



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**PANKREAS KANSER HÜCRELERİNDE
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT' IN MİKRORNA DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ali Haydar KAYĞUSUZ

Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PANKREAS KANSER HÜCRELERİNDE
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT' IN MİKRORNA
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Ali Haydar KAYĞUSUZ

Danışman
DOC. DR. Çığır Biray AVCI

Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Kanser Biyolojisi ve İmmünolojisi

İzmir
2021

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç.Dr. Çığır Biray Avcı

(Danışman)

Üye : Doç.Dr. Nur Selvi Günel

Üye : Doç.Dr. Tuba Edgünlü

Yüksek Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

Önsöz

Bölüme geldiğim ilk günden itibaren güler yüzüyle abla sıcaklığını hissettiğim, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum, her koşulda sonsuz desteğini hissettiğim, umutsuzluğa düştüğüm anlarda sabrı ve içtenliği ile bana ışık olan, sadece okul hayatım ile ilgili değil gerçek hayata karşı olan dertlerimde de desteğe ihtiyaç duyduğum her an beni yüreklendiren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez çalışmamın oluşmasında değerli fikirlerini sunan, onunla çalışmaktan keyif aldığım ve kendimi şanslı hissettiğim, eşsiz hocam ve danışmanım **Sayın Doç. Dr. Çığır Biray AVCI' ya,**

Kapılarını çaldığımda bilgi ve deneyimleriyle her zaman bana yol gösteren, bilgilerini her zaman benimle paylaşan, anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri **Sayın Doç. Dr. Zuhal EROĞLU, Sayın Doç. Dr. Buket KOSOVA' ya ve Sayın Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'E**

Eğitimimde deneyimleriyle bana yardımcı olan, **Doç.Dr Sn. Burçin TEZCANLI KAYMAZ' a, Doc.Dr. Sn. Aslı TETİK VARDARLI' ya, Doc.Dr. Sn. Sunde YILMAZ SÜSLÜER' ve Araş. Gör. Sn. Duygu AYGÜNEŞ' e,**

Bana destek olup yanımda olan, geleceğin önemli akademisyenlerden biri olacağına inandığım Doktora öğrencisi Fatma SÖĞÜTLÜ ile Latife Merve OKTAY

Sonsuz teşekkür ederim...

Ayrıca Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonu'na projemize verdikleri destekten dolayı teşekkür ederiz.

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği TYL-2019-20764 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir
27.05.2021

ALİ HAYDAR KAYĞUSUZ

Özet

Pankreas Kanser Hücrelerinde Epigallokateşin Gallat'ın MikroRna Düzeylerine Etkisi

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri olmakla birlikte, dünyadaki en ölümcül malign neoplazilerden biri olarak bilinmektedir. Pankreas kanseri için 5 yıllık medyan sağkalım oranı %5'ten daha az olduğu gösterilmiştir. Pankreas kanseri'nin insidansı her geçen gün artmaktadır. Semptomları oldukça belirsizdir göstermekle birlikte ve pankreasın baş, gövde ya da kuyruk kısmında oluşmaktadır Erken belirtiler olarak kilo kaybı, mide bölgesinde ağrı ve sarılık bildirilmiştir. Pankreas kanserinin erken teşhisi ve tedavisini sağlayacak yeni yöntemler için her geçen gün yeni çalışmalar yapılmaktadır.

Son zamanlarda pankreas kanserinin herhangi bir semptom göstermeden progresyon gerçekleştirmesinin sebeplerinden birinin genetik mutasyonlar sonucunda dinamik miRNA regülasyonu olabileceği düşünülmeye başlanarak miRNA ekspresyon değişiklikleri üzerinde çalışmalar başlamıştır.

MikroRNA'lar (miRNA), farklılaşma, çoğalma, hipoksi, besin tükenmesi ve hücre döngüsünün geçişi gibi hücrel stresörlere tepki de dahil olmak üzere önemli biyolojik süreçleri düzenleyen 18 ila 22 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli, kodlamayan RNA'lardır.

Pankreas kanserinde, potansiyel terapötik hedefleri tanımlamak, tümörigenezde yer alan yolları anlamak ve tanısal tümör imzalarını tanımlamak için kanser dokusu ve serum miRNA'ları tanımlanmıştır. Pankreas kanseri'nden doku eldesinin invaziv bir yöntem oluşu, pancreas kanseri hastalarının erken teşhis edilmesindeki engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Pankreas dokusunda ve periferik kanda bulunan birçok miRNA imzası ve pankreas kanseri ile ilişkili yollar ile yapılan çalışmalarda detaylı olarak göz önüne alındığında, hem kanser dokusunda hem de kanda üç miRNA biyobelirteci (miR21, miR155 ve miR200) tanımlanmıştır. Bu miRNA'lar p53, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), p16INK4A, BRCA1 / 2 ve KRAS da dahil olmak üzere pankreas kanserinde gözlenen merkezi genetik ve epigenetik değişiklikler tarafından düzenlendiği saptanmıştır.

Gemcitabin (GEM), pankreas kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan pirimidin antimetabolitidir. GEM'in tüm bölünen hücreleri hedeflemesi nedeniyle tedavi sırasında GEM kullanan pancreas hastalarının %10'unda ciddi yan etkiler oluşmakta ve bunun yanında sağlıklı hücreleri de etkilenmektedir. Bu nedenle yapılan meta-analizler ile diğer aktif bileşikler ise kombine edilen GEM'in, pankreas kanseri hastalarının 1 yıllık sağkalımını önemli ölçüde arttırabildiği gösterilmiştir.

Flavanollerden kateşin, çaydaki en önemli polifenol grubunu oluşturmaktadır. Çaydaki polifenollerden kateşinler kuru yaprak ağırlığının %30'unu oluşturmaktadırlar. Bunların arasında EGCG ana polifenoldür ve toplam kateşinlerin %60'ını oluşturmaktadır.

Yeşil çayın (*Camellia sinensis*) etken maddesi, (-)-Epigallocatechin-3-gallate'ın ($C_{22}H_{18}O_{11}$) pankreas kanseri üzerindeki etkisi bir çok çalışma ile incelenmiş ancak bu etken madde ile tedavi sonrasında ekspresyonunda değişiklik gözlemlenen epigenetic modülatör olan miRNA'lar ile çok kapsamlı çalışmalar yapılmamıştır.

Bu çalışmada, Gemsitabin'in terapötik etkinliğinin artırılması amacıyla pankreas kanser modeli olan PANC1 hücrelerinde Gemsitabin ve EGCG kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik etkilerini belirlemesi, sonrasında ise bu kombinasyonun kanser progresyonunda rol oynayan miRNA ekspresyon seviyelerini üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Pankreas kanseri hücrelerinde Gemsitabin ve Epigallocateşin Gallat'ın tek ve kombinasyon halinde uygulamasıyla sitotoksiteleri belirlenecek ve sinerjistik etkiye sahip olup olmadıkları tayin edilecektir. Ayrıca bu ajanların bireysel ve kombinasyon halinde apoptoz ve kanser ile ilişkili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin değişimlerine etkisinin belirlenmesi sayesinde hastalığın hedef spesifik tedavi alternatifleri geliştirilebilecek ve elde ettiğimiz bulgularla literatüre önemli katkılar sağlanmış olacaktır.

Anahtar Kelimeler; Epigallocateşin Gallat, miRNA, Gemsitabin, Epigenetik, Apoptoz, Pankreas Kanseri

Abstract

The Effect of Epigallocatechin Gallate on MicroRna Levels in Pancreatic Cancer Cells

Pancreatic cancer is one of the leading causes of cancer deaths in developed countries, it is known as one of the deadliest malignant neoplasms in the world. The 5-year median survival rate for pancreatic cancer has been shown to be less than 5%. The incidence of pancreatic cancer has been increasing day by day. Although its symptoms are rather vague, involvement occurs in the head, trunk or tail of the pancreas. Weight loss, pain in the stomach area and jaundice have been reported as early symptoms. Innovative approaches are being put forward every day to develop new methods that will provide early diagnosis and treatment of pancreatic cancer.

Recently, studies related to miRNA expression changes have started after it has been thought that one of the reasons that pancreatic cancer progresses without showing any symptoms may be dynamic miRNA regulation as a result of genetic mutations.

MicroRNAs (miRNAs) are 18 to 22 nucleotides in length, single-stranded, non-coding RNAs that regulate important biological processes including response to cellular stressors such as differentiation, proliferation, hypoxia, nutrient depletion.

miRNAs in cancer tissue and serum have been defined in pancreatic cancer to identify potential therapeutic targets, to understand the pathways involved in tumorigenesis, and to define prognostic tumor signatures. The fact that tissue removal from pancreatic cancer is an invasive method is an obstacle in early diagnosis of pancreatic cancer patients. Considering in detail in studies with many miRNA signatures found in pancreatic tissue and peripheral blood and pathways associated with pancreatic cancer, three miRNA biomarkers (miR21, miR155 and miR200) have been identified in both cancer tissue and blood. These miRNAs have been found to be regulated by central genetic and epigenetic changes in some genes including p53, TGF- β , p16INK4A, BRCA1 / 2, and KRAS which has been frequently observed in pancreatic cancer

Gemcitabine (GEM) is a pyrimidine antimetabolite commonly used in the treatment of pancreatic cancer. Since GEM targets all dividing cells, serious side effects occur in 10% of pancreas patients who use GEM during treatment, and healthy cells are also affected. Therefore, GEM combined with other active compounds has increased the 1-year survival of patients with pancreatic cancer has been shown in meta-analyses.

Catechin, one of flavanols, constitutes the most important polyphenol group in tea. Catechins, among the polyphenols in tea, constitute 30% of the dry leaf weight. Among them, EGCG is the main polyphenol and constitutes 60% of the total catechins. The effect of (-) -

Epigallocatechin-3-gallate (C₂₂H₁₈O₁₁), the active compound of green tea (*Camellia sinensis*), on pancreatic cancer has been studied in many studies. But, extensive studies about the therapeutic potential of EGCG on miRNAs in pancreatic cancer have not been conducted.

In this study, it is aimed to determine the cytotoxic and apoptotic effects of EGCG, Gemcitabine and their combination in PANC1 cells, referred as pancreatic cancer model, in order to increase of therapeutic efficacy of Gemcitabine, and then to investigate the effect of this combination on miRNA expression levels that play a role in cancer progression.

The cytotoxicity of Gemcitabine and EGCG in pancreatic cancer cells will be determined by the mono-therapy and combination treatment, and whether they have a synergistic effect will be determined. In addition, target-specific treatment alternatives for the disease will be developed by means of determining the effects of these active compound as single- or combined-treatment on changes in the expression levels of miRNAs associated with apoptosis and cancer, and our findings will be a significant contribution to the literature.

Keywords; Epigallocatechin gallate, miRNA, Gemcitabine, Epigenetic, Apoptosis, Pancreatic Cancer

İçindekiler

Önsöz	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	vi
İçindekiler	viii
Tablolar Dizini.....	x
Şekiller Dizini	xi
Kısaltma Listesi	xii
1 Giriş.....	1
2 Genel Bilgiler	2
2.1 Pankreas Kanseri	2
2.2 Epidemiyoloji.....	2
2.3 Pankreas Tümörlerinin Beslenme ile İlişkisi ..Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
2.4 Gempitabin	2
2.4.1 Gempitabin Etki Mekanizması.....	3
2.5 Yeşil Çay Polifenollerini.....	3
2.5.1 Epigallokateşin Gallat'ın Etki Mekanizması	4
2.6 Kodlamayan RNA'lar	4
2.6.1 MikroRNA (miRNA)'lar ve Genel Özellikleri.....	5
2.6.1.1 MikroRNA Biyogenezi.....	5
2.6.1.2 MikroRNA'ların işlevi	6
2.6.1.3 Pankreas Tümörleri ve MikroRNA.....	7
3 Gereç ve Yöntem.....	8
3.1 Hücre Kültürü	8
3.2 Hücre Üretimi ve Kültür Koşulları	9
3.3 Hücre Hatlarının Hücrelerinin Pasajlanması.....	10
3.4 Hücre Hatlarının Dondurulması.....	10
3.5 Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi	10
3.6 Hücre Hatlarının Canlılığının Belirlenmesi.....	11
3.7 Sitotoksikite Analizi.....	11
3.8 İzobologram Analizi.....	12
3.9 Apoptoz Analizleri.....	13
3.9.1 Annexin V Yöntem Protokolü ve Kit Reaktiflerinin Hazırlanması	14

3.10 miRNA Mikroarray Analizi	15
3.10.1 Total RNA İzolasyonu.....	15
3.10.2 RNA miktar ve saflıklarının ölçümü	16
3.10.3 cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	16
3.10.4 PCR Array Analizi	18
3.10.5 Data Analizi	20
4 Bulgular.....	21
4.1 Etken Maddelerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi ...	21
4.1.1 Gemsitabin ve Epigallokateşin Gallat Kombinasyonunun PANC1 Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	22
4.2 Gemsitabin ve Epigallokateşin Gallat'ın PANC1 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi	23
4.3 Etken Maddelerin Hücrelerde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri	24
5 Tartışma	30
6 Sonuç ve Öneriler	45
7 Kaynaklar	46
8 Teşekkür.....	55
9 Özgeçmiş	56

Tablolar Dizini

Tablo 1. PANC1 hücre hattı özellikleri.....	9
Tablo 2. CI indeksi ve etki tablosu.....	13
Tablo 3. Ters transkriptaz reaksiyon karışımı	17
Tablo 4. Real time qRT-PCR 96 kuyucuk içeriği	19
Tablo 5. miRNA'ların plaka içerisindeki yerleşimi.....	20
Tablo 6. Gemsitabin, Epigallokateşin Gallat ve kombinasyonunun PANC1 hücrelerinde miRNA ekspresyonundaki etkisi.....	25



Şekiller Dizini

Şekil 1. Gemsitabine(Gesto et al., 2012)	3
Şekil 2. Epigallokateşin Gallat.....	4
Şekil 3. miRNA biyogenezi (Macfarlane & Murphy, 2010)	6
Şekil 4. Neubauer lamı ve sayım alanı	11
Şekil 5. GEM ve EGCG'nin 24, 48 ve 72. saatlerde Doz-Etki grafiği	21
Şekil 6. GEM ve EGCG kombinasyonunun 24, 48. ve 72. saatlerdeki Doz-Etki, Medyan-Etki, Fraksiyon (Fa)-kombinasyon indeksi (CI) grafiği	22
Şekil 7. Kontrol (tedavi edilmeyen), EGCG, GEM ve kombinasyonlarının PANC1 hücrelerindeki apoptotik etkisinin görüntülenmesi, Sol alt: canlı, sağ alt: erken apoptotik sağ üst: geç apoptotik, sol üst: nekrotik hücrelerin yüzdesini göstermektedir	23
Şekil 8. Gemsitabin uygulanan PANC1 hücrelerinde kanser progresyonu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri gösteren ısı haritası	27
Şekil 9. EGCG uygulanan PANC1 hücrelerinde kanser progresyonu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri gösteren ısı haritası	28
Şekil 10. Gemsitabin ve EGCG kombinasyonu ile tedavi sonrasında PANC1 hücrelerinde kanser progresyonu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri gösteren ısı haritası.....	28
Şekil 11. Gemsitabin, Epigallokateşin ve kombinasyonları ile tedavi edilen PANC1 hücrelerinde kanser progresyonuna katkıda bulunan miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimi gösteren clustergram analizi	29

Kısaltma Listesi

MiRNA	: Mikro RNA
EGCG	: Epigallokateşin 3 gallat
PDAC	: Pankreas duktal adenokarsinoma
AsPAC	: Adenosarkoma pankreas kanseri
GTP	: Guaniozin 5' tri fosfat
GEM	: Gemitabin
RNA	: Ribo nükleik Asit
RNAaz	: Ribonükleik Asit enzim
DNAaz	: Deoksriboz nükleik asit enzim
NcRNA	: Kodlamayan ribonükleik asit
PANC1	: Pankreas adenokarsinoma
VIP	: Vazoaktif intestinal peptid
PP	: Pankreatik polipeptid
TGF-B	: Dönüştürücü büyüme faktörü
BRCA	: Göğüs kanseri duyarlılık
EMT	: Epitel mezenkimal geçiş
GC	: Gallokateşin
EGC	: Epigallokateşin
C	: Kateşin
A	: Alfa
B	: Beta
D	: Delta
SEER	: ABD gözetim, epidemiyoloji ve nihai sonuçlar
PanIN	: Pankreas intraepitelyal neoplazm
MCN	: Musinöz kistik neoplazm

FDA	: Amerika Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
DFdCMP	: Gempitabin mono fosfat
DFdCTP	: Gempitabin tri fosfat
MAPK	: Mitojen aktif protein kinaz
AP1	: Kinazlar ve aktivatör protein_1
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptör
Exp 5	: Ekspartin 5
NF-KB	: Nükleer faktör kb
DCK	: Deoksistidin kinaz
IGF	: İnsilün benzeri büyüme faktörü
MMP	: Matriks metalloproteinaz
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
DROSHA	: RNAase III enzim
DGCGR8	: Di George kiritik sendromu bölgesi
RISC	: İndüklenen susturma protein
Dicer	: RNase motifli helikaz
SMAD4	: Anneler dekaplejik homolog 4'ye karşı
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
ZEB	: Çinko parmaklı E-kutusu bağlayıcı kutusu
TRBP	: Transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein
SRSF1	: Serin / arginin açısından zengin ekleme faktörü 1
KSRP	: KH tipi bağlayıcı düzenleyici protein
HnRNP	: Heterojen nükleer ribonükleoprotein
DDX5	: DEAD-box protein 5
BMP	: Kemik morfogenetik proteini
TUT4	: Terminal üridililtransferaz 4

FGFR3	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3
IRAK	: İnterleukin-1 reseptör ilişkili kinaz 1
KRAS	: Kirsten sıçan sarkom virüsü
MMP	: Matrix metalloproteinaz
MTA-1	: Metastaz ilişkili protein 1
PDCD4	: Programlanmış hücre ölümü 4
PI3K	: Fosfotidil inozitol 3 kinaz
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog
RRM1	: Ribonükleozid difosfat redükta büyük altbirim
SHC1	: SHC transformik protein 1
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	: Fetal bovine serum
WST-1	: Hücre çoğalması reaktifi
mM	: milimolar
CO2	: Karbon dioksit
µM	: Mikromolar
FITC	: Fluoressein izotiyosiyanat
PS	: Fosfatidil serin
PI	: Propidium iyodür
IC₅₀	: İnhibitör konsantrasyon oranı
H2O	: Su
Rpm	: Dakikada devir sayısı
DNaz	: Deoksiribonükleaz
nm	: Nanometre
Ph	: Hidrojen Gücü

Dk : **Dakika**

°C : **Santigrat**



1 Giriş

Pankreas kanseri diğer kanserler arasında en agresif hastalık seyrine sahip olan malign neoplazmlardan biridir (Qin et al., 2020). Çoğu hasta erken evrede semptomların olmaması nedeniyle cerrahi müdahale yapılamayan bir aşamada teşhis edildiğinden dolayı hastaların sadece % 20'sine ilk aşamada cerrahi rezeksiyon yapılabilmekte ve sıklıkla tedavi aracı olarak kemoterapötikler kullanılmaktadır (Kleeff et al., 2007). Fakat cerrahi müdahale yapılan pankreas kanseri hastalarının %50'sinde relaps meydana gelmekte, kemoterapötik ile tedavi sonrasında ilaç direnci gelişimi gözlemlenmekte olup kemoterapötiklerin hastanın yaşam kalitesini etkileyen yan etkilerin meydana gelmesi, araştırmacıların destekleyici yeni yollar keşfetmeleri gerekliliği ortaya koymuştur. Bu nedenle kemoterapötiklerin sağlıklı hücrelerde yıkıcı etkisinin azaltılmasında, ilaç direncinin azaltılmasında ve kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı hassasiyetinin artırılmasında sıklıkla tedavide kemoterapötikler ile kombine olarak bitkisel kaynaklı aktif bileşikler kullanılmaktadır (Lam, 2010).

Gemsitabin, DNA sentezini engelleyen bir kemoterapi ilacıdır. Birçok klinik çalışma, farklı rejimlerde ve dozlarda gemsitabini değerlendirmiş ve medyan sağkalım iyileştirmesi ile ilerlemiş pankreas kanseri için standart palyatif kemoterapi olarak benimsenmiştir.

Dünyada en çok tüketilen içeceklerden biri olan çayda bulunan EGCG bileşiğinin, pankreatik kanserlerde EGCG'nin apoptoz, EGCG, MAPK, AP-1, EGFR, ERK, COX-2, VEGF ve c-Jun ve DNA metiltransferaz aktivitesini düzenleyen çeşitli sinyal yollarını regüle ettiği bilinmektedir (Nagaraju, 2020). Ayrıca, EGCG'nin birçok kanserde onkojenik miRNA'ların aktivitesini inhibe ederek veya tümör baskılayıcı miRNA'ların aktivitesini teşvik ederek, kansere bağlı hücre proliferasyonu, transformasyonu, invazyonu ile önemli ölçüde ilişkili olan birçok mRNA genini düzenleyebildiği belirlenmiştir (Phuah & Nagoor, 2014).

MikroRNA'lar (miRNA), hücrenin kaderini belirleyen hücresel olayların kontrolünde anahtar rol oynayan pankreas kanseri dahil birçok kanserlerde onkojenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlar sergileyen küçük, kodlamayan RNA molekülleridir (Hayes, Peruzzi, & Lawler, 2014). Bu çalışmada PANC1 hücrelerinde Gemsitabin ve Epigallokateşin Gallat'ın kombinasyonunun hücrenin kaderini etkileyen aracı proteinleri kodlayan genleri posttranskripsiyonel olarak etkileyen miRNA ekspresyon seviyelerinde neden olduğu değişiklikler incelenecek ve Epigallokateşin Gallat'ın pankreas kanseri hücrelerinin Gemsitabin'e karşı hassasiyetini arttırıp arttırmadığı değerlendirilecektir. Ayrıca, elde edilen veriler ile Epigallokateşin Gallat ve Gemsitabin'in ekspresyonunu değiştirdiği miRNA'ların hedef molekülleri irdelenerek pankreas kanserinde yeni terapötik hedefler elde edilebilecektir.

2 Genel Bilgiler

2.1 Pankreas Kanseri

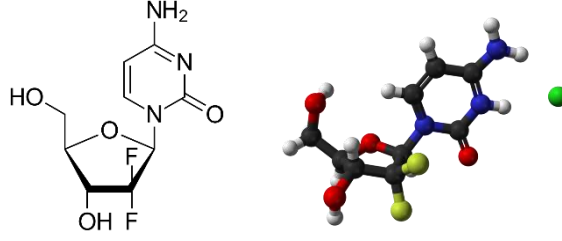
Pankreas kanseri tüm kanser türlerinin yaklaşık %2,3'ünü ve ölümlerle sonuçlanan kanser türlerinin %4,5'ünü oluşturan en ölümcül malign neoplazilerden biri olarak bilinmektedir. Pankreas kanseri, çevre dokulara ve organlara hızlı yayılan ve metastaz yapan duktal adeno karsinomadır (Snell, 2007; Wolfgang et al., 2013). Pankreas kanseri teşhisi ve tedavisi zor bir kanser olup, dünyada sık görülen kanser tipleri arasında ondördüncü sırada yer almakla birlikte, kansere bağlı ölüm sıralamasında yedinci sıradadır (A. McGuigan et al., 2018). Erken belirtiler; kilo kaybı, mide bölgesinde ağrı ve sarılık olmakla birlikte çoğu hasta erken evrede bu semptomları göstermemektedir. Pankreas kanserinin erken teşhis edilmesi, tedavi için en önemli faktörü oluşturmaktadır. Çünkü erken teşhis edilen hastalarda küratif tedavi şansı cerrahi rezeksiyon ile sağlanabilir (Bowles & Benjamin, 2001).

2.2 Epidemiyoloji

Pankreas kanseri, 2018'de 432.242 yeni ölüme neden olan en ölümcül kötü huylu neoplazilerden biri olarak tanımlanmıştır. Küresel olarak, 2018 yılında 458.918 yeni pankreas kanseri vakası bildirilmiştir ve 2040 yılına kadar 355.317 yeni vaka ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir (Bosetti et al., 2012). Yaşam boyu pankreas kanserine yakalanma riski yaklaşık %1.6 olarak belirlenmiştir. İnsidans oranları her yıl %0.5 ile %1 arasında artarak beraber ülkelere göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak insidans gelişmiş ülkelerde yüksek seyrederken, gelişme yolunda olan ülkelere düşük seyir göstermektedir (Ilic & Ilic, 2016).

2.3 Gemsitabin

Gemsitabin yapay pirimidin nükleozid ön ilacı olup deoksisitidinin 2'karbonu üzerindeki hidrojen atomlarının yerini florun aldığı sentetik şeklidir. İlk olarak 1980'lerin başında Larry Hertel'in Eli Lilly and Company'deki bir anti viral ilaç olarak üretilen ilaç sonra lösemi kanseri için denenmiş, 1990 yılın başlarında klinik öncesi pankreas kanserinde bir yıllık sağkalım süresini uzattığı bulunmuştur. 1996 yılında FDA onayını almıştır (Gesto, Cerqueira, Fernandes, & Ramos, 2012).



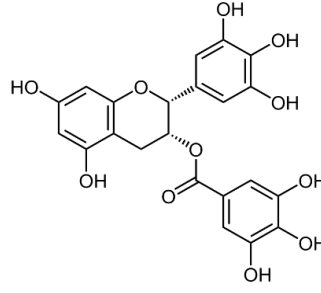
Şekil 1. Gemcitabine(Gesto et al., 2012)

2.3.1 Gemcitabin Etki Mekanizması

Gemcitabin (GEM), nükleositler için moleküler taşıyıcılar (SLC29A1, SLC28A1 ve SLC28A3) aracılığıyla hücelere taşınmaktadır ve hidrofilik özellik göstermektedir. Hücre membranından geçtikten sonra GEM'in yapısına bir fosfat eklenmektedir. Böylece GEM, monofosfat (dFdCMP) halini almaktadır. GEM'in Deoksisitidin kinaz (DCK) enzimi tarafından katalize edilen hızı belirleyicidir. Kalan enzimler tarafından iki fosfat daha eklenmesinden sonra üç fosfatın daha eklenmesi ile GEM trifosfat (dFdCTP) olarak aktif hale gelir (Alvarellos et al., 2014; Mini, Nobili, Caciagli, Landini, & Mazzei, 2006). Hücre proliferasyonu sırasında GEM, sentezlenen yeni DNA zincirlerine dahil edilir. Gemcitabin DNA'ya dahil edildiğinde, yanına doğal veya normal bir nükleosit bazının eklenmesine izin verir. Bu, gemcitabin "hatalı" bir baz olduğundan "maskeli zincir sonlandırmasına" yol açar, ancak komşusu doğal nükleozidi nedeniyle hücrenin normal onarım sisteminden (baz eksizyon onarımı) kaçmaktadır. Bu nedenle, GEM'in hücre DNA'sına dahil edilmesi ile daha fazla DNA sentezinin engellenmesine ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açan ve tamiri mümkün olmayan hasar oluşturmaktadır (Alvarellos et al., 2014; Mini et al., 2006).

2.4 Yeşil Çay Polifenolleri

Flavanollerden kateşin çaydaki en önemli polifenoller grubudur. Başlıca yeşil çay polifenolleri; (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin (EC) (+)-gallocatechin (GC) olarak adlandırılmaktadır. Yeşil çayda büyük miktarlarda bulunan epigallokateşin gallat (EGCG)'ın diğer kateşinlere kıyasla biyolojik aktivitesi daha fazladır. Ayrıca EGCG'in kanser üzerindeki etkisi yapılan çalışmalarda incelenmiş, anti-kanser etkinliği belirlenmiştir (Şekil 2) (Fujiki, 2005).



Şekil 2. Epigallokateşin Gallat

2.4.1 Epigallokateşin Gallat'ın Etki Mekanizması

Çay ve kanser ilişkisinde çayın içeriğinde bulunan ve bir antioksidan olan EGCG en sık karşılaşılan polifenol olarak karşımıza çıkmaktadır. EGCG antioksidan özellik sergilemesiyle kanser hücrelerinin proliferasyonunu, büyümesini ve sağkalımı ile metastazı önlemektedir (Du et al., 2012).

Özellikle EGCG bileşiminde bulunan polifenollerin anjiogenezi engelleyebildiği birçok araştırma ile gösterilmiştir (El Bedoui, Oak, Anglard, & Schini-Kerth, 2005; Oak, El Bedoui, & Schini-Kerth, 2005). EGCG'nin kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ederken, sağlıklı hücrelerde hücre proliferasyonunu ve büyümesini etkileyecek herhangi bir aktivite sergilemediği gösterilmiştir. EGCG'nin kanser hücrelerinde etkili olduğu yollar; mitojen aktif protein (MAP) kinazlar ve aktivatör protein-1 (AP-1), nükleer faktör-kB (NF-kB) sinyal yolu, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aracılı yollar, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 aracılı sinyal transdüksiyon yolları, proteozom aktiviteleri, matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesi, ürokinaz-plazminojen aktivatör aktiviteleri ve apoptozun indüklenerek, hücre döngüsünün durdurulması şeklinde özetlenmektedir (Chowdhury, Sarkar, Chakraborti, Pramanik, & Chakraborti, 2016). EGCG ve kanser ilişkisinin incelendiği çalışmalarda, EGCG gibi fenollerin içeren yeşil çay tüketilmesi artıkça pancreas, prostat, meme, boğaz, mide kanseri gibi farklı tipte kanserlerin meydana gelme riskinin azaldığı belirlenmiştir (Jian, Xie, Lee, & Binns, 2004; Y. Wang, Duan, & Yang, 2015).

2.5 Kodlamayan RNA'lar

Ökaryotik DNA'ların %90'nı mRNA'ya transkripsiyonu gerçekleştirirken, transkribe olan RNA'nın ise %1-2'sinin translasyonu gerçekleşmektedir. Translasyonu gerçekleşmeyen RNA'lara kodlamayan RNA (ncRNA) adı verilmektedir (Sharifi-Rad et al., 2020). Çok sayıda tipi bulunan ncRNA'lar, yaşam için gerekli (housekeeping) ncRNA'lar ve düzenleyici ncRNA olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Housekeeping RNA'lar canlıların bütün dokularında bulunarak çok sayıda işlevleri yerine getirirken, gen ifadesinin

düzenlenmesinde işlevleri olan düzenleyici ncRNA'lar ise nükleotit sayılarına göre uzun ncRNA (>200nt) ve kısa ncRNA (<200nt) olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır (Brosnan & Voinnet, 2009; Costa, 2005)

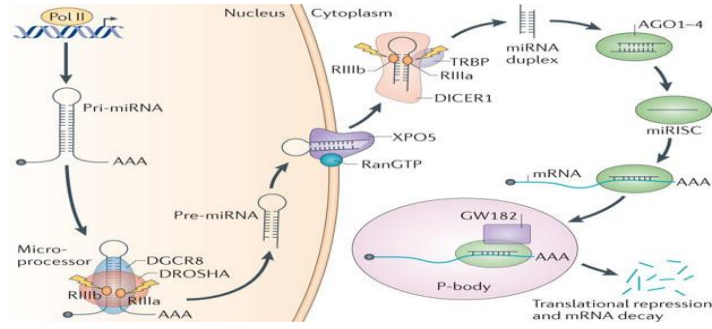
2.5.1 MikroRNA (miRNA)'lar ve Genel Özellikleri

Kodlamayan RNA'lardan gelen miRNA'ların pankreas kanserinde kilit role sahiptir. miRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir (Shenouda & Alahari, 2009). miRNA, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir (Macfarlane & Murphy, 2010).

miRNA'ları gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonal) bir mekanizma ile regüle edilmektedir. Her bir miRNA kendi moleküler işlevini hedef mesajcı RNA'lara (mRNA) ya tam ya da kısmi şekilde bağlanarak mRNA'nın translasyonunun inhibisyonuna ve/veya bu mRNA'nın kesilmesine neden olur, bu da protein üretiminin baskılanmasına yol açmaktadır. Çoğu miRNA'lar organizmanın her yerinde eksprese edilirken, bazıları embriyonik gelişim sürecinde dokuya spesifik ekspresyon özelliği gösterirler. miRNA'ların yaklaşık %60'ı bağımsız eksprese edilirken, %15'i kümeler halinde ve %25'i de intronlarda eksprese edilmektedirler (Costa, 2005; B. Zhang, Pan, Cobb, & Anderson, 2007).

2.5.1.1 MikroRNA Biyogenezi

Mikro RNA'lar (miRNA), kodlamayan 21-24 nükleotid uzunluğunda RNA molekülleridir. Genel olarak, mRNA'nın translasyonunun baskılanmasına veya tahrip olmasına neden olurlar. miRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II aracılığıyla transkripsiyon ile başlar ve firkete yapısındaki olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA'dan (pri-miRNA) oluşur. Firkete yapısı, Drosha (RNAase III enzimi) ve onun kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) içeren bir mikroişlemci tarafından kesintiye uğratılır. Ortaya çıkan öncü miRNA (pre-miRNA), Exportin-5 ile çekirdekte sitoplazmaya taşınır ve diğer RNAaz III enzimi Dicer tarafından uzunluk olarak 21-24 nükleotidlik bir dupleks miRNA'ya kesilir. Olgun dizide kesilecek iplikçi miRNA, RNA ile indüklenen susturma kompleksinde (RISC) Argonaute'ye yüklenir (S. Lin & Gregory, 2015).



Şekil 3. miRNA biyogenezi (Macfarlane & Murphy, 2010)

2.5.1.2 MikroRNA'ların işlevi

In vivo çalışmalarda büyüme faktörlerini, sitokinler, sağkalımdan sorumlu transkripsiyon faktörlerini içeren sinyal moleküllerinin regülasyonu ile miRNA'ların gelişim, bağışıklık, proliferasyon, diferansiyasyon apoptoz ve metabolizma ilişkili aktivitelerde yer aldığı gösterilmiştir (LaPierre & Stoffel, 2017).

Bir çok kanser türünde çok sayıda onkogen ve tümör supresörlerin ekspresyonunu düzenleyerek önemli yapı olan miRNA'ların anormal bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu bilinmektedir. Başlangıçta bazı miRNA'ların tek bir hedef geni baskılayarak düzenledikleri düşünülmüş olsa da ilerleyen zamanda aynı zamanda birçok miRNA'nın birden fazla geni hedefleyebildiği bulunmuştur (Iorio & Croce, 2012).

mRNA molekülüne bir antisens kompleksiyon ile miRNA'lara bağlanarak mRNA'nın normal olarak bloke edilmesi (negatif regülasyonu) aracılığıyla post-transkripsiyonel modifikasyonlar hızlı bir şekilde gen ekspresyonunu düzenlerler. miRNA'ların en küçük RNA molekül yapısı olduğu gerçeği göz önüne alındığında bir miRNA'nın 100'den fazla farklı mRNA'yı hedefleyebildiği ve regüle edildiği kabul edilmiştir (Obnosterer, Leuschner, Alenius, & Martinez, 2006). Onbeşbin'den fazla mRNA'nın bu mekanizma ile doğrudan düzenlendiği ve regüle edildiğine inanılmaktadır (J. Lu & Clark, 2012). Bu nedenle, stres yanıtında, metabolizmada, hücre proliferasyonunda ve apoptozunda ve nekrozda yer alan bir çok hücresel fonksiyonların ve yolların regülasyonunda miRNA'ların yer almaktadır (Z. Wang, 2010). miRNA'ların işlevsel ve yapısal önemini tam olarak belirlenebilmesi ve tedavi veya tanı amaçlı kullanılabilmesi için hedeflerine ne şekilde bağlandıklarının ve gen ifadelerini değişik seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmelidir.

2.5.1.3 Pankreas Tümörleri ve MikroRNA

Diğer kanserlerde olduğu gibi pankreas kanseri de kazanılmış mutasyonların birikiminden kaynaklanır. Çoğu pankreas kanserinin multigenik doğası, üç geniş gen grubundaki aberrasyonlardan (onkojenler, tümör süpressör genler ve genomik bakım genleri) kaynaklanmaktadır (L. H. Wang, Wu, Rajasekaran, & Shin, 2018). Pankreas kanserinde KRAS, CDKN2A, TP53 ve SMAD4 olmak üzere 4 farklı mutasyonla sıklıkla karşılaşılmaktadır.

RAS onkogen ailesinin aktivasyonu, hücre içindeki efektör yolları uyararak hücre proliferasyonunun ve metastazın desteklenmesine veya apoptozun inhibisyonuna yol açmaktadır. Bununla birlikte, miRNA'lar, bunu yapmalarına yardımcı olan kodlamayan RNA'lar olarak görev yapmaktadırlar (Pelosi, Castelli, & Testa, 2017).

miR143 ve miR145 aktivasyonunun azalması veya kaybı, Kras mutasyonunu artışına katkıda bulunurken, bu mutasyon zamanla hücredeki yapıyı bozmaktadır (Pelosi et al., 2017). miR217 ve miR96, ekspresyonlarındaki düzensizlikler sonucunda pankreas kanser hücrelerinin proliferasyon ve metastazını yeniden şekillendirdiği gözlemlenmiştir (Karmakar et al., 2019).

Tümör baskılayıcı genler, onarılamaz DNA hasarı meydana geldiğinde hücre döngüsü durması veya apoptozu tetiklemede rol oynamaktadırlar. Fakat pankreas kanserinde INK4A (p16 / CDKN2A), TP53, SMAD4 ve BRCA2 genlerinde ifade kaybı tanımlanmıştır (Karmakar et al., 2019). Bu etkiyi tetikleyen miRNA'ların ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanan mutasyonlar veya tümör baskılayıcı genlerin baskılanması metastaz ve proliferasyona neden olmaktadır. Pankreas kanserinden alınan doku veya pankreas sıvısındaki miR200, miR15, miR137 gibi küçük kodlamayan RNA'lar da yukarı regülasyon, miR21, miR221 gibi miRNA'ların ifadesindeki yukarı regülasyon kanser progresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Pelosi et al., 2017).

3 Gereç ve Yöntem

3.1 Hücre Kültürü

Hücre ve doku kültürü moleküler biyoloji ve genetik alanında birçok araştırmada en küçük canlı biriminin yapılan çalışmaya verdiği reaksiyonun belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bir grup klonal hücre kullanılarak elde edilebilecek sonuçların tutarlılığı ve tekrarlanabilirliği, ayrıca hassas bir şekilde kontrol edilebilen fizikokimyasal ortamı ve sürekli olarak incelenebilen fizyolojik koşulların kontrolü hücre kültürünü prelinik çalışmalarda vazgeçilmez kılmaktadır. Sağladığı avantajlar nedeniyle in vitro kanser araştırmalarında sıklıkla tümör hücrelerinden elde edilen hücre hatları kullanılmaktadır. Uygun olmayan koşullarda korudukları limitsiz üreme yetenekleri, kolay uygulanabilir olmaları, ticari olarak elde edilip etik kurul belgesi gerektirmemeleri, yüksek derecede homojenite göstermeleri ve donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılabilir hale gelebilmeleri gibi avantajları hücre hatlarını kanser çalışmalarında önemli bir model haline getirmektedir.

Bu çalışmada da kullanılan PANC1 hücre hattı kullanılmış ve bu hücre hattı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Tablo 1. PANC1 hücre hattı özellikleri

Organizma	Homo Sapiens
Doku	Pankreas
Morfoloji	Epitelyal
Kültür özellikleri	Adherent
Hastalık	Epiteliyoid karsinoma
Yaş	56
Cinsiyet	Kadın
İki katına çıkma süresi	52 saat
Yorumlar	Hücreler yumuşak agarda büyür

3.2 Hücre Üretimi ve Kültür Koşulları

In vitro koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamları, hücrelerin in vitro koşullar altında yaşayabilmeleri, büyüebilmeleri ve proliferasyonu için uygun olmalı ve gerekli maddeleri içermelidir. Kullanılan büyüme ortamlarının hücre çoğalmasını desteklemesi amacıyla her bir ortamın içerisine %1 oranında 2 mM L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin, 100 µL plazmocin ve %10 Fetal Bovine Serum sonradan dâhil edildiği L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Eagle's Minimum Essential Medium) kullanılmıştır. Hücreler etken madde ile tedavi edilmeden önce yeterli sayıya ulaşana kadar yatay durumda 25 ve 75 cm²'lik flasklarda çoğaltılıp bakımları sağlanmıştır. Hücrelerin kültüre edildiği flasklar ise % 95 nem, 37°C ve % 5 CO₂ koşullarına sahip inkübatörde muhafaza edilmiştir. Kullanım haricinde hücreler

-86°C sıcaklığındaki koşullara sahip dolaplarda muhafaza edilmiştir. Hücrelerin düzenli kontrolü inverted ve ışık mikroskopları yardımıyla yapılmıştır.

3.3 Hücre Hatlarının Hücrelerinin Pasajlanması

Flask içerisinde hücreler yüzeyi kapladıktan sonra sayının fazla olması nedeniyle yüzey ve besinin yetersiz kalmasıyla kontakt inhibisyon meydana gelmektedir. Bu durumun önüne geçmek için hücre pasajlama işlemine uygulanır. Flask içerisinde adherent olarak canlılığını sürdüren hücreler tripsin-EDTA yardımı ile hücre-hücre ve hücre-matriks glikoprotein bağlantılarındaki peptitlerin kesimi sonucunda birbirlerinden ve hücre yüzeyinden ayrılırlar. Tripsin uygulamasından önce hücrelerin içerisinde yaşadıkları ortam dökülür ardından Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS ile flaskın iç kısmı yıkanır böylece hücreler kültür ortamındaki Ca^{2+} ve Mg^{2+} ve Fetal Bovine Serum içerisindeki tripsin inhibitörlerinden arındırılır. Flaska tripsin eklendikten sonra hücreler inkübatörde 5 dk bekletilir ve kullanılan tripsinin 2 katı ortam flaska konularak yüzeyden ve birbirlerinden ayrılan hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenmek üzere 15 ml'lik tüplere alınırlar. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek kalan pellet üzerine bir miktar taze serumlu ortam ilave edilir ardından pipetaj yapılarak 2 ayrı flaska aktarım yapılır. Flaskların içine 10-12 ml medyum eklenerek pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Hücrelerin flask yüzeye yapışması ve proliferasyona devam edebilmeleri için flasklar inkübatöre konulurlar.

3.4 Hücre Hatlarının Dondurulması

Flask yüzeyine yapışmış olan hücreler tripsin uygulaması ile flask yüzeyinden kaldırılır. Hücrelerin üzerine uygulanan tripsinin 2 katı olacak şekilde serumlu DMEM konulur. Hücreler falkon tüplerin içerisine alınarak 2000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet tüp içerisinde homojenize hale getirilir. Sonrasında 9:1 oranında Fetal Bovine Serum : DMSO karışımından oluşan ortam buz üzerinde hazırlanarak hücrelerin üzerine aktarımları gerçekleşir. Buz içerisinde muhafaza edilen tüpler -86°C'ye kaldırılır.

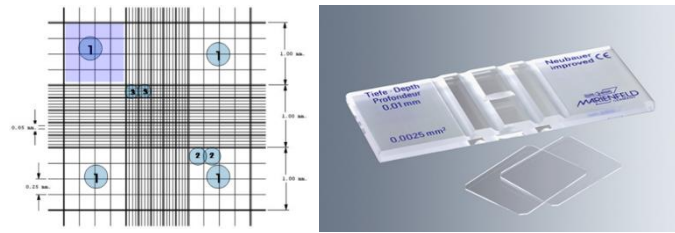
3.5 Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

Dolapta -86°C'de muhafaza edilen tüpler içerisinde bulunan dondurulmuş hücreler oda ısısına alınır. DMSO'dan etkilenme sürecini azaltmak için tüp içerisine ivedilikle serumsuz DMEM

ilave edilir. Pastör pipeti kullanımı ile serumsuz ortama dilüe edilen hücreler 15 ml'lik tüp içerisine aktarılır ve 2500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüp içerisinde süpernatant dökülür ve hücreler üzerine 15 ml serumlu DMEM eklenerek tüp içerisinde hücreler homojenize hale getirilir. Flasklar, 37 °C' de %95 nem ve % 5CO₂ içeren inkübatöre alınarak inkübasyona bırakıldı. Kırk sekiz yada yetmiş iki saat içerisinde üremeye başlayan hücrelerin ortamları değiştirilir. Yaklaşık 5-7 gün içerisinde hücreler bütün flask yüzeyini kapladığında, hücrelerin canlılığını korumak amacıyla pasaj yapılır.

3.6 Hücre Hatlarının Canlılığının Belirlenmesi

Tripan mavisi, canlı hücrelerin içine girmezsen ölü hücrelerin içine girmekte ve onları maviye boyamaktadır. Kültüre edilen hücrelerin canlılıklarını ve sayılarını değerlendirebilmek amacıyla Tripan mavisi boyası kullanılır. Tripsin ile yüzey ve birbiriyle bağlantısı kesilen hücrelerden 50 µl ve 50 µl tripan mavisi karıştırılarak Neubauer lamına konulur ve ışık mikroskobunda sayım yapılır. Neubauer lamı 3 × 3 karelerden oluşan 2 bölme içerir (Şekil 4). Bu bölmelerden birindeki dört 4 × 4 alan sayılarak ortalaması alınır ve bulunan ortalama 2 × 10⁴ ile çarpılır böylece ml'deki canlı hücre sayısı belirlenir. Aynı işlem ölü hücreler için de gerçekleştirildiğinde, ml başına düşen ölü hücre sayısı belirlenir. Hücre canlılığı ise, toplam hücre sayısının canlı hücrelere % olarak oranlanması ile belirlenir.



Epigallokateşin Gallat ve kombinasyonunun hatları üzerindeki sitotoksik etkisi “*Cell proliferation reagent*” (*WST-1*)” solüsyonuyla ile belirlenir. Tetrazolyum tuzlarından biri olan WST-1'in çalışma mekanizması, Tetrazolyum tuzunun, mitokondrinin solunum zincirine ait olan süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi yoluyla formazana parçalanmasına dayanmakta ve bu sürecin sadece canlı hücrelerde işlevsel olduğu görülmektedir. Uygulama aşamasında ise 96 kuyucuklu plaklarda çoğalan hücreler 0,5–4 saat boyunca WST-1 reaktifi ile inkübe edilmektedirler. İnkübasyon periyodundan sonra oluşan formazan boyası ise mikropalak okuyucu ile ölçülmektedir. Ölçülen absorbans değeri canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir.

Pankreas kanser modeli olan PANC1 hücreleri 1 ml de 1×10^4 hücre /kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakada her kuyucuğa 100 μ l dağıtılmıştır. Hücrelerin adherent olması sebebiyle 24 saat yapışmaları beklenmiş ve PANC1 hücrelerine 24, 48, 72 saat için 9.37 μ M - 300 μ M konsantrasyon aralığında EGCG, 6.25 μ M - 200 μ M konsantrasyon aralığında GEM uygulanarak hücreler inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında WST-1 protokolü gereği her bir kuyucuğa 100 μ l ye 10 μ l olacak şekilde WST uygulanarak 0,5–4 saat boyunca mikropalak okuyucuda (Multiskan FC, Thermo) 30 dakikada bir kez 450 nm–620 nm referans aralığında ölçüm yapılmıştır. İlaç ve etken maddenin hücre üzerindeki IC_{50} değerleri CalcuSyn v.2 yazılımında hesaplanmıştır.

3.8 İzobologram Analizi

İzobologram analizi iki ilacın kombinasyonunu uygun dozlarını analiz eden yöntemdir. İlaç kombinasyonlarının kullanımı izobologram kullanımını artırmıştır. Hücreler 96-kuyucuklu plaklara 1×10^4 hücre /kuyucuk olacak şekilde dağıtılır. IC_{50} değerleri doğrultusunda, GEM ve EGCG'nin PANC1 hücreleri için 2:3 oranlarında kombine edilir. Bu kombinasyon oranları sabit tutulacak şekilde, 2 kat artan ve azalan dozlardaki ilaç kombinasyonları hücrelere 3 tekrarlı olarak uygulanır. Madde uygulamasını takiben 24, 48 ve 72. saatlerde WST-1 kullanılarak absorbans değerleri ölçümü ve sitotoksosite yüzdelerinin hesaplanmasını takiben, Medyan etki denkleminin dayanan Chou-Talalay teoreminin kullanıldığı CalcuSyn 2.0 (Biosoft) yazılımında, kombinasyonların sinerjistik, antagonistik veya additif etki gösterip göstermedikleri, sitotoksosite yüzde değerleri kullanılarak otomatik olarak analiz edilir. Doz-etki eğrisi çizilir, uygulanan dozlar tarafından etkilenen fraksiyonlar (F_a), %50'si ve %75'i etkilenen fraksiyonun maruz kaldığı dozlar (ED_{50} , ED_{75}), bu dozlara ait kombinasyon indeksleri (CI) ve doz azalma indeksleri (DRI) ve doz-etki eğrisinin eğimi (m) belirlenir. Kombinasyon dozlarının CI değerlerinin etkileri Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. CI indeksi ve etki tablosu

CI	Etki
< 0,1	Oldukça güçlü sinerjizm
0,11 - 0,3	Güçlü sinerjizm
0,31 - 0,7	Sinerjizm
0,71 - 0,9	İlımlı sinerjizm
0,91 - 1,1	Additif etki
1,11 - 1,45	İlımlı antogonizm
1,46 - 3,3	Antogonizm
> 3,31	Oldukça güçlü antogonizm

3.9 Apoptoz Analizleri

Normal canlı hücrelerde fosfatidilserin (PS), hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde bulunurken apoptozun ara evresinde olan hücrelerde, PS zarın içinden dışına çıkmakta ve hücre membranının dış kısmına yerleşmektedir. Anneksin V, 35 kDa ağırlığında, PS' e affinitesi olan ve Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlayan bir proteindir. Anneksin V yönteminde Anneksin'e FITC içeren bir fluorokrom konjuge edilmiştir. Apoptoz geçiren hücreler, bu flourokromun anneksin'e konjuge olması ve anneksin' inde PS'e affinitesinin olması

sayesinde akım sitometrisinde analiz yapıldığında ışığa vermektedirler. FITC Annexin V ile boyama, propidyum iyodür (PI) veya 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gibi bir boya ile kullanıldığında araştırmacılara hücrenin erken apoptoz, geç apoptoz ya da nekroz da olduğuna dair ayrıntılı bilgi vermektedir. Membran bütünlüğü bozulmamış hücreler PI boyasını hücrenin içine almıyorken, membran bütünlüğü bozulmuş hücreler PI'a geçirgendir. Dolayısıyla Annexin V ve PI birlikte kullanıldığında canlı hücreler, FITC Annexin V ve PI negatif iken, erken apoptozdaki hücreler FITC Annexin V pozitif ve PI negatif, geç apoptozdaki hücreler ise FITC Annexin V ve PI pozitifdir. Bu çalışmada apoptoz, Annexin V-FITC (BD Pharmingen) kiti ile değerlendirilmiştir.

GEM, EGCG ve kombinasyonlarının pancreas kanseri hücrelerindeki apoptotik etkisinin değerlendirilmesi, belirlenen dozlarla muamele edilen hücrelerin Annexin V yönteminin uygulanmasının ardından BD ACCURI C6 akım sitometrisinde (BD Biosciences Pharmingen)'de değerlendirilmiştir.

3.9.1 Annexin V Yöntem Protokolü ve Kit Reaktiflerinin Hazırlanması

10x Annexin V çalışma tamponu 1:9 oranında distile H₂O ile dilüe edilmiştir

- PANC1 hücre hattı, GEM ve EGCG'nin IC₅₀ değeri ve kombinasyonun ED₅₀ değeri ile 48 saat boyunca tedavi edildikten sonra hücreler 5 dakika tripsin ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Sonrasında tripsinin etkisini inhibe etmek için serum içeren DMEM eklenmiştir.
- Hücreler 5 dakika 400g'de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- Her bir gruptaki hücrelerin yıkanması amacıyla 1 mililitre soğuk DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biological industries) eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- Hücreler tekrar 5 dakika 400 g'de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem toplam iki defa uygulanmıştır.
- Her bir tüpe 200 µl 1x bağlanma solüsyonu, 5 mikrolitre FITC ve 5 mikrolitre PI eklenerek pipetlenmiştir.
- Karışımlar nazikçe pipetaj yapılarak karanlıkta 26°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Her bir tüpe 250 mikrolitre 1x bağlanma solüsyonu eklenerek pipetlenmiştir.
- Hücrelerin analizi akım sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir.

3.10 miRNA Mikroarray Analizi

EGCG, Gemsitabin ve kombinasyonunun IC_{50} ve ED_{50} değeri uygulandıktan 48 saat sonra kontrol hücrelerini içeren her bir gruptan total RNA izolasyonu için 18 nükleotidin üzerindeki bütün RNA'ların izolasyonunun gerçekleştirilebilmesine olanak tanıyan miRNeasy Kiti (Qiagen) ile izolasyon gerçekleştirilmiştir.

3.10.1 Total RNA İzolasyonu

RNA içeriği bilinmeyen hücrelerde kit ile izolasyon için en fazla 1×10^7 , en az 1×10^5 hücre kullanılmaktadır. Bu yüzden hücreler sayılarak başlangıç materyalinin miktar kantitasyonu gerçekleştirildi.

- Flaskta tek bir katman halinde büyüyen hücreler (1×10^6) tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldıktan sonra üzerlerine tripsinin iki katı kadar serumlu DMEM eklendi ve içerik 15ml'lik falkon tüpe aktarılıp 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenir.
- Santrifüj sonrası süpernatant dökülür. Çökmüş olan hücreler üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi ve pipetaj ile görünür hiçbir hücre pellet yığını kalmayınca kadar karıştırıldı.
- Hücrelerin patlatılıp RNA eldesinin iyi olması için homojenleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlem için "Qiashredder" tüp kullanıldı. Qiazol ve hücre karışımının hepsi "Qiashredder" tüp içine aktarıldı ve 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- "Qiashredder" tüp içersindeki homojenatlar 5 dk. oda sıcaklığında ($15-25^{\circ}C$) inkübe edildi.
- Kolon atıldı ve karışımın üzerine 140 µl kloroform eklenerek tüpün kendi kapağı kapatıldı ve bir sonraki aşamadaki faz ayrımı için 15 sn. çalkalandı.
- Homojenatların bulunduğu tüpler tekrar oda sıcaklığında ($15-25^{\circ}C$) 2-3 dk inkübe edildi.
- Daha sonra $4^{\circ}C$ 'de 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlenen örneklerin 3 faza ayrışması sağlandı: En üstte RNA içeren renksiz sulu faz (hacmi yaklaşık 350 µl), ortada beyaz ara katman (interfaz) ve en altta kırmızı organik fazdır.
- Renksiz sulu faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldıktan sonra hacminin 1,5 katı kadar %100' lük etanol (~ 525 µl) eklendi ve pipetaj ile tamamen karıştırıldı.

- Örnek karışımının 700 µl' si toplama tüpüne yerleştirilmiş olan RNeasy Mini spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında (15–25°C) 13000 rpm'de 15 sn santrifüjlendi. Elüsyon döküldükten sonra filtre tekrardan toplama tüpüne yerleştirildi ve kalan karışım tekrar filtrelerin üzerine eklenip tekrar oda sıcaklığında 13000 rpm'de 15 sn. santrifüjlendi.
- Elüsyon atılarak toplama tüpüne yerleştirilen filtreli kolon üzerine 350 µl Tampon RWT eklendikten sonra 13000 rpm'de 15 sn. santrifüj edildi.
- Elüsyon atılarak aynı toplama tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 500 µl Tampon RPE tamponu eklendi ve 13000 rpm'de 15 sn santrifüj edilerek yıkandı.
- Elüsyon atılarak kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildikten sonra yıkama işlemi aynı şekilde 500 µl Tampon RPE ile 13000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilerek tekrarlandı.
- Elüsyon atılırken kolon elüsyonla temas etmemesi için dikkat edilerek kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Herhangi bir yıkama tampon veya elüsyon artığını elimine etmek için yeni toplama tüpü içine yerleşik kolon, 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Total RNA'nın (küçük RNA'ları da içeren) elüsyonu için kolon 1,5 ml'lik bir eppendorf tüpe yerleştirildikten sonra 30-50 µl RNase içermeyen su doğrudan membran üzerine dikkatlice eklenerek 13000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
- Elde edilen elüsyon miRNA'ları da içeren total RNA'dan oluşmaktadır.
- İzolasyonu yapılan RNA'lar -86°C'da kullanımına kadar muhafaza edildi.

3.10.2 Total RNA'nın miktarının ve saflığının belirlenmesi

Elde edilen RNA örneklerinin yoğunluğu ve saflıkları 260/280 nm ve 230/260 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçümler tedavi edilen ve edilmeyen her bir hücre grubundan ayrı ayrı 1-2 µl alınarak Nanodrop (Thermo Scientific) cihazında gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların saflığı 230, 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilerek, ideal saflıkta kaliteli RNA'nın 10 mM Tris·Cl (pH 7.5) içindeki A260/ A280 ve A230/ A260 absorbans oranınının 1,9-2,1 olması beklenmektedir.

3.10.3 cDNA (Komplementer DNA) sentezi

İzole edilen uygun kalitedeki küçük RNA lardan, cDNA sentezi "miScript II Reverse Transcription Kit" (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- RNA kalıbı buz üzerinde çözülmüştür. RNase-free su, 10x miScript "Nucleics" Karışım ve 5x miScript "HiSpec" tamponları oda sıcaklığında (15–25°C) çözülmüştür.
- Ters transkriptaz reaksiyonu Tablo 3'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3. Ters transkriptaz reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim
5x miScript “HiSpec” Tamponu	4 µl
10x miScript “Nucleics” Karışımı	2 µl
RNase-free su	Değişir bilir
miScript Ters transkriptaz Karışımı	2 µl
Kalıp RNA	Değişir bilir
Toplam Hacim	20 µl

- Ters transkripsiyon master karışımını içeren her bir tüpe RNA kalıbı eklenip ve nazikçe pipetaj yapılmış ve ardından buz üzerine yerleştirilmiştir.

- 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- miScript ters transkriptaz enziminin inaktivasyonu için 5 dakika 95°C’de karışım inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.10.4 PCR Array Analizi

Önerilen çalışmada beyin kanseri patogenezinde rol oynayan 84 adet miRNA gömülü miRNA PCR Array (Qiagen) kullanılarak bunların pankreas kanserindeki miRNA ekspresyon değişimleri Roche Light Cyler 480 platformunda analiz edilmiştir. Üç biyolojik tekrardan sonra artan azalan miRNA’lar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bunun için elde edilen kalıp cDNA örnekleri kullanılarak PCR Array çalışması “miScript miRNA PCR Array” kiti (Qiagen) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma protokolü:

- 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master karışımı, 10x miScript Universal Primer, kalıp cDNA ve RNase-free su oda sıcaklığında çözünmeye bırakılmıştır.
- Real-Time qRT-PCR karışımı Tablo 4’ye göre hazırlanmıştır.

Tablo 4. Real time qRT-PCR 96 kuyucuk içeriği

Array içeriği	96 kuyucuk formatı
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master	1375 μ l
10x miScript Primer	275 μ l
RNase-free su	1075 μ l
Kalıp cDNA	25 μ l
Toplam Hacim	2750 μl

- Hazırlanan karışım 96 kuyucuğun her bir bölmesine aktarılmıştır. 96 kuyucuklu plaklar Roche Light Cycler 480 cihazına konularak reaksiyon başlatılmıştır.

Tablo 5. miRNA'ların plaka içerisindeki yerleşimi

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-124-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-130a-3p
B	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-133b	hsa-miR-137	hsa-miR-138-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-149-5p
C	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-153-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-182-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-184
D	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-203a-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-210-3p
E	hsa-miR-216a-5p	hsa-miR-217	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-27a-3p
F	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328-3p
G	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-451a	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-9-3p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-96-5p
H	cel-miR-39-3p	cel-miR-39-3p	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	RNU6-6P	miRTC	miRTC	PPC	PPC

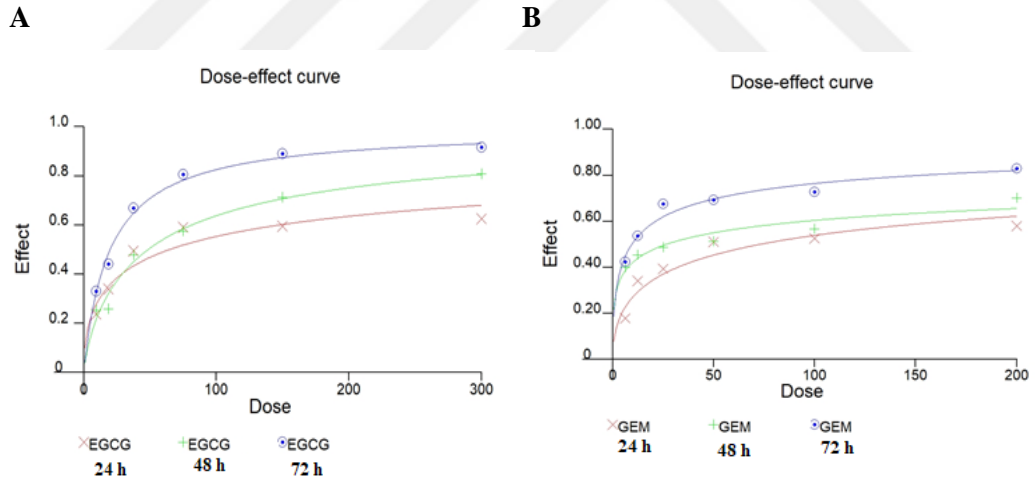
3.10.5 Data Analizi

Real time PCR verileri “miScript miRNA PCR Array Data Analysis” web yazılımında analiz edilmiştir. Threshold cycle değerleri (CT) yüklendikten sonra, yazılım otomatik olarak rölatif kantifikasyonu ve kaç kat değişim olduğunu $\Delta\Delta CT$ metodu ile hesaplar ve farklı formatlarda sonuçları gösterir. Veri analizinde $\Delta Ct = (AVG CT_{miRTC} - 1.1) - (AVG CT_{PPC})$ formülü kullanılmıştır. Bu formülün referans verisi (hiçbir etken maddesi uygulanmayacak hücreler) ile oranı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünü vermektedir. 96 kuyucuklu plakada H3, H4, H5, H6, H7, H8 kuyucuklarında yer alan genler, veri analizinin normalizasyonu için kontrol genleri olarak kullanılmıştır. Bunun yanında 1 tane pozitif PCR kontrolü çalışılmıştır. Sonuçlara Log2 transformasyonu uygulanacak ± 2 kat ve üzeri değişimler istatistiksel analize alınmıştır.

4 Bulgular

4.1 Etken Maddelerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

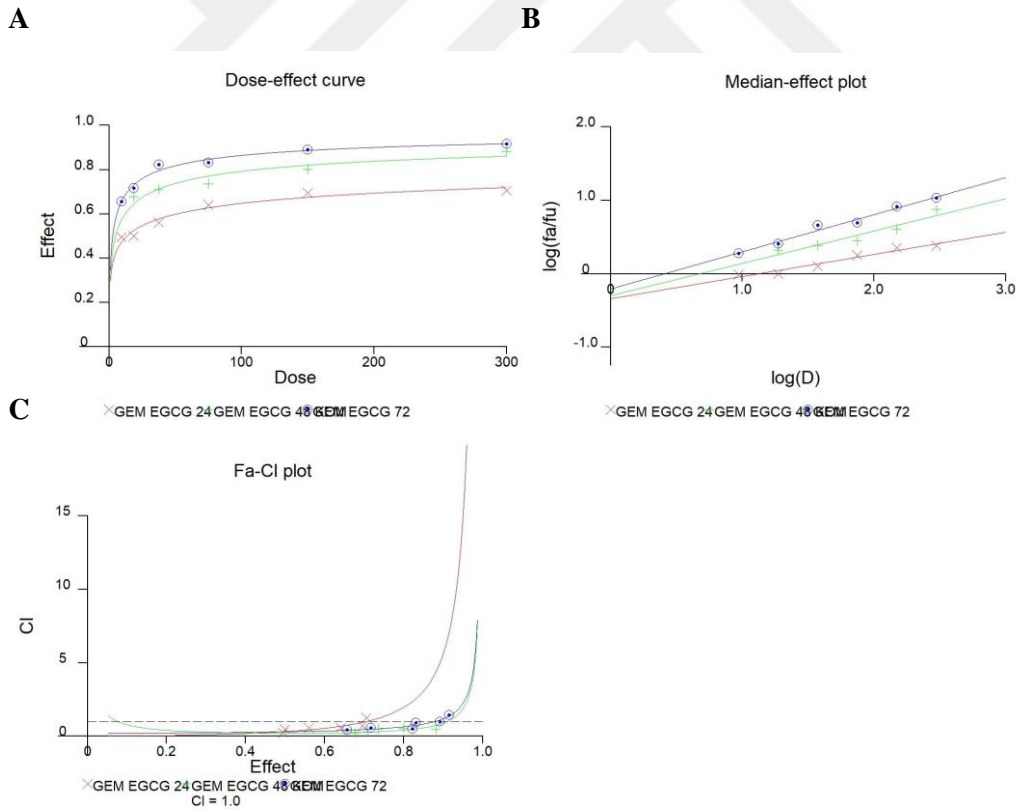
Pankreas kanseri modeli olan PANC1 hücre hattında GEM, EGCG ve kombinasyonlarının sitotoksosite analizi WST-1 ile değerlendirilmiş ve ilaç içermeyen hücreler kontrol grubu olarak alınmıştır. Tüm sitotoksosite deneyleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Aktif bileşiklerin hücre çoğalmasında %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları olarak bilinen IC_{50} dozları belirlenmiş ve bu dozlar doğrultusunda kombinasyonu kurulan ilaçların hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan efektif doz (ED) değerleri belirlenmiştir. PANC1 hücrelerinde 24 saatte GEM ilacının IC_{50} değeri $72.85 \mu M$ (r: 0.94714), 48 saatte $26.55 \mu M$ (r: 0.94634), 72 saatte $9.38 \mu M$ (r: 0.97372) olarak belirlenmiştir. (Şekil 5B). EGCG etken maddesinin PANC1 hücrelerinde 24 saatte IC_{50} değeri, $64.36 \mu M$ (r: 0.94290) iken, 48 saatte $48.34 \mu M$ (r: 0.985769, 72 saatte ise $19.73 \mu M$ (r: 0.99174) olarak saptanmıştır (Şekil 5A).



Şekil 5. GEM ve EGCG'nin 24, 48 ve 72. saatlerde Doz-Etki grafiği

4.1.1 Gemsitabin ve Epigallokateşin Gallat Kombinasyonunun PANC1 Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

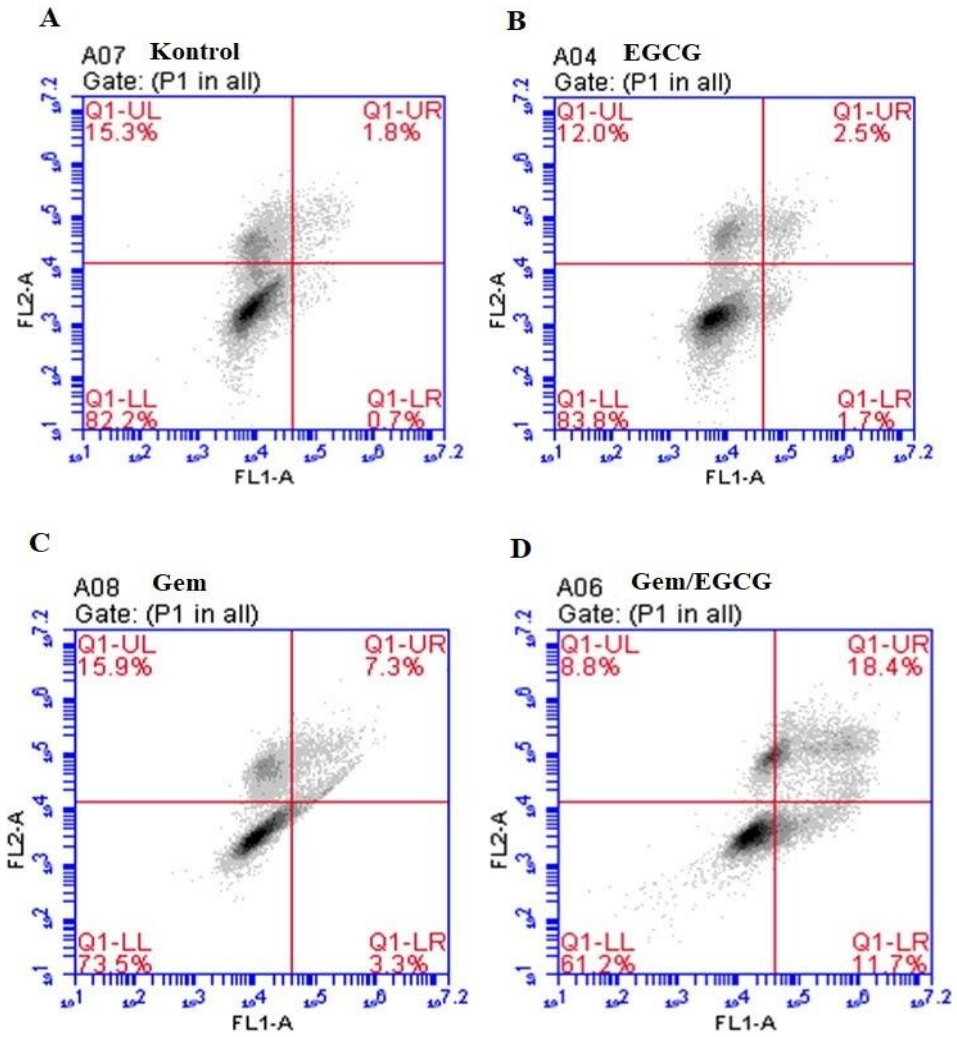
GEM ve EGCG kombinasyonlarının uygun dozlarının PANC1 hücrelerindeki etkilerinin sinerjistik, antagonistik veya additiflik etkilerinin belirlenmesi için izobologram analizi sonrasında kombinasyon indeksi (CI) göz önüne alınmıştır. Bu doğrultuda 24, 48 ve 72. saat sonuçları değerlendirilmiştir. Buna göre 24. Saatte kombinasyonun Fa_{50} 'nın CI, 0.326 (sinerjistik) olarak saptanırken 48. Saatin Fa_{50} 'nin CI'i 0.216 (güçlü sinerjistik) olarak, 72 saatte 0.5'lik fraksiyonun kombinasyon indeksi 0.311(sinerjistik) olarak bulunmuş ve ileri deneyler güçlü sinerjizm gösteren 48. saatin verileriyle gerçekleştirilmiştir.(Şekil 6C) Kırksekizinci saatin doz azaltma indeksine (DRI) bakıldığında EGCG'nin 48.34 μM 'den 10.24 μM 'a GEM ise 26.55 μM 'dan 8.44 μM 'a düşerek EGCG 4.77, GEM ise 3.14'lük DRI sergilemiştir.(Şekil 6A: Şekil 6B)



Şekil 6. GEM ve EGCG kombinasyonunun 24, 48. ve 72. saatlerdeki Doz-Etki, Medyan-Etki, Fraksiyon (Fa)-kombinasyon indeksi (CI) grafiği

4.2 Gemitabin ve Epigallokateşin Gallat'ın PANC1 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

GEM ve EGCG'nin IC₅₀ dozları ve kombinasyonun ED₅₀ değerinin hücre PANC1 üzerindeki apoptotik etkileri 48. saatte tedavi edilmeyen grup ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde, EGCG uygulanan hücrede apoptoz %4.2 olarak belirlenirken, GEM ile tedavi edilen hücrede %10.6, kombinasyon grubunda ise %30.1 olarak bulunmuştur. (Şekil 7B; Şekil 7C; Şekil 7D) EGCG, apoptozda 1.68 kat, GEM 4.24 kat, kombinasyon ise 12.04 kat artış göstermiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Kontrol (tedavi edilmeyen), EGCG, GEM ve kombinasyonlarının PANC1 hücrelerindeki apoptotik etkisinin görüntülenmesi, Sol alt: canlı, sağ alt: erken apoptotik sağ üst: geç apoptotik, sol üst: nekrotik hücrelerin yüzdesini göstermektedir

4.3 Etken Maddelerin Hücrelerde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Kontrol grubu baz alınarak GEM ve EGCG'nin IC_{50} ve kombinasyonun ED_{50} değerlerinin uygulandığı hücrelerde miRNA ekspresyon değişimleri 48, saatlerde incelenmiştir.

GEM uygulanan PANC1 hücrelerinde miR137, miR130a-3p, miR141-3p, miR217, miR30b-5p ekspresyonunun arttığı, miR27a-3p, miR130b-3p, miR144-3p, miR30c-5p, miR182-5p, miR183-5p, miR425-5p, miR187-3p, miR9-3p, miR222-5p, miR296-5p, miR324-5p, miR486-5p, miR21-5p'nin ise ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Tablo 6, Şekil 8).

EGCG'nin IC_{50} dozu ile tedaviden sonra PANC1 hücrelerinde miR137, miR130a-3p, miR130b-3p, miR141-3p'nin ekspresyonunun arttığı, miR27a-3p, miR30c-5p, miR144-3p, miR182-5p, miR425-5p, miR183-5p, miR187-3p, miR9-3p, miR222-5p, miR21-5p ekspresyonlarının ise ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Tablo 6, Şekil 9).

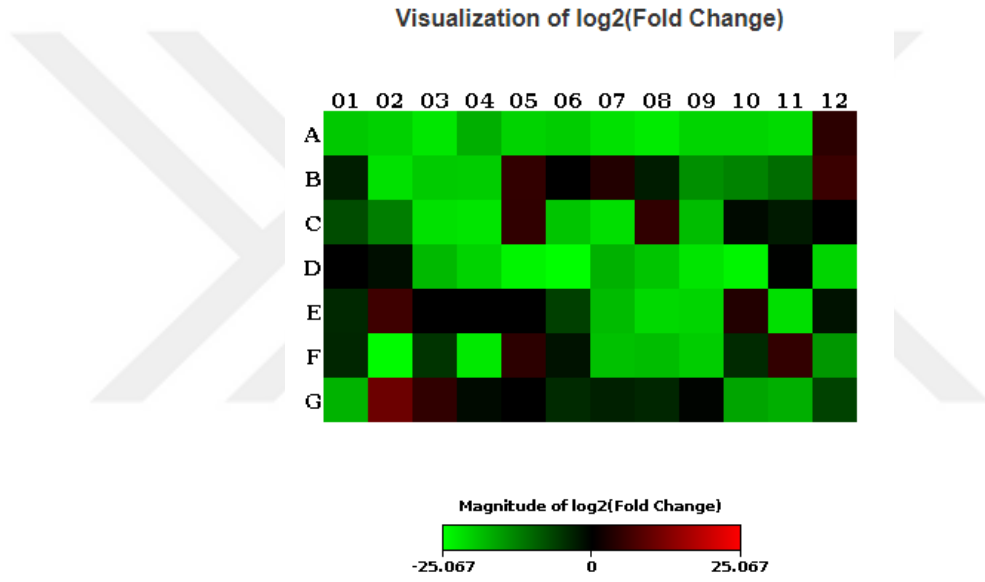
Kombinasyon uygulaması ile birlikte miR137, miR130a-3p, miR130b-3p, miR141-3p ve miR217'nin ekspresyonu artarken, miR27a-3p, miR30c-5p, miR144-3p, miR182-5p, miR425-5p, miR183-5p, miR187-3p, miR9-3p, miR21-5p, miR222-5p, miR324-5p, miR486-5p'nin ekspresyonu azalmıştır (Tablo 6, Şekil 10).

Tablo 6. Gemsitabin, Epigallokateşin Gallat ve kombinasyonunun PANC1 hücrelerinde miRNA ekspresyonundaki etkisi

GEM			EGCG			GEM EGCG		
miRNA	Kat değişim	p değeri	miRNA	Kat değişim	p değeri	miRNA	Kat değişim	p değeri
miR137	9,83	0,000026	miR137	12,84	0,000024	miR137	19,54	0,000033
miR130a-3p	3.32	0	miR130a-3p	3,40	0	miR130a-3p	4,40	0
miR27a-3p	-3.5	0,000000 1	miR27a-3p	-3.9	0,000000 1	miR27a-3p	-5.2	0,000000 4
miR130b-3p	- 4.08	0	miR130b-3p	4,20	0	miR130b-3p	5,1	0
miR141-3p	2.09	0,000003	miR141-3p	2,16	0,000009	miR141-3p	4,27	0,000007
miR30c-5p	-2.6	0,000002	miR30c-5p	-2.7	0,000000 3	miR30c-5p	-4.3	0,0000021
miR144-3p	-4.2	0,000001	miR144-3p	-5,76	0,000001	miR144-3p	-7,20	0,000001
miR182-5p	-2.18	0,000002	miR182-5p	-2,67	0,000003	miR182-5p	-3,18	0,000002

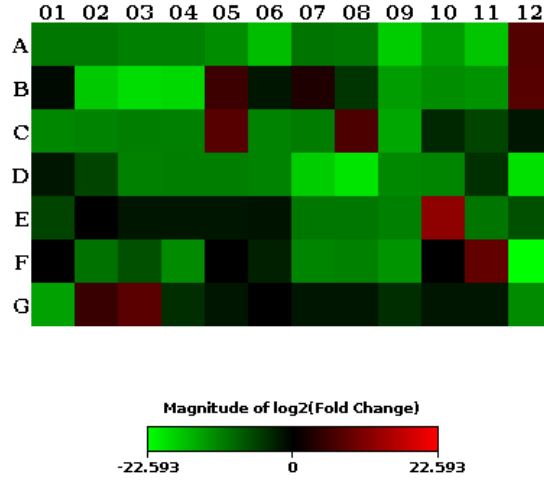
GEM			EGCG			GEM EGCG		
miR425-5p	-2.9	0,000000 5	miR425-5p	-2.9	0,000000 2	miR425-5p	-3.9	0,0000002
miR183-5p	-3.7	0,000002	miR183-5p	-4,06	0,000002	miR183-5p	-5,63	0,000002
miR187-3p	-3.61	0	miR187-3p	-4.5	0	miR187-3p	-5,64	0
miR9-3p	-4.6	0,000003	miR9-3p	-3.5	0,000000 1	miR9-3p	-6.8	0,00001
miR222-5p	-5,44	0,000003	miR222-5p	-4,80	0,000003	miR222-5p	-3.5	0,000003
miR21-5p	-1.09	0,000001	miR21-5p	-3.1	0,000000 1	miR21-5p	-3.7	0,0000001
miR217	4,96	0,000025	-	-	0,000025	miR217	5,44	0,000012
miR324-5p	-2,53	0,000001	-	-	-	miR324-5p	-3.4	0,000001
miR486-5p	-2,49	0,000000 1	-	-	-	miR486-5p	-4.5	0,000001
miR30b-5p	2,07	0						

GEM			EGCG			GEM EGCG		
miR296-5p	-2,72	0,00000 2						



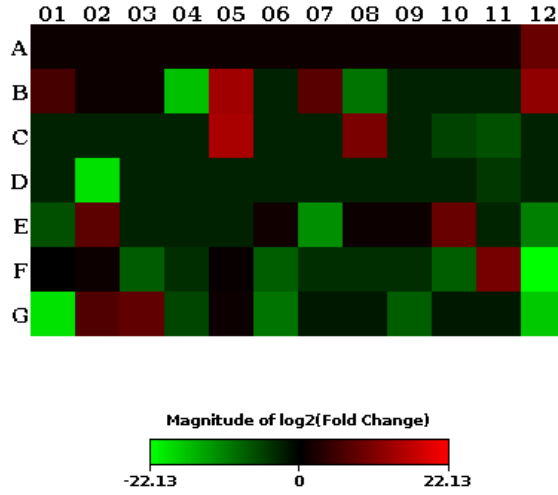
Şekil 8. Gemsitabin uygulanan PANC1 hücrelerinde kanser progresyonu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri gösteren ısı haritası

Visualization of log₂(Fold Change)

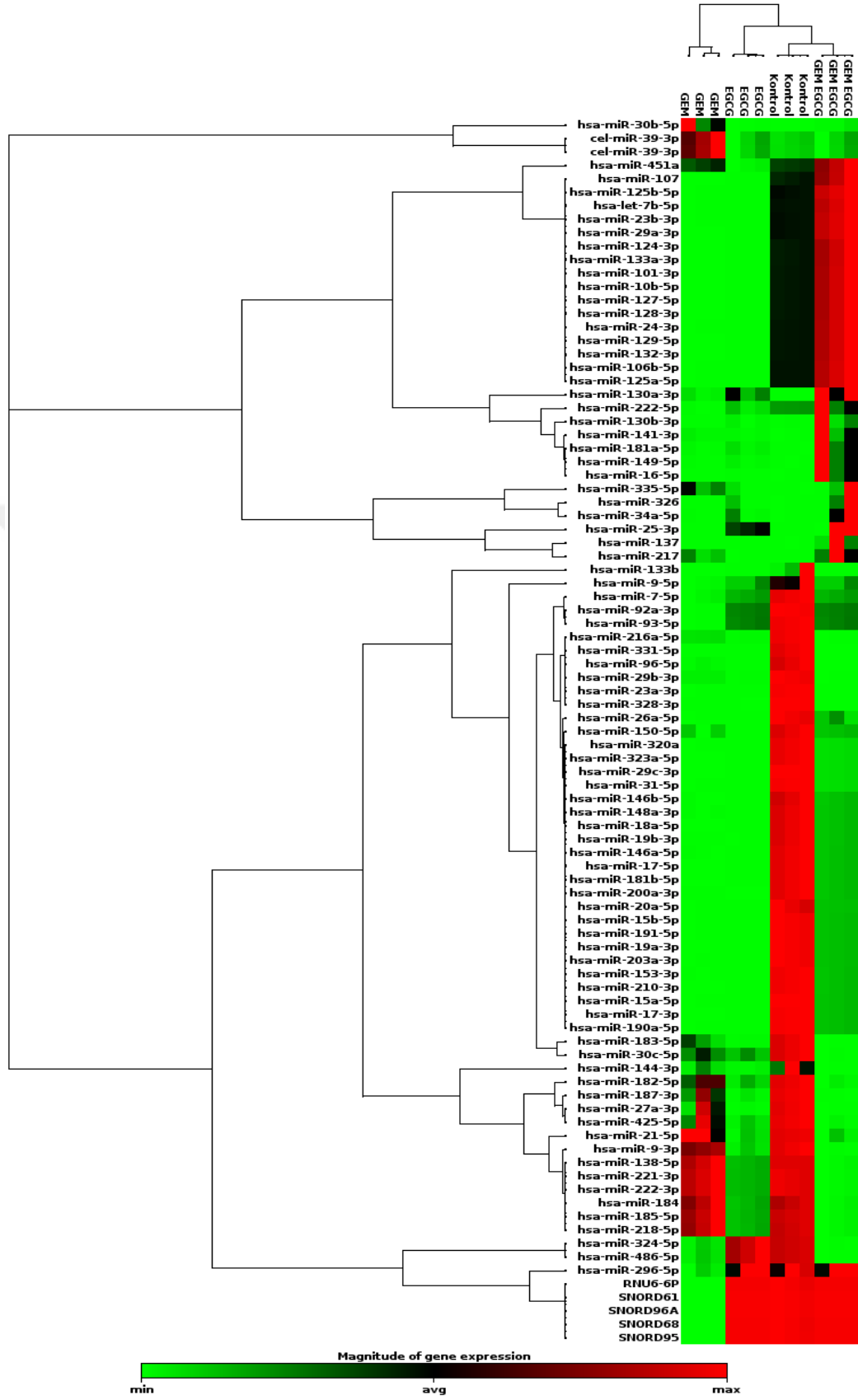


Şekil 9. EGCG uygulanan PANC1 hücrelerinde kanser progresyonu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri gösteren ısı haritası

Visualization of log₂(Fold Change)



Şekil 10. Gemsitabin ve EGCG kombinasyonu ile tedavi sonrasında PANC1 hücrelerinde kanser progresyonu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri gösteren ısı haritası



Şekil 11. Gemisitabin, Epigallokateşin ve kombinasyonları ile tedavi edilen PANC1 hücrelerinde kanser progresyonuna katkıda bulunan miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimi gösteren clustergram analizi

5 Tartışma

Pankreas kanseri tüm kanserlerin %3'ünü oluşturan küresel bir sağlık sorunu olmakla birlikte, batı ülkelerinde kanser ölümlerinin önde gelen beşinci nedenini oluşturmaktadır (Wei, Penso, Hackman, Wang, & Mackenzie, 2019). Teşhis ve prognoz yöntemlerinin yetersizliği nedeniyle teşhis edilen hastaların yaklaşık %50 sinde metastaz görülmektedir ve sağkalımları ise 6 ayı geçmemektedir. Lokal progresyon teşhisi konan hastaların yaklaşık üçte birinde medyan hayatta kalma süreleri 6 ile 9 ay arasında değişmektedir (Louvet et al., 2005).

Bu nedenle teşhis konulan hastaların %5-25'lik bir kısmına cerrahi müdahale yapılabilen ve metastatik pankreas kanseri hastalarında hem birinci basamak tedavi olarak hemde rezeksiyon sonrası gelişen relaps nedeniyle sıklıkla bir deoksitidin analogu olan gemsitabin ve floroürasil (FU) kullanılmaktadır (de Jesus, Camandaroba, Calsavara, & Riechelmann, 2020)

Fakat Gemsitabin ve 5-FU birlikte ele alan çalışmalarda, Gemsitabin'in (20.5 ay; %31 toksisite) 5-FU grubuna (16.9 ay; %22 toksisite, 0.82; P = 0.09) kıyasla daha üstün medyan ve 3 yıllık genel sağkalıma sahip olduğu ayrıca hastalıkla ilişkili semptomların hafifletilmesinde Gemsitabin'in 5-FU'dan daha efektif olduğu belirlenmiştir. Hücre içerisinde dFdCDP ve dFdCTP'ye bağlı iki ayrı mekanizma ile DNA sentezi ve onarımını inhibe ederek aktivite gösteren gemsitabin, tek ajan olarak uygulandığında her ne kadar 5-FU'dan daha yüksek aktiviteye sahip olsa da hastalarda 3 ve 4. derece toksisite oranına sahip olduğu da yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır (Regine et al., 2008).

Bu nedenle Gemsitabin'in tedavisi ile hem sağlıklı hücrelerde oluşturabileceği toksik etkinin hem de oluşabilecek ilaç direncinin bertaraf edilmesi için doğal bileşikler ile kombinasyonunun mevcut tedavi stratejilerini daha da iyileştirebilecek bir yaklaşım olabileceği vurgulanmaktadır (Hackman et al., 2020).

Ayrıca birkaç prospektif klinik çalışma, gemsitabin bazlı kombinasyon tedavinin tek ajan olarak gemsitabin tedavisine göre daha üstün olduğunu göstermiştir ve bu da yayınlanmış verilerin birkaç meta-analiziyle doğrulanmıştır (J. Jin, Teng, & Li, 2018).

Epigallokateşin gallat (EGCG), yeşil çayda bulunan baskın biyoaktif polifenoldür. Prooksidan, anti-inflamasyon, hücre döngüsü ve apoptoz modülatörü gibi farklı mekanizmalar sayesinde anti-kanser aktivite sergilemektedir. EGCG'nin hidrokسيلinin sayısı ve spesifik konumu, kanser tedavilerinde diğer kateşinlerden daha etkili olmasının yolunu açmıştır (Wei, Penso, et al., 2019)

EGCG'nin kolon, böbrek, meme ve beyin kanserleri, lösemi dahil olmak üzere çeşitli tipinde anti-kanserojen aktivite sergilediği belirlenmiştir (B. H. Chen, Hsieh, Tsai, Wang, & Wang, 2020).

Ayrıca 2009 yılında Basu ve arkadaşları tarafından, EGCG'nin pankreas kanserinde hücre döngüsü arrestine ve mitokondriyal membran potansiyeli ilişkili apoptozu modüle ettiği saptanmış ve terapötik potansiyeli açığa çıkarılmıştır (Basu & Haldar, 2009).

Vu ve arkadaşları tarafından 2010 yılında, EGCG'nin Fokal Adezyon Kinaz ve IGF-1R sinyalizasyonunu inhibe ederek pankreatik hücre hatları olan AsPC-1 ve BxPC-3 hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı belirtilmiştir (Vu et al., 2010).

Akabinde EGCG'nin pankreas kanseri üzerindeki güçlü etkinliğinin kanıtlanmasından sonra Gemsitabin ile kombine halde pankreas kanseri hücrelerindeki epitelyal ve mezenkimal geçişi AKT sinyal yolağı üzerinden regüle ederek "*Cadherin switch*" durumunu tersine çevirdiği vurgulanmıştır (Wei, Penso, et al., 2019).

Ayrıca bu ikili kombinasyonunun tek uygulanmalarından ziyade, AsPC-1 ve PANC1 hücrelerinde kaspaz-3 klivajını daha fazla stimüle ettiği gösterilmiştir (Tang, Fu, Shankar, & Srivastava, 2012).

Son olarak 2019 yılında Wei ve arkadaşları EGCG ve Gemsitabin'in kombinasyonunun kanser metabolizması üzerindeki etkisini değerlendirdiklerinde, bu iki kombinasyonun glikolitik yolağa ket vurarak pankreatik tümör gelişimini engellediklerini belirtmişlerdir (Wei, Hackman, Wang, & Mackenzie, 2019)

Fakat pankreas kanserinde Gemsitabin ve epigallokateşin gallat'ın kombinasyonunun epigenetik modülatörü olan ve kanser progresyonuna katkıda bulunan miRNA'ların ekspresyonları üzerindeki değişiklikleri inceleyen bir çalışma yer almamaktadır. Oysaki pankreas kanserinin de içinde olduğu insan kanserlerinde miRNA'ların ekspresyonlarındaki aberrant değişiklikler yaygın olarak görülmektedir (Y. Zhang et al., 2009).

Bazı miRNA'lar tümörün gelişimini ve ilerlemesini indüklemesi nedeniyle onkojenik, bazıları ise tümör süressör özellik sergilemektedir. Temel olarak onkojenik özelliğe sahip olmasının nedeni miRNA'ların tümör suppressör mRNA'ları hedef alarak ilgili protein sentezini inhibe etmesi, tümör süpressör olarak karakterize edilen miRNA'ların ise hedeflerinde onkojenik mRNA'ların olmasından dolayı onkojenik protein sentezinin inhibe olması ile ilişkilendirilmektedir. Bu bilgi ışığında miRNA'ya dayanan kanser tedavilerinde onkojenik miRNA'lara komplementer olarak bağlanarak bu miRNA'ları degrade edebilecek inhibitör oligonükleotidler veya tümör supresör miRNA'ların etkinliğini arttıracak terapötik

yaklaşımlar yeni tedavi yöntemlerini oluşturması bakımından potansiyel olarak değerlendirilmektedir (Hermeking, 2010).

Bu çalışmada Gemsitabin ve Epigallokateşin gallat'ın kombinasyonunun pankreas kanser modeli olan PANC1 hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkisi ortaya çıkarılarak, kanser progresyonunda etkili miRNA'ların ekspresyonunda neden olduğu değişimlerin saptanması amaçlanmıştır. Bu bağlamda aktif bileşiklerin IC₅₀ değeri bulunduktan sonra yapılan kombinasyon deneyi sonrasında EGCG'nin Gemsitabinin efektif %50 inhibitör konsantrasyonunu 3.14'lük DRI sergileyerek düşürmüştür. Bu iki bileşiğin kombinasyonu PANC1 hücrelerinde Fa₁₀'dan Fa₈₅'e kadar sinerjistik/güçlü sinerjistik aktivite göstermiştir. Bu sonuç, GEM ve EGCG'nin pankreas kanser modelinde geniş terapötik etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca EGCG'nin tek ve GEM ile kombinasyon halinde terapötik etkinliğe sahip olmasında, dinamik miRNA regülasyonunun rolü olabilir.

miR137, birden fazla onkojeni hedef alarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe eden bir tümör süpressör olarak görev yapmaktadır. Hatta metastatik sürecin başlangıcında yer alan anoikis inhibisyonunda da miR137'nin in vitro ve vivo çalışmalarda aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (J. Xiao et al., 2014). Sonraki çalışmalarda miR137'nin hedefinin paxillin, Akt ve fokal adezyon kinaz (FAK) olduğunu öne sürülmüş ve sonraki çalışmalarda paxillin'nin pankreas kanser hücrelerinin anoikisi inhibe ettiği fakat miR137'nin fonksiyonel bir hedefi olan paxillin, Akt ve fokal adezyo kinazların baskılanmasının anoikisin önünü açacağı bildirilmiştir (Kanteti, Batra, Lennon, & Salgia, 2016).

Ayrıca pankreas kanser dokularında Akt' nin overeksprese olduğu ve özellikle gemsitabin direncinde Akt'nin major role sahip olduğu gösterilmiştir (Kagawa et al., 2012).

Bu çalışmada da GEM ve EGCG'nin tek uygulanmasının tümör süpressör olarak karakterize edilen miR137 ekspresyonunu arttırdığı fakat aktif bileşiklerinin kombinasyonunun tek uygulamaya göre miR137'nin upregülasyonunu daha fazla indüklediği belirlenmiştir. Bu sonuç, EGCG'nin de GEM'e benzer şekilde miR137 aracılı olarak paxillin, Akt ve FAK'ı hedefine aldığı ve ikili kombinasyonun ise pankreas tümör dokusunda lamellipod oluşumu ile migrasyonu destekleyen FAK ve paxillin, ayrıca malign progresyon ve sağkalımda görevli Akt'nin hedeflenmesini miR137 aracılı olarak artırabileceğini göstermektedir (Kanteti et al., 2016).

miR130a, kemorezistans gelişiminde rol oynayan, yüksek riskli premalignant pankreatik lezyonlarda ekspresyonu azaldığı belirtilen mikro RNA olarak bilinmektedir (Permeth-Wey et al., 2015).

Pankreas kanseri dışında nazofarenks kanser dokularında upregüle olduğu, GEM dirençli hepatosellüler karsinomada ise Smad4 ekspresyonunu inhibe ederek hücre migrasyon ve invazyonunu modüle ettiği saptanmıştır (X. Chen et al., 2017).

Ayrıca özafagus kanserinde miR130a-3p'nin ekspresyonunun artışının kaspaz 9 transkriptom düzeyinde artış ve anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik XIAP protein seviyelerinin azalması ile korelasyon gösterdiği dolayısıyla p53 aracılı apoptotik yolu etkinleştirdiği ortaya çıkarılmıştır (X. Chen et al., 2017).

Bu çalışmada ise GEM ve EGCG ile tedavi edilen pankreas kanser modelinde ekspresyonu artmış ve ikili uygulanması ile upregülasyonu tek ilaç uygulamalarına göre daha yüksek artış göstermiştir. Literatür ile uyumlu olarak bizim sonuçlarımızda da PANC1 hücrelerinde GEM ve EGCG'nin ikili tedavisi ile miR130a-3p'nin posttranskripsiyonel düzenlenmesi sonucunda apoptozun indüklenmesinde rol oynayıp, tümör süpressör olarak aktiviteye sahip olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca miR130a-3p'nin ise tümör süpressör aktiviteye sahip olup pankreatik duktal adenokarsinoma'da kötü prognoz ile ilişilendirilen EPS8, ZWINT, SMC4, LDHA, GJB2, ZCCHC24, TOP2A, ANLN, ADCY3 genlerini hedeflediği keşfedilmiştir (Fukuhisa et al., 2019).

Bu çalışmada GEM uygulaması ile birlikte downregüle olmuş fakat EGCG'nin GEM'in terapötik potansiyelini artırması ile tümör süpressör miR130a-3p ekspresyonu da artmıştır.

miR27a-3p ekspresyonu, pankreas karsinom dokularında ve hücre hatlarında önemli ölçüde yukarı regüle edilmektedir. Overekspresyonu sonucunda pankreas karsinoma hastalarında lenf nodu metastazı, mevcut peritoneal metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. miR27a-3p, vasküler endotelyal büyüme faktörü A ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 ekspresyonunu aktive ederek pankreas karsinom hücrelerinin migrasyonunu ve anjiyogenezini desteklediği saptanmıştır (Silvestris et al., 2017).

Ayrıca pankreas kanser hastalarından alınan örneklerinde, EMT sürecini ve hücreleri birbirinden ayrılarak invaziv davranış kazanmalarını inhibe eden GATA6 mRNA'sının miR27a-3 hedefinde olduğu ve aralarında negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Martinelli et al., 2017).

Ek olarak Sun ve arkadaşlarının melanom hücrelerinde ZBTB10 and Sprouty2 mRNA transkriptlerinin miR27a-3p hedefi olduğu ve bu hedefler üzerinden miR27a-3p'nin hücre sağkalımı ve büyümesinin kontrolünün sağlandığı gösterilmiştir (Q. Sun et al., 2009).

Yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak PANC1 hücrelerinin GEM ve EGCG'nin tek doz ve kombinasyonu ile tedavi edilmesi sonucunda miR27a-3p'nin ekspresyonunun azalması, miR27a-3p'nin pankreas kanserinde GEM ve EGCG'nin ikili uygulanması ile hedeflenmesi

gereken açık bir onkojenik açık bir hedef olduğunu göstermektedir. , PANC1 hücrelerinde miR27a-3p'nin aşağı regülasyonu ile SPRY2 aracılı olarak RAF/MEK/ERK1/2, ZBTB10 bağlantısı ile VEGF, COX2, Survivin kontrol altına alınarak tümör hücrelerinin kaderi değiştirilebilir (Lai et al., 2013).

miR141-3p, farklı kanserlerde tümör süpressör ya da onkogen olarak rol oynayarak pleiotropik etki gösteren posttranskripsiyonel bir düzenleyicidir. Özafagus kanserinde tümör gelişimini destekleyen bir faktör olarak rol oynamış, prostat kanserinde KLF9'u hedefleyerek kanser progresyonuna katkıda bulunmuştur (Y. Y. Jin et al., 2016).

Bunun aksine glioma ve meme kanserinde transkripsiyon faktörü 5'in aktivitesini düzenleyen ve p27 / Kip1, CDK6, PR ve Stat5a'yı regüle eden etki ederek bir tümör baskılayıcı olarak rol oynamıştır (M. Wang et al., 2017).

Pankreas kanserinde ise tümör dokusunda düşük ekspresyon profili sergilerken paratümör dokusunda ekspresyonu yükselmiştir. Özellikle miR141-3p'nin pankreas kanserinde Xist ile negatif korelasyon ile çalıştığı ve miR141-3p'nin downregülasyonu ile TGF-β2'nin aktive olduğu saptanmıştır (J. Sun & Zhang, 2019).

Bu çalışma ile tek ve kombinasyon halinde ilaçların uygulanmasıyla miR141-3p'nin ekspresyonunun arttığını saptadık. GEM, EGCG ve kombinasyonları, pankreas kanser hücrelerinde miR141-3p'nin onkojenik rolünü tersine çevirmiştir.

Tüm miRNA'lar arasında miR30c-5p, küçük hücreli akciğer kanseri (NSCLC) , prostat kanseri ve özofagus skuamöz hücreli karsinom gibi çok sayıda malign tümör progresyonunun anahtar düzenleyici geni olarak görev yapar (Zhou et al., 2019).

Birçok çalışmada miR30c-5p ekspresyon seviyesinin, eşleşen normal dokulara kıyasla PDAC tümör dokularında önemli ölçüde aşağı regüle edildiği gözlemlenmiştir (p=0,0045). Ekspresyonlarının iki PDAC hücre hattında (PANC1 ve SW1990) düşük olduğu doğrulandırılmıştır.(Zhou et al., 2019)

Ago2, miRNA'lara bağlanan RISC'nin önemli bir bileşenidir. Tanaka ve arkadaşları transfekte miRNA'ların PDAC hücrelerinde RISC'ye dâhil edilip edilmediği, bir Ago2 antikoru kullanılarak immünopresipitasyon ile analiz etmişlerdir (Mori, Tanaka, & Shimokawa, 2018).

Transfekte edilmiş miRNA'ların (miR30c-5p ve miR30c-2-3p), PANC1 hücrelerinde işlev gördüğü gösterilmiştir. Çalışmada pre miR30c'nin (miR30c-5p ve miR30c-2-3p) her iki sarmalına odaklanılmış. Ektopik ifade deneylerinde, her iki miRNA ipliğinin PDAC hücrelerinde kanser hücresi çoğalmasını, göçünü ve istilasını hafiflettiğin ortaya çıkarılmıştır (J. Fan et al., 2017).

Önceki çalışmalar, çeşitli kanser türlerinde miR30c-5p'nin aşağı regülasyonunu göstermiştir ve düzenlediği onkojenler, hücre proliferasyonu, metastaz ve ilaç direnci gibi çeşitli kanser yollarında rol oynamıştır. Örneğin, DLEU2'nin (lncRNA) aşırı ifadesi miR30c- 5p'yi baskılayan adsorbe edilmiş bir RNA olarak işlev görür ve daha sonra laringeal skuamöz hücreli karsinomlarda Akt sinyal yolunu aktive eder. Mide kanserinde, miR30c-5p ekspresyonunun kanser dokularında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir ve ayrıca MTA1'i hedefleyerek hem metastazı hem de EMT sürecini baskıladığı keşfedilmiştir (J. Fan et al., 2017).

Bu çalışmada da GEM ve EGCG'nin tek uygulanmasının miR30c-5p'nin ekspresyonunu azalttığı ayrıca aktif bileşiklerinin kombinasyonunun tek uygulamaya göre downregülasyonunu daha fazla indüklediği belirlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda, miR30c-5p ekspresyon seviyesinin, PANC1 hücrelerinde önemli ölçüde aşağı regüle edildiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, miR30c-5p'nin PANC1 hücrelerinde ekspresyonunun azalmasının, GEM ve EGCG kombinasyonunun Akt üzerinden hücrenin sağkalım ve metastatik yayılım isteği üzerine sinyal iletiminin önüne geçebileceğini göstermektedir.

miR144, memelilerde bulunan bir microRNA öncül ailesidir. miR144-3p, bu miRNA ailesine aittir ve işlevi akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, renal hücre karsinomu ve tiroid kanseri dâhil olmak üzere çeşitli neoplazmalarda araştırılmıştır. MiRNA'ların anormal ekspresyonu genellikle çok sayıda kanserin oluşumunu ve ilerlemesini teşvik eder. Birkaç araştırma, miR144-3p'nin çeşitli kanser türlerinde önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini ve bir tümör baskılayıcı olarak davrandığını bildirirken, diğer çalışmalar miR144-3p'nin diğer kanser türlerinde bir onkojen olarak işlev gördüğünü göstermiştir. miR144-3p, birçok kanser türünün tümör oluşumunda rol oynamaktadır. Önceki çalışmalarda miR144-3p'nin glioblastoma, mesane kanseri, laringeal skuamöz hücreli karsinom gibi birçok kanserde azaldığı bildirilmiştir. miR144-3p'nin birçok kanser türünde güçlü bir antitümör etkisi de gösterilmektedir (Zheng, Guo, Zheng, Cheng, & Huang, 2018).

B. YOU ve K.-C. ZHANG 'in MiR144-3p ekspresyonu için yaptıkları çalışmada, androjene bağımlı prostat kanseri (ADPC) tümörlerine kıyasla hem kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) dokularında hem de hücre hatlarında ekspresyonun önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada da GEM ve EGCG'nin tek uygulanmasının miR144-3p ekspresyonunu azalttığı, aktif bileşiklerinin kombinasyonunun tek uygulamaya göre miR144-3p'nin upregülasyonunu daha fazla indüklediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda miR144-3p ifadesinin PANC1 tümör hücrelerinde önemli ölçüde aşağı regüle edilmesi ve miR144-3p'nin aşırı ifadesi hücrelerin proliferatif ve klonojenik yeteneklerini azaltabilir ve apoptotik yolağın

stimülasyonunu teşvik edebilir. Bu durum kombinasyon ile tedavi edilen pankreas kanser hücrelerinde miR144-3p'nin tümör süpressör özelliğini ortaya çıkarmaktadır (You & Zhang, 2018).

miR182-5p'nin meme kanseri ve akciğer kanserinin ilerlemesindeki işlevleri hakkında birçok rapor bulunmaktadır. Önceki birkaç çalışma da, miR182-5p'nin prostat kanseri ilerlemesi ile ilişkili olduğunu ve yüksek dereceli kanser için iyi bir belirteç olarak hizmet edebileceğini bildirilmiştir. Bununla birlikte, miR182-5p'nin yukarı akış regülatörü bu çalışmalarda tanımlanmamıştır. Bunun üzerine Jingjing You ve arkadaşları miR182-5p'nin AR-pozitif hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiğini buldular (Yao et al., 2016).

miR182-5p ekspresyonu AR aktivitesi ile korelidir ve AR, doğrudan promoter bölgesine bağlanır. Bu bağlamda, miR182-5p'nin prostat karsinogenizindeki anahtar rolünü daha da destekleyen AR-güdümlü bir regülatör olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır. Ayrıca miR182-5p'nin hücrel işlevlerinin, membran protein içselleştirmesinde rol oynayabilen ve kanser baskılayıcı bir gen olarak kabul edilen ARRDC3'e bağlı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada GEM ve EGCG'nin tek uygulanmasının miR182-5p ekspresyonunu denk seviyelerde azalttığı ve aktif bileşiklerinin kombinasyonunda miR182-5p ekspresyonunun azaltıldığı gözlemlenmiştir (Yao et al., 2016).

Sun ve arkadaşları tarafından miR425-5p'nin farklı insan kanserlerin de anormal olarak ifade edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca Sun ve arkadaşları Servikal kanser dokularında yüksek miR425-5p ekspresyonunun, tümör aşaması ve lenf düğümü metastazı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (L. Sun et al., 2017).

Bazı araştırma raporlarında miR425-5p'nin tümör oluşumunu, büyümesini ve daha yüksek bir aşamaya ilerlemesini teşvik etmek için onkojenik gen görevi gördüğünü gösterir niteliktedir. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında, miR425-5p'nin mide kanseri dokularında komşu dokulara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu, mide kanseri hücrelerinin invazyonunu ve metastazını teşvik ettiği bulunmuştur. miR425-5p'nin pankreas kanseri tümör dokularında ifadesi, lenf düğümü metastazı, klinik aşama ve farklılaşma derecesi ile ilişkilidir (Y. Lu, Wu, & Wang, 2019).

Bu çalışmada PANC1 hücrelerinin GEM ve EGCG'nin tek doz ve kombinasyonu ile miR425-5p'nin ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durumda miR425-5p'nin PANC1 hücrelerinde ekspresyonunun azalması bu genin bir tümör süpressör gen olduğu ve apoptozu indüklediği sonucuna vardırılabilmektedir (Lumayag et al., 2013).

Çalışmalar da miR183, çeşitli hücrel süreçlerin modülasyonunda rol aldığı ve habis tümörü ayırımında önemli olduğunu göstermiştir (Leung, He, Chan, Law, & Wong, 2015). Ek olarak

miR183, tümör invazyonu ve metastazının düzenleyici mekanizmalarında da rol oynamaktadır (Kundu et al., 2016).

Çalışmalar, miR183'ün meme kanseri (Ouyang et al., 2014) ve prostat kanseri (Mihelich et al., 2011) dâhil olmak üzere tümör türlerinin çoğunda aşırı eksprese edildiğini bildirmiştir (Ventura & Jacks, 2009). Bununla birlikte, miR183'ün retinoblastoma (J. Wang, Wang, Li, Liu, & Teng, 2014) ve akciğer kanseri (J. Wang et al., 2014) gibi belirli tümörlerde aşağı doğru düzenlendiğini ve bir tümör baskılayıcı görevi görebileceğini de vurgulamaktadır. Bir dizi çalışma, miR183 kanserojen mekanizmasının onkojenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesine bağlı olduğunu da göstermiştir: Ueno ve arkadaşları (Ueno et al., 2013), Dkk-3 ve SMAD4'ü miR183'ün potansiyel hedef genleri olarak tanımlarken, Tanaka ve diğerleri (Tanaka et al., 2013) glioblastomlarda miR183'ün yukarı regülasyonunun hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Malignitede miR183'ün fonksiyonel çalışması daha önce çoğu tümörde bildirilmiştir (Van Keuren-Jensen et al., 2016). miR183'ün kanser hücrelerinde biyolojik fonksiyonları modüle ettiği çok sayıda hedefi olması muhtemeldir (Pak, Lee, Lee, Shin, & Roh, 2015). miR183-5p'nin yüksek ekspresyon seviyeleri, böbrek hücresi kanserli hastaların daha kötü prognozlarını öngören düşük genel sağkalım oranları ile korelasyon göstermektedir. Ayrıca, miR183-5p'nin çeşitli hedef genlerle etkileşimi yoluyla akciğer adenokarsinomunda onkojenik bir rol oynadığı da gösterilmiştir. Dahası miR183-5p'nin yukarı regülasyonu, üçlü negatif meme kanseri (Park et al., 2011) ve mesane kanseri gibi diğer kanser türlerinde rol oynamaktadır.

Yüksek miR183 ekspresyon seviyeleri, pankreas kanserinde de bildirilmiştir (Park et al., 2011). miR183-5p ekspresyonunun pankreas kanseri hücre çizgilerinde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği, SOCS-6 ekspresyonunun ise Pankreas kanseri dokularında ve hücre hatlarında belirgin şekilde aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Park et al., 2011) ve bu miRNA'nın Pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını artırabildiği gösterilmiştir. miR183-5p'nin aşağı regülasyonu, onkojenik etkileri kısmen zayıflattığı, bu da bu molekülün bir onkojen olarak hareket edebileceğini göstermiştir

Bu doğrultuda, PANC1 hücrelerinin GEM ve EGCG'nin tek doz ve kombinasyonu ile miR183-5p'nin ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. GEM ve EGCG'nin kombinasyonlarının, tek dozlarına oranla daha fazla ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuca dayanarak miR183-5p'nin pankreas kanserinde tümör süpressör olarak rol oynadığı ve GEM, EGCG ve iki kombinasyonda meydana gelen apoptozun nedenlerinden biri olabileceği fikrini bize kazandırmıştır.

Son yıllarda miR187, tümör hücresi çoğalmasında ve apoptoz ile ilgili önemli bir miRNA olarak kabul edilmektedir. miR187 ekspresyonunun farklı tümör tiplerinde önemli ölçüde değiştiği

bulunmuştur. miR187 ekspresyonu prostat kanserinde benign prostat hiperplazisine (BPH) kıyasla azaldığı ve (Casanova-Salas et al., 2015) benzer şekilde miR187 ekspresyonu mesane kanserinde (BC) azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Z. Li et al., 2018). Zhao J, vd. berrak hücreli renal hücreli karsinom (ccRCC) dokularında yüksek miR187 ekspresyonunu tespit etmişlerdir (Zhao et al., 2013). Kolorektal kanser (CRC) ve hepatoselüler karsinom (HCC) gibi sindirim sistemi kanserlerinde miR187'de bir azalma olduğu gözlenmiştir (Dou et al., 2016). miR187, oral skuamöz hücreli karsinomda (OSCC) kanserojen bir rol oynadığı ve hastanın plazmasında anlamlı derecede yüksek miR187 seviyesi tespit edildiği gösterilmiştir (S. C. Lin et al., 2016), miR187 ekspresyonu meme kanseri hücre dizilerinde, özellikle lümen B hücre dizilerinde yukarı regüle edilmiştir (Matamala et al., 2016). MikroRNA'ların çeşitli tümörlerde anormal ekspresyonu, kanser hastalarının prognozu ile yakından ilişkili olabildiği gösterilmiştir. Metastatik meme kanserinde (MBC), bir çalışma, miR187-3p'nin yukarı regülasyonunun, sırasıyla artmış progresyonsuz sağkalım (PFS) ve genel sağkalım (OS) ile ilişkili olduğu doğrulandığını bildirmiştir. Çalışmalarda miR187'nin aşırı ekspresyonunu takiben TGF- β 1, p-Smad4, ERCC3 ve ERCC4'ün protein ekspresyonları önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmiştir (Zhu, Li, Lv, & Wang, 2019). miR187, osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilen bir tümör baskılayıcısı olarak görev aldığı başka bir çalışmada gösterilmiştir (Y. Xiao, Zhao, Du, Chen, & Zhou, 2018). Benzer şekilde, cui ve ark., miR187'nin işletim sisteminde aşağı regüle edildiğini ortaya çıkarmıştır. MAPK12'nin miR187'nin doğrudan hedefi olduğu doğrulanmış ve azaltılmış miR187, MAPK12 ekspresyonunu artırabildiği ve osteosarkom kanserinin ilerlemesini daha da teşvik edebildiğini göstermiştir. (Cui & Shi, 2017) İlginç bir şekilde, Chao ve ark. over kanserinde (OC) miR187'nin aşağı akış hedefi olan Dab2'nin kanser gelişiminde ikili bir role sahip olduğunu bulmuştur. Pek çok kanıt, Dab2'nin bir tümör baskılayıcı olduğunun altını çizmektedir. Bununla birlikte, Dab2'nin bir tümör baskılayıcı olarak rolü, yalnızca OC'nin erken aşamalarında gösterilmiştir. Spesifik olarak, OC'nin ilk aşamasında yukarı regüle edilmiş miR187, hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (Chao et al., 2012).

miR187 ayrıca çeşitli tümörlerde göç ve invazyonun düzenlenmesinde rol oynar. Çeşitli çalışmalar, miR187'nin, reseptör sinyalleme veya protein kinazlarının epitel-mezenkimal transformasyonu (EMT) ile ilişkili aşağı akış efektörleri olarak hareket ettiğini göstermiştir. Örneğin, TGF aracılı Smad, MAPK ve PI3K / AKT sinyali ve matris metaloproteinaz-2/7/9 (MMP-2/7/9) hepsi EMT sürecine katılır.

Sonuç olarak miR187, çeşitli kanserlerde farklı ekspresyon ve düzenlemeye sahiptir ve bir tümör baskılayıcı gen veya bir onkojen olarak kullanılabilir. Ayrıca miR187, bazı kanserler için kemoterapi ve radyoterapiyi duyarlı hale getirebilir. miR187, proliferasyon, apoptoz, göç,

istila ve hücre döngüsü regülasyonu dâhil olmak üzere kanserin çoklu hücrel süreçlerinde rol oynar.

Bu sonuçlar doğrultusunda bu çalışmada GEM ve EGCG'nin tek uygulanmasının miR187-3p ekspresyonunu azalttığı ve bileşiklerinin kombinasyonunda miR187-3p ekspresyonunu daha da azaltarak apoptoza neden olduğu söylenebilmektedir.

miR9-3p ekspresyonunun, meme kanseri ve hepatoselüler karsinom dâhil olmak üzere birçok insan kanserinde des-regüle edildiği gösterilmiştir (Higashi et al., 2015). Daha düşük miR9-3p ekspresyon seviyesine sahip hastaların önemli ölçüde daha kötü genel sağkalıma sahip olduğunu ve miR9-3p ekspresyonunun 5 yıllık genel sağkalım için bağımsız bir prognostik faktör olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca miR9-3p'nin aşırı ekspresyonunun mide kanseri hücre istilasını önleyebileceğini, miR9-3p ekspresyonunun mide kanserlerinde önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini ve kanser hücresi istilası ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur.

Bir başka çalışmada, miR-9 seviyelerinin Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC) hastalarından alınan tümör dokularında önemli ölçüde azaldığını ve PDAC hücrelerinin doksorubisin duyarlılığı ile pozitif olarak ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. PDAC hücrelerinde miR-9 ekspresyon seviyelerindeki artışlar, otofajiyi baskılayarak tümör hücrelerini doksorubisine duyarlı hale getirmiştir.

Anormal miR-9 ekspresyonu, PDAC dâhil olmak üzere birçok kanser türünde gözlenmiştir ve farklı genleri hedefleyerek dokulara veya çeşitli kanser vakalarına göre tümör gelişimi üzerinde oldukça farklı etkiler sergilemektedir (Y. Wu et al., 2020).

Aynı zamanda miR9-3p, Hepatoselüler karsinom hücrelerinde (HCC) iyi karakterize edilmiş bir tümör baskılayıcı miRNA'dır (Higashi et al., 2015). HCC'deki miR9-3p, TAZ ve HBGF-5 gibi birçok onkojenik proteinin üretimini baskılamaktadır (Higashi et al., 2015). Ayrıca miR9-3p'nin nazofaringeal karsinomda ITGB1, FN1 ve ITGAV'ı aşağı regüle ederek epitel-mezenkimal geçişi inhibe edebileceği bildirilmiştir (Ding, Pan, Liu, Jiang, & Jiao, 2017). Aşağı regüle edilmiş miR9-3p'yi ve mi-9-3p aşırı ekspresyonundan sonra teşvik edilen kanser hücresi göçü ve istilası gözlemlenmiştir, bu da bunun HCC'deki tümör baskılayıcı rolünü daha da doğrulamaktadır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmamızda PANC1 hücrelerinin GEM ve EGCG'nin tek doz ve kombinasyonu ile miR9-3p'nin ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum miR9-3p'nin PANC1 hücrelerinde ekspresyonunun azalmasında bu genin tek başına ve kombinasyonu ile etkili olabileceği gösterilmiştir.

Son zamanlarda, biriken kanıtlar, miR-222'nin kanser hücresi çoğalmasında önemli bir rol oynadığını ve miR-222'nin aşırı ekspresyonunun meme kanseri, kolorektal karsinom, glioblastoma ve mesane kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde bulunduğunu göstermiştir (Hwang et al., 2013). Yüksek miR-222 ekspresyonunun, Ki67 ekspresyon seviyesi ve PDAC'de daha kötü postoperatif sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu veriler miR-222'nin PDAC ilerlemesi ve oluşumunda onkojenik gen olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir. Greither et al.'un yapmış oldukları çalışmada Pankreas duktal adenokarsinomunda yükseltilmiş miR-222 ekspresyonu ile genel hayatta kalma süresi arasındaki önemli korelasyon olduğu ve (Greither et al., 2010) miR-222'nin yukarı regülasyonu, büyüme faktörü sinyal yolu ile S-fazına girerek hücre ölümünü tetiklemeden hücrenin hayatta kalmasını sağladığını göstermiştir (Medina et al., 2008).

Bu çalışmalar doğrultusunda yaptığımız çalışmada GEM'in tek uygulanmasının miR222-5p'in ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir.

miR21-5p, pankreas kanseri hastalarının serumunda ve dokusunda yüksek ekspresyon profili sergileyen ve prognostik değere sahip olan umut verici bir marker olarak kullanılmaktadır (Qu et al., 2017).

Giovanetti ve arkadaşları, miR21'in gemsitabine dirençli pankreas kanseri hücrelerinde yukarı regüle edildiğini ve dirençli hücrelerin yüksek ekspresyon seviyesi ile sağkalım ve invazyon yeteneklerini arttıracak aracı genlerin ekspresyonunu modüle ettiğini, miR21 susturulmasının ise pankreas kanser hücreni gemsitabine duyarlı hale getirdiğini göstermiştir (Khan, Zubair, Srivastava, Singh, & Singh, 2015)

Nitekim bu çalışmada da GEM uygulanan grupta kayda değer bir değişiklik söz konusu değilken, EGCG uygulanan grupta miR21-5p ekspresyonu azalmış ve ilaçların ikili uygulaması tek EGCG uygulamaya nazaran miR21-5p'nin posttranskripsiyonel aktivitesini daha da azaltmıştır. EGCG uygulaması hücreleri gemsitabine daha duyarlı hale getirmiş böylece, miR21-5p, EGCG'nin GEM'in dozunu azaltmasının nedenlerinden birini oluşturmuş olabilir.

Gemsitabin direncinin açıklanması için birçok mekanizma önerilmiş ve bunlardan birinin ise aberrant miRNA ekspresyonu olduğu belirtilmiştir. Bunu takiben yapılan çalışmalarda miR217'nin hem dirençli hem de parental pankreas kanserli dokularda güçlü bir şekilde aşağı regüle olduğu bulunmuştur. miR217 mimic ile gemsitabin dirençli pankreas kanser hücrelerini transfekte ettiklerinde hücre canlılığının azaltarak apoptozun artarak ve hücre döngüsünün S fazında arreste uğratarak gemsitabin direncinin tersine çevrildiği belirlenmiştir (Panebianco et al., 2021)

GEM ve ikili kombinasyonda miR217'nin ekspresyonunun artışı, EGCG'nin primidin anti-metabolitine karşı pankreas kanser hücrelerinin hassasiyetini arttırdığını göstermektedir

Zhang X ve arkadaşlarının 2020 yılı çalışmalarında safra kesesi kanseri, mide kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC) ve mesane kanseri dâhil olmak üzere bazı malignite türlerinde aşağı regüle edilmiş miR324-5p ekspresyonu bulmuşlardır (X. Zhang, Zhang, Chen, & Liu, 2020).

Habis tümörlerde bu ekspresyon seviyeleri, miR324-5p farklı genleri hedef alarak, bir tümör süpressör olarak hareket edebildiğini gösterir niteliktedir. Ayrıca safra kesesi kanserinde miR324-5p ekspresyonunun restorasyonu, doğrudan dönüştürücü büyüme faktörünü (TGF) - β hedefleyerek in vitro hücrelerin göçünü, işgalini ve epitel-mezenkimal geçişini önemli ölçüde inhibe edebileceği kanıtlanmıştır. Zhichan Ba ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda NSCLC'de miR-324-5p'nin FBXO11'i hedefleyerek sisplatin karşı direnç gelişimini güçlendirdiğini doğrulanmıştır (Ba, Zhou, Yang, Xu, & Zhang, 2019).

Meini Wu ve arkadaşları kolon kanserinde miR324-5p, FGFR3'ü hedefleyerek kolon kanseri hücre apoptozunu indükleyebildiğini doğrulamışlardır (M. Wu et al., 2019).

Mesane kanserinde ise miR324-5p'nin FOS'u hedefleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (M. J. Fan et al., 2020).

Bu çalışma da PANC1 hücrelerine GEM tek doz uygulamasında miR324-5p ekspresyonu anlamlı sonuçlar vermemiştir fakat EGCG'nin tek doz ve kombinasyonunun uygulanması ile miR324-5p'nin ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durumda PANC1 hücrelerinde miR324-5p'nin ekspresyonunun azalması, miR324-5p'nin pankreas kanserinde tümör süpressör olarak rol oynayıp ve GEM, EGCG ve iki kombinasyonda meydana gelen apoptozun nedenlerinden biri olabileceğini göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar miR486-5p'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat kanseri dâhil olmak üzere çeşitli tümör türlerinde önemli bir biyobelirteç olarak hizmet ettiğini göstermektedir (Y. Yang et al., 2017).

Ali ve arkadaşları, miR486-5p seviyesinin pankreas kanserli hastalarda önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır (Ali, Saleh, Sethi, Sarkar, & Philip, 2012).

Ayrıca miR486-5p'nin pankreas kanseri hücrelerindeki rolü henüz tam olarak bilinmiyorken 2020 yılında Wei Wang ve arkadaşları, pankreas kanseri olan hastalar için umut verici bir terapötik yön sağlamak amacıyla miR486-5p'nin 5-Fu'nun pankreas kanseri hücreleri üzerindeki anti-tümör etkisini artırıp artırmayacağını belirlemeyi amaçlamışlardır (W. Wang et al., 2020).

Çalışmalarında miR486-5p'nin aşağı regülasyonu, in vitro olarak PANC1 hücrelerinde 5-Fu kaynaklı apoptozu arttırmıştır. miR486-5p'nin aşağı regülasyonu, in vivo 5-Fu'nun anti-tümör etkisini artırabilir. Bu veriler, miR486-5p'nin aşağı regülasyonunu in vitro ve in vivo 5-Fu'nun anti-tümör etkisini artırabildiğini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında miR486-5p'nin aşağı regülasyonunun GEM'inde anti-tümör etkisini artırabildiğini düşündürmektedir (W. Wang et al., 2020).

Bu çalışma da PANC1 hücrelerine GEM tek doz uygulamasında miR486-5p ekspresyonunun azaldığını gözlemliyoruz. Bu durum GEM'in PANC1 hücrelerinde antikanser aktivasyonunun arttığını düşündürebilir. EGCG'nin tek doz miR486-5p'nin ekspresyonunun anlamlı sonuçlar vermediği gözlemlenmiştir. Kombinasyonunda ise miR486-5p'nin PANC1 hücrelerinde ekspresyonunun azalması bu genin apoptozu indiklediğini düşündürmektedir. Ayrıca pankreas kanserinin erken aşamalarında önemli bir biyobelirteç olabilir.

Düşük miR30 ekspresyonu, çeşitli kanserlerin oldukça agresif davranışları ile yakından ilişkilidir (Zhong, Chen, Han, & Li, 2014). Artan kanıtlar, miR30 aile üyelerinin EMT sürecini (Kao et al., 2014) düzenleyerek tümör başlangıcında ve ilerlemede önemli roller oynayabileceğini göstermektedir. Daha da önemlisi, düşük miR30b seviyesi ve yüksek Snail ekspresyonu olan hastalarda, diğer hastalarla karşılaştırıldığında belirgin şekilde olumsuz sağkalım sergilediği gösterilmiştir (Xiong et al., 2018).

miR-30b'nin rolü, pankreas, mide ve akciğer kanseri dâhil olmak üzere çeşitli malignitelere incelenmiştir; hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, istila ve metastaz gibi çoklu işlemlerin düzenlenmesinde yer aldığı bilinmektedir. Ek olarak miR30b, karsinogenez sırasında kanser kökü benzeri hücrelerde epitel belirteçlerinin azaltılmış ekspresyonu ve mezenkimal belirteçlerin yukarı regülasyonu ile karakterize edilen fenotipik bir dönüşüm olan epitel-mezenkimal geçişte (EMT) önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. miR30b, Snail aracılı EMT'yi ve bunun sonucunda pankreas kanseri kök hücrelerinin ve hepatom hücrelerinin göç ve invazif kapasitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (X. Sun et al., 2017; Xiong et al., 2018).

Çalışmalar gösteriyor ki miR30b'nin ekspresyonu meme kanseri dokularında normal dokulara göre daha düşük olduğu (Hafez et al., 2012), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri primer tümörlerinde aşağı doğru düzenlendiği gösterilmiştir (Hu et al., 2016). 2014 yılında yapılan bir çalışmada, mide kanseri dokusunda ve 4 mide kanseri hücre hattında miR30b-5p ekspresyonunun azaldığı ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Qiao et al., 2014). Ayrıca Wszolek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da (Wszolek et al., 2011), invazif mesane kanserinde miR30b ekspresyonunun normal dokulara kıyasla yine aşağı regüle edildiğini bulmuşlardır.

Sonuç olarak tüm kanser dokularında gözlemlenen miR30b-5p'nin ekspresyonlarındaki azalış bizim yaptığımız çalışma ile GEM'in tek dozu miR30b-5p'nin ekspresyonunda artışa sebep olmuştur.

miR296-5p, prostat kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonu ve ankorajdan bağımsız büyüme kabiliyetini azaltmaktadır. Kuen-Haur Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, miR296-5p'nin restorasyonunun, Pin1 proteininin ekspresyonunu sustuğu ve prostat kanseri hücre proliferasyonunu bastırıldığı kanısına vapmışlardır. Bu bulguların, miR296-5p'nin normal prostat hücrelerinde onkojenik Pin1'i doğrudan bastırarak tümör oluşumunun bir baskılayıcısı olduğuna dair kanıt sağladığı araştırmacılar tarafından düşünülmektedir. miR296-5p ekspresyonunun azalması, prostat kanseri hastaları için anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesinin yeni bir terapötik yol açabileceğini düşündürmektedir (Lee et al., 2014).

Bu çalışma da PANC1 hücrelerine GEM tek doz uygulamasında miR296-5p ekspresyonunun azaldığını gözlemliyoruz. Bu durum GEM'in PANC1 hücrelerinde antikanser aktivitesinin arttığını düşündürebilir. EGCG'nin tek doz ve kombinasyonunda miR486-5p'nin ekspresyonunun anlamlı sonuçlar vermediği gözlemlenmiştir.

Kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen kemoterapötiklerin sitotoksik etkisi, kanser hücrelerinin ilk olarak büyümesini inhibe eden ve sonrasında ise ölümünü teşvik eden ana mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmektedir. Apoptoz, kemoterapötik ilaçların malignitelere karşı en önemli tepkilerden biri olduğu bilinmektedir. Ribonükleotid redüktazın aktivitesini baskılayarak antitümör rolü oynayan, böylece DNA sentezini inhibe eden ve hücre çoğalmasını ve bölünmesini bloke eden çözünebilir bir deoksisitidin analogu olan GEM'in pankreas kanseri hücrelerinde indüklediği apoptoz altında yatan moleküler mekanizmalar incelendiğinde pro-apoptotik TP53INP1 geninin ve GSK-3 β (Ser9) proteininin yukarı regüle edildiği, anti apoptotik PAP, c-IAP2 ve Bcl-2'de dramatik bir düşüşe yol açtığı ve bunun sonucu olarak Kaspaz -3 ve Kaspaz-9 aktivitesi ile sitotoksik etki sergileyerek apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Jiang, Motoo, Sawabu, & Minamoto, 2006).

EGCG'nin pankreas kanserindeki apoptotik etkisi ile ilgili olarak bugüne kadar yapılan araştırmalara bakıldığında, Bcl-xl, XIAP ve survivin seviyelerini azaltırken, proapoptotik protein Bad seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Wei ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Bcl-2 modülasyonunu sağlayan ERK1/2 fosforilasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Wei et al., 2020).

Tang ve arkadaşları EGCG'nin total ve fosforile STAT3 seviyesini azaltarak, STAT3 ile düzenlenen genlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini ayrıca Kaspaz 3 aktivasyonu ve PARP klevajı ile pankreas kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklediğini belirtmişlerdir (Tang et al., 2012).

Bu çalışmada ise aktif bileşik uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, GEM, 4.24 kat, kombinasyon ise 12.04 kat apoptozu indüklemiştir. GEM ve EGCG'nin kombinasyonu apoptoz üzerinde de sinerjistik etki göstermiştir.



6 Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada GEM ve EGCC'nin tek doz ve kombinasyonlarının PANC1 hücreleri üzerindeki epigenetik modülatör olan ve kanser progresyonunda rol oynayan miRNA'ların ekspresyonları üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak, tümör süpressör role sahip olan miR137, miR130a-3p, miR130b-3p, miR141-3p, miR217'nin yukarı regülasyonunun ve onkojenik role sahip olan miR27a-3p, miR30c-5p, miR144-3p, miR182-5p, miR425-5p, miR183-5p, miR187-3p, miR9-3p, miR222-5p, miR21-5p, miR324-5p, miR486-5p'nin aşağı regülasyonunu GEM ve EGCG'nin kombinasyonu sonucu pankreas kanseri hücre modelinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteyi desteklediği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiş ve literatüre katkı sağlamıştır. İleriki çalışmalarımızda, bu ikili kombinasyonun pankreas kanser hücrelerinde yol açtığı sitotoksik ve apoptotik etkiye neden olan onkojenik/tümör süpressör miRNA'ların hedef genlerini belirleyerek pankreas kanseri tedavisinde yeni hedefler belirlemeyi ve elde edilen sonuçların in vivo çalışmalar ile desteklenmesini amaçlamaktayız.

7 Kaynaklar

- Ali, S., Saleh, H., Sethi, S., Sarkar, F. H., & Philip, P. A. (2012). MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *107*(8), 1354-1360. doi:10.1038/bjc.2012.383
- Alvarellos, M. L., Lamba, J., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Wang, L., Klein, D. J., . . . Klein, T. E. (2014). PharmGKB summary: gemcitabine pathway. *Pharmacogenet Genomics*, *24*(11), 564-574. doi:10.1097/FPC.0000000000000086
- Ba, Z., Zhou, Y., Yang, Z., Xu, J., & Zhang, X. (2019). miR-324-5p upregulation potentiates resistance to cisplatin by targeting FBXO11 signalling in non-small cell lung cancer cells. *J Biochem*, *166*(6), 517-527. doi:10.1093/jb/mvz066
- Basu, A., & Haldar, S. (2009). Combinatorial effect of epigallocatechin-3-gallate and TRAIL on pancreatic cancer cell death. *Int J Oncol*, *34*(1), 281-286.
- Bosetti, C., Bertuccio, P., Negri, E., La Vecchia, C., Zeegers, M. P., & Boffetta, P. (2012). Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol Carcinog*, *51*(1), 3-13. doi:10.1002/mc.20785
- Bowles, M. J., & Benjamin, I. S. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract: Cancer of the stomach and pancreas. *BMJ*, *323*(7326), 1413-1416. doi:10.1136/bmj.323.7326.1413
- Brosnan, C. A., & Voinnet, O. (2009). The long and the short of noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(3), 416-425. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.001
- Casanova-Salas, I., Masia, E., Arminan, A., Calatrava, A., Mancarella, C., Rubio-Briones, J., . . . Lopez-Guerrero, J. A. (2015). MiR-187 Targets the Androgen-Regulated Gene ALDH1A3 in Prostate Cancer. *PLoS One*, *10*(5), e0125576. doi:10.1371/journal.pone.0125576
- Chao, A., Lin, C. Y., Lee, Y. S., Tsai, C. L., Wei, P. C., Hsueh, S., . . . Lai, C. H. (2012). Regulation of ovarian cancer progression by microRNA-187 through targeting Disabled homolog-2. *Oncogene*, *31*(6), 764-775. doi:10.1038/onc.2011.269
- Chen, B. H., Hsieh, C. H., Tsai, S. Y., Wang, C. Y., & Wang, C. C. (2020). Anticancer effects of epigallocatechin-3-gallate nanoemulsion on lung cancer cells through the activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Sci Rep*, *10*(1), 5163. doi:10.1038/s41598-020-62136-2
- Chen, X., Yue, B., Zhang, C., Qi, M., Qiu, J., Wang, Y., & Chen, J. (2017). MiR-130a-3p inhibits the viability, proliferation, invasion, and cell cycle, and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing BACH2 expression. *Biosci Rep*, *37*(3). doi:10.1042/BSR20160576
- Chowdhury, A., Sarkar, J., Chakraborti, T., Pramanik, P. K., & Chakraborti, S. (2016). Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomed Pharmacother*, *78*, 50-59. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.013
- Costa, F. F. (2005). Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene*, *357*(2), 83-94. doi:10.1016/j.gene.2005.06.019
- Cui, C., & Shi, X. (2017). miR-187 inhibits tumor growth and invasion by directly targeting MAPK12 in osteosarcoma. *Exp Ther Med*, *14*(2), 1045-1050. doi:10.3892/etm.2017.4624
- de Jesus, V. H. F., Camandaroba, M. P. G., Calsavara, V. F., & Riechelmann, R. P. (2020). Systematic review and meta-analysis of gemcitabine-based

- chemotherapy after FOLFIRINOX in advanced pancreatic cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 12, 1758835920905408. doi:10.1177/1758835920905408
- Ding, Y., Pan, Y., Liu, S., Jiang, F., & Jiao, J. (2017). Elevation of MiR-9-3p suppresses the epithelial-mesenchymal transition of nasopharyngeal carcinoma cells via down-regulating FN1, ITGB1 and ITGAV. *Cancer Biol Ther*, 18(6), 414-424. doi:10.1080/15384047.2017.1323585
- Dou, C., Liu, Z., Xu, M., Jia, Y., Wang, Y., Li, Q., . . . Liu, Q. (2016). miR-187-3p inhibits the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting S100A4. *Cancer Lett*, 381(2), 380-390. doi:10.1016/j.canlet.2016.08.011
- Du, G. J., Zhang, Z., Wen, X. D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C. S., & Wang, C. Z. (2012). Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*, 4(11), 1679-1691. doi:10.3390/nu4111679
- El Bedoui, J., Oak, M. H., Anglard, P., & Schini-Kerth, V. B. (2005). Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovasc Res*, 67(2), 317-325. doi:10.1016/j.cardiores.2005.03.017
- Fan, J., Li, H., Nie, X., Yin, Z., Zhao, Y., Chen, C., & Wen Wang, D. (2017). MiR-30c-5p ameliorates hepatic steatosis in leptin receptor-deficient (db/db) mice via down-regulating FASN. *Oncotarget*, 8(8), 13450-13463. doi:10.18632/oncotarget.14561
- Fan, M. J., He, P. J., Lin, X. Y., Yang, C. R., Li, C. Z., & Xing, L. G. (2020). MicroRNA-324-5p affects the radiotherapy response of cervical cancer via targeting ELAV-like RNA binding protein 1. *Kaohsiung J Med Sci*, 36(12), 965-972. doi:10.1002/kjm2.12277
- Fujiki, H. (2005). Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans. *Chem Rec*, 5(3), 119-132. doi:10.1002/tcr.20039
- Fukuhisa, H., Seki, N., Idichi, T., Kurahara, H., Yamada, Y., Toda, H., . . . Natsugoe, S. (2019). Gene regulation by antitumor miR-130b-5p in pancreatic ductal adenocarcinoma: the clinical significance of oncogenic EPS8. *J Hum Genet*, 64(6), 521-534. doi:10.1038/s10038-019-0584-6
- Gesto, D. S., Cerqueira, N. M., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2012). Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy. *Curr Med Chem*, 19(7), 1076-1087. doi:10.2174/092986712799320682
- Greither, T., Grochola, L. F., Udelnow, A., Lautenschlager, C., Wurl, P., & Taubert, H. (2010). Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*, 126(1), 73-80. doi:10.1002/ijc.24687
- Hackman, G. L., Collins, M., Lu, X., Lodi, A., DiGiovanni, J., & Tiziani, S. (2020). Predicting and Quantifying Antagonistic Effects of Natural Compounds Given with Chemotherapeutic Agents: Applications for High-Throughput Screening. *Cancers (Basel)*, 12(12). doi:10.3390/cancers12123714
- Hafez, M. M., Hassan, Z. K., Zekri, A. R., Gaber, A. A., Al Rejaie, S. S., Sayed-Ahmed, M. M., & Al Shabanah, O. (2012). MicroRNAs and metastasis-related gene expression in Egyptian breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(2), 591-598. doi:10.7314/apjcp.2012.13.2.591
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*, 20(8), 460-469. doi:10.1016/j.molmed.2014.06.005

- Hermeking, H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*, 17(2), 193-199. doi:10.1038/cdd.2009.56
- Higashi, T., Hayashi, H., Ishimoto, T., Takeyama, H., Kaida, T., Arima, K., . . . Baba, H. (2015). miR-9-3p plays a tumour-suppressor role by targeting TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*, 113(2), 252-258. doi:10.1038/bjc.2015.170
- Hu, L., Ai, J., Long, H., Liu, W., Wang, X., Zuo, Y., . . . Deng, Y. (2016). Integrative microRNA and gene profiling data analysis reveals novel biomarkers and mechanisms for lung cancer. *Oncotarget*, 7(8), 8441-8454. doi:10.18632/oncotarget.7264
- Hwang, M. S., Yu, N., Stinson, S. Y., Yue, P., Newman, R. J., Allan, B. B., & Dornan, D. (2013). miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS One*, 8(6), e66502. doi:10.1371/journal.pone.0066502
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 22(44), 9694-9705. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694
- Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 33(6), 1126-1133. doi:10.1093/carcin/bgs140
- Jian, L., Xie, L. P., Lee, A. H., & Binns, C. W. (2004). Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *Int J Cancer*, 108(1), 130-135. doi:10.1002/ijc.11550
- Jiang, P. H., Motoo, Y., Sawabu, N., & Minamoto, T. (2006). Effect of gemcitabine on the expression of apoptosis-related genes in human pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, 12(10), 1597-1602. doi:10.3748/wjg.v12.i10.1597
- Jin, J., Teng, C., & Li, T. (2018). Combination therapy versus gemcitabine monotherapy in the treatment of elderly pancreatic cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Des Devel Ther*, 12, 475-480. doi:10.2147/DDDT.S156766
- Jin, Y. Y., Chen, Q. J., Xu, K., Ren, H. T., Bao, X., Ma, Y. N., . . . Ma, H. B. (2016). Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and oxaliplatin chemoresistance in esophageal cancer cells via regulation of PTEN. *Mol Cell Biochem*, 422(1-2), 161-170. doi:10.1007/s11010-016-2816-9
- Kagawa, S., Takano, S., Yoshitomi, H., Kimura, F., Satoh, M., Shimizu, H., . . . Miyazaki, M. (2012). Akt/mTOR signaling pathway is crucial for gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. *J Surg Res*, 178(2), 758-767. doi:10.1016/j.jss.2012.05.065
- Kanteti, R., Batra, S. K., Lennon, F. E., & Salgia, R. (2016). FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(21), 31586-31601. doi:10.18632/oncotarget.8040
- Kao, C. J., Martiniez, A., Shi, X. B., Yang, J., Evans, C. P., Dobi, A., . . . Kung, H. J. (2014). miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT. *Oncogene*, 33(19), 2495-2503. doi:10.1038/onc.2013.200
- Karmakar, S., Kaushik, G., Nimmakayala, R., Rachagani, S., Ponnusamy, M. P., & Batra, S. K. (2019). MicroRNA regulation of K-Ras in pancreatic cancer and opportunities for therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*, 54, 63-71. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.020
- Kleeff, J., Reiser, C., Hinz, U., Bachmann, J., Debus, J., Jaeger, D., . . . Büchler, M. W. (2007). Surgery for recurrent pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of surgery*, 245(4), 566.

- Kundu, S. T., Byers, L. A., Peng, D. H., Roybal, J. D., Diao, L., Wang, J., . . . Gibbons, D. L. (2016). The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers. *Oncogene*, *35*(2), 173-186. doi:10.1038/onc.2015.71
- Lai, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Shu, Y., Luo, X., Yang, Y., . . . Feng, Y. (2013). The microRNA-27a: ZBTB10-specificity protein pathway is involved in follicle stimulating hormone-induced VEGF, Cox2 and survivin expression in ovarian epithelial cancer cells. *Int J Oncol*, *42*(2), 776-784. doi:10.3892/ijo.2012.1743
- Lam, W. (2010). The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity. *Sci. Transl. Med.*, *2*. doi:10.1126/scitranslmed.3001270
- LaPierre, M. P., & Stoffel, M. (2017). MicroRNAs as stress regulators in pancreatic beta cells and diabetes. *Mol Metab*, *6*(9), 1010-1023. doi:10.1016/j.molmet.2017.06.020
- Lee, K. H., Lin, F. C., Hsu, T. I., Lin, J. T., Guo, J. H., Tsai, C. H., . . . Lu, P. J. (2014). MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(9), 2055-2066. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.06.001
- Leung, W. K., He, M., Chan, A. W., Law, P. T., & Wong, N. (2015). Wnt/beta-Catenin activates MiR-183/96/182 expression in hepatocellular carcinoma that promotes cell invasion. *Cancer Lett*, *362*(1), 97-105. doi:10.1016/j.canlet.2015.03.023
- Li, F., Qasim, S., Li, D., & Dou, Q. P. (2021). Updated review on green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate as a cancer epigenetic regulator. *Seminars in Cancer Biology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.11.018>
- Li, Z., Lin, C., Zhao, L., Zhou, L., Pan, X., Quan, J., . . . Lai, Y. (2018). Oncogene miR-187-5p is associated with cellular proliferation, migration, invasion, apoptosis and an increased risk of recurrence in bladder cancer. *Biomed Pharmacother*, *105*, 461-469. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.122
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, *15*(6), 321-333. doi:10.1038/nrc3932
- Lin, S. C., Kao, S. Y., Chang, J. C., Liu, Y. C., Yu, E. H., Tseng, S. H., . . . Chang, K. W. (2016). Up-regulation of miR-187 modulates the advances of oral carcinoma by targeting BARX2 tumor suppressor. *Oncotarget*, *7*(38), 61355-61365. doi:10.18632/oncotarget.11349
- Louvet, C., Labianca, R., Hammel, P., Lledo, G., Zampino, M. G., Andre, T., . . . Giscad. (2005). Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol*, *23*(15), 3509-3516. doi:10.1200/JCO.2005.06.023
- Lu, G., Liao, J., Yang, G., Reuhl, K. R., Hao, X., & Yang, C. S. (2006). Inhibition of adenoma progression to adenocarcinoma in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis model in A/J mice by tea polyphenols and caffeine. *Cancer research*, *66*(23), 11494-11501.
- Lu, J., & Clark, A. G. (2012). Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Res*, *22*(7), 1243-1254. doi:10.1101/gr.132514.111
- Lu, Y., Wu, X., & Wang, J. (2019). Correlation of miR-425-5p and IL-23 with pancreatic cancer. *Oncol Lett*, *17*(5), 4595-4599. doi:10.3892/ol.2019.10099
- Lumayag, S., Haldin, C. E., Corbett, N. J., Wahlin, K. J., Cowan, C., Turturro, S., . . . Xu, S. (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in

- syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(6), E507-516. doi:10.1073/pnas.1212655110
- Macfarlane, L. A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11(7), 537-561. doi:10.2174/138920210793175895
- Martinelli, P., Carrillo-de Santa Pau, E., Cox, T., Sainz, B., Jr., Dusetti, N., Greenhalf, W., . . . Real, F. X. (2017). GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut*, 66(9), 1665-1676. doi:10.1136/gutjnl-2015-311256
- Matamala, N., Vargas, M. T., Gonzalez-Campora, R., Arias, J. I., Menendez, P., Andres-Leon, E., . . . Benitez, J. (2016). MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression. *Oncotarget*, 7(15), 20068-20079. doi:10.18632/oncotarget.7705
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*, 24(43), 4846-4861. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. J. W. j. o. g. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. 24(43), 4846.
- Medina, R., Zaidi, S. K., Liu, C. G., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., Croce, C. M., & Stein, G. S. (2008). MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res*, 68(8), 2773-2780. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6754
- Mihelich, B. L., Khramtsova, E. A., Arva, N., Vaishnav, A., Johnson, D. N., Giangreco, A. A., . . . Nonn, L. (2011). miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells. *J Biol Chem*, 286(52), 44503-44511. doi:10.1074/jbc.M111.262915
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*, 17 Suppl 5, v7-12. doi:10.1093/annonc/mdj941
- Mori, R., Tanaka, K., & Shimokawa, I. (2018). Identification and functional analysis of inflammation-related miRNAs in skin wound repair. *Dev Growth Differ*, 60(6), 306-315. doi:10.1111/dgd.12542
- Nagaraju, G. P. (2020). Phytochemicals Targeting Tumor Microenvironment in Gastrointestinal Cancers. *Springer*.
- Oak, M. H., El Bedoui, J., & Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem*, 16(1), 1-8. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.09.004
- Obernosterer, G., Leuschner, P. J., Alenius, M., & Martinez, J. (2006). Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA*, 12(7), 1161-1167. doi:10.1261/rna.2322506
- Ouyang, M., Li, Y., Ye, S., Ma, J., Lu, L., Lv, W., . . . Wang, W. (2014). MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PLoS One*, 9(5), e96228. doi:10.1371/journal.pone.0096228
- Pak, M. G., Lee, C. H., Lee, W. J., Shin, D. H., & Roh, M. S. (2015). Unique microRNAs in lung adenocarcinoma groups according to major TKI sensitive EGFR mutation status. *Diagn Pathol*, 10, 99. doi:10.1186/s13000-015-0339-4
- Panebianco, C., Trivieri, N., Villani, A., Terracciano, F., Latiano, T. P., Potenza, A., . . . Pazienza, V. (2021). Improving Gemcitabine Sensitivity in Pancreatic

- Cancer Cells by Restoring miRNA-217 Levels. *Biomolecules*, 11(5). doi:10.3390/biom11050639
- Park, Y. G., Lee, K. H., Lee, J. K., Lee, K. T., Choi, D. W., Choi, S. H., . . . Kim, E. J. (2011). [MicroRNA expression pattern in intraductal papillary mucinous neoplasm]. *Korean J Gastroenterol*, 58(4), 190-200. doi:10.4166/kjg.2011.58.4.190
- Pelosi, E., Castelli, G., & Testa, U. (2017). Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicines*, 5(4). doi:10.3390/biomedicines5040065
- Permuth-Wey, J., Chen, Y. A., Fisher, K., McCarthy, S., Qu, X., Lloyd, M. C., . . . Malafa, M. (2015). A genome-wide investigation of microRNA expression identifies biologically-meaningful microRNAs that distinguish between high-risk and low-risk intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *PLoS One*, 10(1), e0116869. doi:10.1371/journal.pone.0116869
- Phuah, N. H., & Nagoor, N. H. (2014). Regulation of microRNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies. *BioMed research international*, 2014.
- Qiao, F., Zhang, K., Gong, P., Wang, L., Hu, J., Lu, S., & Fan, H. (2014). Decreased miR-30b-5p expression by DNMT1 methylation regulation involved in gastric cancer metastasis. *Mol Biol Rep*, 41(9), 5693-5700. doi:10.1007/s11033-014-3439-4
- Qin, C., Yang, G., Yang, J., Ren, B., Wang, H., Chen, G., . . . Zhao, Y. (2020). Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better anticancer strategies. *Molecular cancer*, 19(1), 1-19.
- Qu, K., Zhang, X., Lin, T., Liu, T., Wang, Z., Liu, S., . . . Wu, Z. (2017). Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Sci Rep*, 7(1), 1692. doi:10.1038/s41598-017-01904-z
- Regine, W. F., Winter, K. A., Abrams, R. A., Safran, H., Hoffman, J. P., Konski, A., . . . Rich, T. A. (2008). Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial. *JAMA*, 299(9), 1019-1026. doi:10.1001/jama.299.9.1019
- Sharifi-Rad, M., Pezzani, R., Redaelli, M., Zorzan, M., Imran, M., Ahmed Khalil, A., . . . Sharifi-Rad, J. (2020). Preclinical Pharmacological Activities of Epigallocatechin-3-gallate in Signaling Pathways: An Update on Cancer. *Molecules*, 25(3). doi:10.3390/molecules25030467
- Shenouda, S. K., & Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*, 28(3-4), 369-378. doi:10.1007/s10555-009-9188-5
- Silvestris, N., Danza, K., Longo, V., Brunetti, O., Fucci, L., Argentiero, A., . . . Tommasi, S. (2017). Angiogenesis in adenosquamous cancer of pancreas. *Oncotarget*, 8(56), 95773-95779. doi:10.18632/oncotarget.21319
- Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, 82(12), 1807-1821.
- Snell, R. S. (2007). *Clinical anatomy by systems*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sun, J., & Zhang, Y. (2019). LncRNA XIST enhanced TGF-beta2 expression by targeting miR-141-3p to promote pancreatic cancer cells invasion. *Biosci Rep*, 39(7). doi:10.1042/BSR20190332

- Sun, L., Jiang, R., Li, J., Wang, B., Ma, C., Lv, Y., & Mu, N. (2017). MicoRNA-425-5p is a potential prognostic biomarker for cervical cancer. *Ann Clin Biochem*, 54(1), 127-133. doi:10.1177/0004563216649377
- Sun, Q., Cong, R., Yan, H., Gu, H., Zeng, Y., Liu, N., . . . Wang, B. (2009). Genistein inhibits growth of human uveal melanoma cells and affects microRNA-27a and target gene expression. *Oncol Rep*, 22(3), 563-567. doi:10.3892/or_00000472
- Sun, X., Zhao, S., Li, H., Chang, H., Huang, Z., Ding, Z., . . . Zhang, J. (2017). MicroRNA-30b Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis of Hepatoma Cells. *J Cell Physiol*, 232(3), 625-634. doi:10.1002/jcp.25466
- Tanaka, H., Sasayama, T., Tanaka, K., Nakamizo, S., Nishihara, M., Mizukawa, K., . . . Kohmura, E. (2013). MicroRNA-183 upregulates HIF-1alpha by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. *J Neurooncol*, 111(3), 273-283. doi:10.1007/s11060-012-1027-9
- Tang, S. N., Fu, J., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2012). EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer. *PLoS One*, 7(2), e31067. doi:10.1371/journal.pone.0031067
- Ueno, K., Hirata, H., Shahryari, V., Deng, G., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., . . . Dahiya, R. (2013). microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. *Br J Cancer*, 108(8), 1659-1667. doi:10.1038/bjc.2013.125
- Van Keuren-Jensen, K. R., Malenica, I., Courtright, A. L., Ghaffari, L. T., Starr, A. P., Metpally, R. P., . . . Rakela, J. (2016). microRNA changes in liver tissue associated with fibrosis progression in patients with hepatitis C. *Liver Int*, 36(3), 334-343. doi:10.1111/liv.12919
- Ventura, A., & Jacks, T. (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 136(4), 586-591. doi:10.1016/j.cell.2009.02.005
- Vu, H. A., Beppu, Y., Chi, H. T., Sasaki, K., Yamamoto, H., Xinh, P. T., . . . Ohdomari, I. (2010). Green tea epigallocatechin gallate exhibits anticancer effect in human pancreatic carcinoma cells via the inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 290516. doi:10.1155/2010/290516
- Wang, J., Wang, X., Li, Z., Liu, H., & Teng, Y. (2014). MicroRNA-183 suppresses retinoblastoma cell growth, invasion and migration by targeting LRP6. *FEBS J*, 281(5), 1355-1365. doi:10.1111/febs.12659
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*, 51(6), 2647-2693. doi:10.1159/000495956
- Wang, M., Hu, M., Li, Z., Qian, D., Wang, B., & Liu, D. X. (2017). miR-141-3p functions as a tumor suppressor modulating activating transcription factor 5 in glioma. *Biochem Biophys Res Commun*, 490(4), 1260-1267. doi:10.1016/j.bbrc.2017.05.179
- Wang, W., Liu, B., Sun, S., Lan, L., Chen, Y., Han, S., . . . Li, Z. (2020). Downregulation of miR-486-5p Enhances the Anti-Tumor Effect of 5-Fluorouracil on Pancreatic Cancer Cells. *Onco Targets Ther*, 13, 1649-1659. doi:10.2147/OTT.S231153
- Wang, Y., Duan, H., & Yang, H. (2015). A case-control study of stomach cancer in relation to *Camellia sinensis* in China. *Surg Oncol*, 24(2), 67-70. doi:10.1016/j.suronc.2015.02.002

- Wang, Z. (2010). MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem*, 1(4), 41-54. doi:10.4331/wjbc.v1.i4.41
- Wei, R., Hackman, R. M., Wang, Y., & Mackenzie, G. G. (2019). Targeting Glycolysis with Epigallocatechin-3-Gallate Enhances the Efficacy of Chemotherapeutics in Pancreatic Cancer Cells and Xenografts. *Cancers (Basel)*, 11(10). doi:10.3390/cancers11101496
- Wei, R., Penso, N. E. C., Hackman, R. M., Wang, Y., & Mackenzie, G. G. (2019). Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Suppresses Pancreatic Cancer Cell Growth, Invasion, and Migration partly through the Inhibition of Akt Pathway and Epithelial-Mesenchymal Transition: Enhanced Efficacy when Combined with Gemcitabine. *Nutrients*, 11(8). doi:10.3390/nu11081856
- Wei, R., Wirkus, J., Yang, Z., Machuca, J., Esparza, Y., & Mackenzie, G. G. (2020). EGCG sensitizes chemotherapeutic-induced cytotoxicity by targeting the ERK pathway in multiple cancer cell lines. *Arch Biochem Biophys*, 692, 108546. doi:10.1016/j.abb.2020.108546
- Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. J. C. a. c. j. f. c. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *63(5)*, 318-348.
- Wszolek, M. F., Rieger-Christ, K. M., Kenney, P. A., Gould, J. J., Silva Neto, B., Lavoie, A. K., . . . Summerhayes, I. C. (2011). A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urol Oncol*, 29(6), 794-801 e791. doi:10.1016/j.urolonc.2009.08.024
- Wu, M., Li, W., Huang, F., Sun, J., Li, K. P., Shi, J., . . . Hu, Y. (2019). Comprehensive Analysis of the Expression Profiles of Long Non-Coding RNAs with Associated ceRNA Network Involved in the Colon Cancer Staging and Progression. *Sci Rep*, 9(1), 16910. doi:10.1038/s41598-019-52883-2
- Wu, Y., Tang, Y., Xie, S., Zheng, X., Zhang, S., Mao, J., . . . Chen, W. (2020). Chimeric peptide supramolecular nanoparticles for plectin-1 targeted miRNA-9 delivery in pancreatic cancer. *Theranostics*, 10(3), 1151-1165. doi:10.7150/thno.38327
- Xiao, J., Peng, F., Yu, C., Wang, M., Li, X., Li, Z., . . . Sun, C. (2014). microRNA-137 modulates pancreatic cancer cells tumor growth, invasion and sensitivity to chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(11), 7442-7450.
- Xiao, Y., Zhao, Q., Du, B., Chen, H. Y., & Zhou, D. Z. (2018). MicroRNA-187 Inhibits Growth and Metastasis of Osteosarcoma by Downregulating S100A4. *Cancer Invest*, 36(1), 1-9. doi:10.1080/07357907.2017.1415348
- Xiong, Y., Wang, Y., Wang, L., Huang, Y., Xu, Y., Xu, L., . . . Qian, H. (2018). MicroRNA-30b targets Snail to impede epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cells. *J Cancer*, 9(12), 2147-2159. doi:10.7150/jca.25006
- Yang, Y., Ji, C., Guo, S., Su, X., Zhao, X., Zhang, S., . . . Chen, H. (2017). The miR-486-5p plays a causative role in prostate cancer through negative regulation of multiple tumor suppressor pathways. *Oncotarget*, 8(42), 72835-72846. doi:10.18632/oncotarget.20427
- Yao, J., Xu, C., Fang, Z., Li, Y., Liu, H., Wang, Y., . . . Sun, Y. (2016). Androgen receptor regulated microRNA miR-182-5p promotes prostate cancer progression by targeting the ARRDC3/ITGB4 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 474(1), 213-219. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.107
- You, B., & Zhang, K. C. (2018). MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in castration-resistant prostate cancer by targeting CEP55.

- Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(22), 7660-7670.
doi:10.26355/eurrev_201811_16383
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302(1), 1-12.
doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.028
- Zhang, L., Wu, S., Wang, D., Wan, X., & Zhang, J. (2014). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in or on nanoparticles: Enhanced stability and bioavailability of EGCG encapsulated in nanoparticles or targeted delivery of gold nanoparticles coated with EGCG. *Handbook of nanotoxicology, nanomedicine and stem cell use in toxicology*(8), 131-144.
- Zhang, X., Zhang, L., Chen, M., & Liu, D. (2020). miR-324-5p inhibits gallbladder carcinoma cell metastatic behaviours by downregulation of transforming growth factor beta 2 expression. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 48(1), 315-324. doi:10.1080/21691401.2019.1703724
- Zhang, Y., Li, M., Wang, H., Fisher, W. E., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg*, 33(4), 698-709. doi:10.1007/s00268-008-9833-0
- Zhao, J., Lei, T., Xu, C., Li, H., Ma, W., Yang, Y., . . . Liu, Y. (2013). MicroRNA-187, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, inhibits cell growth and migration though targeting B7-H3. *Biochem Biophys Res Commun*, 438(2), 439-444. doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.095
- Zheng, H., Guo, Z., Zheng, X., Cheng, W., & Huang, X. (2018). MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in prostate cancer by targeting CEP55. *Am J Transl Res*, 10(8), 2457-2468.
- Zhong, K., Chen, K., Han, L., & Li, B. (2014). MicroRNA-30b/c inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting Rab18. *BMC Cancer*, 14, 703. doi:10.1186/1471-2407-14-703
- Zhou, Y., Shi, H., Du, Y., Zhao, G., Wang, X., Li, Q., . . . Huang, Y. (2019). lncRNA DLEU2 modulates cell proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by regulating miR-30c-5p/SOX9 axis. *Aging (Albany NY)*, 11(18), 7386-7401. doi:10.18632/aging.102226
- Zhu, Q. L., Li, Z., Lv, C. M., & Wang, W. (2019). MiR-187 influences cisplatin-resistance of gastric cancer cells through regulating the TGF-beta/Smad signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(22), 9907-9914. doi:10.26355/eurrev_201911_19556

8 Teşekkür

Projemize verdikleri destekten dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna ve bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği TYL-2019-20764 nolu BAP projeleri aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir

27.05.2021

Ali Haydar Kaygusuz



9 Özgeçmiş

İlk, orta ve lise öğrenimimi İzmir’de tamamladım. 2009 yılında Aksaray Üniversitesi Sabire Yazıcı Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitime başladım ve 2015 yılında mezun oldum. 2017 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Kanser Biyoloji ve İmmünolojisinde yüksek lisans eğitimime başladım. Yabancı dil olarak İngilizce bilmekteyim.

e-posta:

