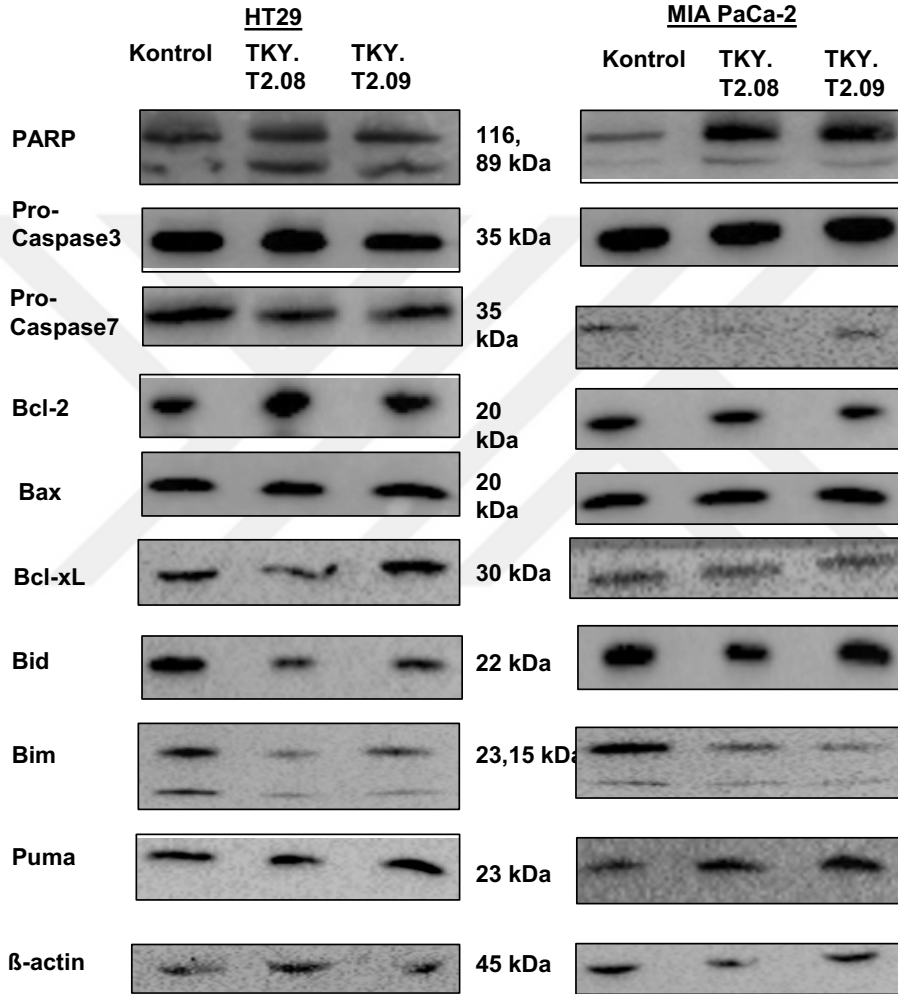


Şekil 38. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Otofaji Yolağındaki Etkilerinin Immünoblotlama ile Gösterilmesi.

İzole edilmiş HT29 ve MiaPaca-2 total proteinleri 40 ug konsantrasyonda hazırlanmış, 5Xlaemmli ile işaretlenmiş ve %12'lik SDS Page'de 80 V 140 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonrasında 70 kDa altı antikorlar 30 dakika-300A, 70 kDa üstü antikorlar 45 dakika-300A ıslak transfer ile jelden membrana aktarılmıştır. Membranlar gerekli primer ve sekonder antikorlarla muamele edildikten sonra Chemidoc cihazı ile çekimleri alınmıştır.

HT-29 hücrelerine 500 nM 72 saat boyunca TKY.T2.08 uygulamasının PARP kesilimini ve Puma anlatımını arttırdığı, Pro-caspase-7, BclxL, Bid, Bim anlatımını azalttığı tespit edilmiştir. TKY.T2.09 uygulamasının ise PARP kesilimini ve Puma anlatımını arttırdığı, pro-kapsaz-7, Bid, Bim anlatımını baskıladığı belirlenmiştir. Mia Paca-2 hücrelerine 500 nM 72 saat boyunca TKY.T2.08 aptamer uygulamasının PARP

kesilimini ve Puma anlatımını arttırdığı tespit edilmiştir. TKY.T2.08 aptamer uygulamasının Bcl-2, Bax, Bid anlatımları üzerinde belirgin etkisinin olmadığı ama BclxL, Bim anlatımını baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 38). TKY.T2.09 aptamer uygulamasının ise Mia Paca-2 hücreleri üzerinde 72 saat zaman zarfında PARP kesilimini ve Puma anlatımını indüklediği, BclxL anlatımını baskıladığı tespit edilirken, Bid, Bcl2, pro-caspase-3 üzerinde belirgin etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 39).



Şekil 39. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Apoptotik Ölüm Yolağındaki Etkilerinin İmmünooblotlama ile Gösterilmesi.

İzole edilmiş HT29 ve MiaPaca-2 total proteinleri 40 ug konsantrasyonda hazırlanmış, 5Xlaemmli ile işaretlenmiş ve %12'lik SDS Page'de 80 V 140 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonrasında 70 kDa altı antikorlar 30 dakika-300A, 70 kDa üstü antikorlar 45 dakika-300A ıslak transfer ile jelden membrana aktarılmıştır. Membranlar gerekli primer ve sekonder antikorlarla muamele edildikten sonra Chemidoc cihazı ile çekimleri alınmıştır.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA

Amerikan Kanser Derneği, kanseri; kontrol edilemeyen büyüme ve anormal büyüme gösteren hücrelerin yayılmasıyla karakterize edilen bir grup hastalık olarak tanımlamıştır. Kanser, 2019 verilerine göre dünya genelinde ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sırada görülmektedir (Verywell., 2017).

Kolorektal kanser, günümüzde yılda yaklaşık 900.000 ölümle dünya sıralamasında dördüncü ölümcül kanser tipi olarak görülmektedir. Obezite, fiziksel egzersiz eksiklikleri ve sigara kullanımı gibi faktörler kolorektal kanser riskini arttırmaktadır [2]. Kolon kanseri en sık bağırsağın sol tarafında inen kolonda ve kalın bağırsağın son bölümü olan rektum kısmında görülmektedir[182]. Kolorektal kanser, GLOBOCAN verilerine bakıldığında 2018 yılında küresel olarak erkeklerde en sık görülen üçüncü, kadınlarda ise en sık görülen ikinci kanser tipidir[49]. Kolorektal kanserde tarama önerilerini etkileyen faktörler; kalıtsal CRC sendromları, FAP, MAP ve Lynch sendromu olarak sınıflandırılmıştır. Küresel olarak kolon kanserine yol açan iki farklı öncü lezyon yolakları bulunmaktadır. Kolorektal kanserin %70-90'ına yol açan adenom-karsinom yolağı ve vakaların %10'unu meydana getiren neoplazi yolağı. Bu yolaklar çoklu genetik ve epigenetik farklılıkları göstermektedir.

Pankreas kanseri küresel olarak kanser ölümleri sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Öngörülere göre ise pankreas kanserinin önümüzdeki yıllarda kansere bağımlı ölümlerde ikinci sıraya yükseleceği söylenmektedir. Pankreas kanseri risk faktörleri arasında en başta obezite ve tütün ürünleri kullanımı görülmektedir. Pankreas kanserinde görülen yüksek ölüm oranı, kanser öncesi neoplazilerin erken teşhisi için güvenilir metodolojilerin olmaması ile ilişkili bulunmuştur. Pankreas kanserleri hastalarının %50'den fazlasında sağ kalım oranı 7-11 ay arasında değişmektedir. Pankreas adenokarsinomunda en yaygın tespit edilen genetik mutasyonlar KRAS, CDK2NA, TP53 ve SMAD4/DPC4 genlerinde gerçekleşmektedir[100].

Tez çalışmasının en temel hedefi olan büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) PACAP/glukagon süper ailesinin bir üyesidir. 44 amino asitten oluşan GHRH peptidinin biyolojik aktivitesi, N-terminal 29 amino asit fragmanı ile korunmaktadır[139]. GHRH'lerin, hipofiz hücrelerinden büyüme hormonu salgılanmasını uyardığı bilinmektedir[131]. GHRH reseptörü olan GHRH-R baskın olarak ön hipofiz bezinde ekspre edilmektedir. GHRH-R geninin 5-bağlanma bölgesi, CREB, Pit-1, östrojenler ve glukokortikoidler gibi faktörler için bağlanma bölgeleri içermektedir[14].

GHRH ve GHRH reseptörünün karsinogenezdeki rolü ile ilişkili birçok kanıt bulunmaktadır[130]. GHRH ilk olarak pankreas ve karsinoid tümörlerde görülmüştür. GHRH'nin ya da GH'n aşırı sentezinin neden olduğu bozuklukların tedavisi amacıyla GHRH antagonistleri geliştirilmiştir[12]. Geliştirilen ilk standart antagonistin ((Ac-[Tyr1, D-Arg2] GHRH (1- 29) NH2)), sıçanlarda GH salınımını baskıladığı ve ektopik GHRH sentezitle akromegali hastarında GH seviyelerini %30-40 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir[121]. GHRH antagonistlerinin antikanser uygulamasındaki klinik durumu neoplazmalı hastalarda GH ve IGF-1 düzeylerini yeterince baskılayamadığı üzerinde olmuştur ve bu durum IGF-1 seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir[123].

Bu tezde efektif olarak kullanılan ve GHRH antagonistlerine alternatif olarak görülen aptamerler ise antikorlara benzer şekilde üç boyutlu olarak katlanarak protein hedeflerine bağlanan tek sarmallı DNA veya RNA molekülleridir. Yapılan çalışmalar sonrası elde edilen bulgulara dayanarak virologlar protein bağlayan bu nükleik asit moleküllerin terapötik ilaç ajanları olma potansiyeline sahip olduğunu kanıtlamıştır. Terapötik olarak geliştirilen aptamerler bulaşıcı hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok tipin baskılanmasında biyolojik yolları modüle edebildiği görülmüştür. Bu alanda verilebilecek en iyi örnek AMD'yi tedavi etmek amacıyla FDA tarafından onaylanan Pegaptanib (Macugen®)'dir. Pegaptanib sodyum çözeltisi, VEGF'yi bloke ederek AMD'yi tedavi etmek için intravitreal olarak enjekte edilmektedir[183]. Kanser tedavisinde kanser hücreleriyle doğrudan etkileşimde bulunan aptamerlerin geliştirilmesine ek olarak, bağışıklık sistemini modüle etmek ve kanser tedavisinde kanser hücre büyümesini dolaylı yolla engellemek içinde geliştirilebilmektedir.

Tüm bu literatür bilgilerinin ışığında bu tezde TÜBİTAK 1001 projesi (Proje no: 117Z254) kapsamında sentezlenmiş olan GHRH 1-29 özgü aptamerleri olan TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerleriyle çalışılmıştır. Literatürdeki bilgilere göre 2012 yılında yapılan bir çalışmaya göre MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücre hattında SV1 ve SV2 reseptör alternatifleri olduğu ve GHRH için mRNA anlatımı olduğu bildirilmiştir. Aptamerlerin, GHRH antagonistlerine karşı alternatif ve daha efektif olarak kullanılabileceğini göstermek amacıyla GHRH sentezinin ve GHRH'ye karşı cevabın en fazla olduğu literatürce bilenen MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri üzerinde antikarsinojenik etkilerinin epitel-mezenkimal geçiş (EMT), endoplazmik retikulum ve otofaji üzerinden apoptoz ile gösterilmesi hedeflenmiştir.

Bu doğrultuda hücre canlılığının ölçülmesi amacıyla MTT testi gerçekleştirilmiştir. MTT Testi, MTT'nin MTT-formazan'a enzimatik olarak indirgenmesiyle açığa çıkan bir reaksiyondur. Bu indirgenmenin mitokondriyal süksinat dehidrojenaz ile katalize edildiği bilinmektedir. Bu nedenle MTT tahlili mitokondriyal solunuma bağlıdır ve dolaylı olarak bir hücrenin hücresel enerji kapasitesinin değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu bağlamda MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde 100, 250 ve 500 nm dozlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerleri uygulanmıştır. Sonuçlar ele alındığında, MiaPaca-2 pankreas kanseri hattında TKY.T2.08 aptamerinin 24 saatte sırasıyla artan dozlarda (100 nm-250 nm-500 nm) hücre canlılığını %83, %71 ve %81 oranlarda, 48 saat aptamer uygulamasında sırasıyla; %84, %81 ve %77 oranlarında ve son olarak 72 saatte 100 nm'da %87, 250 nm'da %82 ve 500 nm'da %77 oranında düşürdüğü bulunmuştur. HT29 kolon kanseri hücre hattında ise TKY.T2.08 aptamerinin 24 saatte sırasıyla artan dozlarda (100 nm-250 nm-500 nm) hücre canlılığını %72, %66 ve %62 oranlarında, 48 saat aptamer uygulamasının sırasıyla; %75, %60 ve %56 oranlarında düşürürken 72 saat TKY.T2.08 aptameri uygulaması sonucunda 100 nm'da %59, 250 nm'da %57 ve 500 nm'da %60 oranına düşürdüğü görülmüştür. Elde edilen bu sonuçların ışığında TKY.T2.08 aptameri için hem MiaPaca-2 hem de HT29 hücre hattında en efektif olarak 72 saat uygulamada 500 nm dozu seçilmiştir.

TKY.T2.09 aptameri için MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında en etkili sonuçlar 72 saat uygulamasında görülmüştür. 72 saat TKY.T2.09 aptamer uygulamasının 100 nm'da %78, 250 nm'da %75 ve 500 nm'da %69 oranına canlılığı azalttığı görülmüştür. HT29 kolon kanserinde ise 72 saat TKY.T2.09 aptamer uygulaması; 100 nm'da %72, 250 nm'da %70 ve 500 nm'da %73 oranına azalttığı sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda TKY.T2.09 aptameri için 72 saat uygulamada 500 nm dozunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Tez kapsamında yapılacak tüm deneyler için hem MiaPaca-2 pankreas kanseri hem de HT29 kolon kanseri hücre hattı için her iki TKY.T2.08 ve TKYT2.09 X-Aptameri için 72 saat – 500 nm dozu seçilmiştir.

Hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla yara kapanma deneyi gerçekleştirilmiştir. GHRH'nin yara iyileşmesindeki rolü literatürce bilinmektedir[184][185]. GHRH'nin aynı zamanda pankreas adacık hücrelerinde hücre proliferasyonunu indükleyerek apoptozu azalttığı bilinmektedir[186]. GHRH'nin kanser hücrelerinde telomerazın aktivitesini modüle etme yeteneği olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak dokunun rejenerasyonu ve onarımı durumlarında GHRH'nin geniş bir rolü olduğu düşünülmektedir[136]. Çalışılan aptamerlerin 24, 48 ve 72 saat aralıklarında yara kapanma üzerine etkileri incelenmiştir. TKY.T2.08 aptameri uygulanmış grupta MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında 0. Saatte 61.3 um olan yara boyutunun 24. Saatte 53.5, 48.saate 50.3 um ve 72. saatte 47.7 um olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 23). HT29 kolon kanseri hücre hattında 0. saatte 105 um olan yara boyutunun 24. Saatte 84.5, 48. Saatte 76,1 um ve 72. Saatte 81.9 um olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 24). TKY.T2.09 aptamerinin uygulanmış olduğu grupta MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında 0. Saatte 82.6 um olan yara boyutunun 24. Saatte 78 um, 48. Saatte 74.2 um ve 72. Saatte 58.1 um olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 23). HT29 kolon kanseri hücre hattında 0. Saatte 96,1 um olan yara boyutunun 24. Saatte 72.9 um, 48. Saatte 82.6 um, 72. Saatte 72.2 um olduğu görülmüştür (Şekil 24). Elde edilen bu sonuçların ışığında GHRH'yi baskılayan TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin hem kolon kanseri hücre hattında hem de pankreas kanseri hücre hattında hücre göçünü baskıladığı görülmüştür. Hem MiaPaca-2 hem de HT29 hücre hatları üzerinde TKY.T2.09 aptamerinin yara kapanmasını daha etkin olarak engellediği gözlemlenmiştir.

GHRH 1-29 özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-aptamerlerinin mitokondri membran potansiyeli üzerine ve hücre ölümü üzerine etkilerinin gösterilmesi amacıyla belirli boyalarla floresan boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada GHRH antagonisti olan JMR-132'nin doza bağımlı olarak HCT-116 kolon kanseri hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı ve DNA fragmentasyonunu ise arttırdığı sonucuna varılmıştır[187]. Litaratürdeki bu bilgiler ışığında yapılan deneysel süreç sonunda, MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde bir etkisinin olmadığı (Şekil 25) fakat HT29 kolon kanseri hücre hattında TKY.T2.08 aptamerinin mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 27). MiaPaca-2 hücre hattında hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 aptameri DNA fragmentasyonunu artırırken, HT29 hücre hattında DNA fragmentasyonunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. MiaPaca-2 ve HT29 hücre hatlarında uygulanmış TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin her iki kanser tipinde hücre ölümünü arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 25-Şekil 27). Reaktif oksijen türevlerinin gösterilmesi amacıyla yapılan DCFDA boyaması sonucunda hem MiaPaca-2 hem de HT29 hücre hattında TKY.T2.08 aptamerinin efektif bir şekilde kontrol grubuna kıyasla reaktif oksijen türevlerini arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 26-Şekil 28). Elde edilen sonuçlar değerlendirdiğinde her iki aptamerinde MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücre hatlarında PI boyama ile anti proliferatif etkisi gösterilerek hücre ölümünü tetiklediği, tüm floresan boyama sonuçları baz alındığında TKY.T2.08 aptamerinin TKY.T2.09 aptamerine göre daha efektif sonuçlar gösterdiği ve her iki aptamerle muamele sonucunda HT29 kolon kanseri hücre hattının daha fazla yanıt verdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Klonojenik tahliller, kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır çünkü koloni oluşunun tümör oluşturma yeteneğine sahip kanser hücrelerinin belirgin bir yeteneği olduğu literatürce bilinmektedir. Bu uygulama ilaçların sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması için hücresel büyüme üzerindeki etkilerinin araştırılması için standart bir deney adımı olarak kullanılmaktadır[188]. Bu tezde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-aptamerlerinin hücre hatlarında koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi amacıyla asılı damla modeli deneyi gerçekteştirilmiştir. MiaPaca-2 pankreas kanserinde TKY.T2.08 aptamerinin 24. Saatte 46.4 um olan koloni çapının 72. Saatte 41,3 um olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.09 aptamerinin ise 24. Saatte 53.5 olan koloni çapının 72. Saatte 45.8 um olduğu tespit edilmiştir (şekil 29). HT29 kolon kanserinde TKY.T2.08 aptamerinin 24. Saatte 83.2 um olan koloni çapının 72. Saatte 58.1 um olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.09 aptamerinin 24. Saatte 91.6 um olan koloni çapının 72. Saatte 52.2 um olduğu görölmüştür (şekil 30). Tüm sonuçlar ele alındığında hem MiaPaca-2 pankreas kanseri hem de HT29 kolon kanseri hücre hattında hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 aptamerlerinin koloni çapını küçölttüğu, TKY.T2.09 aptamerinin etkinliğinin her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görölmüştür.

Seçili GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin tezin amacında belirtildiği gibi GHRH'yi baskıladığını gösterebilmek amacıyla GHRH ekspresyonunun en fazla olduğu bilinen MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında immünofloresan tekniği kullanılarak GHRH'nin aşağı sinyal yolağında önemli markırları olan GH ve GHRH-R seviyelerinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda MiaPaca-2 hücre hattının 72 saat boyunca 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptameriyle muamelesi sonrasında kontrol grubuna ve pozitif kontrol olarak uygulanmış GHRH grubuna kıyasla her iki X-aptamerinin de hem GH hem de GHRH-R seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

GHRH antagonistlerinin, tümöral GHRH reseptörlerinin aracı olduğu kanser hücreleri üzerinde doğrudan çoğalmayı önleyici etkisi olduğu bilinmekte, bununla birlikte GHRH antagonistlerinin antiproliferatif etkisinde işlevsel olan sinyal iletim yolları henüz tam olarak bilinmemektedir[139]. Bu verilere bağlı olarak GHRH antagonistlerine yeni bir alternatif olarak çalıştığımız X-Aptamerler ile Flow Sitometri tekniği kullanılarak PI ve Annexin V/PI uygulaması gerçekleştirilmiş, bu teknik ile hücresel apoptozun hangi evrede gerçekleştiği ve hücre tutulumunun hangi fazlarda meydana geldiğini gösterebilmek hedeflenmiştir. Ardından X-Aptamerlerin antiproliferatif etkisinin hangi sinyal yolları üzerinden gerçekleştiğini aydınlatabilmek amacıyla immünoiblottama tekniği ile EMT, ER Stress, Otofaji ve Apoptoz yollarında önemli işlev gösteren markırlara bakılmıştır.

Hücre akış sitometrisi tekniği aracılığı ile yapılan PI boyama sonuçları ele alındığında; MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin kontrol grubuna kıyasla SubG1 popülasyonunu sırasıyla %1.6'lık bir orandan %24 ve %14.7 oranlarına çıkardığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda MiaPaca pankreas kanseri hücre hattında uygulanan X-Aptamerlerin tutulumu SubG1 evresinde yaparak apoptozu tetiklediği sonucuna varılmıştır. TKY.T2.08 X-Aptamerinin etkisinin daha efektif olduğu gözlemlenmiştir. HT29 kolon kanseri hücre hattında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin kontrol grubuna kıyasla SubG1 popülasyonunu sırasıyla %3.7'lik bir orandan %9.9 ve %10.8 oranlarına çıkararak apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir. Deney sonuçları kıyaslandığında her iki X-Aptamerin de MiaPaca-2 pankreas kanserinde daha anlamlı sonuçlara yol açtığı sonucuna varılmıştır.

Annexin V/PI boyaması plazma membran bütünlüğü ve geçirgenliğindeki farklılıklar yoluyla çalışılan hücrelerin canlı, apoptotik ya da nekrotik olup olmadığını belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir tekniktir[189]. Elde edilen sonuçlar bazında, MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubuna kıyasla TKY.T2.08 X-Aptamerinin erken apoptozu %0.6 oranından %0.7 oranına, nekrozu ise %0.6 oranından %0.7 oranına çıkardığı gözlemlenmiştir. Bu durumda TKY.T2.08 aptamerinin hep erken apoptozu hem de nekrozu %0.1 oranında tetiklediği sonucuna varılmıştır. MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında uygulanan TKY.T2.09 X-Aptamerinde ise apoptotik hücre ölümü üzerinde anlamlı bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir. HT29 kolon kanseri hücre hattında kontrol grubuna kıyasla TKY.T2.08 X-Aptamerinin kontrol grubunda %1 olan geç apoptoz oranını %3 oranına tetiklediği sonucuna varılmıştır. TKY.T2.08 aptameri geç apoptozu indüklerken, TKY.T2.09 X-Aptameri kontrol grubunda %0.5 olan nekroz oranını %3.4 oranında indüklediği gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında kolon kanseri hücre hattında TKY.T2.08'in geç apoptozu tetiklediği görülürken, TKY.T2.09'un nekrozu tetiklediği sonucuna varılmıştır.

GHRH antagonistlerinin antiproliferatif etkilerinin hangi sinyal iletim yolları üzerinden gerçekleştiği henüz literatürce bilinmemektedir. Çalışılan X-Aptamerlerinin MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri üzerinde meydana getirdiği antiproliferatif etki bu tez kapsamında önceki deneylerle gösterilmiştir. Bu etkinin hangi yollar üzerinde gerçekleştiğini gösterebilmek amacıyla EMT-ER Stres-Otofaji ve Apoptoz gibi önemli hücresel aktivitelerde önemli markırların immünoablota ile gösterilmesi hedeflenmiştir.

Litaratürde Meme, kolon ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde tümör büyümesi büyüme hormonu(GH) ile ilişkilendirilmiştir. EMT, epitel hücreleri tanımlayıcı fenotiplerin kaybolması hücresel adezyon kaybuna ve artan hücre göçüne neden olan bir yoldur. GH'nin kanserdeki rolü epitelden mezenkimale geçişin (EMT) bir indüksiyonu olarak görülmektedir. EMT, sınırları tanımlanmış bir tümörden invazif, metastatik bir tümöre geçişinde itici güç olarak kanserde büyük rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda GHRH'yi baskılayan X-Aptamerler ile EMT yolağında önemli olan markırlara immünoblotlama ile bakılmıştır[190]. Bu doğrultuda ilk önce Epitel-Mezenkimal Geçiş yolağında E-cadherin, N-cadherin, Slug, Snail, FAK, Vinculin ve Tensin markırlarına bakılmıştır. HT29 kolon kanseri hücre hattında TKY.T2.08 X-Aptamer uygulamasının E-cadherin anlatımını arttırdığı, N-cadherin, Slug, Snail, FAK ve Vinculin anlatımını kontrol grubuna kıyasla azalttığı gözlemlenmiştir. MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 X-Aptamerinin benzer şekilde N-cadherin anlatımını artırırken, E-cadherin anlatımını azalttığı gözlemlenmiştir. Bu etki TKY.T2.09 X-Aptamerinde daha spesifik olarak görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında her iki hücre hattında da TKY.T2.08 X-apamerinin EMT üzerine ket vurucu etkisi olduğu sonucu elde edilmiştir. HT29 kolon kanseri hücre hattında her iki aptamer uygulamasında Slug ve FAK anlatımları üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlenmiştir.

Endoplazmik Retikulum'un normal işlevlerindeki bozukluklar evrimsel olarak korunan bir hücre stres tepkisine ve açılmış protein tepkisine yol açmaktadır, bu durumda başlangıçtaki hasarın telafi edilmesi amaçlanır fakat ER işlev bozukluğunun uzun sürmesi durumunda bu stres durumu hücre ölümünü tetikleyebilmektedir. Bu sistematikte kritik ER sinyalleşme proteinlerinin arasında PERK, Irea ve ATF6 bulunmaktadır[191]. Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında ER Stres yolağından Calnexin, CHOP, Ire-1a, BiP, Calreticulin, PERK ve ATF-6 anlatımlarına bakılmıştır. HT29 kolon kanseri hücre hattında TKY.T2.08 X-Aptameri uygulamasının kontrol grubuna kıyasla BiP, Calreticulin ve ATF-6 anlatımlarını arttırdığı, PERK anlatımı ise baskıladığı gösterilmiştir. TKY.T2.08 aptamerinin CHOP, Ire-1a ve Calnexin anlatımlarının üzerinde ise bir farklılığa yol açmadığı görülmüştür. TKY.T2.09 X-Aptamerinin ise Calnexin, CHOP ve ATF-6 anlatımlarını arttırdığı gözlemlenmiştir. MiaPaca-2 pankreas kanseri sonuçlarına bakıldığında TKY.T2.08 X-Aptamerinin BiP, PERK ve ATF-6 anlatımlarını arttığı, TKY.T2.09 aptamerinin ise kontrol grubuna kıyasla Ire-1a, PERK ve ATF-6 anlatımlarını arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında her iki aptamerin, HT29 kolon kanseri hücre hattında ise sadece TKY.T2.09 X-Aptamerinin ER Stresi indüklediği sonucuna varılmıştır.

Otofajik programın yürütülmesi ve düzenlenmesi, otofajiye özgü genler(Atg) ile sağlanmaktadır. Bazı Atg proteinleri otofagozom oluşumunda direkt rol oynamaktadır (Atg5, Atg12, Atg7 ve Atg10 gibi). Otofoji kontrolünde en majör markır olan LC3 ise LC3-1 ve LC3-2 olarak iki formda bulunmaktadır[192]. Literatürden elde edilen bu bilgiler ile otofaji yolağı için Atg5, Atg12, Atg16-L1, Atg3, Beclin-1, Atg7 ve LC3A/B markırları çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarda TKY.T2.08 aptamerinin HT29 kolon kanseri hücre hattında Atg5, Atg12, Atg3, Beclin-1 ve Atg7 anlatımlarını indüklediği ve LC3 kesilimine yol açtığı, MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında ise aynı şekilde Atg-5, Atg-12, Atg16, Beclin-1, Atg7 anlatımlarını indüklediği ve LC3 kesilimini indüklediği gösterilmiştir. TKY.T2.09 X-aptamerinin HT29 kolon kanserinde Atg3, Beclin-1, Atg-7 anlatımlarını arttırdığı ve LC3 kesilimini indüklediği, MiaPaca-2 pankreas kanserinde ise Atg12, Atg16, Atg3, Beclin-1, Atg-7 anlatımlarını arttırdığı ve aynı şekilde LC3 kesilimini indüklediği sonucuna varılmıştır. Literatürdeki bilgiler ve tez kapsamında ortaya çıkan sonuçlar birlikte ele alındığında MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücre hatlarında çalışılan her iki X-Aptamerinde LC3 kesilimini indükleyerek otofajiyi tetiklediği sonucuna varılmıştır.

GHRH antagonistleri olan JMR-132 ve JV-1-38 antagonistlerinin PC3 prostat kanseri üzerinde apoptotik ölüm üzerine etkileri Bx, Bcl-2, Siklin-D1 ve kaspaz 3 ile literatürce daha önce gösterilmiştir[193]. GHRH Antagonistlerine alternatif olarak Çalışılan X-aptamerlerin MiaPaca-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü yolağında hangi markırlar ile ilişkili olduğunu aydınlatmak amacıyla her iki hücre tipinde de; PARP, Pro-kaspaz3, Pro-kaspaz7, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bid, Bim ve Puma markırları üzerine etkileri incelenmiştir. TKY.T2.08 X-Aptamerinin HT29 kolon kanseri hücre hattında PARP kesilimini indüklediği, Puma anlatımını arttırdığı ve Pro-kaspaz7, Bcl-xL, Bid ve Bim markırlarının anlatımını azalttığı görülmüştür. Miapaca-2 pankreas kanseri hücre hattında ise aynı şekilde PARP kesilimini indüklediği, Puma anlatımını arttırdığı ve Bcl-xL, Bim anlatımını baskıladığı sonucu elde edilmiştir. TKY.T2.09 X-Aptamerinin HT29 kolon kanseri hücre hattında PARP kesilimini indüklediği, Puma anlatımını arttırdığı ve Pro-kaspaz-7, Bid, Bim anlatımını baskıladığı görülmüştür. MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında ise PARP kesiliminin indüklendiği, Puma anlatımının arttığı ve Bcl-xL anlatımının baskılandığı sonucuna varılmıştır. Tüm bu verilere bakıldığında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin PARP kesilimin indükleyerek, Puma anlatımını arttırarak ve Bcl-xL anlatımını baskılayarak apoptotik hücre ölümü üzerindeki indükleyici etkisi gösterilmiştir.

Tüm sonuçlar ele alındığında tezde amaçlandığı üzere GHRH anlatımını baskıladığı bilinen TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin GHRH anlatımının yüksek olduğu bilinen MiaPaca-2 pankreas kanseri hücre hattında MTT deneyi ile seçilmiş 72 saat – 500 nm doz uygulaması sonucunda GH ve GHRH-R anlatımları ile baskılandığı gösterilmiştir. Bunu takiben TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin her iki hücre hattında da nekrozu tetiklediği, TKY.T2.08 X-Aptamerinin aynı zamanda geç apoptozu da indüklediği gösterilmiştir. Apoptotik hücre ölümünde moleküler yolların aydınlatılması amacıyla TKY.T2.08 aptamerinin iki hücre hattında da E-kaderin anlatımını arttırırken N-Kaderin anlatımını baskılayarak EMT yolağı üzerine inhibe edici etkisi ve hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 aptamerlerinin her iki kanser tipinde de LC3 kesilimini arttırarak otofajiyi tetiklediği ve aynı zamanda PARP kesilimini arttırarak ve Bcl-xL anlatımını baskılayarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

EKLER

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma
Akış Sitometrisi Cihazı	AC6531180147	BD Biosciences
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct q-5UV
Dondurucu (-80°C)	U725	New Brunswick Scientific
Elektroforez	1658004	Bio-Rad
Floresan Mikroskopu	1X71	Olympus
Güç Kaynağı	1645050	Bio-Rad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
Inverted Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Kuru Isıtıcı Blok	FN120	Nüve
Laminar Flow	12469 2000	Thermo Scientific
Laminar Flow	LN090	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart Equipment
Mikropipet (0,5-10 µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200 µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (100-1000 µl)	T27274	Thermo Scientific
Optik Mikroskop	701	Ivy men
Otoklav	OT401	Nüve
pH Metre	N315	SEM BIO
Santrifüj Cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj Cihazı	5810R	Eppendorf
Santrifüj Cihazı	22331	Eppendorf

Soğutmalı Etüv	ES120	Nüve
Sıvı Azot Tankı	Arpege 40	Air Liquide
Spektrofotometre	2100	Amershan

Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma
2-merkaptotanol	S4805940 517	Merck
2-merkaptotanol	M7522	Sigma-Aldrich
Akrilamid/Bis-akrilamid %30 çözelti	A9099	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Ampisilin	P06-07100	PAN-Biotech
Asetik asit	27225	Sigma-Aldrich
Bakır sülfat	02791	Merck
Commasie mavisi	A3480	Applichem
Disodyum EDTA	2937	Applichem
Disodyum fosfat	A4229	Applichem
DMSO	K46505343 517	Merck
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich
Etanol	CAS 64-17-5	AlkoMed
Floksuridin	F0503	Sigma-Aldrich
Glisin	3570	Calbiochem
Hidrojen peroksit	K39218400838	Merck
Hidroklorik asit	K43804717239	Merck
İzopropanol	K44518295321	Merck
Kalsiyum klorür	02382	Merck
Luminol	A2185	Applichem
Magnezyum sülfat	05886	Merck
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT ayıracı	M2128-5G	Sigma-Aldrich

p-Kumarik asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Ponceau kırmızısı	A1405	Applichem
Saf etanol	32221	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	UN1888	Applichem
Sığır serum albümin	A2153	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	A2941	Applichem
TEMED	A1148 0100	Applichem
Tris-baz	648310	Calbiochem
Tris-hidroklorik asit	648317	Calbiochem
Tween20	S6740684 348	Merck
Yağsız süt tozu	SC-2325	Santa-Cruz Biotechnology

Tablo 4. Kullanılan Hücre Kültürü Aparatları

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25 cm ² hücre büyütme kabı	90026	TPP
75 cm ² hücre büyütme kabı	90076	TPP
Fetal sığır serumu	10500-064	Gibco
Hemositometre	640110	Marienfeld-Superior
Penisilin/streptomisin	15140-122	Gibco
RPMI 1640	09521	ScienCell
Trypsin-EDTA	25200-056	Gibco

Tablo 5. Kullanılan Tamponların İçeriği

10X TBS	87,6 gr NaCl 12,11 gr Tris-Baz 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcı ile çözündürülür. pH 8'e yapıldıktan sonra distile su ile toplam hacim 1000 ml yapılır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak üzere 1X TBS'e çevrilir. Çevirmek için; 100 ml 10X TBS mezür ile ölçülür, üzerine 900 ml distile su eklenerek 1X TBS'e dönüştürülür.
1X TBS-Tween-20	1X TBS-Tween-20 için; ilk olarak 10X TBS yukarıda anlatıldığı şekilde 1X TBS'e dönüştürülür. 1X TBS'e %10 olacak şekilde Tween-20 eklenir ve distile su ile toplam hacim ayarlanır.
10X PBS	80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14.4 gr Na ₂ HPO ₄ , 2.4 gr KH ₂ PO ₄ hassas terazi ile tartılır. 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcıda resüspanse edilir. pH metre yardımıyla pH 7,4 e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml 'e tamamlanır. Hazırlanan 10X PBS kullanılmak için 1X PBS'e dönüştürülür. Bunun içinde 100 ml 10X PBS alınarak 900 ml distile su 1000 ml'e tamamlanarak 1X PBS'e dönüştürülür.
Protein Standardı (Bovine Serum Albumin = BSA)	0,015 gr Albumin hassas terazi ile tartılır. 10 ml distile su ile resüspanse edilerek. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanım için hazırlanır.
Bradford Reagent	100 mg Comassie Brilliant Blue (6-250) terazi yardımıyla tartılır. 50 ml %95 etanol de çözündürülür. 100 ml %85 Fosforik asit eklenir. Çözelti 1 litreye tamamlanarak 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanıma hazırlanır.
Hücre Lizis Tamponu (CLB)	1 adet tablet Proteinaz inhibitörü 10 ml memeli protein ekstraksiyon reaktifi (M-PER) ile resüspanse hale getirilerek hazırlanır.
Mild Strip Tamponu	15 gr glisin, 1 gr SDS terazi ile tartılır 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla resüspanse hale getirilerek 10 ml Tween-20 eklenir. pH metre yardımıyla pH 2,2'e ayarlanır ve toplam hacim 1000 ml tamamlanır.

%10 Ammonium Persulfate Solution (APS)	100 mg Ammonium persulfate 1 ml distile suda mikro pipet yardımıyla resüspanse hale getirilerek hazırlanır.
---	---

10X Yürütme Tamponu	30,3 gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 1 gr Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) terazide tartılarak 500 ml distile su içinde çözündürülür. pH metre ile pH: 8.3 e ayarlanır ve toplam hacim 1000ml'e tamamlanır. Hazırlanan 10X yürütme tamponu kullanılmak için 1X yürütme tamponuna dönüştürülür. 100 ml 10X yürütme tamponu ve 900 ml
10X Transfer Tamponu	33,3 gr Tris-baz ve 144 gr Glisin terazi ile tartılarak 500 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla resüspanse hale getirilir. pH metre ile pH: 8.3 e ayarlanır. 10X transfer tamponu 1X transfer tamponuna dönüştürülerek kullanılır. 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile suyla toplam hacim 1000 ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür.
Hücre Dondurma Medyası	45 ml FBS ve 5 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılır. 0,22 µM porçapındaki filtrelerden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Tablo 6. Kemiluminesans Görüntüleme Tamponları İçeriği

	A Tamponu	B Tamponu
Distile Su	9 ml	9 ml
Tris-Baz pH:8,5	1 ml	1 ml
Coumaric Asit	75 ul	-
Luminol	150 ul	-
H2O2	-	15 ul

Tablo 7. %12 (v/v) Poliakrilamid Jel İçeriği

	Üst Jel (%4)	Alt Jel (%12)
Distile Su	1,5 ml	3,4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	-	2.5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8	0,625 ml	-
%10 SDS	0,025 ml	0.1 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30, %0,8 w/v)	0.335 ml	4 ml
Amonyum Persulfat (APS) (%10)	50 ul	80 ul
TEMED	5 ul	10 ul

REFERANSLAR

- [1] M. B. Yurgelun *et al.*, “Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer,” *J. Clin. Oncol.*, 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.71.0012.
- [2] D. V. Avgerinos and J. Björnsson, “Malignant neoplasms: Discordance between clinical diagnoses and autopsy findings in 3,118 cases,” *APMIS*, 2001, doi: 10.1034/j.1600-0463.2001.d01-145.x.
- [3] P. A. Wingo, L. A. G. Ries, H. M. Rosenberg, D. S. Miller, and B. K. Edwards, “Cancer incidence and mortality, 1973-1995: A report card for the U. S.,” *Cancer*, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19980315)82:6<1197::AID-CNCR26>3.0.CO;2-0.
- [4] P. Robberecht *et al.*, “Structural requirements for the activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor (grf): Discovery of (n-ac-tyr1, d-arg2)-grf(1-29)-nh2 as a grf antagonist on membranes,” *Endocrinology*, 1985, doi: 10.1210/endo-117-5-1759.
- [5] S. M. Nimjee, R. R. White, R. C. Becker, and B. A. Sullenger, “Aptamers as Therapeutics,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2017, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558.
- [6] K. E. Mayo *et al.*, “Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor,” 2000.
- [7] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [8] C. Bosetti, P. Bertuccio, E. Negri, C. La Vecchia, M. P. Zeegers, and P. Boffetta, “Pancreatic cancer: Overview of descriptive epidemiology,” *Mol. Carcinog.*, 2012, doi: 10.1002/mc.20785.
- [9] M. Finlay A Macrae, “Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors,” *UptoDate*. 2018.
- [10] R. W. Burt, J. A. DiSario, and L. Cannon-Albright, “Genetics of colon cancer: Impact of inheritance on colon cancer risk,” *Annual Review of Medicine*. 1995, doi: 10.1146/annurev.med.46.1.371.
- [11] M. Ezzati, S. J. Henley, A. D. Lopez, and M. J. Thun, “Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: Current patterns and data needs,” *Int. J. Cancer*, 2005, doi: 10.1002/ijc.21100.

- [12] S. Parry *et al.*, “Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: The advantage of more extensive colon surgery,” *Gut*, 2011, doi: 10.1136/gut.2010.228056.
- [13] M. Jarosz, W. Sekuła, and E. Rychlik, “Influence of diet and tobacco smoking on pancreatic cancer incidence in Poland in 1960-2008,” *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2012, doi: 10.1155/2012/682156.
- [14] M. Lambe, S. Eloranta, A. Wigertz, and P. Blomqvist, “Pancreatic cancer; reporting and long-term survival in Sweden,” *Acta Oncol. (Madr)*, 2011, doi: 10.3109/0284186X.2011.599338.
- [15] L. A. Frohman and R. D. Kineman, “Growth hormone-releasing hormone and pituitary development, hyperplasia and tumorigenesis,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2002, doi: 10.1016/S1043-2760(02)00613-6.
- [16] S. C. Lin, C. R. Lin, I. Gukovsky, A. J. Lusis, P. E. Sawchenko, and M. G. Rosenfeld, “Molecular basis of the little mouse phenotype and Implications for cell type-specific growth,” *Nature*, 1993, doi: 10.1038/364208a0.
- [17] P. Brazeau, N. Ling, P. Bohlen, F. Esch, S. Y. Ying, and R. Guillemin, “Growth hormone releasing factor, somatocrinin, releases pituitary growth hormone in vitro,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, doi: 10.1073/pnas.79.24.7909.
- [18] M. Zarandi *et al.*, “Synthesis and in vitro evaluation of new potent antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH),” *Peptides*, 1997, doi: 10.1016/S0196-9781(96)00344-0.
- [19] A. McGuigan, P. Kelly, R. C. Turkington, C. Jones, H. G. Coleman, and R. S. McCain, “Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes,” *World Journal of Gastroenterology*. 2018, doi: 10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- [20] N. N. Keum and E. Giovannucci, “Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0189-8.
- [21] M. P. De Leon, R. Sassatelli, P. Benatti, and L. Roncucci, “Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry,” *Cancer*, 1993, doi: 10.1002/1097-0142(19930601)71:11<3493::AID-CNCR2820711106>3.0.CO;2-H.
- [22] F. Levi, F. Lucchini, E. Negri, and C. La Vecchia, “Pancreatic cancer mortality in Europe: The leveling of an epidemic,” *Pancreas*, 2003, doi: 10.1097/00006676-200308000-00006.
- [23] G. Halmos, A. V. Schally, T. Czompoly, M. Krupa, J. L. Varga, and Z. Rekasi, “Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor

- splice variants in human prostate cancer,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, doi: 10.1210/jc.2002-020347.
- [24] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2020,” *CA. Cancer J. Clin.*, 2020, doi: 10.3322/caac.21590.
 - [25] M. A. Mattos *et al.*, “Current problems in surgery,” *Current problems in surgery*. 1999, doi: 10.1016/s0011-3840(99)80806-5.
 - [26] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Colorectal cancer mortality rates in adults aged 20 to 54 years in the United States, 1970-2014,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 2017, doi: 10.1001/jama.2017.7630.
 - [27] N. Barabutis, A. Siejka, A. V. Schally, N. L. Block, R. Cai, and J. L. Varga, “Activation of mitogen-activated protein kinases by a splice variant of GHRH receptor,” *J. Mol. Endocrinol.*, 2010, doi: 10.1677/JME-09-0121.
 - [28] A. T. Chan and E. L. Giovannucci, “Primary Prevention of Colorectal Cancer,” *Gastroenterology*, 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.057.
 - [29] M. O. Thorner *et al.*, “HUMAN PANCREATIC GROWTH-HORMONE-RELEASING FACTOR SELECTIVELY STIMULATES GROWTH-HORMONE SECRETION IN MAN,” *Lancet*, 1983, doi: 10.1016/S0140-6736(83)91563-5.
 - [30] R. Busto *et al.*, “The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of its receptor in human gastroenteropancreatic carcinomas,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, doi: 10.1073/pnas.182433099.
 - [31] O. Khorram, M. Garthwaite, E. Grosen, and T. Golos, “Human uterine and ovarian expression of growth hormone-releasing hormone messenger RNA in benign and malignant gynecologic conditions,” *Fertil. Steril.*, 2001, doi: 10.1016/S0015-0282(00)01658-7.
 - [32] A. Havt *et al.*, “The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, doi: 10.1073/pnas.0506844102.
 - [33] K. E. Mayo, R. E. Hammer, L. W. Swansont, R. L. Brinster, M. G. Rosenfeld, and R. M. Evans, “Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene,” *Mol. Endocrinol.*, 1988, doi: 10.1210/mend-2-7-606.
 - [34] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, “Global Cancer Statistics, 2002,” *CA. Cancer J. Clin.*, 2005, doi: 10.3322/canjclin.55.2.74.
 - [35] S. J. Henley *et al.*, “Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics,” *Cancer*, 2020, doi: 10.1002/cncr.32802.

- [36] T. Adachi and Y. Nakamura, "Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application," *Molecules*. 2019, doi: 10.3390/molecules24234229.
- [37] P. Rawla, T. Sunkara, and V. Gaduputi, "Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors," *World J. Oncol.*, 2019, doi: 10.14740/wjon1166.
- [38] A. Bagnato, C. Moretti, J. Ohnishi, G. Frajese, and K. J. Catt, "Expression of the growth hormone-releasing hormone gene and its peptide product in the rat ovary," *Endocrinology*, 1992, doi: 10.1210/endo.130.3.1537276.
- [39] C. Fitzmaurice *et al.*, "Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-Adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study," *JAMA Oncol.*, 2019, doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2996.
- [40] M. Malvezzi *et al.*, "European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias," *Ann. Oncol.*, 2016, doi: 10.1093/annonc/mdw022.
- [41] A. Jemal *et al.*, "Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival," *Journal of the National Cancer Institute*. 2017, doi: 10.1093/jnci/djx030.
- [42] R. L. Siegel *et al.*, "Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013," *Journal of the National Cancer Institute*. 2017, doi: 10.1093/jnci/djw322.
- [43] A. Siejka, H. Lawnicka, G. Melen-Mucha, E. Motylewska, J. Komorowski, and H. Stepień, "Antineoplastic Action of Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) Antagonists," *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, 2011, doi: 10.2174/157489212798358010.
- [44] Y. Gershon and H. Lynch, "Genetic factors and colorectal cancer in Ashkenazi Jews," *Fam. Cancer*, 2004, doi: 10.1007/s10689-004-9547-x.
- [45] K. E. Mayo, G. M. Cerelli, R. V. Lebo, B. D. Bruce, M. G. Rosenfeld, and R. M. Evans, "Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: Structure, sequence, and chromosomal assignment," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1985, doi: 10.1073/pnas.82.1.63.
- [46] Z. Kahán *et al.*, "Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial, and ovarian cancers," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, doi: 10.1210/jc.84.2.582.
- [47] E. Dekker, P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi, and M. B. Wallace, "Colorectal cancer," *The Lancet*. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.

- [48] M. Zarandi *et al.*, “Synthesis and biological activities of highly potent antagonists of growth hormone-releasing hormone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, doi: 10.1073/pnas.91.25.12298.
- [49] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012,” *Eur. J. Cancer*, 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- [50] E. E. Connor, M. S. Ashwell, and G. E. Dahl, “Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor,” *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2002, doi: 10.1016/S0739-7240(02)00129-7.
- [51] I. Chatzistamou *et al.*, “Immunohistochemical detection of GHRH and its receptor splice variant 1 in primary human breast cancers,” *Eur. J. Endocrinol.*, 2004, doi: 10.1530/eje.0.1510391.
- [52] K. Lin-Su and M. P. Wajnrajch, “Growth hormone releasing hormone (GHRH) and the GHRH receptor,” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002, doi: 10.1023/A:1020949507265.
- [53] D. M. Davis, J. E. Marcet, J. C. Frattini, A. D. Prather, J. J. L. Mateka, and V. N. Nfonam, “Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer?,” *J. Am. Coll. Surg.*, 2011, doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2011.04.033.
- [54] A. V. Schally, J. L. Varga, and J. B. Engel, “Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: An emerging new therapy for cancer,” *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*. 2008, doi: 10.1038/ncpendmet0677.
- [55] H. T. Lynch *et al.*, “Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review,” *Gastroenterology*. 1993, doi: 10.1016/0016-5085(93)90368-M.
- [56] C. D. Mathers, D. M. Fat, M. Inoue, C. Rao, and A. D. Lopez, “Counting the dead and what they died from: An assessment of the global status of cause of death data,” *Bull. World Health Organ.*, 2005, doi: /S0042-96862005000300009.
- [57] F. Hohla *et al.*, “Differential expression of GHRH receptor and its splice variant 1 in human normal and malignant mucosa of the oesophagus and colon,” *Int. J. Oncol.*, 2008, doi: 10.3892/ijo.33.1.137.
- [58] T. M. F. Tuohy, K. G. Rowe, G. P. Mineau, R. Pimentel, R. W. Burt, and N. J. Samadder, “Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: A population-based study in Utah,” *Cancer*, 2014, doi: 10.1002/cncr.28227.

- [59] B. Y. Lee and A. Sonnenberg, "Time trends of mortality from colorectal cancer in the United States: A birth-cohort analysis," *JAMA Intern. Med.*, 2013, doi: 10.1001/jamainternmed.2013.656.
- [60] K. E. Singh, T. H. Taylor, C.-J. G. Pan, M. J. Stamos, and J. A. Zell, "Colorectal Cancer Incidence Among Young Adults in California," *J. Adolesc. Young Adult Oncol.*, 2014, doi: 10.1089/jayao.2014.0006.
- [61] E. G. Chiorean and A. L. Coveler, "Pancreatic cancer: Optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies," *Drug Design, Development and Therapy*. 2015, doi: 10.2147/DDDT.S60328.
- [62] M. A. Jenkins *et al.*, "Short-term risk of colorectal cancer in individuals with lynch syndrome: A meta-analysis," *J. Clin. Oncol.*, 2015, doi: 10.1200/JCO.2014.55.8536.
- [63] W. C. Willett, "Diet, nutrition, and avoidable cancer," 1995, doi: 10.1289/ehp.95103s8165.
- [64] S. D. Markowitz and M. M. Bertagnolli, "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.," *N. Engl. J. Med.*, 2009, doi: 10.1056/NEJMra0804588.
- [65] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2014 - Siegel - 2014 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library," ... : *a Cancer Journal for Clinicians*. 2014.
- [66] R. Gupta, S. Sinha, and R. N. Paul, "The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer," *Current Problems in Cancer*. 2018, doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.06.010.
- [67] M. M. Finucane *et al.*, "Re: National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants," *Journal of Urology*. 2011, doi: 10.1016/j.juro.2011.07.061.
- [68] T. Conroy *et al.*, "FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2011, doi: 10.1056/nejmoa1011923.
- [69] D. D. Von Hoff *et al.*, "Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine," *N. Engl. J. Med.*, 2013, doi: 10.1056/nejmoa1304369.
- [70] P. J. Loehrer *et al.*, "Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group trial," *J. Clin. Oncol.*, 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.34.8904.
- [71] S. Y. Moorcraft *et al.*, "FOLFIRINOX for locally advanced or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: The royal marsden experience," *Clin. Colorectal Cancer*, 2014, doi: 10.1016/j.clcc.2014.09.005.

- [72] J. Ma, R. Siegel, and A. Jemal, "Pancreatic cancer death rates by race among us men and women, 1970-2009," *Journal of the National Cancer Institute*. 2013, doi: 10.1093/jnci/djt292.
- [73] American Cancer Society, "American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 2014," *Cancer Facts Fig.*, 2014.
- [74] M. Dong *et al.*, "Ki-ras point mutation and p53 expression in human pancreatic cancer: A comparative study among Chinese, Japanese, and Western patients," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000.
- [75] M. M. Song *et al.*, "Comparison of K-ras point mutations at codon 12 and p21 expression in pancreatic cancer between Japanese and Chinese patients," *J. Surg. Oncol.*, 2000, doi: 10.1002/1096-9098(200011)75:3<176::AID-JSO5>3.0.CO;2-W.
- [76] P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels, "Risk factors for pancreatic cancer: A summary review of meta-analytical studies," *Int. J. Epidemiol.*, 2015, doi: 10.1093/ije/dyu240.
- [77] R. J. Stevens, A. W. Roddam, and V. Beral, "Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: Systematic review and meta-analysis," *British Journal of Cancer*. 2007, doi: 10.1038/sj.bjc.6603571.
- [78] L. Gullo, R. Pezzilli, and A. M. Morselli-Labate, "Diabetes and the Risk of Pancreatic Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 1994, doi: 10.1056/nejm199407143310203.
- [79] P. Anand *et al.*, "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes," *Pharmaceutical Research*. 2008, doi: 10.1007/s11095-008-9661-9.
- [80] E. J. Jacobs *et al.*, "Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: A pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan)," *Int. J. Cancer*, 2010, doi: 10.1002/ijc.25148.
- [81] J. Permuth-Wey and K. M. Egan, "Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: Results from a systematic review and meta-analysis," *Fam. Cancer*, 2009, doi: 10.1007/s10689-008-9214-8.
- [82] J. B. Greer, D. C. Whitcomb, and R. E. Brand, "Genetic predisposition to pancreatic cancer: A brief review," *American Journal of Gastroenterology*. 2007, doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01475.x.
- [83] International Agency for Research on Cancer (IARC), "IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking," *IARC Work. Gr. Eval. Carcinog. Risks to Humans.*, 2004.

- [84] T. Rastogi *et al.*, "Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US," *Int. J. Epidemiol.*, 2008, doi: 10.1093/ije/dym219.
- [85] Y. T. Wang, Y. W. Gou, W. W. Jin, M. Xiao, and H. Y. Fang, "Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: A dose-response meta-analysis of cohort studies," *BMC Cancer*, 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2241-1.
- [86] D. S. Michaud *et al.*, "Alcohol intake and pancreatic cancer: A pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan)," *Cancer Causes Control*, 2010, doi: 10.1007/s10552-010-9548-z.
- [87] F. Rahman, M. Cotterchio, S. P. Cleary, and S. Gallinger, "Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: A case-control study," *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0124489.
- [88] E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, and M. J. Thun, "Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults," *N. Engl. J. Med.*, 2003, doi: 10.1056/nejmoa021423.
- [89] D. Li *et al.*, "Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 2009, doi: 10.1001/jama.2009.886.
- [90] D. Aune *et al.*, "Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: A systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies," *Annals of Oncology*. 2012, doi: 10.1093/annonc/mdr398.
- [91] S. Midha, S. Chawla, and P. K. Garg, "Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review," *Cancer Letters*. 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.022.
- [92] D. S. Michaud *et al.*, "Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women," *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, doi: 10.1093/jnci/dji094.
- [93] S. C. Larsson and A. Wolk, "Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: Meta-analysis of prospective studies," *Br. J. Cancer*, 2012, doi: 10.1038/bjc.2011.585.
- [94] R. Z. Stolzenberg-Solomon *et al.*, "Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0378.
- [95] B. Aschebrook-Kilfoy *et al.*, "Pancreatic cancer and exposure to dietary nitrate and nitrite in the NIH-AARP diet and health study," *Am. J. Epidemiol.*, 2011, doi: 10.1093/aje/kwr092.

- [96] P. N. Appleby, F. L. Crowe, K. E. Bradbury, R. C. Travis, and T. J. Key, "Mortality in vegetarians and comparable nonvegetarians in the United Kingdom," *Am. J. Clin. Nutr.*, 2016, doi: 10.3945/ajcn.115.119461.
- [97] A. Ojajärvi *et al.*, "Occupational exposures and pancreatic cancer: A meta-analysis," *Occup. Environ. Med.*, 2000, doi: 10.1136/oem.57.5.316.
- [98] A. Hartwig, I. Krüger, and D. Beyersmann, "Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair," *Toxicol. Lett.*, 1994, doi: 10.1016/0378-4274(94)90048-5.
- [99] A. Hartwig, L. H. F. Mullenders, R. Schlepegrell, U. Kasten, and D. Beyersmann, "Nickel(II) Interferes with the Incision Step in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells," *Cancer Res.*, 1994.
- [100] M. T. Roth, D. B. Cardin, and J. D. Berlin, "Recent advances in the treatment of pancreatic cancer," *F1000Research*. 2020, doi: 10.12688/f1000research.21981.1.
- [101] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA. Cancer J. Clin.*, 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [102] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, and L. M. Matrisian, "Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states," *Cancer Research*. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- [103] T. Conroy *et al.*, "FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2018, doi: 10.1056/nejmoa1809775.
- [104] M. A. Tempero *et al.*, "APACT: phase III, multicenter, international, open-label, randomized trial of adjuvant nab -paclitaxel plus gemcitabine (nab - P/G) vs gemcitabine (G) for surgically resected pancreatic adenocarcinoma. ," *J. Clin. Oncol.*, 2019, doi: 10.1200/jco.2019.37.15_suppl.4000.
- [105] A. Henriksen, A. Dyhl-Polk, I. Chen, and D. Nielsen, "Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer," *Cancer Treatment Reviews*. 2019, doi: 10.1016/j.ctrv.2019.06.005.
- [106] S. Upadhrasta and L. Zheng, "Strategies in Developing Immunotherapy for Pancreatic Cancer: Recognizing and Correcting Multiple Immune 'Defects' in the Tumor Microenvironment," *J. Clin. Med.*, 2019, doi: 10.3390/jcm8091472.
- [107] M. D. Fesinmeyer, M. A. Austin, C. I. Li, A. J. De Roos, and D. J. Bowen, "Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0120.
- [108] G. Q. Phan, C. J. Yeo, R. H. Hruban, K. D. Lillemoe, H. A. Pitt, and J. L. Cameron, "Surgical Experience with Pancreatic and Peripancreatic

- Neuroendocrine Tumors: Review of 125 Patients,” *J. Gastrointest. Surg.*, 1998, doi: 10.1016/S1091-255X(98)80039-5.
- [109] S. E. Kern, R. H. Hruban, M. Hidalgo, and C. J. Yeo, “An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy,” *Cancer Biology and Therapy*. 2002, doi: 10.4161/cbt.307.
- [110] R. H. Hruban *et al.*, “Pancreatic intraepithelial neoplasia: A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions,” *Am. J. Surg. Pathol.*, 2001, doi: 10.1097/00000478-200105000-00003.
- [111] T. Kolodziej, C. Shugrue, M. Ashat, and E. C. Thrower, “Risk factors for pancreatic cancer: Underlying mechanisms and potential targets,” *Front. Physiol.*, 2014, doi: 10.3389/fphys.2013.00415.
- [112] S. REICHLIN, “Growth hormone content of pituitaries from rats with hypothalamic lesions,” *Endocrinology*, 1961, doi: 10.1210/endo-69-2-225.
- [113] J. Rivier, J. Spiess, M. Thorner, and W. Vale, “Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour,” *Nature*, 1982, doi: 10.1038/300276a0.
- [114] R. Guillemin, P. Brazeau, P. Böhlen, F. Esch, N. Ling, and W. B. Wehrenberg, “Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly,” *Science (80-.)*, 1982, doi: 10.1126/science.6812220.
- [115] P. Bohlen, P. Brazeau, B. Bloch, N. Ling, R. Gaillard, and R. Guillemin, “Human hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF): Evidence for two forms identical to tumor derived GRF-44-NH2 and GRF-40,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, doi: 10.1016/0006-291X(83)90649-6.
- [116] J. Spiess, J. Rivier, and W. Vale, “Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor,” *Nature*, 1983, doi: 10.1038/303532a0.
- [117] N. M. Sherwood, S. L. Krueckl, and J. E. McRory, “The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily*,” *Endocr. Rev.*, 2000, doi: 10.1210/edrv.21.6.0414.
- [118] A. V. Schally, S. L. Steelman, and C. Y. Bowers, “Effect of Hypothalamic Extracts on Release of Growth Hormone in vitro,” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, doi: 10.3181/00379727-119-30138.
- [119] C. A. Jaffe, R. DeMott-Friberg, L. A. Frohman, and A. L. Barkan, “Suppression of growth hormone (GH) hypersecretion due to ectopic GH-releasing hormone (GHRH) by a selective GHRH antagonist,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, doi: 10.1210/jc.82.2.634.

- [120] M. Kovacs, A. Schally, J. Varga, and M. Zarandi, "Endocrine and Antineoplastic Actions of Growth Hormone-Releasing Hormone Antagonists," *Curr. Med. Chem.*, 2008, doi: 10.2174/092986708783497355.
- [121] M. Pollak, "The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: An update," *Nature Reviews Cancer*. 2012, doi: 10.1038/nrc3215.
- [122] M. Pollak, A. W. Sem, M. Richard, E. Tetenes, and R. Bell, "Inhibition of metastatic behavior of murine osteosarcoma by hypophysectomy," *J. Natl. Cancer Inst.*, 1992, doi: 10.1093/jnci/84.12.966.
- [123] J. L. Varga *et al.*, "Increased activity of antagonists of growth hormone-releasing hormone substituted at positions 8, 9, and 10," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, doi: 10.1073/pnas.0307288101.
- [124] L. B. Jaeger, W. A. Banks, J. L. Varga, and A. V. Schally, "Antagonists of growth hormone-releasing hormone cross the blood-brain barrier: A potential applicability to treatment of brain tumors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, doi: 10.1073/pnas.0504163102.
- [125] R. D. Kineman, "Antitumorigenic actions of growth hormone-releasing hormone antagonists," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.2.532.
- [126] J. B. Engel *et al.*, "Inhibition of growth of experimental human endometrial cancer by an antagonist of growth hormone-releasing hormone," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, doi: 10.1210/jc.2004-2179.
- [127] I. Chatzistamou *et al.*, "Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen-independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone," *Anticancer. Drugs*, 2001, doi: 10.1097/00001813-200110000-00008.
- [128] K. Szepeshazi *et al.*, "Antagonists of GHRH decrease production of GH and IGF-I in MXT mouse mammary cancers and inhibit tumor growth," *Endocrinology*, 2001, doi: 10.1210/endo.142.10.8426.
- [129] A. Siejka *et al.*, "GH-RH antagonist (MZ-4-71) inhibits VEGF secretion and proliferation of murine endothelial cells," *Life Sci.*, 2003, doi: 10.1016/S0024-3205(03)00164-4.
- [130] J. Guo, A. V. Schally, M. Zarandi, J. Varga, and P. C. K. Leung, "Antiproliferative effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonist on ovarian cancer cells through the EGFR-Akt pathway," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2010, doi: 10.1186/1477-7827-8-54.
- [131] A. Klukovits *et al.*, "Novel antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit growth and vascularization of human experimental ovarian cancers," *Cancer*, 2012, doi: 10.1002/cncr.26291.

- [132] N. Barabutis, E. Tsellou, A. V. Schally, S. Kouloheri, A. Kalofoutis, and H. Kiaris, "Stimulation of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a transfected splice variant of growth hormone-releasing hormone receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, doi: 10.1073/pnas.0700407104.
- [133] H. Kiaris *et al.*, "Ligand-dependent and -independent effects of splice variant 1 of growth hormone-releasing hormone receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, doi: 10.1073/pnas.1533185100.
- [134] V. J. Csernus, A. V. Schally, H. Kiaris, and P. Armatis, "Inhibition of growth, production of insulin-like growth factor-II (IGF-II), and expression of IGF-II mRNA of human cancer cell lines by antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone in vitro," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.6.3098.
- [135] E. Pozsgai, A. V. Schally, M. Zarandi, J. L. Varga, I. Vidaurre, and S. Bellyei, "The effect of GHRH antagonists on human glioblastomas and their mechanism of action," *Int. J. Cancer*, 2010, doi: 10.1002/ijc.25259.
- [136] Z. Rekasi *et al.*, "Antagonist of growth hormone-releasing hormone induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells through a Ca²⁺-dependent pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, doi: 10.1073/pnas.0410006102.
- [137] S. Shrivastava, I. Y. Sohn, Y. M. Son, W. Il Lee, and N. E. Lee, "Real-time label-free quantitative fluorescence microscopy-based detection of ATP using a tunable fluorescent nano-aptasensor platform," *Nanoscale*, 2015, doi: 10.1039/c5nr05839b.
- [138] A. D. Ellington and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands," *Nature*, 1990, doi: 10.1038/346818a0.
- [139] S. C. B. Gopinath, "Methods developed for SELEX," *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, doi: 10.1007/s00216-006-0826-2.
- [140] J. Qu, S. Yu, Y. Zheng, Y. Zheng, H. Yang, and J. Zhang, "Aptamer and its applications in neurodegenerative diseases," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017, doi: 10.1007/s00018-016-2345-4.
- [141] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science (80-.)*, 1990, doi: 10.1126/science.2200121.
- [142] D. L. Robertson and G. F. Joyce, "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA," *Nature*, 1990, doi: 10.1038/344467a0.
- [143] C. Walss-Bass *et al.*, "X-Aptamer Technology Identifies C4A and ApoB in Blood as Potential Markers for Schizophrenia," *Mol. Neuropsychiatry*, 2019, doi: 10.1159/000492331.

- [144] X. Yang and D. Gorenstein, "Progress in Thioaptamer Development," *Curr. Drug Targets*, 2005, doi: 10.2174/1389450043345074.
- [145] B. N. Gawande *et al.*, "Selection of DNA aptamers with two modified bases," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2017, doi: 10.1073/pnas.1615475114.
- [146] A. D. Gelinas *et al.*, "Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand," *J. Biol. Chem.*, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.532697.
- [147] G. L. Lokesh *et al.*, "X-Aptamer selection and validation," in *Methods in Molecular Biology*, 2017.
- [148] X. Yang *et al.*, "Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers.," *Nucleic Acids Res.*, 2003, doi: 10.1093/nar/gng054.
- [149] N. D. Abeydeera *et al.*, "Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage," *Nucleic Acids Res.*, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw725.
- [150] G. Zhu and X. Chen, "Aptamer-based targeted therapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.005.
- [151] C. R. Ireson and L. R. Kelland, "Discovery and development of anticancer aptamers," *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0172.
- [152] P. J. Bates, J. B. Kahlon, S. D. Thomas, J. O. Trent, and D. M. Miller, "Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding," *J. Biol. Chem.*, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.37.26369.
- [153] S. Soundararajan *et al.*, "Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells," *Mol. Pharmacol.*, 2009, doi: 10.1124/mol.109.055947.
- [154] S. Soundararajan, W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck, and D. J. Fernandes, "The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells," *Cancer Res.*, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5723.
- [155] J. O. McNamara *et al.*, "Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice," *J. Clin. Invest.*, 2008, doi: 10.1172/JCI33365.
- [156] G. Kolb *et al.*, "Endogenous expression of an anti-TAR aptamer reduces HIV-1 replication," *RNA Biol.*, 2006, doi: 10.4161/rna.3.4.3811.
- [157] D. Shangguan *et al.*, "Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells," *J. Proteome Res.*, 2008, doi: 10.1021/pr700894d.

- [158] C. P. Rusconi *et al.*, “RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa,” *Nature*, 2002, doi: 10.1038/nature00963.
- [159] H. Acloque, M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser, and M. A. Nieto, “Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease,” *Journal of Clinical Investigation*. 2009, doi: 10.1172/JCI38019.
- [160] F. Guo *et al.*, “Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions,” *Journal of Hematology and Oncology*. 2014, doi: 10.1186/1756-8722-7-19.
- [161] K. Steinestel, S. Eder, A. J. Schrader, and J. Steinestel, “Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition,” *Clin. Transl. Med.*, 2014, doi: 10.1186/2001-1326-3-17.
- [162] A. Prat and C. M. Perou, “Deconstructing the molecular portraits of breast cancer,” *Molecular Oncology*. 2011, doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.003.
- [163] J. C. Tse and R. Kalluri, “Mechanisms of metastasis: Epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment,” *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, doi: 10.1002/jcb.21215.
- [164] T. Anelli and R. Sitia, “Protein quality control in the early secretory pathway,” *EMBO Journal*. 2008, doi: 10.1038/sj.emboj.7601974.
- [165] P. Pizzo and T. Pozzan, “Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics,” *Trends in Cell Biology*. 2007, doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.011.
- [166] Y. Ma and L. M. Hendershot, “ER chaperone functions during normal and stress conditions,” *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2004, doi: 10.1016/j.jchemneu.2003.08.007.
- [167] R. Rizzuto, M. R. Duchen, and T. Pozzan, “Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison,” *Science’s STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004, doi: 10.1126/stke.2152004re1.
- [168] A. R. Frand, J. W. Cuozzo, and C. A. Kaiser, “Pathways for protein disulphide bond formation,” *Trends in Cell Biology*. 2000, doi: 10.1016/S0962-8924(00)01745-1.
- [169] L. Egger, J. Schneider, C. Rhême, M. Tapernoux, J. Häcki, and C. Borner, “Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions,” *Cell Death Differ.*, 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401288.
- [170] B. Levine and G. Kroemer, “Autophagy in the Pathogenesis of Disease,” *Cell*. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.

- [171] N. Mizushima, "Autophagy: Process and function," *Genes and Development*. 2007, doi: 10.1101/gad.1599207.
- [172] N. Mizushima, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, "The role of atg proteins in autophagosome formation," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- [173] C. G. Towers and A. Thorburn, "Therapeutic Targeting of Autophagy," *EBioMedicine*. 2016, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.034.
- [174] D. J. Klionsky *et al.*, "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy," *Autophagy*. 2012, doi: 10.4161/auto.19496.
- [175] D. F. Egan *et al.*, "Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates," *Mol. Cell*, 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.031.
- [176] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicologic Pathology*. 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [177] P. S. Tawadros, I. M. Paquette, A. M. Hanly, A. F. Mellgren, D. A. Rothenberger, and R. D. Madoff, "Adenocarcinoma of the rectum in patients under age 40 is increasing: Impact of signet-ring cell histology," *Dis. Colon Rectum*, 2015, doi: 10.1097/DCR.0000000000000318.
- [178] X. Luo *et al.*, "Computational approaches toward the design of pools for the in vitro selection of complex aptamers," *RNA*, 2010, doi: 10.1261/rna.2102210.
- [179] R. Granata *et al.*, "Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in rat heart," *Cardiovasc. Res.*, 2009, doi: 10.1093/cvr/cvp090.
- [180] R. M. Kanashiro-Takeuchi *et al.*, "Cardioprotective effects of growth hormone-releasing hormone agonist after myocardial infarction," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, doi: 10.1073/pnas.0914138107.
- [181] B. Ludwig *et al.*, "Agonist of growth hormone-releasing hormone as a potential effector for survival and proliferation of pancreatic islets," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, doi: 10.1073/pnas.1005098107.
- [182] H. Kiaris and A. V. Schally, "Decrease in telomerase activity in U-87MG human glioblastomas after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.1.226.
- [183] F. Hohla *et al.*, "GHRH antagonist causes DNA damage leading to p21 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells," *Cell Cycle*, 2009, doi: 10.4161/cc.8.19.9698.

- [184] A. Munshi, M. Hobbs, and R. E. Meyn, "Clonogenic cell survival assay.," *Methods Mol. Med.*, 2005, doi: 10.1385/1-59259-869-2:021.
- [185] A. M. Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, and D. R. Barreda, "Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death," *J. Vis. Exp.*, 2011, doi: 10.3791/2597.
- [186] A. L. Brittain, R. Basu, Y. Qian, and J. J. Kopchick, "Growth hormone and the epithelial-To-mesenchymal transition," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017, doi: 10.1210/jc.2017-01000.
- [187] C. Xu, B. Bailly-Maitre, and J. C. Reed, "Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions," *Journal of Clinical Investigation*. 2005, doi: 10.1172/JCI26373.
- [188] E. Tasdemir *et al.*, "Methods for assessing autophagy and autophagic cell death," *Methods Mol. Biol.*, 2008, doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_3.
- [189] L. Muñoz-Moreno *et al.*, "Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GHRH antagonists in prostate cancer," *Oncotarget*, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10710.
- [190] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. Cancer*, 2015, doi: 10.1002/ijc.29210.
- [191] C. Bosetti *et al.*, "Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980," *Ann. Oncol.*, 2013, doi: 10.1093/annonc/mdt301.
- [192] D. Lightsey, "Comment on Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: Meta-analysis of prospective studies," *British Journal of Cancer*. 2012, doi: 10.1038/bjc.2012.111.
- [193] S. D. Solomon, K. Lindsley, S. S. Vedula, M. G. Krzystolik, and B. S. Hawkins, "Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration," *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019, doi: 10.1002/14651858.CD005139.pub4.
- [194] A. Vincent, J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban, and M. Goggins, "Pancreatic cancer," 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- [195] M. Schröder and R. J. Kaufman, "ER stress and the unfolded protein response," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.
- [196] J. L. Varga *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of antagonists of growth hormone-releasing hormone with high and protracted in vivo activities," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.2.692.

