

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSTEİNİL LÖKOTRIEN RESEPTÖR ANTAGONİSTİ
MONTELUKAST'IN PANKREATİK DUKTAL
ADENOKARSİNOM HÜCRELERİNDE ANTİKANSEROJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nazife MERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülün ÇORA

İkinci Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM

KONYA- 2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSTEİNİL LÖKOTRIEN RESEPTÖR ANTAGONİSTİ
MONTELUKAST'IN PANKREATİK DUKTAL
ADENOKARSİNOM HÜCRELERİNDE ANTİKANSEROJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nazife MERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülün ÇORA

İkinci Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21202013 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA- 2023

ÖNSÖZ

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi (BAP) tarafından 21202013 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışması boyunca akademik tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tülün ÇORA'ya, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren, benim her zaman başaracağıma inanan, takdir eden ve güvenen değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM ve Doç. Dr. Nadir KOÇAK 'a,

Yüksek lisans eğitimimin ders sürecinde, akademik bilgi ve birikimlerini paylaştan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Dr. Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Yüksek lisans sürecim boyunca varlığını esirgemeyen, hayatımın her aşamasında fikir ve görüşlerinden faydalandığım, maddi ve manevi desteğini hep hissettiğim, her zaman en iyisini yapabileceğime inanan ve bu yolda beni asla yalnız bırakmayan Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM'a,

Tez çalışmamda gerekli olan BxPC-3 hücrelerini temin ettiğimiz Prof. Dr. Ömer Faruk BAYRAK'a ve tez konumu belirlememde yardımları olan Dr. Huseyn BABAYEV'e,

Tanıştığım günden bu yana varlıklarını hep hissettiğim, pes etmek üzereyken maddi manevi desteklerini her zaman gördüğüm, mutluluğumu, sevincimi, üzüntümü paylaşabildiğim ve en önemlisi daha iyisini yapabileceğime inanan, güvenen çok değerli arkadaşlarım Cansu AKMAZ, Kübra SOYTÜRK, Ahmet SOYTÜRK, Gökhan GENCER ve Nadire GÜMÜŞ' e teşekkür ederim.

Bu tezi hayatımın her evresinde varlıklarıyla bana destek olan, iyi kötü her anımda yanımda olup beni destekleyen, yanımda olan, kalbe bir hediye olarak gördüğüm ablam Ayşegül MERCAN ve kardeşim Aleyna MERCAN'a,

Yine hayatımın her evresinde varlıklarıyla bana destek olan, iyi kötü her anımda yanımda olup beni destekleyen, her daim evlatları için çabalayan ve ne karar verirsem vereyim her zaman yanımda olan, başıma ne gelirse gelsin pes etmemeyi öğrendiğim babam Halil MERCAN ve annem Aliye MERCAN'a ithaf ediyorum. Varlıklarına teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pankreas.....	3
1.2. Pankreas Kanseri.....	5
1.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi.....	6
1.2.2. Pankreas Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	7
1.2.3. Pankreas Kanseri Tanısı.....	13
1.2.4. Pankreas Kanseri Tedavisi.....	15
1.3. Sisteinil Lökotrienler.....	18
1.3.1. Sisteinil Lökotrien Reseptörleri.....	19
1.3.2. Sisteinil Lökotrien Yolu ve Kanser.....	20
1.3.3. Sisteinil Lökotrien Antagonistleri.....	22
1.4. Montelukast.....	23
1.4.1. Montelukast ve Kanserdeki Rolü.....	23
2. GEREÇ ve YÖNTEM	25
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	25
2.2. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler.....	26
2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	29
2.4. Hücre Kültürü.....	30
2.4.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Büyütülmesi.....	31
2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması, Sayımı ve Stoklanması.....	31
2.5. Montelukast Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	32
2.6. Hücre Sitotoksikite Testi (MTT)	32
2.7. Kantitatif Gen Ekspresyon Analizi (Real-Time PCR)	33
2.8. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu.....	33
2.9. DNaz Muamelesi.....	34
2.10. cDNA Sentezi.....	35
2.11. Primerlerin Sulandırılması.....	35
2.12. Referans Gen Seçimi.....	35

2.13. Gerçek Zamanlı PCR ile Hücrelerdeki İfade Profiline Belirlenmesi.....	35
2.14. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	37
2.15. Protein Ekspresyon (Western Blot) Analizi.....	38
2.15.1. Total proteinin izole edilmesi.....	38
2.15.2. Qubit ile Protein Konsantrasyon Tayini.....	38
2.16. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi.....	39
2.17. Jeldeki proteinlerin membrana transfer edilmesi (blotlama), bloklanması ve görüntülenmesi.....	40
2.18. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	41
3. BULGULAR	43
3.1. Montelukast'ın Sitotoksik Etkisi.....	43
3.1.1. Montelukast'ın PANC-1 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	43
3.1.2. Montelukast'ın BxPC-3 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	44
3.1.3. Montelukast'ın HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	46
3.2. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları.....	47
3.2.1. Montelukast'ın PANC-1 hücre hattında hedef genlerin ifade düzeyine etkisi.....	48
3.2.2. Montelukast'ın BxPC-3 hücre hattında hedef genlerin ifade düzeyine etkisi.....	50
3.2.3. Montelukast'ın HEK293 hücre hattında hedef genlerin ifade düzeyine etkisi.....	54
3.3. Protein Ekspresyon Analiz (Western Blot) Sonuçları.....	57
3.3.1. Montelukast'ın PANC-1 kanser hücreleri üzerindeki etkisinin Western Blot ile analizi.....	57
3.3.2. Montelukast'ın BxPC-3 kanser hücreleri üzerindeki etkisinin Western Blot ile analizi.....	58
3.3.3. Montelukast'ın HEK293 hücreleri üzerindeki etkisinin Western Blot ile analizi.....	59
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	72

6. KAYNAKLAR.....	75
7. EKLER	89
EK A: Etik Kurul Kararı.....	89
EK B: Turnitin Raporu.....	90
8. ÖZGEÇMİŞ.....	97



SİMGELER VE KISALTMALAR

μ: Mikro

5-FU: 5-fluorourasil

5-HpETE: 5-hidroperoksi-eikosatetraenoik asit

cAMP: Siklik adenzin monofosfat

COX-2: Siklooksijenaz

CysLT: Sisteinil lökotrien

CysLT1R: Sisteinil lökotrien 1 reseptörü

CysLT2R: Sisteinil lökotrien 2 reseptörü

DNA: Deoksi ribonükleik asit

DPEP: Dipeptidaz

FLAP: 5-LOX aktive edici protein

g: gram

GGT: Gama glutamil transferaz

GPCR: G-Proteini bağı reseptör

GSK3β: Glikojen sentaz kinaz-3 beta

KML: Kronik miyeloid lösemi

LOX: Lipoksijenaz

LTA4: Lökotrien A4

LTB4: Lökotrien B4

LTC4: Lökotrien C4

LTD4: Lökotrien D4

LTRA: Sisteinil LT reseptör antagonistleri

mL: Mililitre

mM: Milimolar

nm: Nanometre

PDAC: Pankreatik duktal adenokarsinom

PGE2: Prostoglandin E2

PK: Pankreas kanseri

PKB: Protein kinaz B

PKCε: Protein kinaz C epsilon

RNA: Ribonükleik asit

RT- PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

β: Beta

ε: Epsilon

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSTEİNİL LÖKOTRIEN RESEPTÖR ANTAGONİSTİ MONTELUKAST'IN PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOM HÜCRELERİNDE ANTİKANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nazife MERCAN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA- 2023

Pankreas Kanseri, hızlı metastaz özelliği ile insidansı ve ölüm oranı yüksek olan ciddi bir hastalıktır. Pankreas kanserinde temel tedavisel yaklaşım kemoterapi ve radyoterapidir ancak kanser hücrelerinde oluşan direnç mekanizması tedaviyi başarısız kılmaktadır. Bu nedenle hastalığın ilerlemesinde ve direnç gelişmesinde etkili olan mekanizmaların incelenmesi, bu mekanizmaların terapötik hedef olarak kullanılabilirliğinin tespit edilmesi önemlidir. Sisteinil lökotrienler çok çeşitli farmakolojik ve fizyolojik etkinlikleri olan, 5-lipoksijenaz yoluyla araşidonik asitten sentezlenen proenflamatuar aracılı sinyal molekülleridir. Sisteinil lökotrien sinyalizasyonu plazma membranındaki CysLT1 ve CysLT2 reseptörlerine agonist bir molekülün bağlanmasıyla gerçekleşir. Enflamasyondaki rollerine ek olarak CysLT reseptörlerinin karsinogenezden de sorumlu olduğu, birkaç kanser türünde normal dokulardan daha fazla eksprese edildikleri belirtilmiştir. CysLT1R antagonist tedavisinin, çeşitli insan kanser hücre hatlarında apoptozu indükleyerek tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada CysLT1R antagonisti olan Montelukast'ın in vitro kültür ortamında pankreas kanseri üzerindeki antikanserojenik etkilerinin belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla ilk olarak Montelukast'ın hücre canlılığına etkisi hücrelerde MTT testi ile belirlenmiş IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Montelukast'ın kanserli olamayan hücrelere etkisini belirlemek için HEK293 hücreleri kullanılmıştır. Hücrelere IC₅₀ dozlarında 48 saat Montelukast uygulaması yapılmış, ardından qRT-PCR ile *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR17*, *GPR99*, *ERK1/2*, *COX-2*, *MYC*, *HMGB1*, *TP53*, *MTOR*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genlerinin kantitatif ekspresyon analizi yapılmıştır. Western Blot ile BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerinin ekspresyon analizi yapılmıştır. Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ve literatürde yer alan sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Montelukast'ın hücresel proliferasyonu inhibe ederek pankreas karsinogenezisini baskıladığı sonucuna ulaşılabilmektedir. Montelukast bu özelliği ile pankreas karsinogenezinin tedavisi için umut verici potansiyele sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Montelukast; Pankreas Kanseri; Sisteinil Lökotrien.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

INVESTIGATION OF ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF CYSTEINYL LEUKOTRIENE RECEPTOR ANTAGONIST MONTELUKAST ON PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA CELLS

Nazife MERCAN

Department of Medical Biology

MASTER THESIS / KONYA- 2023

Pancreatic Cancer is a serious disease with rapid metastasis and high incidence and mortality. The basic therapeutic approach in pancreatic cancer is chemotherapy and radiotherapy, but the resistance mechanism in cancer cells makes the treatment unsuccessful. For this reason, it is important to examine the mechanisms that are effective in the progression of the disease and the development of resistance, and to determine the usability of these mechanisms as therapeutic targets. Cysteinyl leukotrienes are proinflammatory-mediated signaling molecules synthesized from arachidonic acid via 5-lipoxygenase, with a wide variety of pharmacological and physiological activities. Cysteinyl leukotriene signaling occurs by binding of an agonist molecule to the CysLT1 and CysLT2 receptors on the plasma membrane. In addition to their role in inflammation, it has been stated that CysLT receptors are also responsible for carcinogenesis, and they are expressed more than normal tissues in several cancer types. CysLT1R antagonist therapy has been shown to inhibit tumor growth by inducing apoptosis in various human cancer cell lines. In this study, it was aimed to determine the anticarcinogenic effects of Montelukast, a CysLT1R antagonist, on pancreatic cancer in in vitro culture. For this purpose, firstly, the effect of Montelukast on cell viability was determined by IC_{50} values determined by MTT test in cells. HEK293 cells were used to determine the effect of Montelukast on non-cancerous cells. Montelukast was applied to the cells at IC_{50} doses for 48 hours, followed by quantitative expression analysis of *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR17*, *GPR99*, *ERK1/2*, *COX-2*, *MYC*, *HMGB1*, *TP53*, *MTOR*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genes by qRT-PCR. Expression analysis of BAX, BCL-2 and CASP3 proteins was performed by Western Blot. As a result, when the data we obtained in our study and the results in the literature are evaluated together, it can be concluded that Montelukast suppresses pancreatic carcinogenesis by inhibiting cellular proliferation. With this feature, Montelukast has promising potential for the treatment of pancreatic carcinogenesis.

Key Words: Cysteinyl Leukotriene; Montelukast; Pancreatic Cancer.

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri, tüm dünyada kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır (Kuo ve ark 2021, Layeghi-Ghalehsoukhteh ve ark 2020). Hastalığın prognozu oldukça kötü olup, 5 yıllık sağkalımı %9'dan daha azdır (Ilic ve Ilic 2016). Son evreye kadar asemptomatik olarak ilerlemesi ve yüksek metastaz özelliği, erken tanı ve etkili tedavi imkanlarını kısıtlamaktadır (Zhou ve ark 2017). Pankreas kanserinde tek küratif tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyondur ancak çoğu hastada rezeksiyon sonrası bile hastalık nüksetmektedir (Conroy ve Ducreux 2019). Bu durum da tedavide radyoterapi ve kemoterapi gibi cerrahi dışı yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmaktadır (Kim ve ark 2020).

Pankreas kanserinin etiyolojisi tam anlaşılmamış olsa da genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve çevresel risk faktörleri arasında kompleks bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Lin ve ark 2011). Belirlenen risk faktörleri içerisinde ileri yaş, sigara kullanımı, ailede pankreas kanseri varlığı, tip 2 diyabet, kronik pankreatit, obezite ve çevresel karsinojenlere maruziyet sıralanabilir (Krejs 2010). Sisteinil lökotrienler (CysLT'ler), esas olarak eozinofillerde sentezlenen, akut ve kronik inflamasyona aracılık eden lipid yapılı sinyal molekülleridir (Singh ve ark 2010). Bu sinyal molekülleri fosfolipaz A2 tarafından membran fosfolipidlerinden serbest bırakılan araşidonik asitten sentezlenir. İlk olarak, 5-hidroperoksi-eikosatetraenoik asit (5-HpETE), sitoplazmadan nükleer zara hareket eden 5-LOX ve 5-LOX aktive edici proteinin (FLAP) etkisiyle araşidonik asitten üretilir. Sürekli devam eden enzimatik reaksiyon sonucu, 5-HpETE geçici epoksit ara ürünü olan lökotrien A4'e (LTA 4)'e, LTA4 ise lökotrien A4 hidrolaz enzimiyle lökotrien B4'e (LTB4), lökotrien C4 (LTC4) sentaz enzimi ile LTC4'e dönüştürülür. LTC4'ten LTD4 oluşumu, gama glutamil transferazın (GGT) enzimatik etkisiyle katalize edilir. Dipeptidaz (DPEP) ayrıca sıralı peptit klevaj işlemini tamamlamak için LTD4'ü LTE4'e dönüştürür. LTC4, LTD4 ve LTE4 toplu olarak sisteinil lökotrienler (CysLT) olarak adlandırılır (Miyata ve ark 2020). CysLT'ler biyolojik etkilerini G proteinine bağlı reseptörlerden olan (GPCR'ler), CysLT1R ve CysLT2R' ye bağlanarak gösterirler (Lynch ve ark 1999). CysLT1R, LTD4 için daha yüksek bir afiniteye sahipken, CysLT2R'nin hem LTD4 hem de LTC4 için CysLT1R'den daha düşük ancak eşit bir afiniteye sahiptir (Heise ve ark 2000). CysLT1R ve CysLT2R'ler farklı hücresel ve doku sistemlerindeki bir dizi agonist veya antagoniste yanıt olarak farmakolojik karakterizasyonlarına ve

fonksiyonel profillerine dayalı olarak çeşitli sinyal yollarını uyarırlar (Heise ve ark 2000).

LTD4, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyali yoluyla protein kinaz Akt / PKB ve GTPazlardan Rho ve Rac'ı uyarır. Akt/ PKB, Axin ve adenomatöz polipozis koli ile birlikte sitozolik-katenin için yıkım kompleksini içeren glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β)'yi inhibe eder. Yıkım kompleksinin inhibisyonu, sitozolde β -katenin birikimine ve çekirdeğe translokasyonuna neden olur. Çekirdekte, β -katenin esas olarak T-hücre faktörü/ lenfoid enhancer faktör (TCF/ LEF) ailesinin üyeleriyle etkileşime girerek hedef genleri aktive ederek siklin D1, sikloksijenaz-2 gibi çeşitli proteinlerin ifadesine yol açar (Mezhybovska ve ark 2006). LTD4-CysLT1R sinyali ayrıca mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/ hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (Erk) yolları aracılığıyla hücre proliferasyonunu regüle eder (Paruchuri ve ark 2002). LTD4-CysLT1R aynı zamanda fosfolipaz C (PLC), Raf-1 ve mitojenle aktive olan protein kinaz kinazı (MEK-1/2) aktive eder. Bu aktivasyon, p-Erk'in sitozolden çekirdeğe translokasyonuna ve çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive edebilen p90RSK ile etkileşimine yol açar. LTD4-CysLT1R, protein kinaz C α (PKC α) ve transkripsiyon faktörü cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) aracılığıyla hayatta kalmaya aracılık eder (Paruchuri ve Sjölander 2003). CysLT'ler, özellikle astım ve alerjik rinitte enflamasyondaki rolleriyle iyi bilinir. Ancak son zamanlarda, CysLT'lerin vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezdeki rollerine ilişkin çalışmalarda kanserdeki rolleri ortaya çıkmıştır (Slater ve ark 2018, Burke ve ark 2016, Duah ve ark 2018). Mesane (Matsuyama ve ark 2009), beyin (Zhang ve ark 2004), prostat (Matsuyama ve ark 2007), meme (Magnusson ve ark 2011), kolorektal adenokarsinom (Ohd ve ark 2003), mide dahil olmak üzere birçok insan kanserinde CysLT1R'nin aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Venerito ve ark 2011). Yüksek CysLT1R ekspresyonunun meme ve kolon kanseri hastalarında kötü prognoz ve düşük sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Magnusson ve ark 2011, Ohd ve ark 2003), buna karşılık düşük CysLT1R ve yüksek CysLT2R ekspresyonu kolorektal karsinom hastalarında iyi bir prognoza işaret etmektedir (Magnusson ve ark 2010). Bu nedenle kanser araştırmalarında CysLT1R ekspresyonu ve bu reseptörün antagonistlerinin tümör gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesine ihtiyaç vardır. CysLT1R antagonistleri, romatoid artrit ve ateroskleroz gibi inflamatuvar hastalıkların çalışmalarında kullanılmıştır (Shiota ve ark 2006, Mueller ve ark 2008).

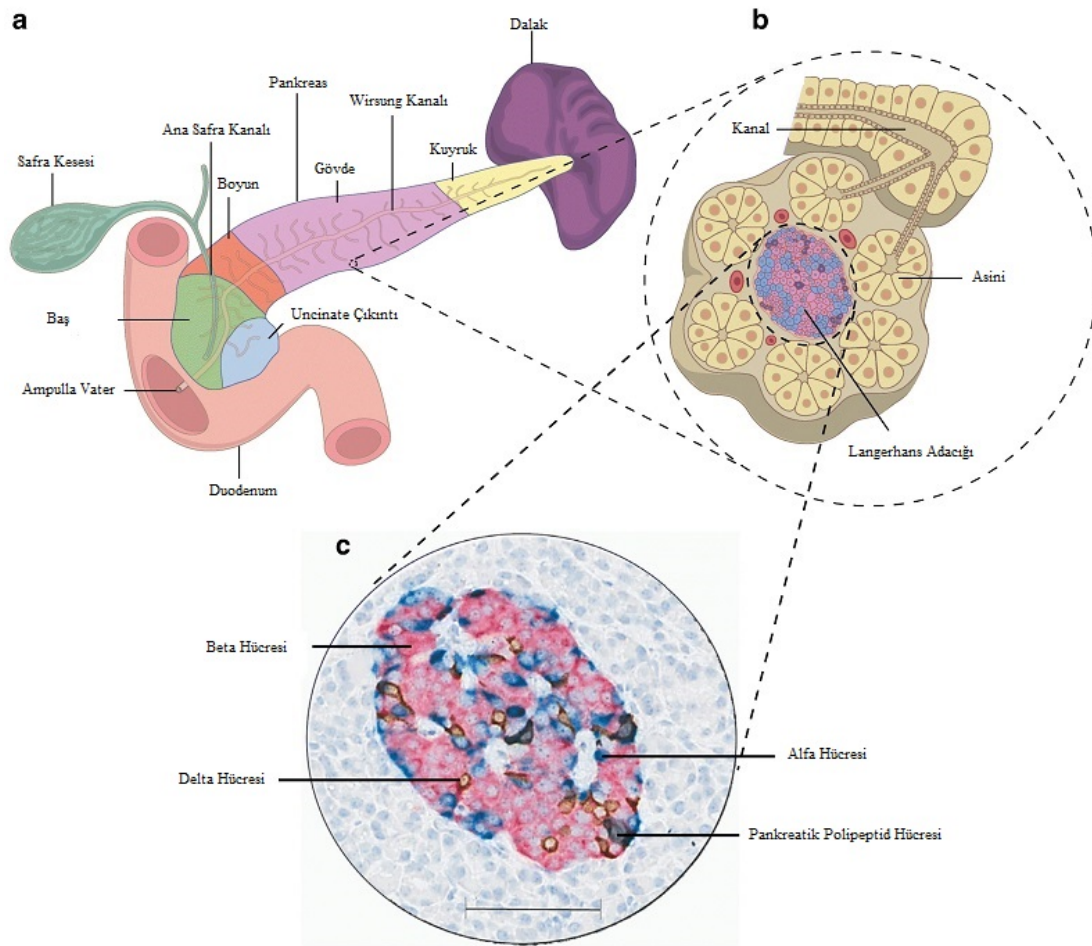
Montelukast, bronşiyal astımda antiinflamatuvar etkileri olan güçlü bir sisteinil lökotrien (CysLT1) reseptör antagonistidir (Diamant ve Molen, 2005). Ticari olarak mevcuttur ve şu anda astım hastalarını tedavi etmek için klinik olarak kullanılmaktadır (Saad ve ark 2015). Antiinflamatuvar etkilerinin yanısıra Montelukast'ın astım hastalarını özellikle akciğer, göğüs, kolorektal ve karaciğer kanserlerinden doza bağımlı bir şekilde koruduğu bildirilmiştir (Tsai ve ark 2016). Montelukast'ın çeşitli kanser türlerinde antikarsinojenik etkileri de araştırılmıştır. Bir akciğer kanseri modelinde Montelukast'ın hücre ölümünü indüklediği ve tümör büyümesini inhibe ederek kemopreventif etkisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Tsai ve ark 2017). Başka bir çalışmada Montelukast'ın, bir hayvan modelinde kimyasal kaynaklı meme karsinogenezinin gelişmesini önlediği bildirilmiştir (Jose ve ark 2013). Diğer deneysel bir çalışmada tümör kaynaklı eksozomların CysLT1R aracılığıyla akciğer kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağladığı ve Montelukast kullanılarak bu kanser hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (Lukic ve ark 2019). Bellamkonda ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada Montelukast, kolon kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini azaltmıştır ve aynı çalışmada insan kolorektal karsinomunun fareye subkutan ksenograftlanması ile oluşturulan hayvan modelinde Montelukast'ın tümör boyutunu azalttığı görülmüştür (Bellamkonda ve ark 2018). Bu veriler Montelukast'ın kanser hücrelerinin elimine edilmesine yönelik tedavi yaklaşımları için önemli bir hedef olabileceğini göstermektedir. Bu amaçla Montelukast'ın pankreatik kanser hücre hatları üzerindeki etkilerinin: Kanser hücrelerinin büyüme, çoğalma, hayatta kalma, hareketlilik, migrasyon süreçlerinde rol oynayan *COX-2*, *C-MYC*, *MTOR*, *ERK1/2*, *HMGB1* genleri; CYSLT yolunda rol oynayan *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR99*, *GPR17* genleri ve apoptozis sürecinde rol oynayan *TP53*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genlerinin ifadesinde meydana getirdiği değişikliklerin ve ek olarak apoptozis sürecinde rol oynayan BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerinin seviyesine olan etkisinin araştırılması planlanmıştır.

1.1. Pankreas

Normal, sağlıklı yetişkin bir insanda yaklaşık 100 gr ağırlığında (Beger ve ark 2009). 14 ile 25 cm uzunlukta ve yaklaşık $72.4 \pm 25.8 \text{ cm}^3$ (Saisho ve ark 2007) hacimde olan pankreas hem lobüler hem de uzunlamasına şekle sahip olan bir organdır. Arka ve üst karın duvarının arkasında eğik olarak uzanan bu organ; baş,

uncinate çıkıntı (başın ventral lobunda bulunur), boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere beş anatomik bölüme ayrılmıştır (Şekil 1.1) (Atkinson ve ark 2020):

Üst karın bölgesinde yer alan ve başı duodenuma bitişik olan pankreasın gövde ve kuyruk bölgeleri, vücudun orta hattı boyunca dalağa yakın bir noktaya kadar uzanır. Baş kısmı doğrudan C şeklindeki duodenuma doğru iner ve duodenumun yatay kısımlarına yaslanır. Uncinate çıkıntı, baş kısmından aşağı doğru çıkıntı yapar ve posterior olarak superior mezenterik artere doğru uzanır. Boyun kısmı, pankreas gövdesine bağlandığı yerden yanal olarak uzanır. Boynun arkasında superior mezenterik arter ve venin yanı sıra hepatik portal venin orijini bulunur. Aort, superior mezenterik arter, sol renal damarlar ve sol böbreğin her biri pankreas gövdesinin arkasında yer alır. Son olarak, kuyruk dalak hilusuna kadar uzanır (Atkinson ve ark 2020, Longnecker ve ark 2014).



Şekil 1.1. İnsan pankreasının temel anatomik yapısı. **a.** Pankreas ve çevre organların şeması. **b.** Endokrin ve ekzokrin pankreasın hüresel düzeyde organizasyonunun şematik gösterimi. **c.** Dört endokrin hücre tipini gösteren insan pankreas adacığı (Atkinson ve ark 2020).

Pankreasın büyük çoğunluğu, gastrointestinal sistemin bir parçası olarak, sindirim enzimlerinin üretildiği ve karmaşık bir duktal kanal aracılığıyla duodenuma salgılandığı ekzokrin işlevine ayrılmıştır (Longnecker ve ark 2014). Pankreastaki bu sindirim enzimlerini üreten hücreler, üzüm salkımlarına benzer demetler oluşturan hücresel kümeler olduklarından dolayı, Latince üzüm anlamına gelen 'acinus' kelimesinden türetilen asiner hücreleri olarak adlandırılırlar (Şekil 1.1) (Williams 2010). Pankreasın yaklaşık %85'ini oluşturan asiner hücreler, asinüslerde düzenlenir ve tripsin, lipaz ve amilaz dahil olmak üzere protein, yağ ve karbonhidrat sindiriminde aktif olan enzimleri sentezler ve salgırlar (Atkinson ve ark 2020). Endokrin pankreas vücuttaki enerji metabolizmasını ve depolanmasını kontrol etmek amacıyla hormonları salgılayan ve bu hormonların kana salınımında rol oynayan endokrin hücre tiplerini içerir. İnsanlarda endokrin hücrelerinin yaklaşık %40-60'ı insülin salgılayan beta hücreleridir, geri kalanı glukagon salgılayan alfa, somatostatin salgılayan delta, pankreatik polipeptit salgılayan pankreatik polipeptit (PP) ve ghrelin salgılayan epsilon hücreleridir (Şekil 1.1) (Atkinson ve ark 2020, Bonner ve ark 2015, Kilimnik ve ark 2012).

1.2. Pankreas Kanseri

Tüm kanserlerin %2'sinden ve kansere bağlı ölümlerin %5'inden sorumlu olan pankreas kanseri, ağırlıklı olarak erkeklerde ve ileri yaşlarda (40-85 yaş) görülen, agresif seyreden ölümcül bir malignitedir (Goral 2015). Sıklığı son yıllarda giderek artmakta olan pankreas kanseri erken bulgu vermediği ve çevre organlara hızla yayıldığı için tespit edilmesi oldukça güç olan bir hastalıktır. Ek olarak, pankreas kanserini tedavi etmek için kullanılan terapötikler, hastanın hayatta kalmasını birkaç aydan fazla uzatmada başarısız olduklarından nispeten etkisizdirler (Garrido-Laguna ve Hidalgo 2015).

Pankreas kanserleri, endokrin veya ekzokrin hücrelerden kaynaklanabilir. Endokrin tümörler ekzokrin tümörlere nispeten nadirdir ve tüm pankreas kanserlerinin %5'inden azını oluşturur. Çok daha yaygın olan pankreas adenokarsinomasına kıyasla 27 aylık medyan sağkalım ve 0,28 kat daha düşük ölüm riski ile ilişkilidirler (Fesinmeyer ve ark 2005).

Endokrin tümörler genellikle pankreatik adacık hücrelerinden gelişir ve sıklıkla yapısal olarak yüksek seviyelerde pankreatik hormon üretir. Ayrıca kaynak hücrelerine ve salgıladıkları hormonlara bağlı olarak insülinomalar, glukagonomlar ve gastrinomlar olarak kategorize edilebilirler. Pankreas endokrin tümörleri, hipoglisemi veya nekrolitik gezici eritem (deri döküntüsü) gibi dramatik semptomlara yol açan aşırı hormon salgılamaları nedeniyle kolayca teşhis edilebilir (Phan ve ark 1998).

Ekzokrin hücre kaynaklı pankreas kanserleri, endokrin tümörlerden daha yaygındır ve tipik olarak iki histolojik alt tipte sınıflandırılabilir: Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK) alt tipi, ekzokrin tümörlerin çoğunu oluşturur ve tüm pankreas malignitelerinin %90'ından fazlasını oluşturur. PDAK' lar, pankreas kanalını takip eden ve kökenleri nedeniyle bez benzeri görünen epitel hücrelerinden türetilir (Fesinmeyer ve ark 2005). Bu kanserler sıklıkla karaciğer veya lenf bezlerine metastaz yapar (Kern ve ark 2002). Kanser gelişiminin erken evrelerinde semptom göstermemeleri nedeniyle, PDAK' lara genellikle geç bir aşamada, potansiyel olarak kanser zaten metastaz yaptıktan sonra teşhis edilir (Grant ve ark 2016). Diğer bir ekzokrin pankreas kanseri türü olan müsinöz tümörler, tüm tümörlerin <% 10'unu oluşturan ikinci en yaygın histolojik pankreas kanseri türüdür. Müsinöz tümörler genellikle tanı sırasında diğer ekzokrin pankreas kanseri türlerine göre daha az invazivdir (Lichtenstein ve Carr-Locke, 1995). Bu tümörler keseye benzer yapılar oluştururlar, müsin salgırlar ve tipik olarak pankreas duktal epitelinden köken alırlar (Lichtenstein ve Carr-Locke, 1995).

1.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanserinin küresel yükü son birkaç on yılda önemli ölçüde artış göstermekte ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Pourshams ve ark 2019).

Gelişmiş radyolojik araçlar dahil olmak üzere sağlık hizmetlerine olan sınırlı erişim, rapor edilen pankreas kanseri oranlarının doğruluğunu etkileyebilmektedir (Boffetta ve ark 2014). Son yirmi yılda, teşhis edilen küresel yıllık pankreas kanseri sayısı iki katına çıkmış, 1990'da dünya çapında 196.000 olan pankreas kanseri vakası 2017'de 441.000 sayılarına ulaşmıştır (Pourshams ve ark 2019). Bildirilen insidans ve ölüm oranlarındaki artışlar, 1970'lerden bu yana, özellikle yüksek gelirli ülkelerde

meydana gelmiştir. Bazı raporlar Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da insidans ve mortalitenin aynı seviyede olduğunu öne sürse de, en son veriler insidansın Birleşik Krallık ve Kuzey Amerika'da muhtemelen yaşlanan nüfusun bir sonucu olarak artmaya devam edecektir (Malvezzi ve ark 2015, Liao ve ark 2021, Siegel ve ark 2015). Amerika Birleşik Devletleri'nde, en yüksek oranlar siyah bireyler arasındadır. (100.000 erkek başına 12-15 vaka ve 100.000 kadın başına 8-10 vaka); bu oranlar, beyaz olan kişiler için ~%30-50 daha yüksektir (Steliarova-Foucher ve ark 2014). Okyanusya'da, uzun vadeli doğrulanmış istatistikler olmamasına rağmen, %30'dan fazla bir artışla en çok yerli nüfus etkilenmektedir. Muhtemelen yetersiz tanıdan etkilenen en düşük oranlar Hindistan ile Kuzey ve Orta Afrika'da kaydedilmiştir (100.000 erkek başına <2 vaka ve 100.000 kadın başına 1 vaka). Ölüm oranları, insidans oranlarıyla paralellik göstermektedir.

Pankreas kanserinden ölüm riskinin, yaşla birlikte dramatik bir şekilde arttığını belirten uluslararası bir rapor, 2012'de küresel nüfusun %8'inin, pankreas kanseri açısından en yüksek risk taşıyan yaş grubu olan 65 yaşın üzerinde olduğunu kaydetmiştir (He ve ark 2021). Önümüzdeki 30 yılda, özellikle Asya, Avustralya, Avrupa'daki tüm bölgeler ve Latin Amerika'daki birçok bölgede, pankreas kanserinden yaşa göre standardize edilmiş bu oranın ikiye katlanarak %16,7'ye çıkması beklenmektedir (Pourshams ve ark 2019). Tanıya erişimin kısıtlı olması nedeniyle pankreas kanseri insidans oranlarının düşük kaldığı Afrika'da bile, 65 yaş üstü nüfusun oranının önümüzdeki birkaç on yılda iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (He ve ark 2016). Bu nedenle, pankreas kanseri insidansı önümüzdeki birkaç on yılda artmaya devam edecektir.

1.2.2. Pankreas Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin etiyolojisi kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup çok sayıda meta-analizin birleştirilmiş sonucu olarak, şimdiye kadar, birçok risk faktörü tanımlanmıştır (Rawla ve ark 2019). Bu risk faktörlerini iki kategoriye ayırmak mümkündür: Değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri (Midha ve ark 2016).

Değiştirilebilir risk faktörleri

Sigara, alkol, obezite, diyet faktörleri ve toksik maddelere maruz kalma değiştirilebilir risk faktörleri olarak pankreas kanserinde tanımlanmışlardır.

Sigara, dünyadaki pankreas kanseri için en önemli çevresel faktörü temsil etmektedir ve dünya çapında bin milyondan fazla insan tütün kullanmaktadır. Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı, sigara içmenin pankreas kanseri ile nedensel olarak ilişkili olduğunu doğrulamıştır (Ezzati ve ark 2005, Smoke ve Smoking 2004). Pankreas kanseri riski, sigara içme süresi ve günlük içilen sigara sayısı ile artmaktadır ve risk, sigara içenlerde içmeyenlere göre yaklaşık iki kat daha fazladır (Kuzmickiene ve ark 2013, Mizuno ve ark 2014, Pelucchi ve ark 2014).

Sigara ile ilişkili pankreas kanseri riski, alkol tüketimi gibi potansiyel faktörler hesaba katıldıktan sonra da yüksek olmaya devam etmektedir. Pek çok araştırmaya göre, pankreas kanseri riski şüphesiz yüksek alkol tüketimiyle (günde üçten fazla içki) artarken, düşük ila orta derecede alkol alımı arasında bir ilişki bulunmamıştır (Lucenteforte ve ark 2012, Tramacere ve ark 2010, Wang ve ark 2016). 2010'da yapılan büyük bir vaka kontrol çalışması, 60 g/gün veya daha fazla likör (içki) tüketiminde bile riskin arttığını göstermiş, ancak bira veya şarapla bir ilişki bulamamıştır (Michaud ve ark 2010).

Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, yoğun alkol tüketimiyle birlikte halen sigara içenlerin pankreas kanseri riskinde önemli bir artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca, düşük ila orta derecede alkol alımı, halen sigara içenler arasında artmış pankreas kanseri riski ile ilişkili olarak tespit edilmiştir (Rahman ve ark 2015), bu da sigara içmenin alkol-kanser ilişkisini değiştirebileceğini öne sürmektedir. Ancak alkol ve sigara arasındaki ilişki çok yakındır. Bu nedenle, alkolü pankreas kanseri için bağımsız bir risk faktörü olarak dahil etmek zor olabilir.

Obezite, pankreas kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri için artmış risk ile ilişkilendirilmiştir (Davoodi ve ark 2013). Bazı çalışmalar, obezitenin pankreas kanseri insidansını ve mortalitesini artırdığını bulmuştur (Berrington de Gonzalez ve ark 2003, Calle ve ark 2003). Li ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir araştırma, erken yetişkinlik döneminde aşırı kilolu veya obez olmanın daha yüksek hastalık riski ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Ayrıca Li ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada daha ileri yaşta (30-79 yaş) obezite, pankreas kanserinde daha düşük genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca yağ birikimine ve aşırı kiloya katkıda bulunabilen fiziksel hareketsizliğin, pankreas kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Aune ve ark 2012).

Diyet de pankreas hastalıkları dahil olmak üzere farklı sindirim hastalıkları ve kanser riskini etkilemesi üzerinde etkilidir. Diyet faktörleri pankreas kanseri üzerinde %30-50'ye varan bir etkiye sahiptir ve bazı gıdaların daha yüksek riskle ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (Maisonneuve ve ark 2015, Michaud ve ark 2005, Midha ve ark 2016).

Kırmızı et tüketimi (özellikle yüksek sıcaklıkta pişirildiğinde), işlenmiş etler, kolesterol, kızarmış yiyecekler ve nitrozamin içeren diğer yiyecekler pankreas kanseri riskini artırabilir (Lightsey ve ark 2012, Stolzenberg-Solomon ve ark 2007). Etteki karsinogenler ve işlenmiş etleri korumak için kullanılan nitrit veya N-nitroso bileşiklerinin pankreas kanseriyle ilişkilendirilmesi olasıdır (Beaney ve ark 2017). 11 vaka kontrol çalışmasını içeren bir meta-analizin sonuçları, kırmızı et alımının pankreas kanseri riskini yaklaşık %48 oranında artırdığını göstermiştir. Öte yandan, özellikle narenciye ve antioksidanlarla zenginleştirilmiş sebze ve meyvelerin yüksek oranda alınması, pankreas kanseri riskini sırasıyla %38 ve %29 oranında azaltan koruyucu bir etkiye sahiptir (Paluszkiewicz ve ark 2012).

Mesleki riskler de pankreas kanserinin değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer almaktadır. Bir popülasyonda mesleki maruziyetlere (metal işleme ve böcek ilaçlarına maruz kalmayı içeren) bağlı pankreas kanserinin etiyolojik fraksiyonunun %12 olduğu tahmin edilmektedir (Rawla ve ark 2019).

Mesleki maruziyetler ve pankreas kanserine ilişkin bir meta-analiz, nikel maruziyeti ile artan bir risk bildirmiştir (Ojajarvi ve ark 2000). Mesleki ortamlarda nikel, yüksek konsantrasyonlarda poliklorlu bifenillerle ilişkilendirilebilir ve son bileşikler, gözlemlenen artan riskten sorumlu olabilir (Bosch de Basea ve ark 2011, Porta ve ark 1999). Nikelin kanserojen mekanizmaları, DNA metilasyonunu artırmayı, DNA onarımını engellemeyi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla apoptozu tetiklemeyi içerebilir (Rawla ve ark 2019).

Değiştirilemeyen risk faktörleri

Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, etnik köken, diyabet, ailede pankreas kanseri öyküsü, genetik faktörler, kan grubu, kronik pankreatit ve kronik enfeksiyonlar yer almaktadır (Rawla ve ark 2019).

Cinsiyet sınıfı değerlendirildiğinde pankreas kanseri erkeklerde kadınlardan daha yaygındır. Küresel olarak, pankreas kanseri insidansı erkeklerde 100.000'de 5.5 ve kadınlarda 100.000'de 4.0'dür (Bray ve ark 2018). Pankreas kanseri, muhtemelen çevresel veya mesleki risk faktörlerinin yanı sıra erkeklerde yoğun sigara içme ve yüksek alkol alımı gibi yaşam tarzları nedeniyle daha fazla görülür; bununla birlikte, erkeklerde ve kadınlarda kanser insidansını ve ölüm oranını etkileyen henüz keşfedilmemiş genetik faktörlerin olması da mümkündür (Rawla ve ark 2019).

Kanser İstatistikleri incelemesi (SEER- Surveillance, Epidemiology, and End Results), pankreas kanserinin ağırlıklı olarak yaşlı bir popülasyonun hastalığı olduğunu ve hastaların çoğunun 50 yaşından büyük olduğunu belirtmektedir (Howlader ve ark). Gerçekten de, pankreas kanseri gelişme riski yaşla birlikte artar ve en yüksek pik 60 ila 80 yaşları arasında gerçekleşir (Bosetti ve ark 2012, Bray ve ark 2018, Siegel ve ark 2018). Bu geç yaş başlangıcının nedeni henüz belli olmamakla birlikte pankreatik bir lezyon veya enflamatuar bir durumun ortaya çıktığı andan itibaren, kanserin malign bir neoplazmaya dönüşmesi birkaç yıl alabilir. Ancak bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Rawla ve ark 2019).

Etnik köken olarak değerlendirme yapıldığında birçok çalışma, ırklar arasında pankreas kanseri insidansında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir (Brotherton ve ark 2016, Ma ve ark 2013, Shavers ve ark 2009). Afrikalı-Amerikalılar için pankreas kanseri insidans oranları, Kafkasyalılardan daha yüksekken, insidans Asyalı-Amerikalılar ve Pasifik Adalılarında en düşük seviyededir (American Cancer Society, 2014). Genel olarak, siyah insanlarda pankreas kanseri oranı riski, diğer ırk gruplarından önemli ölçüde daha yüksektir (Yadav ve Lowenfels 2013). İrklar arasında pankreas kanseri insidansındaki farklılıklar, diyet, alkol, sigara ve D vitamini eksikliği gibi değiştirilebilir risk faktörlerine bağlanabilir. (Rawla ve ark 2019).

Hem tip I hem de II diyabet ile pankreas kanseri riski arasındaki pozitif ilişki çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (Batabyal ve Vander Hoorn 2014, Haugvik ve ark 2015, Maisonneuve ve Lowenfels 2015, McAuliffe ve Christein 2013, Pezzilli ve Pagano 2013, Stevens ve Roddam 2007). Pankreas kanseri riski diyabetin süresi uzadıkça azalır, ancak %30'dan fazla bir risk diyabet teşhisi konulduktan sonra yirmi yılı aşkın bir süre devam eder (Bosetti ve ark 2014). Oral anti-diyabetik ilaçlar veya insülin kullanımı, pankreas kanseri riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Bosetti ve

ark 2014, Live ark 2011). Pankreas kanseri ve periferik insülin direnci olan bazı hastalarda, tümörün çıkarılması glukoz metabolizmasını iyileştirmiştir bu da, değişmiş glukoz metabolizmasının tümörün bir sonucu olabileceğine dair kanıt sağlamıştır (Permert ve ark 1993).

Pankreas kanserli bireylerin yaklaşık % 5-10'unun ailede pankreas kanseri öyküsü olduğu bildirilmiştir (Anand ve ark 2008, Jacobs ve ark 2010, Permuth-Wey ve Egan 2009, Shi ve ark 2009). Ailesel pankreas kanseri, çoğu çalışmada birinci derece akrabalarda (ebeveyn, kardeş veya çocuk) pankreas kanseri teşhisi konan aileler olarak tanımlanmaktadır. Bu malign hastalığı olan ailelerin prospektif analizi, ailesel pankreas kanseri olan bireylerin birinci derece akrabalarının genel popülasyona göre dokuz kat daha fazla pankreas kanseri riskine sahip olduğunu göstermektedir (Klein ve ark 2004). Ayrıca kanıtlar, ailede genç başlangıçlı pankreas kanseri vakası (yaş <50) olan ailesel pankreas kanseri olan akrabalarda, genç başlangıçlı vakası olmayanlara kıyasla riskin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Brune ve ark 2010). Ailesel pankreas kanserli hastalar ayrıca sporadik pankreas kanserli hastalardan daha fazla prekanseröz lezyonlara sahiptir (Shi ve ark 2009) ve ekstra-pankreatik kanser geliştirme risklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark 2009).

Genetik varyasyon veya mutasyon (germ-line mutasyonu), pankreas kanseri riskinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır (Ghiorzo 2014). Pankreas kanseri olan hastaların yaklaşık %10'unda, hastalığın gelişmesinde gen varyasyonları veya değişiklikleri gibi bazı genetik yatkınlıklar bulunmaktadır (Shi ve ark 2008). *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *CDKN2A*, *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PRSS1* ve *STK11*, *KRAS*, *TP53* gibi çeşitli germ hattı mutasyonlarının pankreatik kanserin kalıtsal formlarında yer aldığı tanımlanmıştır (Berrozpe ve ark 1994, Solomon ve ark 2012, Vincent ve ark 2011).

ABO kan grubu sisteminin antijenleri, kırmızı kan hücresi zarlarının yanı sıra diğer bazı normal ve patolojik hücre ve dokuların yüzeyinde de ifade edilir. 60 yılı aşkın bir süre önceki ilk klinik gözlemlerin ardından, ABO kan grubunun kanser biyolojisindeki rolü, birkaç araştırmacı tarafından yoğun bir şekilde incelenmiştir ve artık ABO antijenlerinin, pankreas da dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerini geliştirme riskiyle ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Anstee 2010,

Franchini ve ark 2012, Franchini ve ark 2016, Liumbruno ve Franchini 2013, Zhang ve ark 2014).

Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışma (Macafee 1964) ve altı ülkeyi kapsayan bir çalışmada (Vioqueve ve Walker 1991), kan grubu A olan kişilerde pankreas kanseri riskinin arttığını gözlemlenmiştir. İtalya'da yapılan bir araştırmada (Annese ve ark 1990), kan grubu B olan kişilerde de pankreas kanseri riskinin arttığı saptanmış ve ayrıca ABD'de yapılan bir kohort çalışması (Wolpin ve ark 2009), O kan grubuna kıyasla A, B ve AB kan gruplarını kendisi bildiren kişilerde artmış risk bulmuştur. Son olarak, genom çapında ilişkilendirme çalışması "Panscan I"nin bulguları O olmayan kan grubu ile pankreas kanseri (Amundadottir ve ark 2009), arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu bağlantıyı desteklemek için önerilen mekanizmalar arasında enflamasyon, kötü huylu hücreler için bağışıklık gözetimi, hücreler arası yapışma ve zar sinyalleme yer almaktadır (Rawla ve ark 2019).

Pankreatit, akut veya kronik olabilen ve pankreas hasarına neden olan bir pankreas iltihabıdır (Rawla ve ark 2019). Tekrarlayan akut pankreatit nöbetleri, glandüler hasara neden olabilmekte ve bu durum pankreasın tamamen yok edilmesiyle sonuçlanan yıkıcı bir inflamatuvar süreci indükleyerek kronik pankreatite yol açabilmektedir (Etemad ve Whitcomb 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalar uzun süreli önceden var olan kronik pankreatitin pankreas kanseri için güçlü bir risk faktörü olduğunu tanımlamıştır (Duell ve ark 2012, Ekbom ve ark 1994, Raimondi ve ark 2010). Pankreatit vakalarının önemli bir oranının pankreas tümörü ile ilişkili duktal obstrüksiyonun bir sonucu olduğu düşünülmektedir ve bu durum pankreatitin pankreas kanseri üzerinde bir risk faktörü veya erken hastalık belirtisi olabileceğini göstermektedir (Bracci ve ark 2009, Lowenfels ve ark 1993, Olson 2012, Raimondi ve ark 2010).

Uzun süredir devam eden kronik pankreatit ve kanser arasındaki ilişki bazı araştırmalara göre kanıtlanmıştır. Pankreas kanseri, bilinen tüm etiyolojilerden kaynaklanan kronik pankreatit ortamında gelişmekte, ancak hastaların önemli bir yüzdesinin pankreas kanseri geliştirmesi için 30-40 yıllık bir enflamasyon gerektirdiği görülmektedir (Rawla ve ark 2019).

1.2.3. Pankreas Kanseri Tanısı

Histolojik İnceleme

Histopatoloji analizi ve sitoloji pankreas kanseri tanısı için “altın standarttır”. Cerrahi rezeksiyon yapılan hastalar dışında, geri kalan hastalar bir tedavi planı oluşturmadan önce net bir patolojik tanı için çaba göstermelidir. Histopatoloji veya sitoloji örnekleri elde etmek için mevcut yöntemler endoskopik ultrasonografi (EUS) veya bilgisayarlı tomografi (CT) eşliğinde biyopsi, asit sıvısı sitolojisi ve laparoskopi veya açık cerrahi tanı ile keşif biyopsisi olarak ayrılmıştır (Zhao ve Liu 2020).

Tümör Biyobelirteçleri

Son yıllarda, pankreatik kanser moleküler değişiklikleri hakkındaki bilginiz önemli ölçüde artmıştır ve bu bilgiler yeni serum tümör belirteçlerinin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Şu anda pankreas kanserinde 6 yaygın tümör biyobelirteci (CA19-9, CA242, karsinoembriyonik antijen [CEA], CA125, mikroRNA'lar ve *K-RAS* gen mutasyonları) bulunmaktadır (Ge ve ark 2017). Tümör belirteçleri ve görüntüleme yöntemlerinin kombinasyonu, pankreas kanseri için erken tarama amacıyla ilk tercih olabilme potansiyeline sahiptir (Gemmell ve ark 2009). Son yıllarda, sitoloji ve genomikteki gelişmeler pankreas kanserinin erken teşhisi için serum tümör belirteçleri ile birlikte kullanılmaktadır. Pankreas kanserinin erken evrelerinde, tümörle ilişkili makrofajların (TAM), nötrofiller ve T hücrelerinde bir azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lee ve Gibbs 2019). CA19-9, PK nüksünün ve prognozunun postoperatif tespiti için en sık kullanılan biyobelirteçtir.

Son yıllarda, dolaşımdaki hücre dışı DNA (cfDNA) ve mutasyona özgü dolaşımdaki hücre dışı tümör DNA'sı (ctDNA), yeni potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır (Hufnagel ve ark 2020). Mevcut çalışmalar, cfDNA ve ctDNA konsantrasyonlarındaki değişiklikler ile tedavi yanıtı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, cfDNA ve ctDNA, tedaviden sonra kanserin etkinliğini değerlendirmek için yeni biyobelirteçler haline gelebilir ve metastazların tümör hacmi ile korelasyonları nedeniyle, tümör hacmini tahmin etmek için araçlar olarak da kullanılabilirler (Hufnagel ve ark 2020).

Bilgisayarlı Tomografi/Pozitron Emisyon Tomografisi

Şüpheli pankreas lezyonlarının tanısında, pankreas kanserinin rezektabilitesinin değerlendirilmesinde, vasküler invazyonun değerlendirilmesinde ve metastatik hastalığın tanısında çok dedektörlü bilgisayarlı tomografi (ÇDBT) artık rutin bir incelemedir (Ahn ve ark 2009).

ÇDBT sadece küçük kollanan damarları ve peripankreatik damarları değil, aynı zamanda lezyonların detaylarını ve mekansal anatomik ilişkiyi daha iyi anlayabilen vasküler anatomik varyasyonları da görüntülemektedir. Bu inceleme tümör morfolojisindeki değişiklikleri ve çeşitli dokuların yoğunluğundaki değişiklikleri de göstermektedir ((Ahn ve ark 2009).

Evreleme için tanı kriterleri, Japon Pankreatik Vaka Derneği Kriterleri tarafından belirlenen PK evrelemesine atıfta bulunur: Evre I, tümör çapı 2 cm'den küçük veya eşittir, vasküler invazyon ve metastaz yok; Evre II, tümör çapı 2 cm'den büyük ve 4 cm'den küçük, zarflı kanser hücresi infiltrasyonu, vasküler invazyon yok, metastaz; Evre III, tümör çapı 4 cm'den büyüktür ve yakınlarda lenfatik metastaz vardır; ve Evre IV, tümör çapı 4 cm'den büyüktür ve uzak lenf düğümü metastazı kanıtı vardır (Zhao ve Liu 2020).

Pozitron emisyon tomografisi (PET), vücuttaki ince doku fonksiyonu ve metabolizma gibi moleküler bilgileri ortaya çıkarabilmektedir. PET-CT, tümörleri ve diğer hastalıkları erken teşhis edebilen bir yöntemdir. Tümör hücrelerinin aktif metabolizması nedeniyle, görüntüleme ajanlarını alma yeteneği normal hücrelerin 2-10 katıdır ve görüntü üzerinde bariz bir "ışık noktası" oluşturmaktadır. Bu nedenle, tümör anatomik değişiklikler üretmeden önce, gizlenmiş mikroskobik lezyonları tespit ederek PK'nin erken saptanması ve teşhis edilmesi ile sonuca ulaşılmaktadır (Ghaneh ve ark 2018).

Çeşitli avantaj ve dezavantajlarına göre değerlendirmeler yapılarak endoskopik ultrasonografi (EUS) veya bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi (ERCP) yöntemleri de pankreas kanserinin tanısında kullanılmaktadır.

1.2.4. Pankreas Kanseri Tedavisi

Geleneksel pankreas kanseri tedavisi cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve palyatif bakımı içermektedir. Son yıllarda, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve mikrobiyal terapi üzerine araştırmalar giderek artmıştır ve gelecekte PK tedavisi için geleneksel yöntemlerle birleştirilmesi öngörülmektedir (Zhao ve Liu 2020).

Cerrahi

Pankreas kanserinde potansiyel tek tedavi yöntemi olan cerrahi rezeksiyonda, kemoterapinin ve adjuvanın birlikte desteklenmesiyle hayatta kalmada daha fazla iyileşme olduğunu gösteren bazı sonuçlar olmuştur (Pliarchopoulou ve Pectasides 2009). Tam rezeksiyon ve adjuvan gempitabin tedavisiyle sağkalım 13.4 ay, tedavi edilememiş vakalarda ise sağkalım 6.9 ay süre arasında değişebilmektedir (Pliarchopoulou ve Pectasides 2009). Cerrahi rezeksiyonun en önemli kısmı, pozitif rezeksiyon sınırı (R1 veya R2) nüks ve kötü prognoz ile ilişkili olduğundan, negatif bir rezeksiyon sınırına (R0) ulaşmasını sağlamaktır. Cerrahi rezeksiyon kanserden tam olarak kurtulmak için en önemli tedavi olmasına karşılık tümör metastazından dolayı sınırlı olarak istenilen sonuçlar elde edilebilmektedir. Adjuvan kemoterapi ile desteklenen bu tedavi sonrası gerçekleşen müdahale cerrahi rezeksiyonun nüksetmemesi için oldukça önemli bir rol taşımaktadır ve hayati değerleri oldukça fazladır (Brunner ve ark 2019).

Kemoterapi

Kemoterapi, PK'nin kapsamlı tedavisinin önemli bir parçasıdır. Çalışmalar, radikal rezeksiyondan sonra, adjuvan kemoterapinin PK'li hastaların hastalıksız sağkalımını ve genel sağkalımını önemli ölçüde iyileştirebileceğini göstermiştir (Springfeld ve ark 2019). Radikal rezeksiyondan sonra, modifiye lökovorin, 5-florourasil, irinotekan ve oksaliplatin genellikle 6 aylık adjuvan kemoterapi veya 6 aylık gempitabin ve kapesitabin için kullanılır (Springfeld ve ark 2019).

Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini yok etmek veya onlara zarar vermek için X ışınlarını kullanır, bu da onların çoğalmasını engeller. Radyoterapi esas olarak lokal ileri PK'li hastalarda kullanılır (Loehrer ve ark 2011, Takaori ve ark 2016). Klinik

kullanımında X ışınları, gama ışınları, elektronlar ve ışın radyasyon tedavisi olmak üzere 4 ana radyoterapi şekli bulunmaktadır (Chin ve ark 2018).

Palyatif bakım

PK hastalarının bir noktada palyatif bakıma ihtiyacı olduğundan, palyatif bakım diğer tedaviler kadar önemlidir. Perkütan safra kanalı drenajı, cerrahi gastrojejunostomi ve endoskopik duodenal stentler mide çıkışı obstrüksiyonu olan hastaların tedavisinde 3 ana yaklaşımdır (Kamisawa ve ark 2016).

Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavi birçok kanser türünde çok başarılıdır. Örneğin kolorektal kanserde EGFR veya VEGF'ye yönelik antikorlar, HER-2 pozitif meme kanserinde trastuzumab veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri alt popülasyonlarında krizotinib gibi tirozin inhibitörleri hedeflenmektedir. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) yakın zamanda pembrolizumabı PK için hedeflenmiş bir tedavi olarak onaylamış olsa da, bugüne kadar affrecept, cetuximab, sorafenib, bevacizumab ve axitinib dahil olmak üzere diğer tüm hedefli ilaçlar PK hastalarında başarısız olmuştur (Zhen ve ark 2018).

Son zamanlarda, metastatik PK'li 19 hasta klinik olarak incelenmiştir. Bu hastalar gemsitabin ve oksaliplatin ile ikili tedavi almışlar ve sonuçlar, hastaların %55'inde tümör belirteçlerinin >%50 oranında azaldığını göstermiştir. Ancak 7 (%88) hasta tedaviden sonraki 3 ay içinde ölmüş ve geri kalanı ikinci basamak tedavi görmüştür (Tesfaye ve ark 2019). PEGPH20 ve CKAP4 gibi yakın zamanda PK için hedefe yönelik tedavi için yeni hedefler belirlenmiştir (Kimura ve ark 2019).

PK tümör hücreleri, genetik olarak yönlendirilen farklı mutasyonlar taşıdığından, bu durum moleküler hedefli tedavi için büyük bir zorluk teşkil eder (Zhao ve Liu 2020).

İmmünoterapi

Bağışıklık kontrol noktası blokajı (ICB) tedavisi artık melanom, akciğer kanseri, renal hücreli karsinom ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu gibi çeşitli kanser türleri için onaylanmıştır (Haanen ve ark 2018). Bununla birlikte, PK daha az

immünojenik bir kanser olarak kabul edilir. PK tümörlerinin mikro çevresinin, immünosüpresif bir ortam yarattığı düşünülmektedir. Bu nedenle, şu anda PK'li hastalar için onaylanmış bir immünoterapi yoktur. CTLA-4 veya PD1 inhibitörlerinin monoterapisi, PK'de esasen etkisizdir ve birçok klinik çalışma, immünoterapiyi kemoterapi, kemoradyoterapi, aşılar ve sitokin antagonizmi ile kombinasyon halinde test etmiştir (Sahin ve ark 2017). Teorik olarak, klinikte ilgili ilaç kemoterapisi, bağışıklık yanıtını azaltmalıdır, ancak klinik çalışmalar, hastanın bağışıklık durumunun değişmediğini göstermiştir (Middleton ve ark 2016, Middleton ve ark 2014).

Mikrobiyal Tedavi

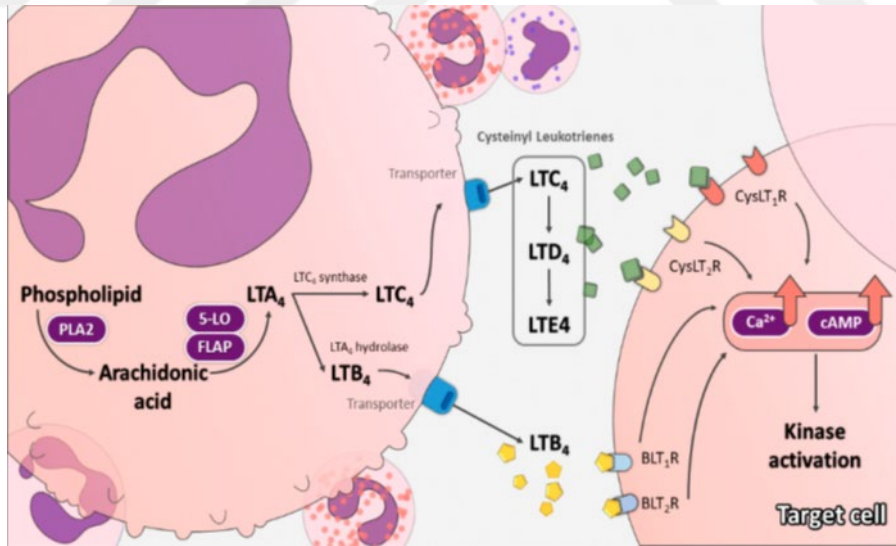
İnsan mikrobiyotasının kanser gelişimini ve kanser tedavisine yanıtı düzenlemede önemli bir rol oynadığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Mikrobiyota, bağırsak ve parenteral dokuların kanser tedavisine verdiği yanıtı etkiler (Raza ve ark 2019). Bir çalışmada araştırmacılar, PK konakçılarından alınan bağırsak bakteri özlerini bir fare modeline nakletmiş ve hastaların bakteriyel özündeki makrofajların CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu engellediğini bulmuşlardır. Antijenik makrofaj antijenlerini sunma yeteneğinin azalması, tümör makrofajlarında farklı model tanıma reseptörlerinin (PRR'ler) daha yüksek aktivasyonunu indüklemiştir (Riquelme ve ark 2018).

Bugüne kadar, PK'de sistemik bağışıklık ve tümöre özgü bağışıklık oluşturan bağırsak mikroflorasının sonuçları doğrulanmıştır, ancak mekanizma üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Daley ve ark 2017). Birkaç çalışma, insan mikropplarının ve bağırsak bakterilerinin PK tümörü mikro çevresinin önemli bileşenleri olduğunu ve fekal transplantasyon gibi mikrobiyal koşullandırmanın gelecekteki klinik deneyler için güçlü bir aday olduğunu göstermiştir (Schulz ve ark 2014).

Gelecekte, mikrofloranın bağışıklık toleransının kurulmasına ve sürdürülmesine nasıl katkıda bulunduğu, yeni tedavi stratejileri bulma girişimindeki araştırmaların odak noktası olacaktır. PK ile ilişkili mikrofloranın ayrıntılı bir analizi, PK'nin gelişimi ve ilerlemesinde olumlu veya olumsuz bir rol oynayan spesifik toplulukları belirlemek için kullanılabilir.

1.3. Sisteinil Lökotrienler

Lökotrienler, ilk olarak 1970'lerin sonlarında mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, bazofiller ve makrofajlar dahil olmak üzere farklı hücrelerde araşidonik asitten (AA) sentezlenen bir inflamatuvar lipid aracıları ailesi olarak tanımlanmıştır (Peters-Golden ve ark 2006). Hücre zarı uyarılma veya yaralanma ile karşılaştığında, fosfolipaz A2, hücre zarının fosfolipidlerinden AA'nin hidrolizini katalize eder (Şekil 1.2). Stimülasyon, ani aşırı duyarlılık, trombosit aktive edici faktör veya kalsiyum iyonofor gibi inflamatuvar veya immünolojik süreçler olabilmektedir. Serbest kalan AA daha sonra 5-lipoksijenaz aktive edici protein (FLAP) ile uyumlu olarak 5-lipoksijenaz (5-LO) ile dehidre edilecek ve kararsız epoksit lökotrien A4 (LTA₄) haline gelecektir (Ophir ve ark 1985; Peters-Golden ve ark 2003). Bir sonraki adımda, kararsız epoksit LTA₄, LTA₄ hidrolaz tarafından lökotrien B₄'e (LTB₄) ve lökotrien C₄ (LTC₄) sentaz tarafından LTC₄'e dönüştürülür (Haeggström ve ark 2002). Hücre dışı ortama taşındıktan sonra LTC₄, lökotrien D₄'e (LTD₄) dönüştürülecektir (Peters-Golden ve ark 2007). Son olarak, dipeptidaz, LTD₄'ün glisin kalıntısından yoksun kalır ve LTD₄'ü lökotrien E₄'e (LTE₄) dönüştürür (Al-Azzam ve ark 2020).



Şekil 1.2. Sisteinil lökotrien yolu (Tsai ve ark 2022).

Araşidonik asit kaynaklı lökotrien A₄ (LTA₄), LTC₄ sentaz tarafından lökotrien C₄'e (LTC₄) dönüştürülür. Hücre dışı ortama taşındıktan sonra, LTC₄, lökotrien D₄'e (LTD₄) ve ardından lökotrien E₄'e (LTE₄) dönüştürülür. LTC₄, LTD₄ ve LTE₄ dahil olmak üzere sisteinil lökotrienler, hedef hücrelerdeki sinyal yollarını aktive etmek için

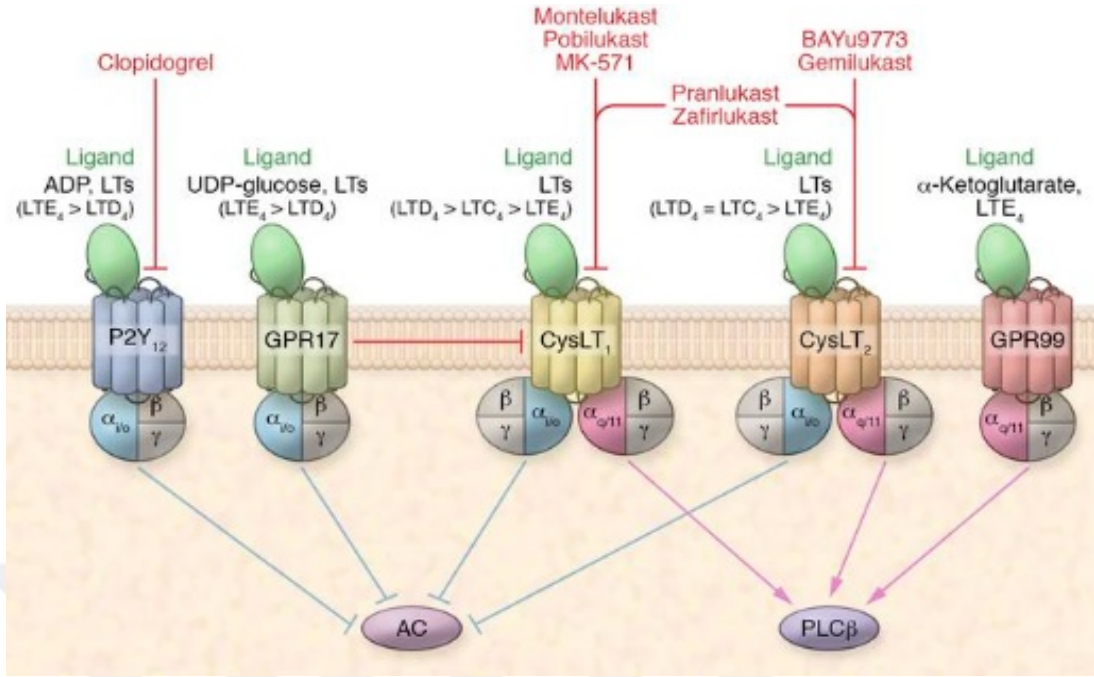
sisteinil lökotrien reseptörlerine, özellikle CysLT1R ve CysLT2R'ye bağlanır (Şekil 1.2) (Tsai ve ark 2022).

Sisteinil lökotrienlerin peptit yan zincirinin olmaması nedeniyle, LTB₄, sisteinil lökotrien olarak sınıflandırılmamıştır (Crooks ve ark 1998). Klasik bir kemoatraktan olarak LTB₄, lökositlerin endotelyuma agregasyonunu ve yapışmasını tetikleyebilmektedir. Ayrıca, enfeksiyonlara karşı konak savunması ile ilişkili bağışıklık tepkilerini de düzenlemektedir. LTB₄, dermatit, artrit, nefrit ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi birçok inflamatuvar hastalıkta rol oynamaktadır (Haeggström ve ark 2002).

Sisteinil lökotrienler (CysLT'ler) LTC₄, LTD₄ ve LTE₄'ü içerir (Şekil 1). Bunlar arasında LTE₄, idrarda ölçülebilen en kararlı olanıdır. Bu nedenle idrar LTE₄ seviyesi, "tüm vücut" lökotrien sentezinin bir belirteci olarak kullanılabilir (Singh ve ark 2010). LTD₄ bir insan monositik lösemi hücre hattı olan THP-1 hücrelerinde sitozolik kalsiyumu arttırmış ve MAPK yolunu aktive etmiştir. CysLT'lerin inflamasyondaki rolleri iyi bilinmektedir ve pro-anjiyogenik aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir (Murphy ve ark 2016).

1.3.1. Sisteinil Lökotrien Reseptörleri

Sisteinil lökotrienler, hedef hücrelerdeki sinyal yollarını aktivasyonunu sisteinil lökotrien reseptörlerine bağlanarak sağlar (Yokomizo ve ark 2018). Şimdiye kadar beş CysLT reseptörü tanımlanmıştır: Bunlar CysLT1, CysLT2, P2Y₁₂, GPR99 ve GPR17'dir (Şekil 1.3). CysLT1 yaygın olarak dalak, lökositler, akciğer, ince bağırsak, kolon ve iskelet kasında eksprese edilir (Lynch ve ark 1999, Sarau ve ark 1999, Woszczek ve ark 2005). CysLT2, CysLT1 ile %37.3 amino asit özdeşliği sergiler ve özellikle kalp, adrenaller, lökositler, dalak, lenf düğümleri ve beyinde eksprese edilir (Heise ve ark 2000, Kanaoka ve ark 2004, Nothacker ve ark 2000, Takasaki ve ark 2000). CysLT1 tercihen LTD₄ tarafından aktive edilirken, CysLT2 hem LTC₄'ü hem de LTD₄'ü eşit afinite ile bağlar. Son zamanlarda, P2Y₁₂, GPR99 ve GPR17'nin LTE₄ için reseptörler olduğu bildirilmiştir (Paruchuri ve ark 2009, Fumagalli ve ark 2011, Kanaoka ve ark 2013). Ayrıca GPR17, CysLT1'in varsayılan bir negatif regülatörü olarak bildirilmiştir (Maekawa ve ark 2010).



Şekil 1.3. CysLT1, CysLT2, GPR17, GPR99 ve P2Y12 aracılığıyla sinyalleme. Her reseptör için sentetik antagonistler kırmızı metinle belirtilmiştir. Ligandlar ve nispi afiniteler, ilgili reseptörlerine bitişik olarak verilmiştir. GPR17, CysLT1 için negatif bir regülatördür. Her reseptörün altında gösterilen, Gi/o ve adenilil siklaz (AC) ve/veya Gq/11 ve fosfolipaz Cβ (PLCβ) ile aşağı akış bağlantısıdır (Yokomizo ve ark 2018).

1.3.2. Sisteinil Lökotrien Yolu ve Kanser

Son yıllarda sisteinil lökotrienlerin (CysLT'ler) tümörögenezdeki rolü hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir. Tümörü teşvik eden inflamasyon (Saier ve Peyruchaud 2022), tümör mikro çevresindeki (TME) iltihaplanma, tümörün ilerlemesi için kritik bir bileşendir ve şimdi kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Hem kanser hücrelerinin hem de kanser olmayan stromal hücrelerin güçlü CysLT üreticileri olduğu göz önüne alındığında, tümör ilerlemesi, CysLT sinyal yollarına entegre bir yanıt içerir. LT'ler, bronşiyal düz kasın kasılması, vasküler geçirgenliğin uyarılması, lökositlerin çekilmesi ve aktivasyonu gibi çeşitli biyolojik etkiler sergiler (Hammarström 1983). CysLT'ler temel olarak miyeloblastik soyun lökositleri (özellikle eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri tarafından) ve monoblastik soyların (monositler/makrofajlar) yanı sıra dendritik hücreler tarafından biyosentezlenir (Peters ve Henderson 2007).

CysLT'ler, kemik iliği hücreleri, düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve bağırsak hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde hücre proliferasyonunu indükler (Bäck ve ark 2014). LTD4- CysLT1 reseptör sinyalinin aktivasyonu, hücre proliferasyonunu ve çoklu yollardan hayatta kalmayı desteklemektedir. LTD4, tümör olmayan bağırsak Int407 hücrelerinde ERK1/2'nin Ras'tan bağımsız, PKCε'ye bağımlı bir aktivasyonu aracılığıyla hücre çoğalmasını indüklemiştir (Paruchuri ve ark 2002). LTD4 ile indüklenen CysLT1 reseptörlerinin aktivasyonunun ayrıca, GSK3β'nin PI3K'ya bağlı bir fosforilasyonu yoluyla β-katenin sinyalinin aktivasyonu ile bağırsak hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını desteklediği bildirilmiştir (Mezhybovska ve ark 2006). Kolon kanseri hücrelerinde, LTD4-CysLT1 reseptör sinyali, β-katenin nükleer translokasyonunu ve ardından HT116 hücrelerinde MYC ve CCND1 transkripsiyonunu indükler, ancak HT29 hücrelerinde olmaz ve β-katenin'in GSK-3β kaynaklı bozulmasını azaltır (Salim ve ark 2014). LTD4 sadece çekirdeğe β-katenin translokasyonunu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda hayatta kalmayı desteklemek için Bcl-2 ile fiziksel olarak etkileşime girebileceği mitokondriye de translokasyonunu indükler (Mezhybovska ve ark 2006).

LTD4 ayrıca kaspaz 8, kaspaz 3 aktivasyonuna müdahale ederek ve MEK/ERK sinyalini aktive ederek bağırsak hücrelerinde COX-2 inhibisyonunun neden olduğu apoptozu engeller (Ohd ve ark 2003, Wikström, Juhas ve ark 2003, Wikström, Öhd ve ark 2003). LTD4'ün, COX-2 ekspresyonunu ve PGE2 üretimini indükleyerek hücre sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir (Bellamkonda ve ark 2015, Massoumi ve ark 2003, Ohd ve ark 2003), bu da CysLT'ler ve PG'ler yolları arasında bir crosstalk olduğunu düşündürmektedir. LTD4 kaynaklı COX-2 artışına, Int407 ve Caco-2 hücrelerinde ERK1/2 sinyalinin aracılık ettiği gösterilmiştir (Wikström, Öhd ve ark 2003).

Birkaç sonuç ayrıca LTD4'ün hücre ölümünden hücre sağkalımına bir geçiş sinyali verdiğini göstermektedir (Hoshino ve ark 1998). CREB'nin değiştirilmiş ekspresyonu, kanser hastalarının sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir ve bu da akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi veya Hodgkin lenfoma gibi bir dizi CREB ile ilişkili kanserin tanımlanmasına yol açmış ve CREB'nin bir prognostik belirteç ve terapötik olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır (Steven ve ark 2020).

Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında CysLT'ler:

-Kanser hücrelerinin; proliferasyon, migrasyon ve invazyon olaylarında rol oynayan sinyal yollarını aktive ederek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını indüklerler.

-Antiapoptotik Bcl-2 proteinin ekspresyonunu artırarak apoptozise direnç gösterirler.

-Anjiyogenezi indükleyerek vasküler geçirgenliği modüle eder ve endotelial hücrelerin proliferasyonu ile migrasyonunu stimüle eder.

-Hücre enerji sinyal mekanizmalarının deregülasyonunda rol oynarlar. Beta-katenin translokasyonu ve c-myc aktivasyonu yoluyla glikolizi indüklerler.

-LTD4, NOX4'ün nükleer translokasyonu yoluyla oksidatif DNA hasarına neden olmaktadır (Saier ve Peyruchaud 2022).

Sonuç olarak CysLT'lerin ve reseptörlerinin kanser ilerlemesindeki rolünün altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması, anti-kanser tedavisi için CysLT sinyallerini hedefleme potansiyelinin incelenmesine yardımcı olacaktır.

1.3.3. Sisteinil Lökotrien Antagonistleri

Sisteinil LT reseptör antagonistleri (LTRA'lar), Montelukast, zafirlukast ve pranlukast gibi spesifik inhibitörler, bronşiyal astım ve alerjik rinit tedavisi için yirmi yılı aşkın süredir klinik olarak mevcuttur. LTRA'lar kanserde CysLT sinyalini hedeflemek için kesinlikle en umut verici seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır (Yokomizo ve ark 2018). Astımlı hastalar üzerinde yapılan geniş bir epidemiyolojik çalışma, LTRA'lerin kanser gelişimi riskini, özellikle akciğer, meme, kolorektal ve karaciğer kanserlerini doza bağımlı bir şekilde azalttığını ve ayrıca CysLT reseptörlerinin karsinogenezdeki rolünü desteklediğini göstermiştir (Tsai ve ark 2016).

CysLT1 reseptörü antagonistleri, ürolojik (Matsuyama ve Yoshimura 2010), prostat (Matsuyama ve ark 2007), akciğer (Tsai ve ark 2017), meme (Suknuntha ve ark 2018) ve kolon (Paruchuri ve ark 2006, Savari ve ark 2013) kanserlerinin yanı sıra nöroblastomalar (Sveinbjörnsson ve ark 2008), glioblastomlar (Piromkraipak ve ark 2018) ve kronik miyeloid lösemi (Zovko ve ark 2018) de dahil olmak üzere çok sayıda insan kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder ve/veya apoptozu indükler.

LTRA'lar, CysLT1 sinyalini inhibe etmede ortak farmakolojik özelliklere sahip olsa da, Montelukast esas olarak apoptozu indüklerken, zafirlukast etkisini hücre döngüsü üzerinde gösterir (Piromkraipak ve ark 2018, Suknuntha ve ark 2018). Benzer şekilde, LTD4'ün bağlanmasını bloke eden ancak LTC4'ü bloke etmeyen seçici bir CysLT1 reseptör antagonisti olan MK-571'in, hücre sağkalımını değiştirmeden kolorektal kanser hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Paruchuri ve ark 2006). İlginç bir şekilde, pranlukast hem beyin hem de periferik kılcal damarlardan tümör hücresi göçünü inhibe ederken, Montelukast sadece periferik kılcal damarlarda hücre göçünü inhibe etmiştir (Nozaki ve ark 2010). Ayrıca Montelukast, kanser metastazı özelliklerinin ek özellikleri olan 5-FU'ya dirençli hücre kolonosferlerini ve köklenmeyi güçlü bir şekilde azaltmıştır (Satapathy ve Sjölander 2020). CysLT1 reseptörü antagonistleri pranlukast ve Montelukast, alerjenle indüklenen astımı olan farelerin akciğerlerinde VEGF ekspresyonunu düzenleyerek vasküler geçirgenliği azaltmıştır ve bununla birlikte CysLT1 reseptörlerinin tümör anjiyogenezindeki potansiyel rolü daha da desteklenmiştir (Lee ve ark 2004). Bu veriler, LTRA'ların anti-tümör özelliklerinin bir kısmının, CysLT1 reseptörlerinin antagonizmi dışındaki mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

1.4. Montelukast

Montelukast $C_{35}H_{36}ClNO_3S$ kimyasal formülüne sahip (Tan ve ark 2017), klinikte astım ve alerjik rinit hastalıklarında kullanımı olan, lökotrien D4 ve E4 için sisteinil lökotrien reseptörüne yüksek afinite ile bağlanan oldukça seçici bir lökotrien reseptörü antagonistidir (Wermuth ve ark 2021). Montelukast, lökotrien reseptörlerine bağlandığında, herhangi bir agonist aktivite göstermeden lökotrienin fizyolojik etkilerini (hava yolu ödemi, düz kas kasılması ve normal hücresel aktivitenin bozulması gibi) inhibe eder (Wermuth ve ark 2021).

1.4.1. Montelukast ve Kanserdeki Rolü

Antiinflamatuvar etkilerinin yanısıra Montelukast'ın astım hastalarını özellikle akciğer, göğüs, kolorektal ve karaciğer kanserlerinden doza bağımlı bir şekilde koruduğu bildirilmiştir (Tsai ve ark 2016). Kronik miyeloid lösemide yapılan bir çalışmada Montelukast CysLT1R'e bağlı bir yol aracılığıyla, proapoptotik etkiye sahip Bax aşırı ekspresyonunu, sitokrom C salınımını, PARP-1 bölünmesi ve kaspaz-3

aktivasyonunu indükleyerek KML hücrelerinin apoptozunu indüklediği belirtilmiştir (Zovko ve ark 2018). Kolorektal kanser hücreleri olan HT-29 ve SW-480 ile yapılan bir çalışmada Montelukast, LTD4'ün neden olduğu koloni oluşumunu ve kolonosferleri bozmanın yanı sıra kanser kök hücre belirteçlerinin (ALDH1 ve DCLK1) aşağı regülasyonunu önleyerek, CysLT1R inhibisyonunun kanser kök hücrelerini en aza indirmede yararlı etkisini düşündürmektedir (Bellamkonda ve ark 2018).

Birkaç pankreas kanseri hücre hattında (PA-TU-8988T, SUIT-2 ve PANC-1 hücreleri, ancak MIAPaCa-2 hücrelerinde değil) yapılan kapsamlı bir çalışmada kanser hücre proliferasyonunun LTD4 ile indüklenmesi sonrası CysLT1R ekspresyonu artmış olup; hücrelerin Montelukast ile tedavi edilmesi hücre döngüsünün apoptozu indüklemeyen G0/G1 fazında durmasına neden olmuştur (Kachi ve ark 2021).

Birçok çalışma renal hücreli karsinom, mesane kanseri, prostat kanseri ve testis kanserinin insan kanser hücrelerinde CysLT1R ekspresyonunu göstermiştir (Matsuyama ve ark 2010, Matsuyama ve ark 2009, Matsuyama ve ark 2009). Çalışmaların sonucunda Montelukast ile tedavinin, insan prostat kanseri hücrelerinde (LNCaP, PC3, DU-145) (Matsuyama ve ark 2010, Matsuyama ve ark 2007), insan böbrek kanseri hücrelerinde (Caki-1), insan mesane kanseri hücrelerinde (T24) (Matsuyama ve ark 2010, Funao ve ark 2008) ve testis kanseri hücrelerinde (NEC-8) (Matsuyama ve ark 2010, Matsuyama ve ark 2009) CysLT1R ekspresyonunu aşağı doğru regüle etmiş, hücre canlılığını azaltmış ve erken apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Etkiler, normal stromal prostat hücre hatlarında (Matsuyama ve ark 2007), normal proksimal tübüler endotel hücrelerinde (PRTEC) (Ghosh ve Myers 1998) gözlenmemiştir. Birkaç akciğer kanseri hücre hatları (A549, H460, H1299, CL1-0 ve CL1-5) ile yapılan bir çalışmada Montelukast'ın hücre canlılığını/proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indükleyen faktörün (AIF) nükleer translokasyonu yoluyla hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir (Tsai ve ark 2017).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Tanı Teknolojileri Laboratuvarlarında (TTL) gerçekleştirilmiştir.

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 2.1. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.

KİMYASAL/ KİT ADI	MARKA
Montelukast	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Diagnovum
RPMI 1640	Diagnovum
FBS (Fetal Bovine Serum)	Diagnovum
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
(DPBS)Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Gibco
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
MTT	Sigma-Aldrich
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich
Trypan Blue Boyası	Sigma-Aldrich
cDNA Sentez Kiti (First Strand cDNA Synthesis Kit)	Thermo Fisher Scientific
DNase I	Thermo Scientific
RNA Cleanup Kit	Monarch- T2050L
SYBR Green qPCR Master Mix	Bio-Rad
Primer	Sentebiolab
Bcl-2 Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
Bax Primer Antikor	Cell Signalling Technology
Caspase-3 Primer Antikor	Affinity Biosciences
β - Aktin Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
Sekonder Antikor (Anti-Mouse IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology

Tablo 2.1 (Devam). Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.

Sekonder Antikor (Mouse Anti-Rabbit IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich
Trypsin- EDTA	Sigma-Aldrich
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Akrilamid/ Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
APS (Amonyum persülfat)	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Trisma Base	Sigma-Aldrich
Nitroselüloz Membran	Macherey-Nagel
Protein Marker	Thermo Fisher Scientific
Clarity Max Western ECL Substrates	Bio-Rad
Clarity Western ECL Substrates	Bio-Rad
Tween 20	Sigma-Aldrich
Whatman Blotlama Kağıdı	Bio-Rad
Metanol	Sigma-Aldrich

2.2. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 2.2. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar.

MATERYAL VE CİHAZ	MARKA
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
Real Time PCR Cihazı	BioRad CFX96
Western Blot Görüntüleyici	Azure C600
Buzdolabı (+4°C)	Bosch

Tablo 2.2 (Devam). Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar.

Çeker Ocak	Tolkim
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel, Siemens
Derin Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Premium U410
Distile Su (dH ₂ O) Üretme Cihazı	MP MINI Pure
Etüv	Memmert
Mikroplaka Spektrofotometresi	Epoch
15 mL ve 50 mL'lik Santrifüj Tüpleri	Labsolute/ Isolab
Hassas Terazı	Shimadzu
Isıtıcı Bloğu	Techne
Karbondioksitli Etüv (İnkübatör)	Mini Galaxy A
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Magnetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
Mikropipet Takımı	Nichipet
Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Nanodrop	Thermo Scientific
Qubit Fluorometre	Thermo Scientific
Otoklav	HMC Hirayama
PCR (Thermal Cycler)	Bio-Rad T100
pH Metre	Mettler Toledo
Pipet Uçları	Isolab
Serolojik Pipetler	Labsolute
Sıvı Azot Tankı	Taylor- Wharton

Tablo 2.2 (Devam). Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar.

Sıvı Azot Tankı	Taylor- Wharton
Steril Kabin (Biyogüvenlik Kabin)	Esco Class 2
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Işık Mikroskobu	Olympus
Sıcak Su Banyosu	Memmert
Ters (Inverted) Işık Mikroskobu	Zeiss Primovert
Vorteks	Velp
Mini Çalkalayıcı	Bio- San
Spin- Down	OniLab
Yatay Elektroforez Sistemleri	Thermo Scientific
Dikey Elektroforez Sistemleri	BioRad
T-25 Flask (Filtreli, steril)	Labsolute
T-75 Flasklar (Filtreli, steril)	Labsolute/ Corning
Vial (Cryogenic Tubes)	Isolab/ Corning
Strip Tüpler	Qiagen
Steril 0.22 mikronluk filtre	Merck
6 Kuyucuklu Plaka	Labsolute
96 Kuyucuklu Plaka	Labsolute/ Greiner bio-one
1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
Cell Scraper (Hücre Kazıyıcı)	Labsolute

2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Tablo 2.3. Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİK
%70'lik Etil Alkol	30 mL saf su üzerine 70 mL etil alkol eklenerek hazırlandı.
%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid	37,5 g akrilamid, 1 g bisakrilamid alınarak 128 mL dH ₂ O içerisinde 37°C'de çözülerek hazırlandı.
%10'luk SDS	1 g SDS tartılıp ve 9 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.
%10'luk APS	0,1 g APS tartılıp ve 1 mL distile suda çözüldü.
%5'lik Bloklama Çözeltisi	5 g BSA alınıp ve 95 mL TBS-T içerisinde çözülerek hazırlandı.
10X TBS Çözeltisi	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris tartılıp; 900 mL distile su içerisinde çözüldü. 1 M HCl ile pH=7,4'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
10X Transfer Çözeltisi	29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS tartılıp ve 900 mL distile su içinde çözüldü. pH=8.3' e ayarlanarak son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
1X TBS-T Çözeltisi	10X TBS'den 100 mL alınıp ve 900 mL distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra çözeltiye 1 mL Tween-20 eklendi.
10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu	30,2 g Tris, 188 g Glisin ve 100 mL %10'luk SDS eklenip çözelti 1 L distile su ile çözüldü.

Tablo 2.3 (Devam). Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.

1 M Tris/ HCl Tamponu (pH: 6.8)	121,14 g Tris 900 mL distile su içinde çözülüp, 1 M HCl ile pH: 6,8'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
1,5 M Tris/HCl Tamponu (pH: 8.8)	181,7 g Tris 900 mL distile su içinde çözülüp, 1M HCl ile pH: 8,8'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.
1X Transfer Çözeltisi	10X Transfer çözeltisinden 100 mL alınıp, 700 mL distile su ve 200 mL metanol ilave edilerek hazırlandı.
1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu	10X Tris-Glisin Elektroforez çözeltisinden 100 mL alınıp, 900 mL distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
1X SDS-PAGE Yükleme Tamponu	0.125 M Tris pH 6.8, %2 SDS, %10 (v/v) gliserol, %10 (v/v) β -merkaptotanol, ve %0.01 (w/v) bromfenol mavisi) karıştırılarak hazırlandı. -20°C de saklandı.

2.4. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan PANC-1, BxPC-3, HEK293 hücre hattı ATCC' den (American Type Culture Collection) temin edildi. PANC-1 ve HEK293 hücreleri %10 fetal sıgır serum (FBS) ve 10.000 U/mL penisilin 10.000 ng/mL streptomisin eklenmiş DMEM besiyerinde kültüre edildi. BxPC-3 hücreleri ise %10 fetal sıgır serum (FBS) ve 10.000 U/mL penisilin 10.000 ng/mL streptomisin eklenmiş RPMI-1640 besiyerinde kültüre edildi.

2.4.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Büyütülmesi

-80 °C’de dondurulmuş olarak temin edilen hücreler, 37 °C’ye alındı ve çözölmeleri sağlandı. Çözöldükten sonra hücreler, içerisinde PANC-1 ve HEK293 için 5 ml DMEM, BxPC-3 için 5 ml RPMI içeren falkon tüplere aktarıldı. 300xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüpte pellet olarak kalan hücrelere %10 FBS, L-glutamin ve penisilin-streptomisin içeren 5ml DMEM ve 5 ml RPMI besiyerleri eklendi. Süspanse hale getirilen hücreler 25 cm²’lik flasklara ekildi. Ekimi tamamlanan hücreler %5 CO₂ ihtiva eden 37°C inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra 2-3 günde bir kontrol edildi. Kontrol esnasında hücrelerin ve besiyerinin durumuna bağılı olarak, 1X DPBS ile yıkanarak besiyerleri değıştirildi.

2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması, Sayımı ve Stoklanması

25 cm²’lik flasklara ekimi yapılan hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri yapıldı. Flask yoğunluğu inverted mikroskop ile takip edildi. Pasajlama için ilk olarak flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı. 1X DPBS ile yıkama işlemleri gerçekleştirildi ve tripsin-EDTA ile hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı. Tripsin- EDTA’yı nötralize etmek için FBS içeren besiyeri kullanıldı. Elde edilen hücreler 15 ml’lik falkonlarda toplanarak 5 dakika süreyle 300xg’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve altta pellet olarak kalan hücreler taze besiyeri içerisinde tekrar süspanse edildi.

Deneyde kullanılacak hücre miktarını belirlemek amacıyla hücre sayımı yapıldı. Bu işlem Thoma lamında, hücre sayım alanına 10 µl hücre ve trypan blue karışımı eklenerek yapıldı. Işık mikroskopunda hücreler sayılıp ml başına hücre konsantrasyonu belirlendi.

Sayımı yapılan hücreler deney planına ve yoğunluklarına göre 25 cm² ve 75 cm²’lik flasklara ekilip %5 CO₂ ihtiva eden 37°C inkübatöre kültüre edildi.

Hücre dondurma ve stoklama işlemi, içeriğı %90 FBS, %10 DMSO olan hücre dondurma çözeltisi ile yapıldı. Süspanse edilen hücrelerden belirli bir sayıda alındı ve hücre dondurma çözeltisi ile karıştırılıp, kriyovial tüplerde -80 °C’de dondurularak stoklandı.

2.5. Montelukast Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Katı kimyasal madde şeklinde ticari olarak satın alınan Montelukast Sodyum (MA: 608,17 gr/mol, Sigma PHR1603) konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde nükleaz içermeyen su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan bu stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm' lik steril filtreden geçirildi ve +4°C' de saklandı. Çalışmada kullanılan farklı konsantrasyondaki solüsyonlar stok solüsyondan PANC-1 ve HEK293 hücreleri için DMEM ve BxPC-3 hücreleri için RPMI-1640 besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

2.6. Hücre Sitotoksikite Testi (MTT)

Montelukast'ın PANC-1, BxPC-3 ve HEK293 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi uygulandı. MTT testi hücrelerin metabolik aktiviteleri ile formazan tuzlarının indirgenmeleri sonucu formazan kristallerinin kolorometrik yöntemle ölçülerek hücre canlılığının belirlenmesi esasına dayanan bir testtir.

96 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta 100 µl besiyeri içerisinde yaklaşık 5-10x10³ hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası eski besiyeri uzaklaştırıldı. Montelukast konsantrasyonları ilk olarak 10, 25, 50, 75, 100, 200 ve 400 µM olacak şekilde belirlendi. Bu konsantrasyonlarda yapılan MTT sonrası 200 ve 400 µM'da hücrelerin canlılığını tamamen kaybettiği görüldükten sonra doz kısıtlamasına gidildi ve MTT konsantrasyon aralığı 50,70, 90,110,130,150 µM olarak belirlendi. Ana stoktan seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanan besiyerlerinden kuyucuklara 100 µl ilave edilerek 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Hücreler kuyu başına 100 µl 1X DPBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 10 ul 10X MTT içeren 100 µl DMEM-RPMI-1640 besi ortamı eklenerek 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT içeren besi ortamı uzaklaştırılarak yerine 50 µl DMSO eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan kristallerinin tam olarak çözülmesi beklendi. Mikroplate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Montelukast uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı.

2.7. Kantitatif Gen Ekspresyon Analizi (Real-Time PCR)

Montelukast'ın *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR17*, *GPR99*, *ERK1/2*, *COX-2*, *MYC*, *HMGB1*, *TP53*, *MTOR*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) çalışması yapıldı.

Ekspresyonu her hücrede olan ve değişmeyen; *housekeeping* gen olarak *GAPDH* kullanıldı. Real Time PCR cihazı (Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR) ile *Ct* değerleri hesaplandı. Elde edilen *Ct* değerleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemine göre analiz edildi, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüyle ekspresyon değişim miktarları hesaplandı.

2.8. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

Montelukast'ın PANC-1, BxPC-3 ve HEK293 hücre hatlarında hedef genlerin ifade düzeylerindeki değişikliği saptamak için öncelikle RNA izolasyonu yapıldı. 25 cm² flasklara 5 ml besiyeri içerisinde yaklaşık 4×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flasklara PANC-1 hücre hattı için 70 µM, BxPC-3 hücre hattı için 45 µM ve HEK293 hücre hattı için 55 µM konsantrasyonlarında Montelukast uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat Montelukast uygulaması literatürde yer alan çalışmalara paralel olarak hücrelerin ilaca daha fazla maruz kalmasını sağlamak ve bunun sonucunda meydana gelen ekspresyon değişikliklerini saptamak amacıyla yapıldı.

RNA izolasyonu TRI-Reagent solüsyonu (Sigma, 93289) kullanılarak gerçekleştirildi.

Montelukast içeren besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 kez 1X DPBS ile yıkandı. Her bir flaska 1 ml TRI-Reagent solüsyonu eklenip pipetaj yapılarak 1,5ml'lik ependorf tüpe aktarıldı, 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda üzerine 250 µl kloroform eklendi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 30 saniye vorteks yapıldı ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım 14000xg'de 15dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Karışım üzerine 400µl soğuk izopropanol ilave edildi ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım, 14000xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant

uzaklaştırıldı ve pellete 1 ml %70'lik soğuk etanol eklendikten sonra 14000 g'de 5 dakika +4°C'de tekrar santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kere tekrarlandı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan RNA pelleti kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra RNA pelleti 50-100 µl nükleaz içermeyen su ile çözündürüldü. Nanodrop spektrofotometrede RNA konsantrasyonu belirlendi. RNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

2.9. DNaz Muamelesi

Deneyde tüm gruplar için genomik DNA uzaklaştırması yapılarak total RNA elde edildi. Bu yöntemin kullanılmasının sebebi, qRT-PCR analizlerinde RNA örneklerini kirleten genomik DNA'nın da çoğalıp yanlış pozitif yanıtlara yol açabilmesinden kaynaklanan hatalı sonuçları önlediğidir. PCR'ın aşırı duyarlılığı nedeniyle, genomik dizinin tek bir kopyası bile cihaz tarafından tespit edilebilir. Bu durum, test edilen genler DNA seviyesinde mRNA' ya benzer sekanslara sahip psödogenler barındırdığında daha da ciddileşir. Bu nedenle RNA elde edilirken DNA çıkarımı yapılması önerilmektedir. DNA çıkarımıyla izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA'nın, qRT-PCR'da ortaya koyduğu eşik döngülerinde bir azalma vardır ve sonuçlar genomik DNA kontaminasyonu içermediği için daha güvenilirdir (Dotti ve Bonin 2011).

Tablo 2.4. DNaz muamelesi için gerekli reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
RNA	5 µg
10X reaksiyon buffer	1 µl
DNaz I, RNaz içermeyen	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	20 ul' ye tamamlanana kadar

Tablo 2.4' e göre 0.2 ml'lik tüplere hazırlanan karışım, Biorad T100 Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 1 µl 0.5 mM EDTA eklenerek DNaz enziminin inaktivasyonu sağlandı.

DNA çıkarımı yapılan RNA örnekleri Monarch RNA CleanUp kit ile saflaştırıldı. Saflaştırma sonrası elde edilen total RNA'lar cDNA sentezi yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.10. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi, First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1612, Fermentas Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, USA) kullanılarak, kitin mevcut protokolüne göre gerçekleştirildi. Bir tüp içerisine 500 ng RNA, 1 µl 100 µM random hexamer primer, 2 µl 10 mM dNTP miks, 4 µl 5X reaksiyon buffer, 2 µl 20 U M-MuLV ters transkriptaz enzimi, 1 µl 20 U RiboLock RNaz inhibitör, 20µl'ye tamamlayacak miktarda nükleaz içermeyen su eklenerek sentez için 25 °C'de 5 dk., 37 °C'de 60 dk., 70 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Sentezlenen cDNA, 1:1 oranında sulandırılarak qRT-PCR için kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

2.11. Primerlerin Sulandırılması

Liyofilize primerler 3000 g hızında 3 dakika santrifüj edildi ve 100 µMol/µl konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen su içerisinde çözündürüldü. Her bir genin forward ve reverse primerinden 10 µM alt stoklar hazırlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

2.12. Referans Gen Seçimi

Çalışmada sıklıkla kullanılan referans genlerden biri olan Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (*GAPDH*) kullanılmıştır. Bu, bir dizi gen arasından farklı biyolojik şartlar altında en minimum değişkenlik gösteren; nispeten en stabil olan referans gen olarak seçilmiştir.

2.13. Gerçek Zamanlı PCR ile Hücrelerdeki İfade Profiline Belirlenmesi

Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) deneyinde kullanılmak üzere *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR17*, *GPR99*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *TP53*, *MYC* genleri için primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information) platformu kullanılarak dizayn edilmiştir. *GAPDH*, *ERK1/2*, *COX-2*, *MTOR*, *HMGB1* genleri için primerler ise tabloda belirtilen makalelerden alınmıştır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan Forward ve Reverse Primer Çiftleri.

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi (5'→3')	Referans
<i>GAPDH</i>	Forward Reverse	CAAGGTCATCCATGACAACTTTG GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	Sun ve ark. 2014
<i>CYSLTR1</i>	Forward Reverse	TCATAACCTTGTCTCTGGCTG CTGGGTACATAAGTCACGCTG	Gen ID: 10800 Tasarlanan
<i>CYSLTR2</i>	Forward Reverse	AAGGCAGGAGAGATAGAGGCA TTGAGGAAGTCTCCATACCTTGC	Gen ID: 57105 Tasarlanan
<i>GPR17</i>	Forward Reverse	CCCCAAGAGAGATGCTGAAAC CAGGGAGAAGTTGGTGATCAG	Gen ID: 2840 Tasarlanan
<i>GPR99</i>	Forward Reverse	TGGCTTCCATTTCAACCTTT CGGAAGAGGCTAAAGCAGGT	Gen ID: 27199 Tasarlanan
<i>BAX</i>	Forward Reverse	CCAAGAAGCTGAGCGAGTGT GCTGGCAAAGTAGAAAAGGGC	Gen ID: 581 Tasarlanan
<i>BCL-2</i>	Forward Reverse	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	Gen ID: 596 Tasarlanan
<i>CASP3</i>	Forward Reverse	TGTCGATGCAGCAAACCTCA CCTTCTTCACCATGGCTCAGA	Gen ID: 836 Tasarlanan
<i>TP53</i>	Forward Reverse	CAGACCTATGGAACTACTTCCTG GCATTCTGGGAGCTTCATCT	Gen ID: 7157 Tasarlanan
<i>MYC</i>	Forward Reverse	CAGATCAGCAACAACCGAAA GGCCTTTTCATTGTTTTCCA	Gen ID: 4609 Tasarlanan
<i>ERK1/2</i>	Forward Reverse	TCAAGCCTTCCAACCTC GCAGCCCACAGACCAA	Jiang ve ark. 2018
<i>COX2</i>	Forward Reverse	TTATCTACACGGCCCCCTCC CCAGGGCACGATGAAGTCAC	Cadassou ve ark. 2021
<i>MTOR</i>	Forward Reverse	TTCGTGCCTGTCTGATTCTC ATCCCGATTCATGCCCTTC	Koller ve ark. 2020
<i>HMGB1</i>	Forward Reverse	TATGGCAAAAGCGGACAAGG CTTCGCAACATCACCAATGGA	Ghaffari ve ark. 2021

Tüm RT-qPCR deneyleri, CFX96 Touch Real-Time PCR sistemi ve SYBR Green Master Miks (iTaQ Universal SYBR Green Supermix, BioRad-1725121) kullanılarak yapıldı (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
SYBR Green Master Miks	5 ul
Forward Primer (10 µM)	0,2 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,2 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	3,6 µl
Toplam	10 µl

Her reaksiyon aynı plate’de üç tekrar olacak şekilde yapıldı. qRT-PCR: 95°C’de 1 dakika boyunca denatürasyon, ardından 95°C’de 15 saniye, 59°C’de 30 saniye olmak üzere 39 döngülük amplifikasyon ile gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonundan hemen sonra 95°C’de 10 s, 65°C ile 95°C arasında 0.5°C/s sıcaklık geçiş hızı ile erime eğrileri oluşturuldu.

2.14. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

PANC-1, BxPC-3 ve HEK293 hücre hatlarındaki *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR17*, *GPR99*, *ERK1/2*, *COX-2*, *MYC*, *HMGB1*, *TP53*, *MTOR*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genlerinin ifade düzeyleri, Ct değerleri üzerinden yorumlandı. Her bir örneğe ait ilgili genin Ct değeri, o örneğin referans geninin Ct değerinden çıkarılarak delta Ct (ΔCt) değerleri hesaplandı. Montelukast uygulanan örneğin ΔCt değerinden Montelukast uygulanmayan kontrol grubu örneğinin ΔCt değeri çıkarılarak delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) değerleri hesaplandı. Bu değerler Excel programına girildi ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle analizleri yapıldı. Livak tarafından önerilen bu yöntem ile Montelukast uygulanmayan kontrol grubu genleri ve Montelukast uygulanan hücrelerdeki genlerin ifade düzeyleri karşılaştırıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden elde edilen verilere göre Graphpad Prism 8 yazılım

programı kullanılarak grafikler çizildi. Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.15. Protein Ekspresyon (Western Blot) Analizi

Montelukast'ın PANC-1, BxPC-3 ve HEK293 hücre hatlarında BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerinin ifade düzeylerindeki değişikliğini saptamak için Western Blot çalışması yapıldı. Housekeeping gen olarak *ACTB* (Beta-aktin) geni kullanıldı.

2.15.1. Total proteinin izole edilmesi

25 cm² flasklara 5 ml besiyeri içerisinde yaklaşık 4×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flasklara, IC₅₀ değerleri dikkate alınarak; PANC-1 hücre hattı için 70 µM, BxPC-3 hücre hattı için 45 µM ve HEK293 hücre hattı için 55 µM konsantrasyonlarında Montelukast uygulandı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.

1. Uygulama yapılan ve yapılmayan hücre gruplarının besiyeri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
2. Daha sonra tekrar soğuk PBS ile hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Hücreler, 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti 2×10^7 /ml oranına uygun miktarda Ripa Lizis Buffer ile çözüldü.
4. 4°C'de 60 dk. 1500 rpmde çalkalandı.
5. 60 dakikanın ardından 16000 g'de 20 dk 4°C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve pellet atıldı.
7. Hücre lizatları -20°C'de muhafaza edildi.

2.15.2. Protein Konsantrasyon Tayini

Elde edilen hücre lizatının protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Qubit™ Protein Assay Kit (Catalog number: Q33211) kullanıldı. Ölçüm kitin mevcut protokolüne göre gerçekleştirildi.

200:1 oranında Protein BR Assay Buffer: Protein BR Reagent hazırlandı. Standartlar için 190 µl, örnekler için 199 µl olacak şekilde bu karışımdan 0.5 ml ependorf tüplere eklendi. Sonrasında standartlar sırasıyla 10 µl olacak şekilde, her bir protein örneğinden de 1 µl olacak şekilde karışıma eklendi, pipet yardımıyla

karıştırıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra standartlar ve örnekler Qubit 2.0 Fluorometer’de ölçüldü.

2.16. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Deneyin amacına göre hangi yüzdelik jeli hazırlamamız gerektiği belirlendikten sonra SDS-PAGE elektroforez için jel hazırlandı. SDS jeli yükleme jeli (Tablo 2.7) ve ayırma jeli (Tablo 2.8) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır.

Her bir örnekten 30-50 µg protein (total hacim 20 µL) jele yüklendi. Örnekleri jele yüklemekten önce içine 4X SDS-PAGE yükleme tamponu (0.125 M Tris pH 6.8, %2 SDS, %10 (v/v) gliserol, %10 (v/v) β-merkaptoetanol %0.01 (w/v) bromfenol mavisi) ve 1:50 oranında β-merkaptoetanol ilave edildi. 95°C ısıtma bloğunda 5 dk proteinler denatüre edildi ve örnekler 10 dk boyunca buz üzerinde bekletildi.

Denatüre olan örnekler yükleme jeline yüklendikten sonra 110 Voltta yaklaşık 15 dakika elektroforezde yürütüldü. Örnekler ayırma jeline geçmeye başladığında voltaj 150 volta çıkarılarak 60 dakika daha yürütülmeye devam edildi.

Tablo 2.7. SDS Jel Elektroforezi için Kullanılan Ayırma Jeli Değerleri.

Bileşenler (1 jel için)	%12 (mL)
Distile Su	1,6
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	2,0
Tris pH:8,8 (1,5M)	1,3
SDS (%10)	0,05
APS (%10)	0,05
TEMED	0,002
Toplam	5

Tablo 2.8. SDS-PAGE Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Yükleme Jeli Değerleri.

Bileşenler (1 jel için)	%5 (mL)
Distile Su	0,68
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	0,17
Tris pH:6,8 (1 M)	0,13
SDS (%10)	0,01
APS (%10)	0,01
TEMED	0,001
Toplam	1

2.17. Jeldeki proteinlerin membrana transfer edilmesi (blotlama), bloklanması ve görüntülenmesi

SDS poliakrilamid jeli üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler blotlama cihazı kullanılarak nitroselüloz membrana transfer edildi. Blotlama prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Jel boyutunda kesilen nitroselüloz membran, blotlama işleminde kullanılmadan önce 5 dk boyunca 1X Transfer buffer ile muamele edildi. Blotlama cihazı içerisine sıra ile 1 parça blotlama kâğıdı, nitroselüloz membran, jel, 1 parça blotlama kâğıdı konularak 2,5 Amper, 25 Volt'da 30 dk süre ile proteinler transfer edildi. Membran 1 saat (h) oda sıcaklığında bloklama çözeltisi ile muamele edildi. Bloklama çözeltisi olarak 1X TBS-T ile hazırlanan %5'lik BSA kullanıldı. Bloklama işlemi bittikten sonra membran 3 kez 10 dk boyunca 1X TBS-T ile yıkandı. Membran 4°C'de 1 gece bloklama çözeltisi içerisinde hazırlanmış birincil antikorlar ile Tablo 2.9'daki gibi dilüe edilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında membran 3 kez 10 dk boyunca 1X TBST ile yıkandı. Membran 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi içerisinde hazırlanmış ikincil antikor ile Tablo 2.10'daki gibi dilüe edilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında membran 3 kez 10 dk boyunca 1X TBST ile yıkandı. Antikorum kimyasal sinyal oluşturmasını sağlamak amacıyla ECL reagent substratları (Biorad, Clarity Max Western ECL Substrate/Clarity™ Western

ECL Substrate) kullanıldı. Membranın kemilüminesans görüntüsü Azure c600 Gel Imaging System cihazı kullanılarak elde edildi.

Tablo 2.9. Western Blot Çalışması için Kullanılan Birincil Antikorlara ait Bilgiler.

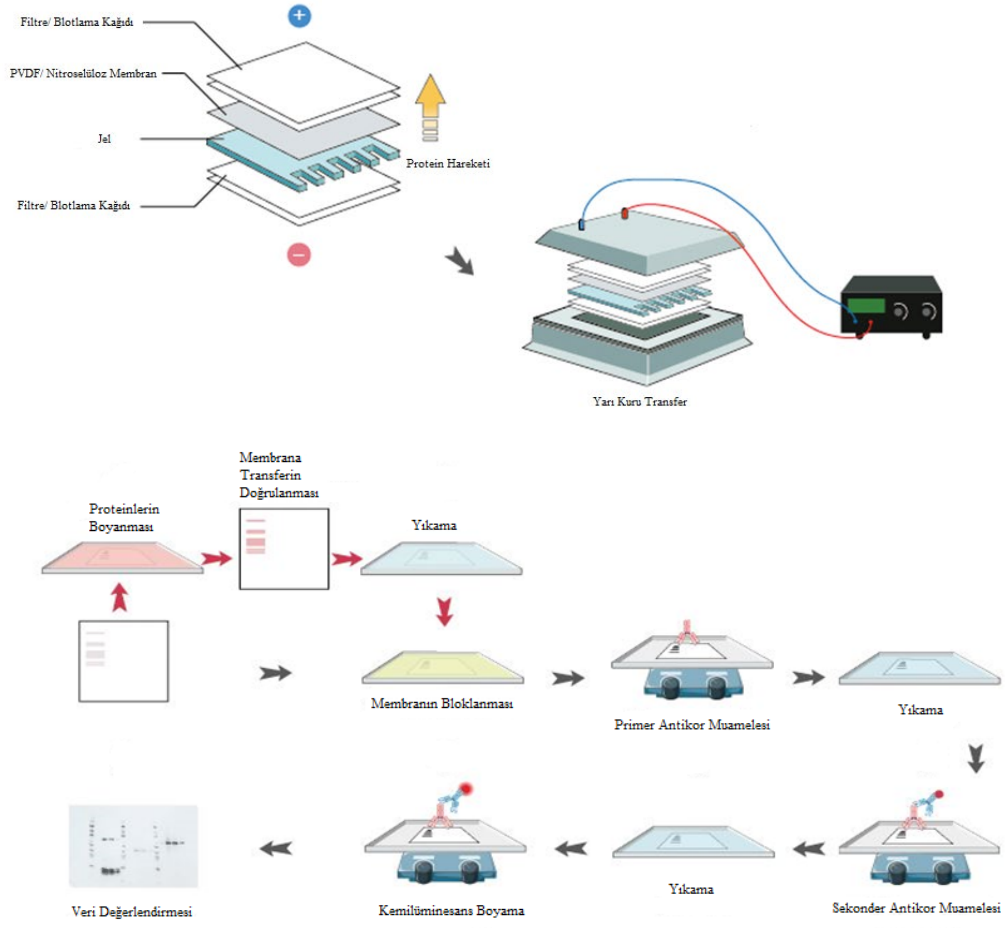
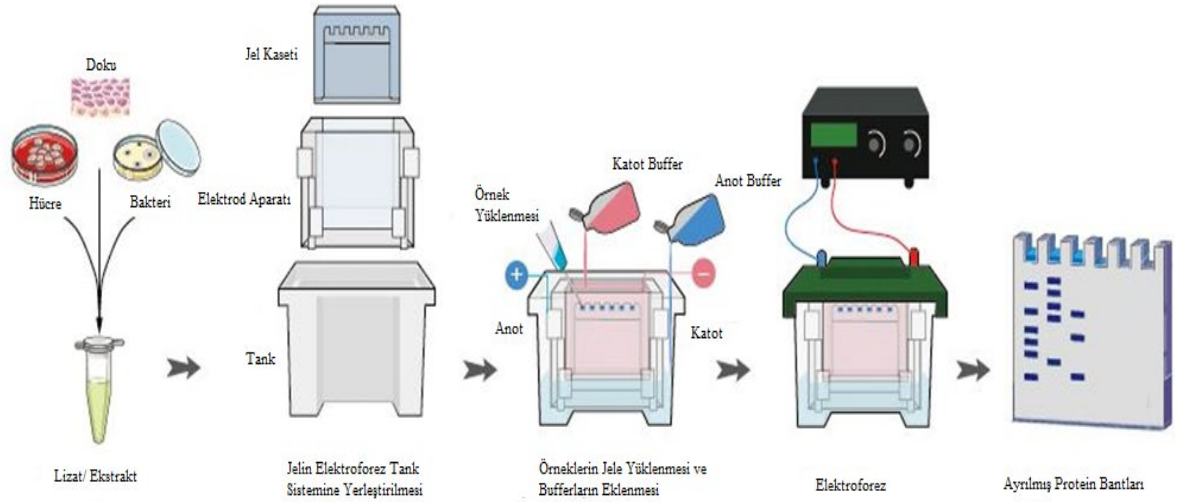
Birincil Antikor	Marka/ Kod	Bloklama Solüsyonu	Bloklama Süresi	Seyreltme Oranı	Antikor ile İnkübasyon	Protein Büyüklüğü
BAX	Cell Signaling Technology/ #2774	%5 BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:1000	+4 °C'de 1 gece	20 kDa
BCL-2	Santa Cruz/ sc-7382	%5 BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:1000	+4 °C'de 1 gece	26 kDa
CASP3	Affinity Biosciences/ AF6311	%5 BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:2000	+4 °C'de 1 gece	37 kDa
β-Aktin	Santa Cruz/ sc-69879	%5 BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:5000	+4 °C'de 1 gece	43 kDa

Tablo 2.10. Western Blot Çalışması için Kullanılan İkincil Antikorlara ait Bilgiler.

İkincil Antikor	Marka/ Kod	Seyreltme Oranı	İnkübasyon süresi
Anti- mouse	Santa Cruz/ sc-516102	1:5000	Oda sıcaklığında 1 saat
Mouse Anti- Rabbit	Santa Cruz/ sc-2357	1:5000	Oda sıcaklığında 1 saat

2.18. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilen Western Blot metodu ile analizi gerçekleştirilen proteinlerin kemilüminesans sinyal yoğunluğu ImageJ software programı kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Deneyler 3'er kez tekrarlanarak hedef protein, housekeeping protein olan beta-aktin ile karşı normalize edildi. Elde edilen verilere göre Graphpad Prism 8 yazılım programı kullanılarak grafikler çizildi. Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 2.1. Western Blot Tekniğinin Şematik Gösterimi.

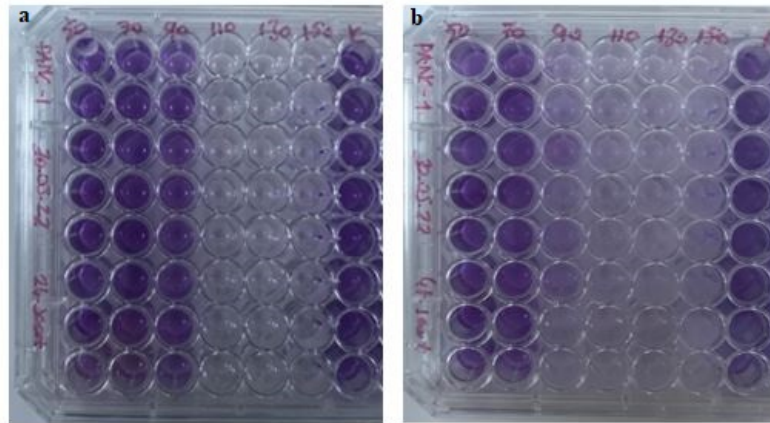
3. BULGULAR

3.1. Montelukast'ın Sitotoksik Etkisi

Montelukast'ın insan pankreas kanser hücreleri (PANC-1 ve BxPC-3) ve insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) üzerindeki etkisi, doz (50-70-90-110-130-150 μ M) ve zaman (24 ve 48 saat (h)) bağımlı olarak hücre sitotoksikite testi (MTT) ile değerlendirildi. Her hücre hattı için IC₅₀ değerleri Microsoft Excel 2016 programı kullanılarak belirlendi.

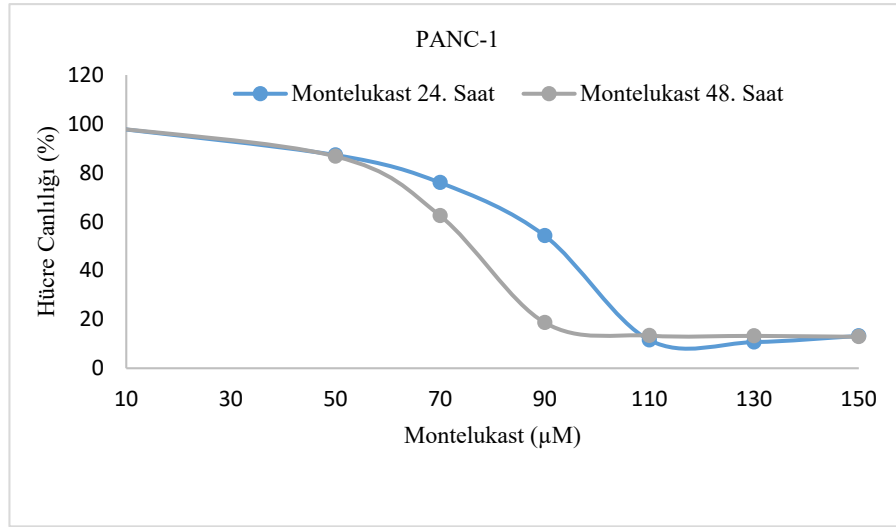
3.1.1. Montelukast'ın PANC-1 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Montelukast, PANC-1 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yüksek dozlarda (>90 μ M) antiproliferatif etki gösterdi. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdi (Şekil 3.1).



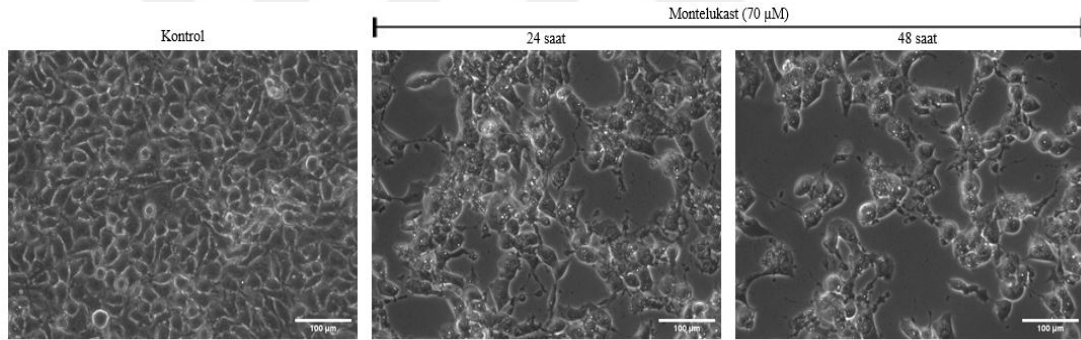
Şekil 3.1. MTT Testi (PANC-1) **a.** PANC-1 hücre hattında 50-150 μ M Montelukast'ın 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **b.** PANC-1 hücre hattında 50-70-90-110-130-150 μ M Montelukast'ın 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

PANC-1 hücre hattında Montelukast'ın 24 saatlik inkübasyonu neticesinde IC₅₀ değeri 92,6 μ M, 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC₅₀ değeri 72,1 μ M olarak belirlendi (Grafik 3.1).



Grafik 3.1. PANC-1 hücre hattında Montelukast'ın, canlılık üzerine etkisi.

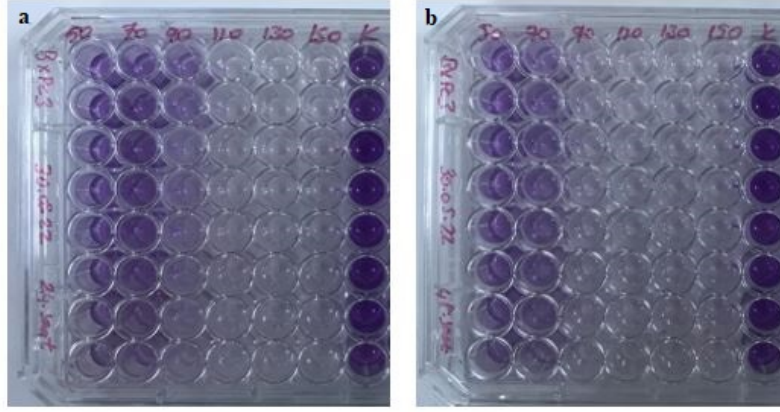
Montelukast için belirlenen IC50 değerinin uygulanması sonucu 24. ve 48. saate ait mikroskop görüntüleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattında 24 ve 48 saat uygulanması sonucu canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi.

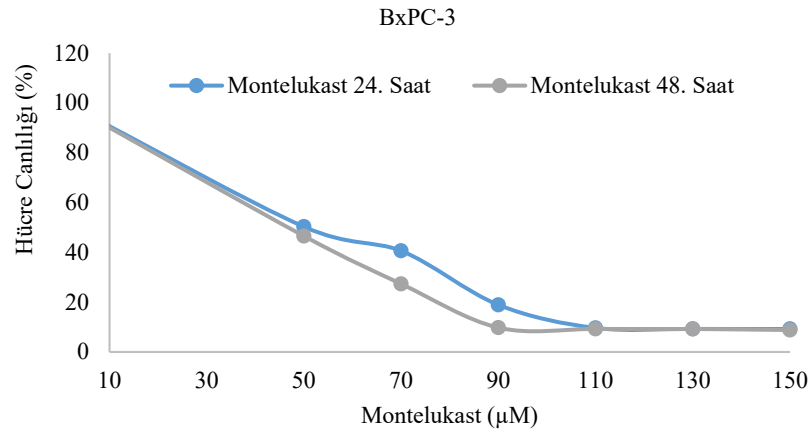
3.1.2. Montelukast'ın BxPC-3 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Montelukast, BxPC-3 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında >70 μM üzerinde antiproliferatif etki gösterdi. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdi (Şekil 3.3).



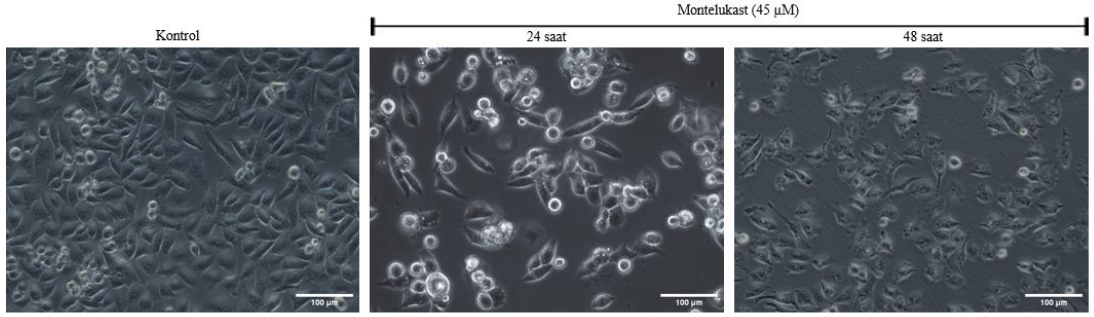
Şekil 3.3. MTT Testi (BxPC-3) **a.** BxPC-3 hücre hattında 50-70-90-110-130-150 μ M Montelukast'ın 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **b.** BxPC-3 hücre hattında 50-150 μ M Montelukast'ın 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

BxPC-3 hücre hattında Montelukast'ın 24 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 49,6 μ M, 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 42,3 μ M olarak belirlendi.



Grafik 3.2. BxPC-3 hücre hattında Montelukast'ın, canlılık üzerine etkisi.

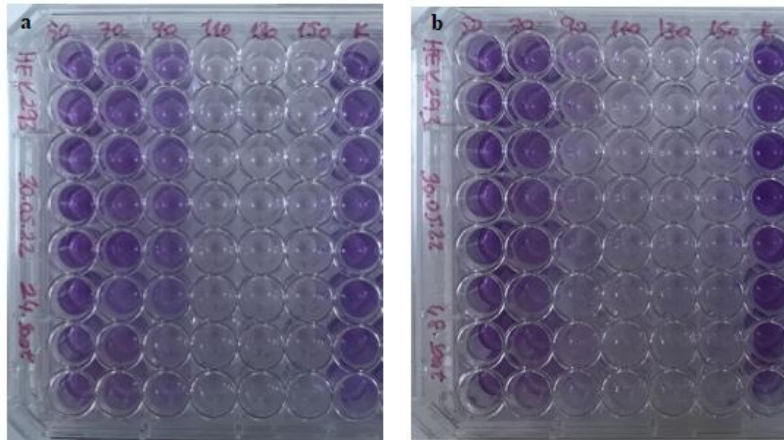
Montelukast için belirlenen IC_{50} değerinin uygulanması sonucu 24. ve 48. saate ait mikroskop görüntüleri Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattında 24 ve 48 saat uygulanması sonucu canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi.

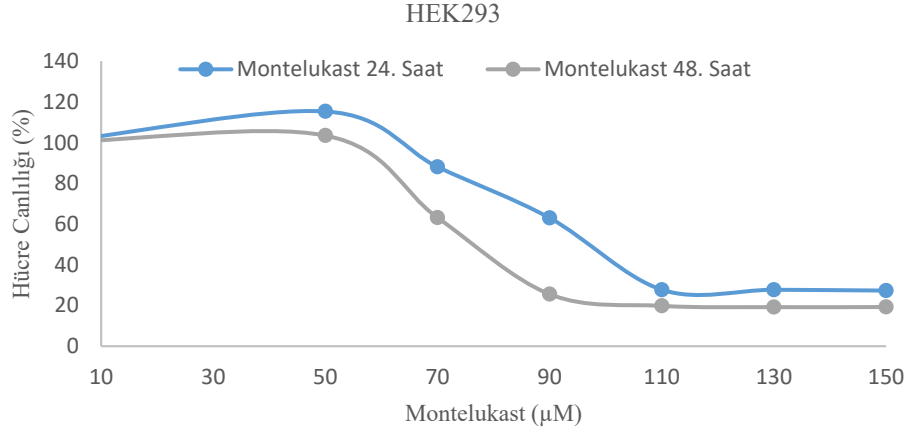
3.1.3. Montelukast'ın HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Montelukast, HEK293 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında $>70 \mu\text{M}$ üzerinde antiproliferatif etki gösterdi. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdi (Şekil 3.5).



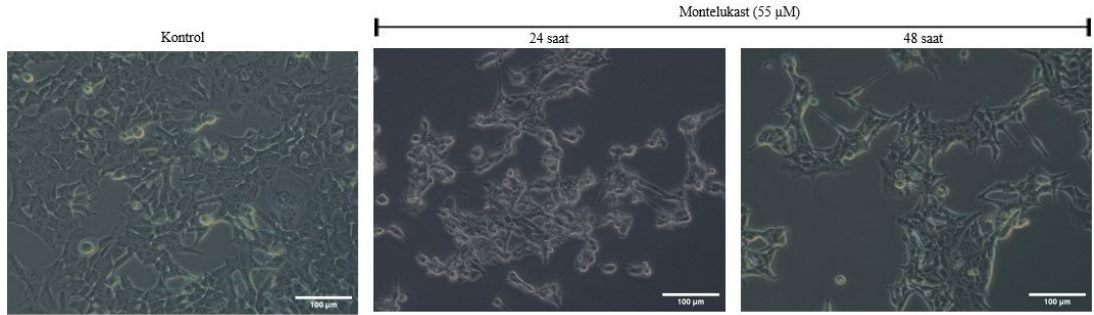
Şekil 3.5. MTT Testi (HEK293) **a.** HEK293 hücre hattında 50-70-90-110-130-150 μM Montelukast'ın 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **b.** HEK293 hücre hattında 50-150 μM Montelukast'ın 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

HEK293 hücre hattında Montelukast'ın 24 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 86,1 μM , 48 saatlik inkübasyonu neticesinde IC_{50} değeri 61,3 μM olarak belirlendi.



Grafik 3.3. HEK293 hücre hattında Montelukast'ın, canlılık üzerine etkisi.

Montelukast için belirlenen IC₅₀ değerinin uygulanması sonucu 24. ve 48. saate ait mikroskop görüntüleri Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Montelukast'ın, HEK293 hücre hattında 24 ve 48 saat uygulanması sonucu canlılık üzerine etkisinin invert mikroskop ile gösterimi.

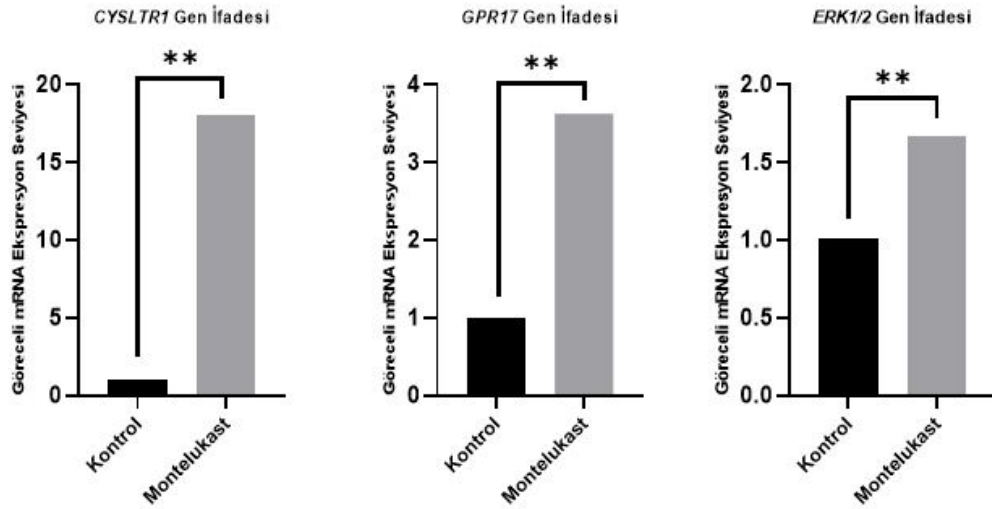
3.2. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları

Montelukast'ın PANC-1, BxPC-3 ve HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonrası *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR17*, *GPR99*, *ERK1/2*, *COX-2*, *MYC*, *HMGB1*, *TP53*, *MTOR*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genlerindeki ifade düzeylerine etkisi araştırıldı. Real Time PCR sonrası gen ekspresyonu sonuçları kontrol ve muamele gruplarına ait Ct değerlerine göre standart sapmalarıyla Livak Metodu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) ile analiz edildi (Livak ve Schmittgen 2001). GraphPad Prism 8 istatistik programı kullanılarak sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı ve Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p > 0,05 = ns$ (not significant) önemsiz, $*p < 0,05 =$ (significant) önemli, $**p < 0,01 =$ (very

significant) çok önemli, *** $p < 0,001$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

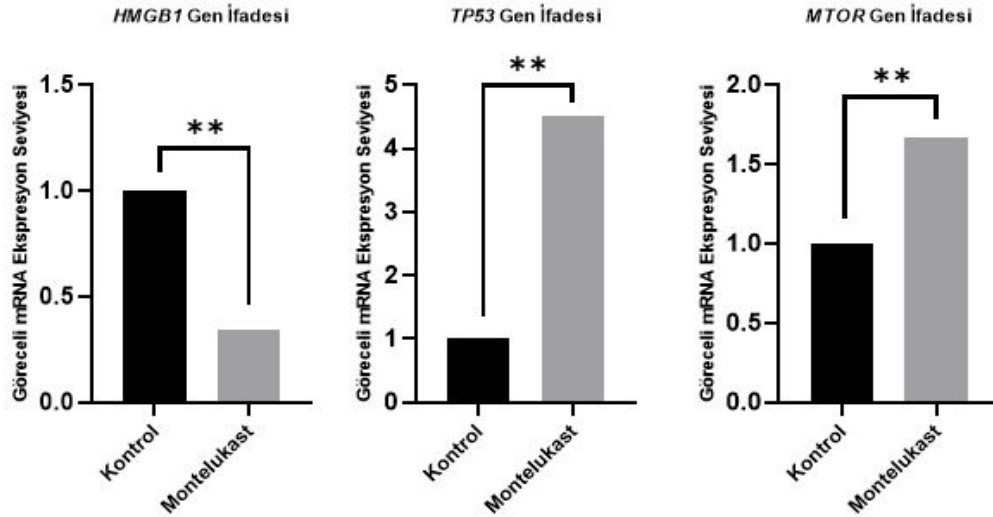
3.2.1. Montelukast'ın PANC-1 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeyine Etkisi

Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattına belirlenen 70 μM IC_{50} dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *CYSLTR1*, *GPR17*, *ERK1/2* gen ifadesinde çok önemli derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 17,12; 1,64; 3,6 kat değişikliği verileri elde edildi. *CYSLTR1*, *GPR17* ve *ERK1/2* genlerindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 3.7).



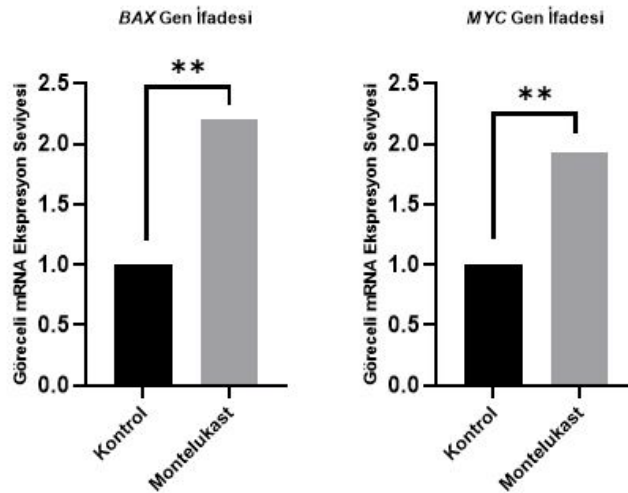
Şekil 3.7. Montelukast'ın, PANC-1 kanser hücre hattında *CYSLTR1*, *GPR17*, *ERK1/2* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattına belirlenen 70 μM IC_{50} dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *HMGB1* gen ifadesinde çok önemli derecede azalış, *TP53*, *MTOR* gen ifadesinde önemli derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 0,34; 4,52; 1,67; kat değişikliği verileri elde edildi. *HMGB1*, *TP53* ve *MTOR* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 3.8).



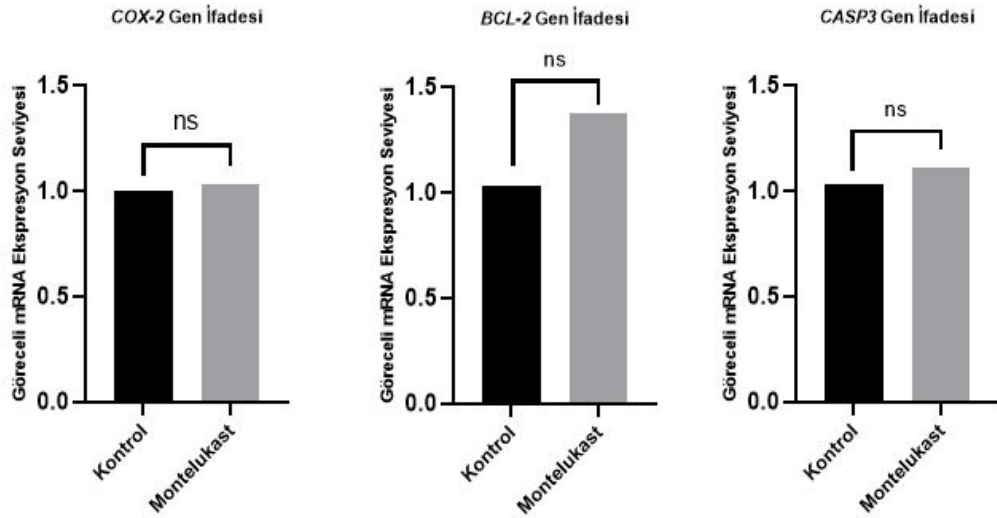
Şekil 3.8. Montelukast'ın, PANC-1 kanser hücre hattında *HMGB1*, *TP53* ve *MTOR* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattına belirlenen 70 μM IC_{50} dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *BAX* ve *MYC* gen ifadesinde çok önemli derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 2,19; 1,91 kat değişikliği verileri elde edildi. *BAX* ve *MYC* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Montelukast'ın, PANC-1 kanser hücre hattında *BAX* ve *MYC* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattına belirlenen 70 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *COX-2*, *BCL-2* ve *CASP3* gen ifadesinde önemli olmayan derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 1,03; 1,33; 1,07 kat değişikliği verileri elde edildi. *COX-2*, *BCL-2* ve *CASP3* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (ns, $p>0.05$) (Şekil 3.10).

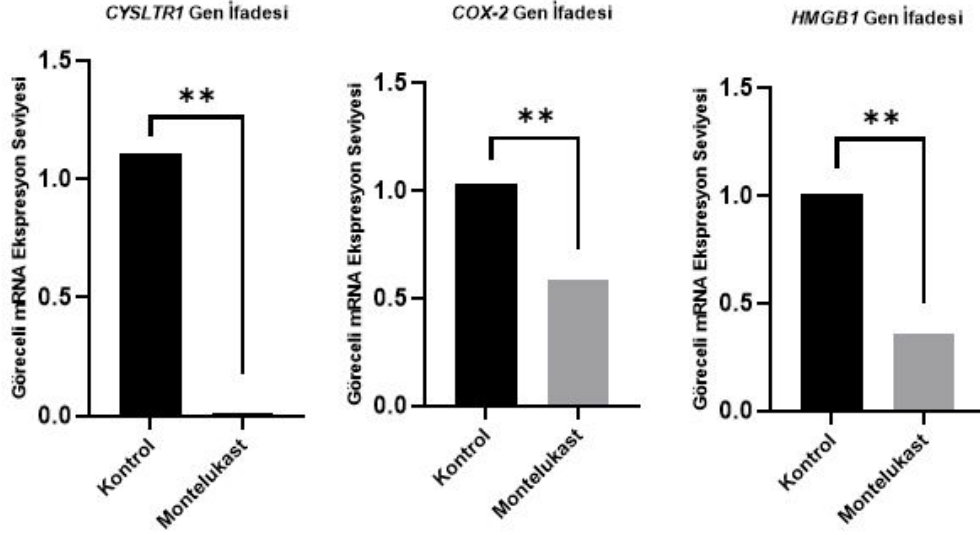


Şekil 3.10. Montelukast'ın, PANC-1 kanser hücre hattında *COX2*, *BCL-2* ve *CASP3* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattına belirlenen 70 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubunda ve Montelukast uygulaması yapılan grupta *CYSLTR2* ve *GPR99* genlerinin ifadeleri tespit edilemedi.

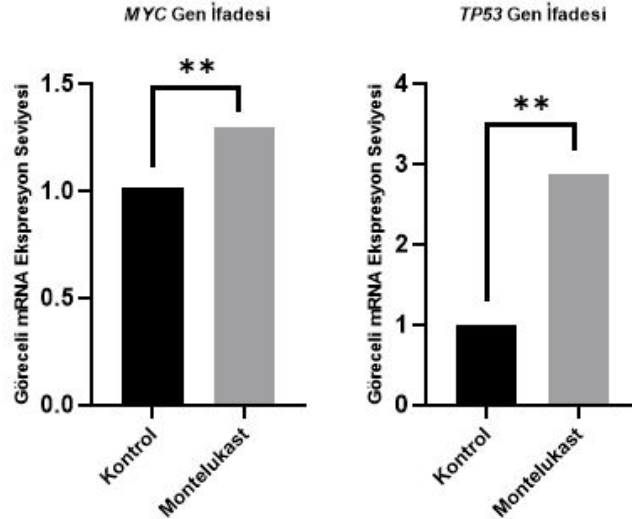
3.2.2. Montelukast'ın BxPC-3 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeyine Etkisi

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattına belirlenen 45 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *CYSLTR1*, *COX-2*, *HMGB1* gen ifadesinde çok önemli derecede azalış tespit edildi ve sırasıyla 0,01; 0,57; 0,35 kat değişikliği verileri elde edildi. *CYSLTR1*, *COX-2* ve *HMGB1* genlerindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p<0.01$) (Şekil 3.11).



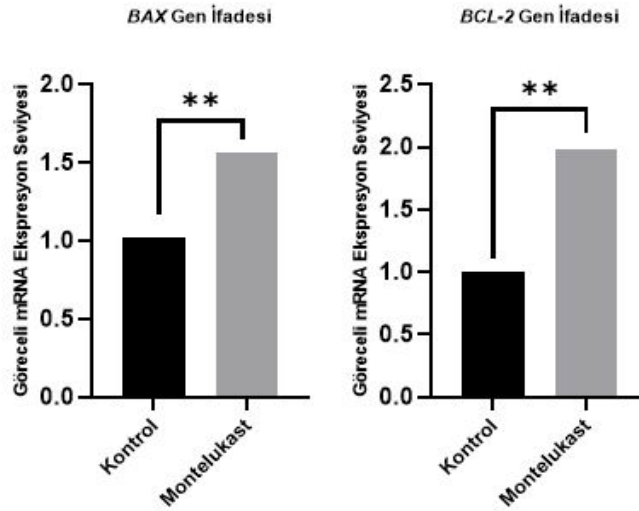
Şekil 3.11. Montelukast'ın, BxPC-3 kanser hücre hattında *CYSLTR1*, *COX2* ve *HMGB1* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattına belirlenen 45 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *MYC*, *TP53* gen ifadesinde çok önemli derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 1,28; 2,87 kat değişikliği verileri elde edildi. *MYC* ve *TP53* genlerindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 3.12).



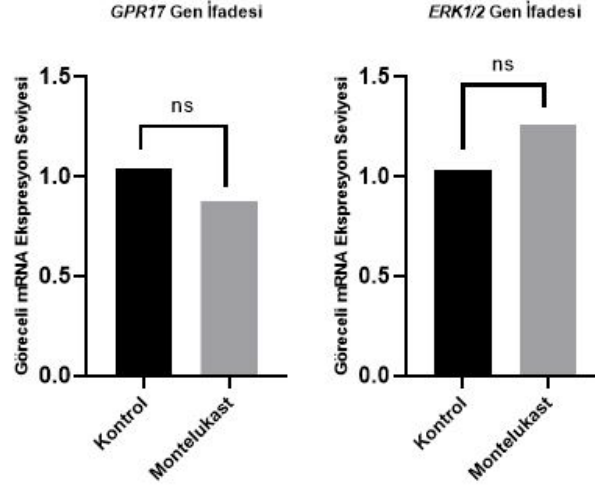
Şekil 3.12. Montelukast'ın, BxPC-3 kanser hücre hattında *MYC* ve *TP53* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattına belirlenen 45 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *BAX* ve *BCL-2* gen ifadesinde çok önemli derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 1,53; 1,98 kat değişikliği verileri elde edildi. *BAX* ve *BCL-2* genlerindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p<0.01$) (Şekil 3.13).



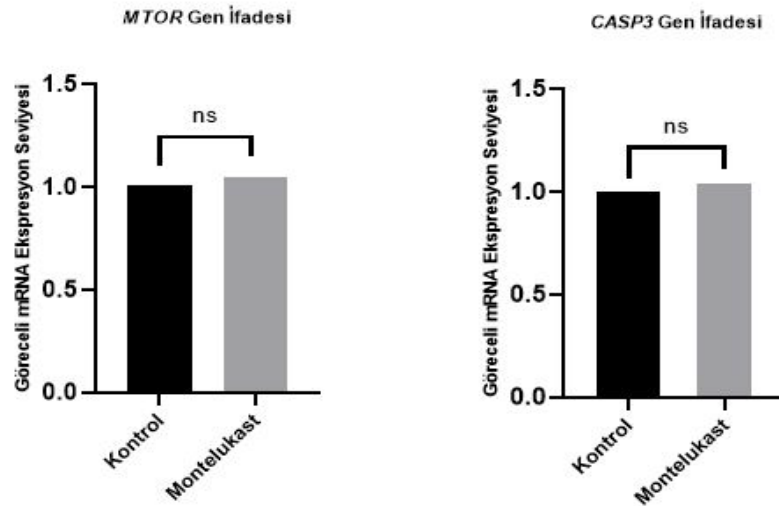
Şekil 3.13. Montelukast'ın, BxPC-3 kanser hücre hattında *BAX* ve *BCL-2* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattına belirlenen 45 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *GPR17* gen ifadesinde önemli olmayan derecede azalış ve *ERK1/2* gen ifadesinde önemli olmayan derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 0,84; 1,22 kat değişikliği verileri elde edildi. *GPR17* ve *ERK1/2* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (ns, $p>0.05$) (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Montelukast'ın, BxPC-3 kanser hücre hattında *GPR17* ve *ERK1/2* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattına belirlenen 45 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *MTOR* ve *CASP3* gen ifadesinde önemli olmayan derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 1,03; 1,05 kat değişikliği verileri elde edildi. *MTOR* ve *CASP3* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (ns, $p > 0.05$) (Şekil 3.15).

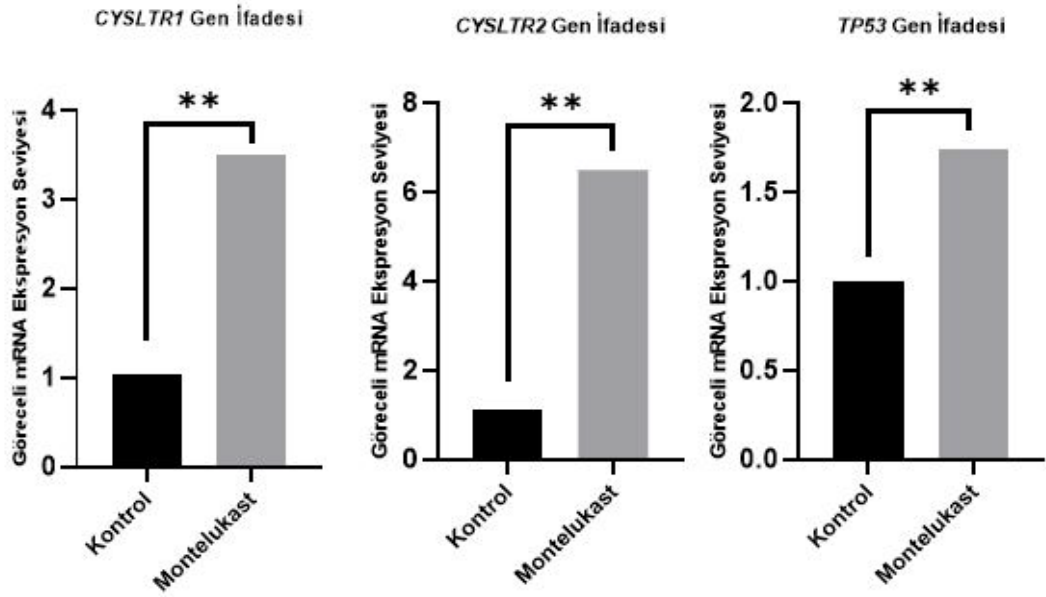


Şekil 3.15. Montelukast'ın, BxPC-3 kanser hücre hattında *MTOR* ve *CASP3* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattına belirlenen 45 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubunda ve Montelukast uygulaması yapılan grupta *CYSLTR2* ve *GPR99* genlerinin ifadeleri tespit edilemedi.

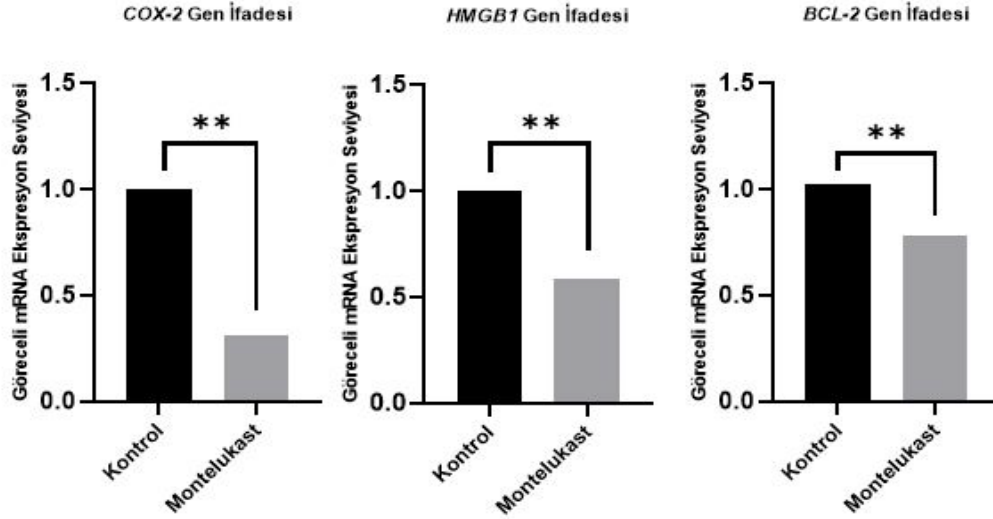
3.2.3. Montelukast'ın HEK293 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeyine Etkisi

Montelukast'ın, HEK293 hücre hattına belirlenen 55 μM IC_{50} dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *CYSLTR1*, *CYSLTR2* ve *TP53* gen ifadesinde çok önemli derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 3,36; 5,79; 1,73 kat değişikliği verileri elde edildi. *CYSLTR1*, *CYSLTR2* ve *TP53* genlerindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 3.16).



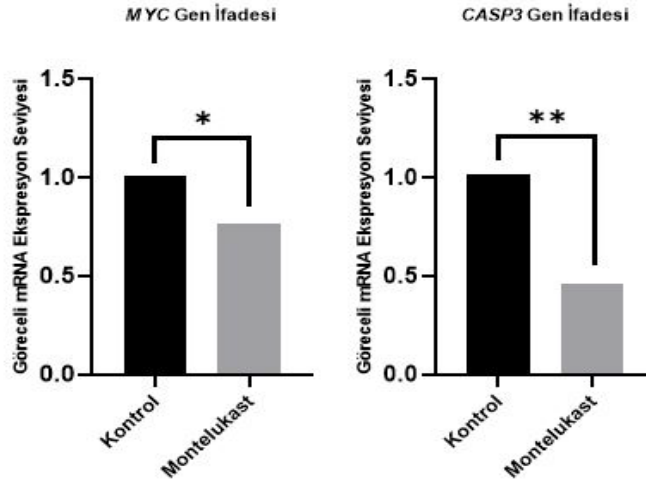
Şekil 3.16. Montelukast'ın, HEK293 kanser hücre hattında *CYSLTR1*, *CYSLTR2* ve *TP53* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, HEK293 hücre hattına belirlenen 55 μM IC_{50} dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *COX-2*, *HMGB1* ve *BCL-2* gen ifadesinde çok önemli derecede azalış tespit edildi ve sırasıyla 0,3; 0,58; 0,76 kat değişikliği verileri elde edildi. *COX-2*, *HMGB1* ve *BCL-2* genlerindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$) (Şekil 3.17).



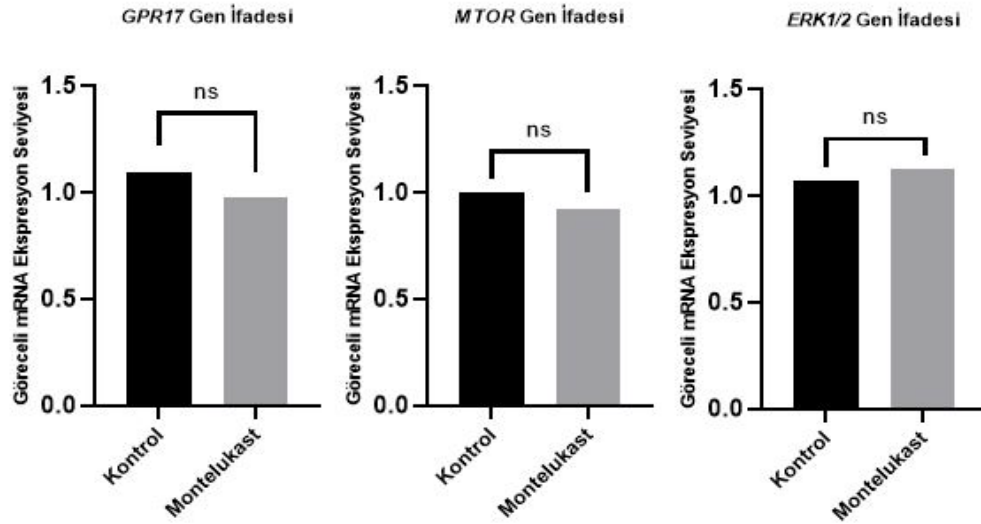
Şekil 3.17. Montelukast'ın, HEK293 kanser hücre hattında *COX-2*, *HMGB1* ve *BCL-2* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, HEK293 hücre hattına belirlenen 55 μM IC_{50} dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *MYC* gen ifadesinde önemli derecede ve *CASP3* gen ifadesinde çok önemli derecede azalış tespit edildi ve sırasıyla 0,75; 0,45 kat değişikliği verileri elde edildi. *MYC* ve *CASP3* genlerindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$) (Şekil 3.18).



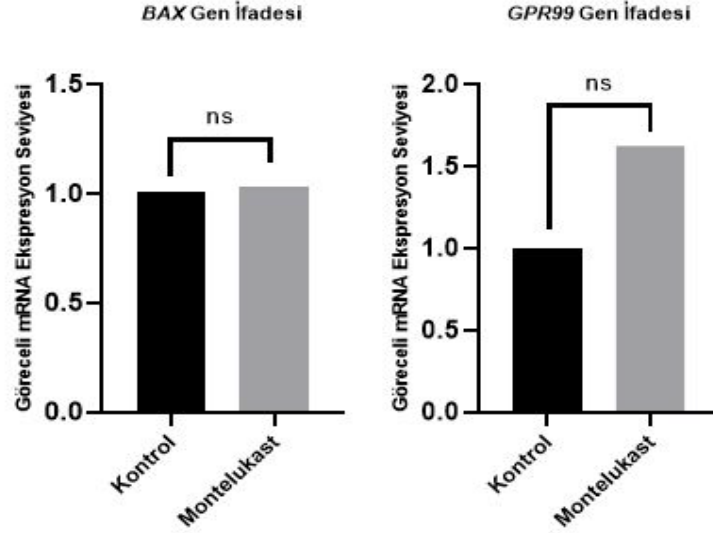
Şekil 3.18. Montelukast'ın, HEK293 kanser hücre hattında *MYC* ve *CASP3* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, HEK293 hücre hattına belirlenen 55 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *GPR17* ve *MTOR* gen ifadesinde önemli olmayan derecede azalış, *ERK1/2* gen ifadesinde önemli olmayan derecede artış tespit edildi ve sırasıyla 0,89; 0,92; 1,05 kat değişikliği verileri elde edildi. *GPR17*, *MTOR* ve *ERK1/2* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (ns, p>0.05) (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Montelukast'ın, HEK293 kanser hücre hattında *GPR17*, *MTOR* ve *ERK1/2* genlerinin *qPCR* ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Montelukast'ın, HEK293 hücre hattına belirlenen 55 μ M IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *BAX* ve *GPR99* gen ifadesinde önemli olmayan derecede artış tespit edildi ve 1,02; 1,62 kat değişikliği verileri elde edildi. *BAX* ve *GPR99* genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (ns, p>0.05) (Şekil 3.20).



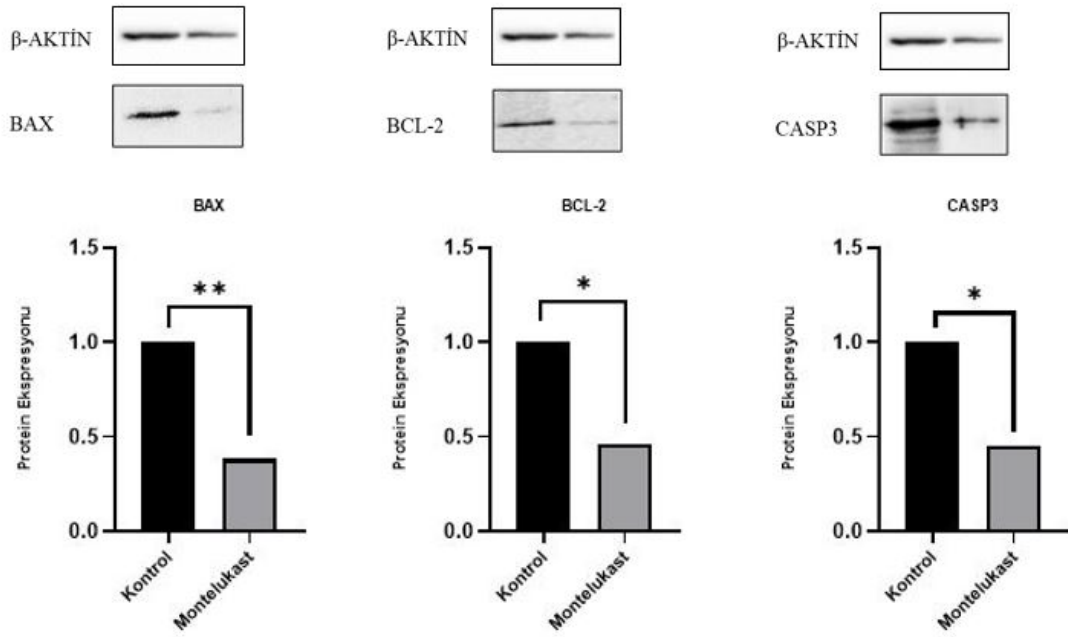
Şekil 3.20. Montelukast'ın, HEK293 kanser hücre hattında *BAX* ve *GPR99* genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

3.3. Protein Ekspresyon Analiz (Western Blot) Sonuçları

3.3.1. Montelukast'ın PANC-1 Kanser hücreleri üzerindeki etkisinin Western Blot ile analizi

Montelukast'ın, PANC-1 hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} dozunun uygulanması sonucunda proapoptotik BAX, CASP3 ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı.

Beta Aktin ile normalize edildiğinde BAX proteininin kontrole kıyasla 0,41 kat, BCL-2 proteininin 0,33 kat, CASP3 proteininin ise 0,34 kat azaldığı tespit edildi. BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*, $p < 0.5$, **, $p < 0.01$) (Şekil 3.21).

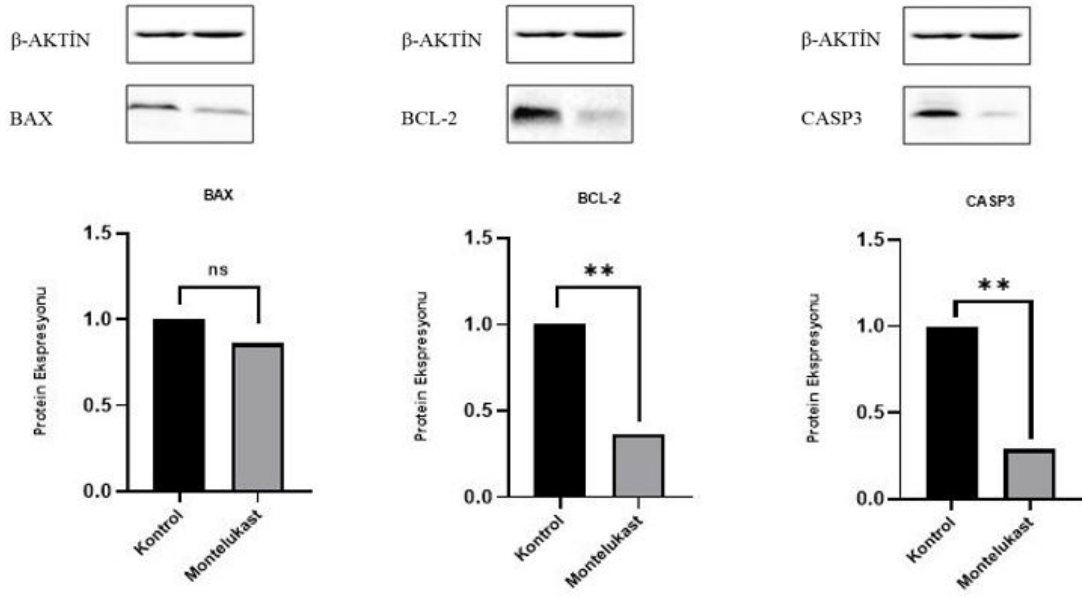


Şekil 3.21. Montelukast'ın belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda PANC-1 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyonuna etkisi.

3.3.2. Montelukast'ın BxPC-3 Kanser hücreleri üzerindeki etkisinin Western Blot ile analizi

Montelukast'ın, BxPC-3 hücre hattı üzerine belirlenen IC_{50} dozunun uygulanması sonucunda proapoptotik BAX, CASP3 ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı.

Beta Aktin ile normalize edildiğinde BAX proteininin kontrole kıyasla 0,06 kat, BCL-2 proteininin 0,43 kat, CASP3 proteininin ise 0,54 kat azaldığı tespit edildi. BAX proteinindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı (ns, $p>0.05$) bulunmazken, BCL-2 ve CASP3 proteinlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p<0.01$) (Şekil 3.22).

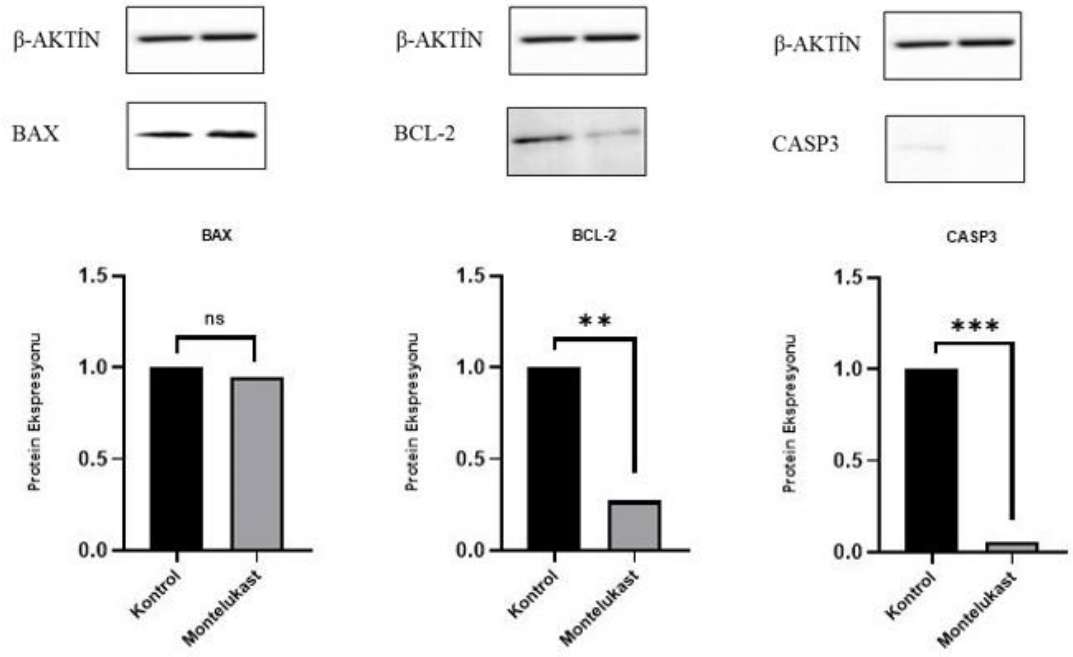


Şekil 3.22. Montelukast'ın belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda BxPC-3 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyonuna etkisi.

3.3.3. Montelukast'ın HEK293 hücreleri üzerindeki etkisinin Western Blot ile analizi

Montelukast'ın, HEK293 hücre hattı üzerine belirlenen IC₅₀ dozunun uygulanması sonucunda proapoptotik BAX, CASP3 ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı.

Beta Aktin ile normalize edildiğinde BAX proteininin kontrole kıyasla 0,02 kat, BCL-2 proteininin 0,56 kat, CASP3 proteininin ise 1,25 kat azaldığı tespit edildi. BAX proteinindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı (ns, $p > 0.05$) bulunmazken, BCL-2 ve CASP3 proteinlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$) (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. Montelukast'ın belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda HEK293 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyonuna etkisi.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda PANC-1 ve BxPC-3 insan pankreas kanseri hücrelerinde, genel olarak sisteinil lökotrien, apoptoz ve hücre sağkalım yollarını inhibisyon ve aktivasyon mekanizmasıyla antikanser ve apoptotik etkilerini araştırdığımız Montelukast, bir sisteinil lökotrien antagonistidir ve klinikte anti-alerjik tedavilerde halihazırda kullanılmakta olan bir ilaçtır.

Montelukast'ın antikanser etkisini kronik miyeloid lösemide, kolorektal, prostat, böbrek, mesane, testis, akciğer, meme, karaciğer, pankreas kanseri hücrelerinde CYSLTR1 ekspresyonunu inhibe etme, hücre canlılığını azaltma ve erken apoptozu indüklemeye, hücre döngüsünü durdurma yollarıyla gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde Montelukast'ın çeşitli kanser hücrelerinde antikanser etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmasına rağmen pankreas kanserinde Montelukast'ın rolü hakkında yakın zamanda Kachi ve arkadaşlarının (2021) yaptığı çalışma haricinde bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Literatürdeki bu eksiklikten yola çıkılarak gerçekleştirilen bu tez çalışmasında PANC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde Montelukast'ın sitotoksik etkisini, Montelukast uygulaması sonrası aktive ve inhibe olan çeşitli sinyal yollarını mRNA ve protein seviyesinde incelemeyi hedefledik. Bu anlamda IC₅₀ dozunda Montelukast uygulamasının olası antikanser etkilerini; kanser hücrelerinin büyüme, çoğalma, hayatta kalma, hareketlilik, migrasyon süreçlerinde rol oynayan *COX-2*, *C-MYC*, *MTOR*, *ERK1/2*, *HMGB1* genleri; CYSLT yolunda rol oynayan *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *GPR99*, *GPR17* genleri ve apoptozis sürecinde rol oynayan *TP53*, *BAX*, *BCL-2*, *CASP3* genlerinin ifadesinde meydana getirdiği değişiklikleri analiz ederek inceledik. Ek olarak çalışmamızda Montelukast'ın pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik etkisi BAX, BCL-2, CASP3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin western-blot ile analizi sonucu belirlenmiştir.

İlk olarak Montelukast'ın, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak pankreas kanseri hücreleri (PANC-1 ve BxPC-3) ve insan böbrek embriyonik hücrelerindeki (HEK293) canlılığa olan etkisi MTT testi ile belirlenmiştir.

Literatürde Montelukast'ın kanser hücrelerinde antiproliferatif, antikanser ve apoptotik etkileri olduğu bildirilmiştir (Matsuyama ve ark 2007, Matsuyama ve Yoshimura 2010, Paruchuri ve ark 2006, Piromkraipak ve ark 2018, Suknuntha ve ark

2018, Savari ve ark 2013, Sveinbjörnsson ve ark 2008, Tsai ve ark 2017, Zovko ve ark 2018). Montelukast'ın sitotoksitesisi ile ilgili yapılan bir çalışmada 48 saat Montelukast uygulaması sonrasında HT-29 ve SW-480 kolon kanseri hücrelerinde IC₅₀ değeri 10 µM olarak belirlenmiştir ve bu dozun hücreleri önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür. (Bellamkonda ve ark 2018). Montelukast'ın sitotoksitesisinin belirlendiği başka bir çalışmada ise A549, H1299, CL1-5, and LLC akciğer kanseri hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası IC₅₀ dozunun 50 ve 75 µM arasında olduğu belirlenmiştir ve zamana bağlı olarak sitotoksitesisinin arttığı belirtilmiştir. Bu çalışmada ise PANC-1 hücrelerinde Montelukast'ın 24 saatlik IC₅₀ değeri 92,6 µM, 48 saatlik IC₅₀ değeri 72,1 µM olarak belirlenmiştir (Grafik 3.1). BxPC-3 hücre hattında Montelukast'ın 24 saatlik IC₅₀ değeri 49,6 µM, 48 saatlik IC₅₀ değeri 42,3 µM olarak belirlenmiştir (Grafik 3.2). HEK293 ise hücre hattında Montelukast'ın 24 saatlik IC₅₀ değeri 86,1 µM, 48 saatlik IC₅₀ değeri 61,3 µM olarak belirlenmiştir (Grafik 3.3). Invert mikroskop görüntüleri (Şekil 3.2, 3.4, 3.6) ve MTT sonuçlarına göre Montelukast'ın uygulama yapılan bütün hücrelerde antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür ancak bu etkinin PANC-1 hücrelerinde daha yoğun olduğu belirlenmiştir.

CysLT yolu kanserde; enflamasyon, tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazda önemli roller oynamaktadır. Artan 5-LO ekspresyonu ve aşağı akış CysLT yolu, tümör mikro çevresini şekillendiren inflamasyon olarak kabul edilmiştir ve bu yol kanser proliferasyonu, göçü ve invazyonu ile ilişkilidir (Tsai ve ark 2022). CysLT1R'nin ifade seviyesinde, normal dokudan düşük dereceli ve daha sonra ilerlemiş malignitelere kadar olan bir seri değişiklik, birkaç kanserde bildirilmiştir (Matsuyama ve ark 2010). Örneğin, nispeten normal dokularda veya ürolojik organların iyi huylu lezyonlarında azalmış CysLT1R ekspresyonu gözlenmiştir (Matsuyama ve ark 2010). Buna karşılık, birkaç ürolojik kanser örneğinde güçlü CysLT1R ekspresyonu kaydedilmiş ve daha yüksek ekspresyon, daha yüksek bir tümör derecesi veya ileri bir evre ile ilişkilendirilmiştir (Funao ve ark 2008, Matsuyama ve ark 2010, Matsuyama, Funao ve ark 2009, Matsuyama, Kawahito ve ark 2009, Matsuyama ve ark 2007).

Çalışmamızda veya literatürde gen ekspresyon analizi sonuçları değerlendirildiğinde, Montelukast uygulaması yapılan iki farklı pankreas kanseri hücre hattında (PANC-1 ve BxPC-3) ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak belirlenen

genler, farklı profillerde ifade edilmektedir. Montelukast, PANC-1 hücrelerinde etki ettiği reseptör olan *CYSLTR1* geninin ifadesinde önemli derecede artış gösterirken; BxPC-3 hücrelerinde önemli derecede azalış göstermektedir. Literatürde Montelukast uygulanan kanser hücrelerinde *CYSLTR1* ekspresyonunun arttığı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Kachi ve arkadaşlarının (2021) farklı pankreas kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmada PANC-1 hücrelerinde *CYSLTR1* ekspresyonu Western Blot ile gösterilmiştir ancak Montelukast uygulaması sonrasında bu proteinin varlığı araştırılmamıştır. Mevcut çalışmada Montelukast uygulanan BxPC-3 hücrelerinde *CYSLTR1* ekspresyonunun azaldığı yönünde aldığımız sonuçlar, Piromkraipak (2018) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar ile uyumluluk göstermekte ve Montelukast'ın *CYSLTR1* ekspresyonunu inhibe ettiğini bir kez daha doğrulamaktadır. Ayrıca, kanser olmayan, kontrol grubu olarak kullandığımız HEK293 hücrelerine Montelukast uygulaması sonrası *CYSLTR1* gen ifadesinde de önemli bir artış gözlenmiştir. PANC-1 ve HEK293 hücrelerinde meydana gelen bu artış reseptörün ilaca karşı direnç geliştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Montelukast ile bloklanmış *CYSLTR1* 'lerin yanında ilaç maruziyetiyle başa çıkabilmek için yeniden eksprese olan *CYSLTR1* 'lerin varlığı da söz konusu olabilir. Elde edilen sonuçlar literatüre yeni kazandırılacak olup, *CYSLTR1* ekspresyonundaki bu değişiklikler farklı saat ve farklı konsantrasyonlarda Montelukast uygulaması ile doğrulanabilir.

Çalışmamızda sisteinil lökotrien reseptörlerinden olan *CYSLTR2*, *GPR99* ve *GPR17*'nin Montelukast uygulanması sonrası değişen mRNA ekspresyonları da hem pankreas kanseri hücrelerinde hem de insan böbrek embriyonik hücrelerinde incelenmiştir. *CYSLTR2* ve *GPR99*'un ekspresyonları PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde saptanamamıştır. *CYSLTR1* reseptörünün LTD4 için *CYSLTR2* ve *GPR99*'dan güçlü afinite gösterdiği (Tsai ve ark 2022) ve Montelukast'ın esas olarak *CYSLTR1* antagonisti olduğu (Lee ve ark 2004) bilgilerine dayanarak bu durum BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde *CYSLTR1* ekspresyonu ile elde ettiğimiz sonuçları doğrulamaktadır. Montelukast uygulanan HEK293 hücrelerinde *GPR99* ekspresyonu Montelukast uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir, ancak *CYSLTR2* için sonuçlar *GPR99*'dan farklı olarak Montelukast uygulanan hücrelerde *CYSLTR2* ekspresyonunun artmış olduğunu göstermektedir. Literatürde HEK293 hücrelerinin Montelukast muamelesi ile ilgili bir

çalışmaya rastlanılamamıştır, sonuçlarımız bu genler ile ilgili ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır.

GPR17'nin nöronal lif büyümesindeki rolünün incelendiği bir çalışmada beyin hasarından sonra nörorejeneratif etkilerin Montelukast ile indüklendiği ve bu duruma GPR17 antagonizminin aracılık ettiği bildirilmiştir (Braune ve ark 2021). Ayrıca son araştırmalarda GPR17'nin Montelukast ile bloke edilmesinin, nöral kök ve progenitör hücre proliferasyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir (Marschallinger ve ark 2015, Kabba ve ark 2018) CYSLTR1'in negatif düzenleyicisi olduğu bilinen (Maekawa ve ark 2010) *GPR17*'nin ekspresyonu Montelukast uygulaması sonucunda BxPC-3 hücrelerinde önemli derecede değişiklik göstermemiştir. Bu sonuçların aksi yönünde *GPR17*'nin PANC-1 hücrelerinde Montelukast sonrası mRNA ekspresyonunun önemli derecede artmış olduğu görülmüştür. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde Montelukast, antikanser özelliklerini CYSLT reseptörlerinden olan GPR17 sinyal yolu aracılığıyla göstermemektedir. Kontrol grubu olan sağlıklı HEK293 hücrelerinde *GPR17* ekspresyonu Montelukast uygulaması sonrasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

Mitokondriyal membran bütünlüğü, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Anti-apoptotik Bcl-2, dış mitokondriyal zarıda bulunur ve pro-apoptotik aile üyeleri Bax ve Bak'ın aktivasyonunu inhibe etme yolu ile apoptozu önler (Daugas ve ark 2000, Hsieh ve ark 2014, Lindsay ve ark 2011). Mitokondriden salınan apoptoz indükleyici faktörün (AIF) nükleer translokasyonu, kaspazdan bağımsız programlanmış hücre ölümüne katkıda bulunan kritik bir olaydır (Artus ve ark 2010, Baritaud ve ark 2010, Boujrad ve ark 2007, D'Anneo ve ark 2013, Hsieh ve ark 2014, Li ve ark 2001, Susin ve ark 1999). Tsai ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir çalışmada Montelukast ile muamele edilen akciğer kanser hücreleri, B-hücreli lenfoma 2'nin aşağı regülasyonunu (Bcl-2), Bcl-2 homolog antagonistinin (Bak) yukarı regülasyonunu ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) nükleer translokasyonunu göstermiştir. Montelukast, hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu inhibe ederek akciğer kanseri hücrelerinin hücre ölümünü indüklemiştir. Bu çalışmada Montelukast ayrıca hücre ölümüne katkıda bulunabilecek lizin 1 içermeyen (WNK1), protein kinaz B (Akt), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (Erk1/2), MAPK/Erk kinaz (MEK)

ve 40-kDa'lık (PRAS40) prolin açısından zengin Akt substratı gibi çeşitli proteinlerin fosforilasyonunu da önemli ölçüde azaltmıştır.

Bu bilgiler referans alınarak bu çalışmada Montelukast'ın apoptotik etkisi için pankreas kanseri hücrelerinde *BAX* ve *BCL-2* seviyeleri qRT-PCR ile mRNA ve Western Blot ile protein düzeyinde kontrol edilmiştir. qRT-PCR sonuçlarına göre PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde proapoptotik *BAX* geninin ekspresyonu önemli derecede artış göstermiştir. Ancak Western Blot sonuçları PANC-1 hücrelerinde *BAX* protein miktarının önemli derecede azaldığını, BxPC-3 hücrelerinde *BAX* protein miktarında anlamlı bir değişikliğin olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre Montelukast, her iki pankreas kanseri hücresinde de, gen düzeyinde proapoptotik etkinliğini gösterirken, BxPC-3 hücrelerinde protein düzeyinde anlamlı etkinliğinin olmadığını göstermektedir. Gen ve protein ekspresyonundaki bu karşıt durumun posttranslasyonel değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Öte yandan PANC-1 hücrelerinde *BAX* seviyesinin azalmış olması klasik apoptoz ile uyumlu değildir. Tsai ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada da benzer sonuçlara A549 ve CL1-5 akciğer kanseri hücrelerinde rastlanılmıştır. Çalışmamızda pankreas kanseri hücrelerine Montelukast uygulaması sonrası antiapoptotik molekül olan *BCL-2* seviyelerinde protein düzeyinde her iki hücrede de önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmalara benzer sonuçlardır (Piromkrapak ve ark 2018, Tsai ve ark 2017). Ancak qRT-PCR sonuçlarına göre PANC-1 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, BxPC-3 hücrelerinde önemli derecede *BCL-2* ekspresyon artışı gözlenmiştir. Ek olarak çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde her iki pankreas kanseri hücresinde *BCL-2* protein miktarındaki azalma ile Montelukast'ın etkinliği, glioblastoma hücrelerindeki etkinliği ile benzerlik göstermektedir. HEK293 hücrelerinde ise Montelukast uygulaması sonrası hem qPCR hem de Western Blot sonuçlarına göre *BAX*'ın ekspresyonunun değişmediği, *BCL-2* seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde *BAX* seviyesinin değişiklik göstermemesi klasik apoptozla uyumlu değildir, bu durumun mRNA ve protein yarılanma ömürleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Montelukast konsantrasyonlarında ve uygulama sürelerinde değişiklik yapılarak yeniden değerlendirilmesi sonuçların doğrulanmasını sağlayacaktır.

p53, tümör büyümesi sırasında hücre döngüsünü, DNA replikasyonunu ve kontrolsüz hücre bölünmesini kontrol ettiği için tümör baskılayıcı protein olarak bilinmektedir (Luo ve ark 2017). Kanser hücrelerinde olduğu gibi kontrolsüz hücre büyümesi ortaya çıktığında, p53, p21'in ekspresyonunu indükleyerek hücre döngüsünün durmasını sağlar (Georgakilas ve ark 2017, Faria ve ark 2007). Ayrıca p53, Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi olan BAX başta olmak üzere apoptozla ilgili genlerin ekspresyonunu sağlayarak programlanmış hücre ölümünü indükler (Gottlieb ve Oren 1998). İnsan glioblastoma hücrelerinde (A172 ve U-87 MG) Montelukast ve CYSLTR2 antagonisti olan zafirlukastın etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (Piromkraipak ve ark 2018) glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu her iki ilaç da inhibe etmiştir. Zafirlukast glioblastoma hücrelerinde p53 ve p21'in ekspresyonunu artırarak G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurma yoluyla Montelukasttan daha fazla antiproliferatif etki göstermiştir. Montelukast'ın A172 hücrelerinde zafirlukasttan daha fazla apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Sonuç olarak her iki ilacın da Bax seviyesini etkilemeden Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda Montelukast uygulanan PANC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde *TP53* geninin ifadesi, her iki hücre de de önemli derecede artmıştır. Bu sonuç Piromkraipak ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar göstermekle birlikte Montelukast'ın antikanser etkinliğini doğrular niteliktedir. HEK293 hücrelerinde Montelukast'ın *TP53* genindeki etkinliği incelendiğinde PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerine benzer şekilde genin ifadesini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Kaspaz-3, *CASP3* geni tarafından kodlanan bir protein olup, apoptotik hücrelerde hem ekstrinsik (ölüm ligandları) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollarla aktive edilen, apoptozun ana aracıdır (Cade ve Clark 2015). Genellikle kanser tedavisinin etkinliği için bir belirteç (Zhou ve ark 2018) olarak kullanılan kaspaz-3 başlangıçta olgunlaşmamış bir zimojen (prokaspaz) olarak sentezlenmekte ve aktive olması için spesifik proteoliz gerektirmektedir (Favaloro ve ark 2012). Çalışmamızda Montelukast'ın apoptotik etkileri, BAX ve BCL-2'ye ek olarak *CASP3* ekspresyon seviyeleri kontrol edilerek belirlenmiştir. PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde Montelukast muamelesi sonrası mRNA düzeyinde önemli bir değişiklik

saptanmamıştır. Protein düzeyinde bakıldığında CASP3 ekspresyonunda her iki hücrede de önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bu ters yönde aldığımız sonuç apoptozun, kaspazdan bağımsız yollarla da meydana gelebilme özelliği (Baritaud ve ark 2010) ile açıklanabilir ve Montelukast'ın apoptozu indükleyen faktörün (AIF) mitokondriden çekirdeğe translokasyonu yolu (Baritaud ve ark 2010) ile pankreas hücrelerinin apoptozuna aracılık edebileceği düşüncesi akla gelmektedir. Montelukast, HEK293 hücrelerinde *CASP3* geni ve CASP3 protein ekspresyonunu azaltma yönünde etkinlik göstermiş olup, bu sonuçlar da BAX geninde olduğu gibi klasik apoptoz ile uyumsuz bir profil sergilemektedir. Ancak günümüzde kemoterapötik ilaçların büyük probleminin kanser hücrelerinin yanında normal hücrelerin de proliferasyonuna engel olup, apoptozu yönlendirdiği göz önüne alındığında, elde ettiğimiz bu sonuçların Montelukast'ın sağlıklı hücrelerde apoptozise etkisinin bulunmadığını göstermektedir.

Siklooksijenaz-2 (COX-2), karsinogenez ve kanser hücresinin kemo ve radyoterapiye direncinin oluşumunda veya teşvikinde rol oynar ve birçok kanser türünde sıklıkla eksprese edilir (Hashemi ve ark 2019). COX-2, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), makrofaj tip 2 (M2) hücreleri ve kanser hücreleri tarafından tümör mikroortamına (TME) salınır. COX-2, kanser hücrelerinin apoptotik direncini, çoğalmasını, anjiyogenezini, iltihaplanmasını, istilasını ve metastazını indükler (Hashemi ve ark 2019). COX-2 ekspresyonunun anormal bir şekilde olması özellikle kolorektal kanser olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde tümör başlangıcına neden olduğunu düşündürmektedir (Massoumi ve ark 2007, Rao ve ark 2012, Wang ve ark 2010, Yang ve ark 2012). Kolorektal tümörler için hayvan kanser modellerinde ve kanserli hastalarda COX-2 inhibitörlerinin ve non-steroidal anti-alerjik ilaçların kullanılması kanserin ilerlemesi ve insidansında azalmayı sağlayabilmektedir (Greenhough ve ark 2009). Akciğer kanseri hücrelerine Montelukast uygulanması ile yapılan bir çalışmada artan Montelukast miktarı ile birlikte azalan COX-2 protein ekspresyonu Western Blot ile gösterilmiştir (Tsai ve ark 2017). Nath ve arkadaşlarının (2015) yaptığı bir analizde pankreas kanseri hastalarının yüksek seviyede COX-2 eksprese ettiği bu durumun kötü prognozla ilişkilendirildiği göz önünde bulundurularak çalışmamızda Montelukast'ın *COX-2* gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişiklikler rapor edilmiştir. Montelukast PANC-1 kanser hücrelerinin *COX-2* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemesine rağmen; BxPC-3 hücrelerinde Montelukast uygulaması ile birlikte *COX-2*

ekspresyonunda anlamlı şekilde azalmaya neden olmuştur. PANC-1 hücrelerinde Montelukast aracılı *COX-2* seviyesinin kontrolü uygulanan Montelukast dozunda ve süresinde değişiklik yapılarak yeniden değerlendirilebilir. Montelukast'ın *COX-2* ekspresyonunda meydana getirdiği değişiklik normal HEK293 hücrelerinde incelendiğinde, sonuçlarımız literatürle benzerlik göstererek ekspresyonun azaldığı yönündedir.

Hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz (ERK)1/2, bir mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesi proteinidir ve aktivatör protein-1 dahil olmak üzere sinyal iletim yollarında ve transkripsiyon faktörlerinin işlevinde önemli bir rol oynamaktadır (Plotnikov ve ark 2011). Hücrenin hayatta kalması, çoğalması ve gelişmesi ile ilişkili yollarda işlev gören ERK1/2 (Zou ve ark 2019), kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve göçünü destekler (Tsai ve ark 2017, Kuo ve ark 2014, Roberts ve Der 2007). Endotel hücrelerle yapılan bir çalışmada LTD4, CysLT1 reseptörü aracılığıyla ERK1/2 fosforilasyonunu indüklemiştir ve endotelial hücrelerin proliferasyonunu değil migrasyonunu uyardığı bulunmuştur (Yuan ve ark 2009). Kachi ve arkadaşlarının (2021) yaptığı bir çalışmada Montelukast'ın *LTD4-CYSLTR1- ERK* yolunu baskılayarak pankreas karsinogenezini inhibe edebileceği Western Blot ile belirlenmiştir. Ayrıca, insan akciğer kanseri hücreleri olan A549 ve CL1-5'te Montelukast kaynaklı azalmış ERK1/2 fosforilasyonu ile hücre ölümü bildirilmiştir (Tsai ve ark 2017). İnsan glioblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada lökotrien antagonistlerinden Montelukast ve Zafirlukast'ın beyin kanserinde ERK1/2 fosforilasyonunu azalttığı görülmüştür (Piromkraipak ve ark 2018). Yaptığımız çalışmada Montelukast uygulanan pankreas kanseri hücrelerinde qRT-PCR ile mRNA düzeyinde incelenen *ERK1/2* ekspresyonu, PANC-1 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik göstermemiş olup ve BxPC-3 hücrelerinde anlamlı bir şekilde artmıştır. Sonuçlarımız literatürle zıt yönde farklılık göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Montelukast'ın IC_{50} dozlarından düşük ve yüksek dozlarda uygulama yapılması ile yeniden değerlendirilmesi gerektiğini ön plana çıkarmaktadır. HEK293 hücrelerinde *ERK1/2* seviyesinin Montelukast uygulamasının ardından değerlendirildiği çalışmamızda genin ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir. Sadece gen düzeyinde analiz edildiği değerlendirildiğinde Montelukast'ın ERK1/2 sinyal yolu üzerindeki etkinliği hakkında kesin bilgi elde edilememiştir ancak HEK293 hücrelerinin

normal hücreler olduğu ele alındığında ekspresyon seviyesinde değişikliğin meydana gelmemesi tarafımızca olumlu değerlendirilmektedir.

Yüksek mobilite grubu (HMG) proteinleri, histon olmayan nükleer proteinlerin bir grubu olup, yüksek mobiliteli grup box 1 (HMGB1), en iyi çalışılmış ve hücrede bol miktarda bulunan HMG proteinidir (Goodwin ve ark 1973). HMGB1, hücre içinde bir otofaji sürdürücüsü, apoptotik hücre ölümünden koruyucu olarak görev yapmaktadır (Goodwin ve ark 1973, Sun ve Tang 2014). HMGB1 normalde çekirdekte bulunur ve replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve onarım gibi DNA ile ilişkili bir dizi işlemin düzenlenmesinde yer alan bir DNA şaperonu görevi görür (Sun ve Tang 2014). HMGB1'in hücre dışına salınması, hücre stresi veya ölümü ile indüklenebilmektedir ve hücre dışı sıvıdaki HMGB1, eksojen HMGB1 olarak adlandırılmaktadır (Tang ve Lotze 2012). Pek çok araştırmacı, kolon, meme, akciğer, prostat, rahim ağzı, cilt, böbrek, mide, pankreas, karaciğer, kemik ve kan kanserleri dahil olmak üzere bir dizi kanserde HMGB1'in ana rolünü ortaya koymuşlardır (Ellerman ve ark 2007, Lotze ve ark 2003, Sims ve ark 2009, Tang ve ark 2010, Li ve ark 2017). Son zamanlarda Zhu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada eksojen HMGB1'in radyoterapiden sonra pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını desteklediğini bildirmişlerdir (Zhu ve ark 2021). Bu verilerden yola çıkarak ve daha önce *HMGB1* ekspresyonuna etkisinin araştırılmadığı bilinen Montelukast'ın PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerindeki etkisi çalışmamızda incelenmiştir. Aldığımız sonuçlar her iki hücrede de *HMGB1* ekspresyonunun Montelukast tedavisi sonrası önemli bir şekilde azaldığı yönündedir. HMGB1'in pankreas kanserinin gelişimi ve ilerlemesi için çok önemli bir protein olduğu bilgisi göz önüne alınarak (Cebrian ve ark 2016) verilerimiz Montelukast'ın pankreas kanseri üzerinde HMGB1 bağımlı yollar ile etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca Montelukast'ın HEK293 hücrelerinde *HMGB1* ekspresyonunu önemli derecede azalttığı sonuçlarına ulaşılmıştır.

Hücreler ve dokular, insülin, glikoz, büyüme faktörleri, sitokinler (Sun ve ark 2020), integrinler, B ve T hücre reseptörleri (Nepstad ve ark 2020), hormonlar ve kemokinler gibi çeşitli moleküllerin tirozin kinazlara (RTK'ler) bağlanmasıyla veya hücre yüzeyindeki G-protein reseptörlerine (GPCR'ler) bağlanarak birbirleriyle iletişim kurarlar. Bu iletişim, sınıf I fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Protein kinaz B

(AKT)/rapamisinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolu gibi hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Dibble ve ark 2015, Noorolyai ve ark 2019, Sharma ve ark 2021). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, hücrenin hayatta kalması, büyümesi, çoğalması (Ediriweera ve ark 2019), metabolizması ve motilitesinde (Alzahrani 2019) çok önemli roller oynamaktadır. PI3K/AKT/mTOR yolunun önemli bir proteini olan mTOR, hücre büyümesini ve proliferasyonunu, protein sentezini, apoptoz ve otofajiyi düzenlemektedir (Larsen ve Möller 2020). Pankreas kanseri hastalarında PI3K/AKT/mTOR yolu bileşenleri sıklıkla anormal aktivasyon göstermektedir ve bu yolların hedeflenmesi pankreas kanserinin tedavisi için önemli bir seçenektir. (Mortazavi ve ark 2022). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (Tong ve ark 2019) Montelukast'ın, multipl miyelom tedavisinde kullanılan karfilzomib ile kombinasyon halinde uygulanmasının mTOR yolağının baskılanması yoluyla hücrede sitotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak pankreas kanseri hücrelerinde Montelukast'ın antikanser etkinliğini değerlendirdiğimiz bu tez çalışmasında *MTOR* geninin ekspresyonu qRT-PCR ile değerlendirilmiş; PANC-1 hücrelerinde Montelukast uygulaması sonrası *MTOR* ekspresyonunun arttığı ve BxPC-3 hücrelerinde ise uygulama sonrası *MTOR* ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalar (Tong ve ark 2019) ile karşılaştırıldığında Montelukast uygulaması sonrası *MTOR* ekspresyonunun azalmış olması beklenirken, PANC-1 hücrelerinde artmış olması Montelukast'ın pankreas kanserinde PI3K/AKT/mTOR yolu üzerinde inhibe edici bir etkinliğinin olmadığını düşündürmüştür, ancak kesin sonuçlar için yolak üzerindeki tüm proteinlerin ekspresyonu incelenmelidir ve farklı test sistemleri ile doğrulanmalıdır. Normal hücrelerde Montelukast'ın etkinliğini değerlendirmek için HEK293 hücrelerinde *MTOR* düzeyi kontrol edilmiş ve sonuç olarak Montelukast'ın *MTOR*'un ekspresyonunu değiştirmedeği belirlenmiştir.

MYC, birçok farklı kanser türünün oluşumunda, devamında ve ilerlemesinde yer alan, *C-MYC*, *L-MYC* ve *N-MYC* olmak üzere 3 üyeden oluşan bir genidir (C.V. Dang 2016, M.E. Beaulieu ve Castillo 2020, P.A. Carroll ve ark 2018, R.M. Kortlever ve ark 2017). *MYC* proteinleri hücre büyümesi, hücre döngüsü, farklılaşması, apoptoz, anjiyogenez dahil olmak üzere birçok farklı hücresel süreçte yer alan genlerin düzenlenmesinde görevli transkripsiyon modülatörleri olarak işlev görmektedir (C.V. Dang 2016, M.E. Beaulieu ve Castillo 2020, P.A. Carroll ve ark 2018, R.M. Kortlever ve ark 2017). Çok sayıda çalışma, en yaygın şekilde araştırılan ve kansere neden olan

genlerden biri olan *MYC*'nin çeşitli kanserlerin büyümesinde ve ilerlemesinde rol oynadığını (C.V. Dang 2016, M.E. Beaulieu ve Castillo 2020, P.A. Carroll ve ark 2018, R.M. Kortlever ve ark 2017) ve *MYC* gen ekspresyonunun düzensizliğinin insan kanserlerinin %70'e kadarında meydana geldiğini göstermiştir (C.V. Dang 2012). *C-MYC*'nin aşırı ekspresyonu primer pankreas kanserlerinin %43,5'inde bulunmakta (Schleger ve ark 2002, Allenson ve ark 2017) ve pankreas kanserinin proliferasyonunu, invazyonunu, metastazını, anjiyogenezini ve immün kaçışını artırmaktadır (Ala 2022). Pankreas kanserinde birkaç onkogenik yolun ortak alt hedefi olan *C-MYC*'yi inhibe etmenin her bir yolu tek başına inhibe etmekten daha olumlu sonuçlar getirdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Hayes ve ark 2016, Zhai ve ark 2021, Bryant ve ark 2019, Sheng ve ark 2017, Sheng ve ark 2020, Tanaka ve ark 2019, Diersch ve ark 2016, Zhong ve ark 2013). Karfilzomib ile kombinasyon halinde Montelukast uygulamasının multipl miyelomda mTOR yolunun inhibisyonunun yanı sıra *C-MYC* ekspresyonunu da önemli ölçüde azalttığı Tong ve ark'nın yaptığı çalışmada rapor edilmiştir (Tong ve ark 2019). Bu bilgiler ışığında PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinin Montelukast ile muamele edilmesi sonucunda *MYC* gen ekspresyonu incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda her iki hücre hattında da *MYC* ekspresyonu literatürde belirtilenden farklı olarak artış göstermiştir. mTOR ve c-MYC yollarının birbirini aynı yönde etkilediği (Ala 2022) ele alındığında PANC-1 hücreleri için her iki genin ekspresyonunun artması birbirine paralellik göstermektedir. Kontrol grubu olarak ele aldığımız HEK293 hücrelerine Montelukast uygulanması sonrasında *MYC* gen ekspresyonu literatürle paralel yönde değişiklik göstererek azalmıştır. Bu durum Montelukast'ın kanser olmayan, normal hücrelerde *MYC* ekspresyonunu negatif yönde etkilediğini ve hücre proliferasyonuna *MYC* yolu üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ve literatürde yer alan sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Montelukast'ın hücresel proliferasyonu inhibe ederek pankreas karsinogenezisini baskıladığı sonucuna ulaşılabilmektedir. Montelukast bu özelliği ile pankreas karsinogenezinin tedavisi için umut verici potansiyele sahiptir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sisteinil lökotrien antagonisti olan Montelukast'ın PANC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerindeki antikanser etkileri; sitotoksite, gen ekspresyon analizi ve protein ekspresyon analizi yöntemleriyle araştırıldı. Kanserli olmayan hücrelerdeki etkisi ise HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerinde araştırıldı.

Montelukast'ın PANC-1 hücrelerinde 50-70-90-110-130-150 μM konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonrası IC_{50} değeri 92,6 μM ve 48 saat uygulanması sonrası IC_{50} değeri 70 μM olarak belirlendi. MTT testi sonuçlarına ve invert mikroskop görüntülerine göre Montelukast'ın zaman ve doza bağlı olarak PANC-1 hücrelerinde, hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi. Gen ve protein ekspresyon analizi için hücreler 48 saat boyunca 70 μM Montelukast ile muamele edildi.

Montelukast uygulaması (70 μM) sonrasında PANC-1 hücrelerinde; *CYSLTR1*, *GPR17*, *ERK1/2*, *TP53*, *MTOR*, *BAX*, *MYC* genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Uygulama sonrası *HMGB1* gen ifadesinde anlamlı bir azalış gözlenirken; *COX-2*, *BCL-2*, *CASP3* genlerinin ifadesinde önemli bir değişiklik gözlenmedi. *CYSLTR2* ve *GPR99* genlerinin ifadesi PANC-1 hücrelerinde tespit edilemedi.

PANC-1 hücrelerine Montelukast uygulaması sonrasında protein ekspresyon analizi sonuçlarına göre apoptotik BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinleri Montelukast uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi. Sonuçlar istatistiki olarak anlamlı olsa da; proapoptotik olan BAX protein miktarının azalması ve apoptozda efektör olarak etkili olan CASP3 protein miktarının azalması Montelukast'ın apoptotik potansiyelinin BAX ve CASP3 proteinleri üzerinden etkili olmadığını gösterdi.

Montelukast'ın BxPC-3 hücrelerinde 50-70-90-110-130-150 μM konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonrası IC_{50} değeri 49,6 μM ve 48 saat uygulanması sonrası IC_{50} değeri 42,3 μM olarak belirlendi. MTT testi sonuçlarına ve invert mikroskop görüntülerine göre Montelukast'ın zaman ve doza bağlı olarak BxPC-3 hücrelerinde, hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi. Gen ve protein ekspresyon analizi için hücreler 48 saat boyunca 45 μM Montelukast ile muamele edildi.

Montelukast uygulaması (45 μM) sonrasında BxPC-3 hücrelerinde; *CYSLTR1*, *COX-2*, *HMGB1* gen ifadelerinde anlamlı bir azalış gözlemlendi. *MYC*, *TP53*, *BAX*, *BCL-2* genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. *GPR17*, *ERK1/2*, *MTOR*, *CASP3* genlerinin ifadesinde önemli bir değişiklik gözlenmezken; *CYSLTR2* ve *GPR99* genlerinin ifadesi BxPC-3 hücrelerinde de tespit edilemedi.

BxPC-3 hücrelerine Montelukast uygulaması sonrasında protein ekspresyon analizi sonuçlarına göre apoptotik BCL-2 ve CASP3 proteinleri Montelukast uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenirken; BAX proteininde anlamlı derecede değişiklik gözlenmedi. BAX protein miktarının değişmemesi ve CASP3 protein miktarının azalması PANC-1 hücrelerinde olduğu gibi Montelukast'ın apoptotik potansiyelinin BAX ve CASP3 proteinleri üzerinden etkili olmadığını gösterdi.

Montelukast'ın HEK293 hücrelerinde 50-70-90-110-130-150 μM konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonrası IC_{50} değeri 86,1 μM ve 48 saat uygulanması sonrası IC_{50} değeri 61,3 μM olarak belirlendi. MTT testi sonuçlarına ve invert mikroskop görüntülerine göre Montelukast'ın zaman ve doza bağlı olarak HEK293 hücrelerinde, hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi. Gen ve protein ekspresyon analizi için hücreler 48 saat boyunca 55 μM Montelukast ile muamele edildi.

Montelukast uygulaması sonrasında HEK293 hücrelerinde; *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *TP53* genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak artış gözlemlendi. *COX-2*, *HMGB1*, *BCL-2*, *MYC*, *CASP3* genlerinin ifadelerinde ise anlamlı azalış gözlemlendi. *GPR17*, *ERK1/2*, *BAX*, *GPR99*, *MTOR* genlerinin ifadelerinde önemli bir değişiklik gözlenmedi.

HEK293 hücrelerine Montelukast uygulaması sonrasında protein ekspresyon analizi sonuçlarına göre apoptotik BCL-2 ve CASP3 proteinleri Montelukast uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenirken; BAX proteininde anlamlı derecede değişiklik gözlenmedi. BAX protein miktarının değişmemesi ve CASP3 protein miktarının azalması PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde olduğu gibi Montelukast'ın apoptotik potansiyelinin BAX ve CASP3 proteinleri üzerinden etkili olmadığını gösterdi.

Sonuçların tamamı ele alındığında Montelukast, pankreas kanseri hücrelerinde (PANC-1 ve BxPC-3) hücresel proliferasyonu inhibe ederek pankreatik karsinogenez üzerindeki inhibitör etkilerini göstermektedir. İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) de hücresel proliferasyonu inhibe ederek antiproliferatif etkinliğini göstermiştir. Montelukast'ın antiproliferatif etkinliğinin hücre döngüsünün hangi evresinde meydana geldiğini tespit etmek için flow sitometri ile hücre döngüsü analizi yapılması gerekmektedir.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde Montelukast'ın pankreas kanseri üzerine etkisi, Montelukast'ın farklı konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda uygulanması ile detaylandırılabilir. Hücre döngüsü analizleri ile antiproliferasyon profili belirlenebilir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlara göre Montelukast'ın apoptozdan bağımsız olarak hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile pankreas kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği düşünülmektedir. Moleküler mekanizmasının ve antikanser etkinliğinin daha ileri çalışmalar ile aydınlatılması gerekmekte olup; elde edilen ve literatürdeki diğer sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Montelukast pankreas kanseri tedavisi için kemoterapötik ajan olma potansiyeli taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Ahn SS, Kim MJ, Choi JY, et al. Indicative findings of pancreatic cancer in pre diagnostic CT Eur Radiol. 2009;19(10):2448–2455.
- Ala, M. (2022). Target c-Myc to treat pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 23(1), 34-50.
- Al-Azzam, N., & Elsalem, L. (2020). Leukotriene D4 role in allergic asthma pathogenesis from cellular and therapeutic perspectives. *Life Sciences*, 260, 118452.
- Allenson K, Castillo J, San Lucas F, Scelo G, Kim D, Bernard V, Davis G, Kumar T, Katz M, Overman MJ, et al. High prevalence of mutantKRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(4):741–747.
- Alzahrani A.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Semin. Cancer Biol*. 2019;59:125–132.
- American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2014. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2014.html>. 2014.
- Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Fuchs CS, Petersen GM, Arslan AA, Bueno-de-Mesquita HB. et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2009;41(9):986–990.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*. 2008;25(9):2097–2116.
- Annese V, Minervini M, Gabbrielli A, Gambassi G, Manna R. ABO blood groups and cancer of the pancreas. *Int J Pancreatol*. 1990;6(2):81–88.
- Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood*. 2010;115(23):4635–4643.
- Artus C., Boujrad H., Bouharrou A., Brunelle M.N., Hoos S., Yuste V.J., Lenormand P., Rousselle J.C., Namane A., England P., et al. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J*. 2010;29:1585–1599.
- Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*, 63(10), 1966-1973.
- Aune D, Greenwood DC, Chan DS, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Cade JE. et al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol*. 2012;23(4):843–852.
- Bäck, M., Powell, W. S., Dahlgren, S. E., Drazen, J. M., Evans, J. F., Serhan, C. N., ... & Rovati, G. E. (2014). Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *British journal of pharmacology*, 171(15), 3551-3574.
- Baritaud, M., Boujrad, H., Lorenzo, H. K., Krantic, S., & Susin, S. A. (2010). Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell cycle*, 9(16), 3186-3193.
- Batabyal P, Vander Hoorn S, Christophi C, Nikfarjam M. Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of 88 studies. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(7):2453–2462.
- Beaney AJ, Banim PJR, Luben R, Lentjes MAH, Khaw KT, Hart AR. Higher meat intake is positively associated with higher risk of developing pancreatic cancer in an age-dependent manner and are modified by plasma antioxidants: a prospective cohort study (EPIC-Norfolk) using data from food diaries. *Pancreas*. 2017;46(5):672–678.
- Beger, H. G., Buchler, M. W., Kozarek, R., Lerch, M. M., Neoptolemos, J. P., Warshaw, A. L., ... & Shiratori, K. (Eds.). (2009). *The pancreas: an integrated textbook of basic science, medicine, and surgery*. John Wiley & Sons.
- Bellamkonda K., Satapathy S.R., Douglas D., Chandrashekar N., Selvanesan B.C., Liu M., Savari S., Jonsson G., Sjolander A. Montelukast, a CysLT1 receptor antagonist, reduces colon cancer stemness and tumor burden in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Cancer Lett*. 2018;437:13–24.

- Bellamkonda, K., Sime, W., & Sjölander, A. (2015). The impact of inflammatory lipid mediators on colon cancer-initiating cells. *Molecular carcinogenesis*, 54(11), 1315-1327.
- Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(3):519-523.
- Berrozpe, G., Schaeffer, J., Peinado, M. A., Real, F. X., & Perucho, M. (1994). Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 58(2), 185-191.
- Boffetta, P., Boccia, S., & Vecchia, C. L. (2014). Overview of the major causes of human cancer. In *A quick guide to cancer epidemiology* (pp. 77-88). Springer, Cham.
- Bonner-Weir, S., Sullivan, B. A., & Weir, G. C. (2015). Human islet morphology revisited: human and rodent islets are not so different after all. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(8), 604-612.
- Bosch de Basea M, Porta M, Alguacil J, Puigdomenech E, Gasull M, Garrido JA, Lopez T. et al. Relationships between occupational history and serum concentrations of organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. *Occup Environ Med*. 2011;68(5):332-338.
- Bosetti C, Rosato V, Li D, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Neale RE. et al. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol*. 2014;25(10):2065-2072.
- Boujrad H., Gubkina O., Robert N., Krantic S., Susin S.A. AIF-mediated programmed necrosis: A highly regulated way to die. *Cell Cycle*. 2007;6:2612-2619.
- Bracci PM, Wang F, Hassan MM, Gupta S, Li D, Holly EA. Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes Control*. 2009;20(9):1723-1731. / 179. Olson SH. Selected medical conditions and risk of pancreatic cancer. *Mol Carcinog*. 2012;51(1):75-97.
- Braune, M., Scherf, N., Heine, C., Sygnecka, K., Pillaiyar, T., Parravicini, C., ... & Franke, H. (2021). Involvement of GPR17 in neuronal fibre outgrowth. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11683.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
- Brotherton L, Welton M, Robb SW. Racial disparities of pancreatic cancer in Georgia: a county-wide comparison of incidence and mortality across the state, 2000-2011. *Cancer Med*. 2016;5(1):100-110.
- Brune KA, Lau B, Palmisano E, Canto M, Goggins MG, Hruban RH, Klein AP. Importance of age of onset in pancreatic cancer kindreds. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(2):119-126.
- Brunner M, Wu Z, Krautz C, Pilarsky C, Grützmann R, Weber GF, 2019. Current clinical strategies of pancreatic cancer treatment and open molecular questions. *International journal of molecular sciences*, 20, 18, 4543.
- Bryant KL, Stalneck CA, Zeitouni D, Klomp JE, Peng S, Tikunov AP, Gunda V, Pierobon M, Waters AM, George SD, et al. Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nat Med*. 2019;25(4):628-640.
- Burke L., Butler C.T., Murphy A., Moran B., Gallagher W.M., O'Sullivan J., Kennedy B.N. Evaluation of Cysteinyl Leukotriene Signaling as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer. *Front. Cell Dev. Biol*. 2016;4:103.
- C.V. Dang A time for MYC: metabolism and therapy *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 81 (2016), pp. 79-83.
- C.V. Dang MYC on the path to cancer *Cell*, 149 (2012), pp. 22-35./ N. Meyer, L.Z. Penn Reflecting on 25 years with MYC *Nat Rev Cancer*, 8 (2008), pp. 976-9900.
- Cadassou, O., Raza, M. Z., Machon, C., Gudefin, L., Armanet, C., Chettab, K., ... & Jordheim, L. P. (2021). Enhanced migration of breast and lung cancer cells deficient for cN-II and CD73 via COX-2/PGE2/AKT axis regulation. *Cellular Oncology*, 44(1), 151-165.

- Cade, C. E., Clark, A. C. (2015). Caspases–key players in apoptosis. In *Proteases in apoptosis: Pathways, protocols and translational advances* (pp. 31-51). Springer, Cham.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625–1638.
- Cebrian, M. J. G., Bauden, M., Andersson, R., Holdenrieder, S., & Ansari, D. (2016). Paradoxical role of HMGB1 in pancreatic cancer: tumor suppressor or tumor promoter?. *Anticancer research*, 36(9), 4381-4389.
- Chin V, Nagrial A, Sjoquist K, et al. Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;3(3):CD011044.
- Conroy, T. and M. Ducreux (2019). "Adjuvant treatment of pancreatic cancer." *Current Opinion in Oncology* 31(4): 346-353.
- Crooks, S. W., & Stockley, R. A. (1998). Leukotriene B4. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(2), 173-178.
- D'Anneo A., Carlisi D., Lauricella M., Emanuele S., Di Fiore R., Vento R., Tesoriere G. Parthenolide induces caspase-independent and AIF-mediated cell death in human osteosarcoma and melanoma cells. *J. Cell Physiol*. 2013;228:952–967.
- Daley D, Mani VR, Mohan N, et al. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance. *Nat Med*. 2017;23(5):556–567.
- Daugas E., Susin S.A., Zamzami N., Ferri K.F., Irinopoulou T., Larochette N., Prevost M.C., Leber B., Andrews D., Penninger J., et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*. 2000;14:729–739.
- Davoodi SH, Malek-Shahabi T, Malekshahi-Moghadam A, Shahbazi R, Esmaeili S. Obesity as an important risk factor for certain types of cancer. *Iran J Cancer Prev*. 2013;6(4):186–194.
- Diamant Z, van der Molen T. Treating asthma: Is there a place for leukotriene receptor antagonists? *Respir Med*. 2005;99:655–62.
- Dibble C.C., Cantley L.C. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*. 2015;25:545–555.
- Diersch S, Wirth M, Schneeweis C, Jörs S, Geisler F, Siveke JT, Rad R, Schmid RM, Saur D, Rustgi AK, et al. Kras G12D induces EGFR-MYC cross signaling in murine primary pancreatic ductal epithelial cells. *Oncogene*. 2016;35(29):3880–3886.
- Dotti ve Bonin, (2011). *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Ed.: Stanta G, Springer-Verlag, Italy, s.:87-90. doi: 10.1007/978-3-642-17890-0_18.
- Duah E., Teegala L.R., Kondeti V., Adapala R.K., Keshamouni V.G., Kanaoka Y., Austen K.F., Thodeti C.K., Paruchuri S. Cysteinyl leukotriene 2 receptor promotes endothelial permeability, tumor angiogenesis, and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;116:199–204.
- Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA, Silverman DT. et al. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4) *Ann Oncol*. 2012;23(11):2964–2970.
- Ediriweera M.K., Tennekoon K.H., Samarakoon S.R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin. Cancer Biol*. 2019;59:147–160.
- Ekbom A, McLaughlin JK, Karlsson BM, Nyren O, Gridley G, Adami HO, Fraumeni JF Jr. Pancreatitis and pancreatic cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(8):625–627.
- Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, Zeh HJ, Billiar T, Rubartelli A, Lotze MT. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2836–2848.
- Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001;120(3):682–707.
- Ezzati, M., Henley, S. J., Lopez, A. D., & Thun, M. J. (2005). Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *International journal of cancer*, 116(6), 963-971.

- Faria M.H., Patrocinio R.M., Filho M.O.M., Rabenhorst S.H. Immunoexpression of tumor suppressor genes p53, p21 WAF1/CIP1 and p27 KIP1 in human astrocytic tumors. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2007;65:1114–1122.
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(5): 330.
- Fesinmeyer, M. D., Austin, M. A., Li, C. I., De Roos, A. J., & Bowen, D. J. (2005). Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(7), 1766-1773.
- Franchini M, Favaloro EJ, Targher G, Lippi G. ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012;49(4):137–149.
- Franchini M, Liumbruno GM, Lippi G. The prognostic value of ABO blood group in cancer patients. *Blood Transfus*. 2016;14(5):434–440.
- Fumagalli M, et al. Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(12):10593–10604.
- Funao K., Matsuyama M., Naganuma T., Kawahito Y., Sano H., Nakatani T., Yoshimura R. The cysteinylLT1 receptor in human renal cell carcinoma. *Mol. Med. Rep*. 2008;1:185–189.
- Garrido-Laguna, I., & Hidalgo, M. (2015). Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(6), 319-334.
- Ge L, Pan B, Song F, et al. Comparing the diagnostic accuracy of five common tumour biomarkers and CA19-9 for pancreatic cancer: a protocol for a network meta-analysis of diagnostic test accuracy. *BMJ Open*. 2017;7(12).
- Gemmel C, Eickhoff A, Helmstadter L, Riemann JF. Pancreatic cancer screening: state of the art. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;3(1):89–96.
- Georgakilas A.G., Martin O.A., Bonner W.M. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol. Med*. 2017;23:310–319.
- Ghaffari, S., Jang, E., Naderinabi, F., Sanwal, R., Khosraviani, N., Wang, C., ... & Lee, W. L. (2021). Endothelial HMGB1 is a critical regulator of LDL transcytosis via an SREBP2–SR-BI axis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(1), 200-216.
- Ghaneh P, Hanson R, Titman A, et al. PET-PANC: multicentre prospective diagnostic accuracy and health economic analysis study of the impact of combined modality 18fluorine-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography with computed tomography scanning in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Health Technol Assess*. 2018;22(7):1–114.8.
- Ghiorzo P. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(31):10778–10789.
- Ghosh J., Myers C.E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998;95:13182–13187.
- Gomez-Rubio, P., Zock, J. P., Rava, M., Marquez, M., Sharp, L., Hidalgo, M., ... & PanGenEU Study Investigators. (2017). Reduced risk of pancreatic cancer associated with asthma and nasal allergies. *Gut*, 66(2), 314-322.
- Goodwin GH, Johns EW. Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem*. (1973) 40:215–9.
- Gottlieb T.M., Oren M. p53 and apoptosis. *Semin. Cancer Biol*. 1998;8:359–368.
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Progress in molecular biology and translational science*, 144, 241-275.
- Greenhough, A., Smartt, H. J., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30(3), 377-386.

- Gunning W. T., Kramer P. M., Steele V. E. & Pereira M. A. Chemoprevention by lipoxygenase and leukotriene pathway inhibitors of vinyl carbamate-induced lung tumors in mice. *Cancer Res* 62, 4199–4201 (2002).
- Haanen J, Carbone F, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv264–iv266.
- Haeggström, J. Z., Kull, F., Rudberg, P. C., Tholander, F., & Thunnissen, M. M. (2002). Leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 495-510.
- Hammarström, S. (1983). Leukotrienes. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 355–377.
- Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cyclooxygenase-2 in cancer: a review. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 5683-5699.
- Haugvik SP, Hedenstrom P, Korsath E, Valente R, Hayes A, Siuka D, Maisonneuve P. et al. Diabetes, smoking, alcohol use, and family history of cancer as risk factors for pancreatic neuroendocrine tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuroendocrinology.* 2015;101(2):133–142.
- Hayes TK, Neel NF, Hu C, Gautam P, Chenard M, Long B, Aziz M, Kassner M, Bryant KL, Pierobon M, et al. Long-term ERK inhibition in KRAS-mutant pancreatic cancer is associated with MYC degradation and senescence-like growth suppression. *Cancer Cell.* 2016;29(1):75–89.
- He, W., Goodkind, D. & Kowal, P. *An Aging World: 2015.* US Census Bureau Report Number P95/16-1 (US Government Publishing Office, 2016). (Klein, A. P. (2021).
- He, W., Goodkind, D. & Kowal, P. *An Aging World: 2015.* US Census Bureau Report Number P95/16-1 (US Government Publishing Office, 2016).
- Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J., Sawyer N., Nguyen T., Im D.-S., Stocco R., Bellefeuille J.N., Abramovitz M., Cheng R., et al. Characterization of the Human Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:30531–30536.
- Heise CE, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30531–30536.
- Hoshino, M., Izumi, T., & Shimizu, T. (1998). Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase C α -Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 4878–4882.
- Howlander, N. N. A. K. M., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse, S. F., ... & Cronin, K. A. (2016). *SEER cancer statistics review, 1975–2013.* National Cancer Institute, 1992-2013.
- Hsieh C.J., Kuo P.L., Hsu Y.C., Huang Y.F., Tsai E.M., Hsu Y.L. Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 2014;67:159–170.
- Hufnagl C, Leisch M, Weiss L, et al. Evaluation of circulating cell-free DNA as a molecular monitoring tool in patients with metastatic cancer. *Oncol Lett.* 2020;19(2):1551–1558.
- Ilic, Milena, and Irena Ilic. 2016. 'Epidemiology of pancreatic cancer', *World journal of gastroenterology*, 22: 9694.
- Jacobs EJ, Chanock SJ, Fuchs CS, Lacroix A, McWilliams RR, Steplowski E, Stolzenberg-Solomon RZ. et al. Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan) *Int J Cancer.* 2010;127(6):1421–1428.
- Jiang, L., & Tang, Z. (2018). Expression and regulation of the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways in periodontal tissue remodeling of orthodontic tooth movement. *Molecular medicine reports*, 17(1), 1499-1506.
- Jose MA, Amathi R, Sathyamurthy D, Kumar BN. Chemopreventive effect of Montelukast in n-nitroso n-methyl urea induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Indian J Pharmacol.* 2013;45:286–8.
- Kabba, J. A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., ... & Pang, T. (2018). Microglia: housekeeper of the central nervous system. *Cellular and molecular neurobiology*, 38(1), 53-71.

- Kachi, K., Kato, H., Naiki-Ito, A., Komura, M., Nagano-Matsuo, A., Naitoh, I., ... & Takahashi, S. (2021). Anti-allergic drug suppressed pancreatic carcinogenesis via down-regulation of cellular proliferation. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7444.
- Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2016;388(10039):73–85.
- Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol*. 2004;173(3):1503–1510.
- Kanaoka Y, Maekawa A, Austen KF. Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem*. 2013;288(16):10967–10972.
- Kern, S. E., Hruban, R. H., Hidalgo, M., & Yeo, C. J. (2002). An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer biology & therapy*, 1(6), 607-613.
- Kilimnik, G., Jo, J., Periwal, V., Zielinski, M. C., & Hara, M. (2012). Quantification of islet size and architecture. *Islets*, 4(2), 167-172.
- Kim, R. Y., et al. (2020). "Total Neoadjuvant Therapy for Operable Pancreatic Cancer." *Annals of Surgical Oncology*.
- Kimura H, Yamamoto H, Harada T, et al. CKAP4, a dkk1 receptor, is a biomarker in exosomes derived from pancreatic cancer and a molecular target for therapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(6):1936–1947.
- Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Griffin C. et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res*. 2004;64(7):2634–2638.
- Koller, A., Bruckner, D., Aigner, L., Reitsamer, H., & Trost, A. (2020). Cysteinyl leukotriene receptor 1 modulates autophagic activity in retinal pigment epithelial cells. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Kommalapati, A., Tella, S. H., Goyal, G., Ma, W. W., & Mahipal, A. (2018). Contemporary management of localized resectable pancreatic cancer. *Cancers*, 10(1), 24.
- Krejs GJ. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Digestive Dis*. 2010.
- Kuo P.-L., Huang M.-S., Hung J.-Y., Chou S.-H., Chiang S.-Y., Huang Y.-F., Yang C.-J., Tsai M.-J., Chang W.-A., Hsu Y.-L. Synergistic effect of lung tumor-associated dendritic cell-derived HB-EGF and CXCL5 on cancer progression. *Int. J. Cancer*. 2014;135:96–108.
- Kuo, T. C., Wu, M. H., Yang, S. H., Chen, S. T., Hsu, T. W., Jhuang, J. Y., ... & Huang, M. C. (2021). C1GALT1 high expression is associated with poor survival of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and promotes cell invasiveness through integrin α v. *Oncogene*, 1-13.
- Kuzmickiene I, Everatt R, Virviciute D, Tamosiunas A, Radisauskas R, Reklaitiene R, Milinaviciene E. Smoking and other risk factors for pancreatic cancer: a cohort study in men in Lithuania. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(2):133–139.
- Larsen L.J., Møller L.B. Crosstalk of hedgehog and mTORC1 pathways. *Cells*. 2020;18:2316.
- Layeghi-Ghalehsoukhteh, S., Choudhuri, S. P., Ocal, O., Zolghadri, Y., Pashkov, V., Niederstrasser, H., & Wilkie, T. M. (2020). Concerted cell and in vivo screen for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) chemotherapeutics. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Lee B, Gibbs P. Inflammation, biomarkers and immuno-oncology pathways in pancreatic cancer. *J Pers Med*. 2019;9(2): 20.
- Lee, K. S., Kim, S. R., Park, H. S., Jin, G. Y., & Lee, Y. C. (2004). Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(5), 1093–1099.
- Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, Abbruzzese JL. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*. 2009;301(24):2553–2562.
- Li D, Tang H, Hassan MM, Holly EA, Bracci PM, Silverman DT. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis of three large case-control studies. *Cancer Causes Control*. 2011;22(2):189–197.

- Li JH, CL , Richard SA, Liu YH. Giant solitary primary intracranial lymphoma masquerading as meningioma: a case and review of literature. *Pan African Medical Journal*. 2017;28.
- Li L.Y., Luo X., Wang X. Endonuclease g is an apoptotic dnase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412:95–99.
- Liao, W., Clift, A. K., Patone, M., Coupland, C., González-Izquierdo, A., Pereira, S. P., & Hippisley-Cox, J. (2021). Identifying symptoms associated with diagnosis of pancreatic exocrine and neuroendocrine neoplasms: a nested case-control study of the UK primary care population. *British Journal of General Practice*, 71(712), e836-e845.
- Lichtenstein DR, Carr-Locke DL. Mucin-secreting tumors of the pancreas. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1995;5:237–58.
- Lightsey D. Comment on 'Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies'. *Br J Cancer*. 2012;107(4):754–755.
- Lin Y, Yagyu K, Egawa N, et al. An Overview of Genetic Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk in Molecular Epidemiologic Studies, *J Epidemiol*. 2011; 21(1):2-12.
- Lindsay, J., Degli Esposti, M., & Gilmore, A. P. (2011). Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), 532-539.
- Liumbruno GM, Franchini M. Beyond immunohaematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfus*. 2013;11(4):491–499.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Loehrer PJSr, Feng Y, Cardenes H, et al. Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an eastern cooperative oncology group trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4105–4112.
- Longnecker, D. S. (2014). Anatomy and Histology of the Pancreas (version1.0). *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- Lotze MT, DeMarco RA. Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs (London, England: 2000)* 2003;4:1405–1409.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP. et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med*. 1993;328(20):1433–1437.
- Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, Bosetti C. et al. Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4) *Ann Oncol*. 2012;23(2):374–382.
- Lukic, A., Wahlund, C. J., Gómez, C., Brodin, D., Samuelsson, B., Wheelock, C. E., ... & Rådmark, O. (2019). Exosomes and cells from lung cancer pleural exudates transform LTC4 to LTD4, promoting cell migration and survival via CysLT1. *Cancer letters*, 444, 1-8.
- Luo Q., Beaver J.M., Liu Y., Zhang Z. Dynamics of p53: A Master Decider of Cell Fate. *Genes*. 2017;8:66.
- Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.-S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nat. Cell Biol*. 1999;399:789–793.
- Lynch KR, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*. 1999;399(6738):789–793.
- M.E. Beaulieu, F. Castillo, L. Soucek Structural and biophysical insights into the function of the intrinsically disordered Myc oncoprotein Cells, 9 (2020), p. 1038.
- Ma J, Siegel R, Jemal A. Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970-2009. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(22):1694–1700.
- Macafee AL. ABO blood groups and carcinoma of pancreas. *Ulster Med J*. 1964;33(2):129–131.

- Maekawa, A., Xing, W., Austen, K. F., & Kanaoka, Y. (2010). GPR17 regulates immune pulmonary inflammation induced by house dust mites. *The Journal of immunology*, 185(3), 1846-1854.
- Magnusson C, Liu J, Ehrnström R, Manjer J, Jirstrom K, Andersson T, Sjölander A. Cysteinyl leukotriene receptor expression pattern affects migration of breast cancer cells and survival of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2011;129:9–22.
- Magnusson C, Mezhybovska M, Löhrinc E, Fernebro E, Nilbert M, Sjölander A. Low expression of CysLT1R and high expression of CysLT2R mediate good prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46:826–835.
- Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol*. 2015;44(1):186–198.
- Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol*. 2015;44(1):186–198.
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Rosso, T., Rota, M., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2015). European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women?. *Annals of Oncology*, 26(4), 779-786.
- Marschallinger, J., Schäffner, I., Klein, B., Gelfert, R., Rivera, F. J., Illes, S., ... & Aigner, L. (2015). Structural and functional rejuvenation of the aged brain by an approved anti-asthmatic drug. *Nature communications*, 6(1), 1-16.
- Massoumi R., Sjölander A. The role of leukotriene receptor signaling in inflammation and cancer. *Sci. World J*. 2007;7:1413–1421.
- Massoumi, R., Nielsen, C. K., Azemovic, D., & Sjölander, A. (2003). Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of $\alpha 2\beta 1$ -integrin. *Experimental cell research*, 289(2), 342-351.
- Matsuyama M, Funao K, Hayama T, Tanaka T, Kawahito Y, Sano H, Takemoto Y, Nakatani T, Yoshimura R. Relationship between cysteinyl-leukotriene-1 receptor and human transitional cell carcinoma in bladder. *Urology*. 2009;73:916–921.
- Matsuyama M, Hayama T, Funao K, Kawahito Y, Sano H, Takemoto Y, Nakatani T, Yoshimura R. Overexpression of cysteinyl LT1 receptor in prostate cancer and CysLT1R antagonist inhibits prostate cancer cell growth through apoptosis. *Oncol Rep*. 2007;18:99–104.
- Matsuyama M., Funao K., Kawahito Y., Sano H., Chargui J., Touraine J.L., Nakatani T., Yoshimura R. Expression of cysteinylLT1 receptor in human testicular cancer and growth reduction by its antagonist through apoptosis. *Mol. Med. Rep*. 2009;2:163–167.
- Matsuyama M., Yoshimura R. Cysteinyl-leukotriene1 receptor is a potent target for the prevention and treatment of human urological cancer. *Mol. Med. Rep*. 2010;3:245–251.
- McAuliffe JC, Christein JD. Type 2 diabetes mellitus and pancreatic cancer. *Surg Clin North Am*. 2013;93(3):619–627.
- Mezhybovska, Maryna, Katarina Wikström, John F Öhd, and Anita Sjölander. 2006. 'The inflammatory mediator leukotriene D4 induces β -catenin signaling and its association with antiapoptotic Bcl-2 in intestinal epithelial cells', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 6776-84.
- Michaud DS, Skinner HG, Wu K, Hu F, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA. et al. Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(7):518–524.
- Michaud DS, Vrieling A, Jiao L, Mendelsohn JB, Steplowski E, Lynch SM, Wactawski-Wende J. et al. Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan) *Cancer Causes Control*. 2010;21(8):1213–1225.
- Middleton G, Greenhalf W, Costello E, et al. Immunobiological effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy in advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2016;114(5):510–518.
- Middleton G, Silcocks P, Cox T, et al. Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):829–840.

- Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* 2016;381(1):269–277.
- Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer letters*, 381(1), 269-277.
- Miyata, J., Fukunaga, K., Kawashima, Y., Ohara, O., & Arita, M. (2020). Cysteinyl leukotriene metabolism of human eosinophils in allergic disease. *Allergology International*, 69(1), 28-34.
- Mizuno S, Nakai Y, Isayama H, Kawahata S, Saito T, Takagi K, Watanabe T. et al. Smoking, family history of cancer, and diabetes mellitus are associated with the age of onset of pancreatic cancer in Japanese patients. *Pancreas*. 2014;43(7):1014–1017.
- Mortazavi, M., Moosavi, F., Martini, M., Giovannetti, E., & Firuzi, O. (2022). Prospects of targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in pancreatic cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 103749.
- Mueller CF, Wassmann K, Widder JD, Wassmann S, Chen CH, Keuler B, Kudin A, Kunz WS, Nickenig G. Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. *Circulation*. 2008;117:2912–2918.
- Murphy, A. G., Casey, R., Maguire, A., Tosetto, M., Butler, C. T., Conroy, E., & O’Sullivan, J. (2016). Preclinical validation of the small molecule drug quininib as a novel therapeutic for colorectal cancer. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Nath, S., Roy, L. D., Grover, P., Rao, S., & Mukherjee, P. (2015). Mucin 1 regulates Cox-2 gene in pancreatic cancer. *Pancreas*, 44(6), 909.)
- Nepstad I., Hatfield K.J., Grønningsæter I.S., Reikvam H. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:2907.
- Noorolyai S., Shajari N., Baghbani E., Sadreddini S., Baradaran B. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene*. 2019;25:120–128.
- Nothacker HP, Wang Z, Zhu Y, Reinscheid RK, Lin SH, Civelli O. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol*. 2000;58(6):1601–1608.
- Nozaki M. et al. Cysteinyl leukotriene receptor antagonists inhibit tumor metastasis by inhibiting capillary permeability. *Keio J Med* 59, 10–18 (2010).
- Nozaki, M., Yoshikawa, M., Ishitani, K., Kobayashi, H., Houkin, K., Imai, K., Ito, Y., & Muraki, T. (2010). Cysteinyl leukotriene receptor antagonists inhibit tumor metastasis by inhibiting capillary permeability. *The Keio Journal of Medicine*, 59(1), 10–18.
- Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Löfberg H, Sjölander A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 2003;124:57–70.
- Ojajarvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen TP. et al. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occup Environ Med*. 2000;57(5):316–324.
- Ophir, J., Brenner, S., & Kivity, S. (1985). Leukotrienes. *International Journal of Dermatology*, 24(4), 199-203.
- P.A. Carroll, B.W. Freie, H. Mathsyaraja, R.N. Eisenman The MYC transcript network: balancing metabolism, proliferation and oncogenesis *Front Med*, 12 (2018), pp. 412-425.
- Paluszkievicz P, Smolinska K, Debinska I, Turski WA. Main dietary compounds and pancreatic cancer risk. The quantitative analysis of case-control and cohort studies. *Cancer Epidemiol*. 2012;36(1):60–67.
- Paruchuri S, et al. Leukotriene E4-induced pulmonary inflammation is mediated by the P2Y12 receptor. *J Exp Med*. 2009;206(11):2543–2555.
- Paruchuri, S., Mezhybovska, M., Juhas, M., & Sjölander, A. (2006). Endogenous production of leukotriene D4 mediates autocrine survival and proliferation via CysLT1 receptor signalling in intestinal epithelial cells. *Oncogene*, 25(50), 6660–6665.

- Paruchuri, Sailaja, and Anita Sjölander. 2003. 'Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 45577-85.
- Paruchuri, Sailaja, Bengt Hallberg, Maria Juhas, Christer Larsson, and Anita Sjölander. 2002. 'Leukotriene D4 activates MAPK through a Ras-independent but PKC ϵ -dependent pathway in intestinal epithelial cells', *Journal of cell science*, 115: 1883-93.
- Pelucchi C, Galeone C, Polesel J, Manzari M, Zucchetto A, Talamini R, Franceschi S. et al. Smoking and body mass index and survival in pancreatic cancer patients. *Pancreas*. 2014;43(1):47–52.
- Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnquist HJ, Larsson J. Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. *Br J Surg*. 1993;80(8):1047–1050.
- Permuth-Wey J, Egan KM. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer*. 2009;8(2):109–117.
- Peters Golden & Henderson, 2007 , Peters-Golden, M., & Henderson, W. R. Jr. (2007). Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine*, 357(18), 1841–1854.
- Peters-Golden, M., & Brock, T. G. (2003). 5-lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, 69(2-3), 99-109.
- Peters-Golden, M., & Henderson Jr, W. R. (2007). Leukotrienes. *New England Journal of Medicine*, 357(18), 1841-1854.
- Peters-Golden, M., Gleason, M. M., & Togias, A. (2006). Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(6), 689-703.
- Pezzilli R, Pagano N. Is diabetes mellitus a risk factor for pancreatic cancer? *World J Gastroenterol*. 2013;19(30):4861–4866.
- Phan, G. Q., Yeo, C. J., Hruban, R. H., Lillemoe, K. D., Pitt, H. A., & Cameron, J. L. (1998). Surgical experience with pancreatic and peripancreatic neuroendocrine tumors: review of 125 patients. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2(5), 473-482.
- Piromkraipak, P., Parakaw, T., Phuagkhaopong, S., Srihirun, S., Chongthammakun, S., Chaithirayanon, K., & Vivithanaporn, P. (2018). Cysteinyl leukotriene receptor antagonists induce apoptosis and inhibit proliferation of human glioblastoma cells by downregulating B-cell lymphoma 2 and inducing cell cycle arrest. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(8), 798–806.
- Pliarchopoulou K, Pectasides D, 2009. Pancreatic cancer: current and future treatment strategies. *Cancer treatment reviews*, 35, 5, 431-6.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619-1633.
- Porta M, Malats N, Jarid M, Grimalt JO, Rifa J, Carrato A, Guarner L. et al. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Lancet*. 1999;354(9196):2125–2129.
- Pourshams, A., Sepanlou, S. G., Ikuta, K. S., Bisignano, C., Safiri, S., Roshandel, G., ... & Vahedian-Azimi, A. (2019). The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, 4(12), 934-947.
- R.M. Kortlever, N.M. Sodik, C.H. Wilson, D.L. Burkhart, L. Pellegrinet, L. Brown Swigart, et al. Myc cooperates with RAS by programming inflammation and immune suppression *Cell*, 171 (1301–1315) (2017), Article e14.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research*, 74(11), 2913-2921.
- Rahman F, Cotterchio M, Cleary SP, Gallinger S. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124489.

- Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(3):349–358.
- Rao C.V., Janakiram N.B., Mohammed A. Lipoxygenase and cyclooxygenase pathways and colorectal cancer prevention. *Curr. Colorectal Cancer Rep*. 2012;8:316–324.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. *World journal of oncology*, 10(1), 10.
- Raza MH, Raza MH, Arshad A, et al. Microbiota in cancer development and treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(1):49–63.
- Riquelme E, Maitra A, McAllister F. Immunotherapy for pancreatic cancer: more than just a gut feeling. *Cancer Discovery*. 2018;18(4), 386–388.
- Roberts P.J., Der C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26:3291–3310.
- Saad MA, Abdelsalam RM, Kenawy SA, Attia AS. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist protects against hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Neurochem Res*. 2015;40:139–50.
- Sahin IH, Askan G, Hu ZI, O'Reilly EM. Immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma: an emerging entity? *Ann Oncol*. 2017;28(12):2950–2961.
- Saier, L., & Peyruchaud, O. (2022). Emerging role of cysteinyl LTs in cancer. *British Journal of Pharmacology*, 179(22), 5036-5055.
- Saisho, Y., Butler, A. E., Meier, J. J., Monchamp, T., Allen-Auerbach, M., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007). Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clinical anatomy*, 20(8), 933-942.
- Salim, T., Sand-Dejmek, J., & Sjölander, A. (2014). The inflammatory mediator leukotriene D4 induces subcellular β -catenin translocation and migration of colon cancer cells. *Experimental cell research*, 321(2), 255-266.
- Sarau HM, et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol*. 1999;56(3):657–663.
- Satapathy, S. R., & Sjölander, A. (2020). Cysteinyl leukotriene receptor 1 promotes 5-fluorouracil resistance and resistance-derived stemness in colon cancer cells. *Cancer Letters*, 488, 50–62.
- Savari S., Liu M., Zhang Y., Sime W. & Sjolander A. Cyslt(1)r antagonists inhibit tumor growth in a xenograft model of colon cancer. *PLoS One* 8, e73466 (2013).
- Savari, S., Liu, M., Zhang, Y., Sime, W., & Sjölander, A. (2013). CysLT(1)R antagonists inhibit tumor growth in a xenograft model of colon cancer. *PLoS One*, 8(9), e73466.
- Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U. c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol*. 2002;15(4):462–469.
- Schulz MD, Atay Ç, Heringer J, et al. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature*. 2014;514(7523):508–512.
- Sharma A., Mehan S. Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism. *Neurochem. Int*. 2021;147:105067.
- Shavers VL, Harlan LC, Jackson M, Robinson J. Racial/ethnic patterns of care for pancreatic cancer. *J Palliat Med*. 2009;12(7):623–630.
- Sheng W, Chen C, Dong M, Wang G, Zhou J, Song H, Li Y, Zhang J, Ding S. Calreticulin promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer cells via Integrin/EGFR-ERK/MAPK signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3147–e.
- Sheng W, Shi X, Lin Y, Tang J, Jia C, Cao R, et al. Musashi2 promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer via ZEB1-ERK/MAPK signaling. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39:1–15.

- Shi C, Daniels JA, Hruban RH. Molecular characterization of pancreatic neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 2008;15(4):185–195.
- Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(3):365–374.
- Shiota N, Shimoura K, Okunishi H. Pathophysiological role of mast cells in collagen-induced arthritis: study with a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, Montelukast. *Eur J Pharmacol*. 2006;548:158–166.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin*. 2019;69:7–34.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7–30./, Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C, Zeegers MP, Boffetta P. Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol Carcinog*. 2012;51(1):3–13.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(1), 5-29.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer statistics, 2021. *Ca Cancer J Clin*, 71(1), 7-33.
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2009;28:367–388.
- Singh R., Gupta S., Dastidar S., Ray A. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Molecular and Functional Characteristics. *Pharmacology*. 2010;85:336–349.
- Slater K., Hoo P.S., Buckley A.M., Piulats J.M., Villanueva A., Portela A., Kennedy B.N. Evaluation of oncogenic cysteinyl leukotriene receptor 2 as a therapeutic target for uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37:335–345. doi: 10.1007/s10555-018-9751-z.
- Smoke, T., & Smoking, I. (2004). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, Lyon, 1, 1-1452.
- Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J*. 2012;18(6):485–491.
- Springfeld C, Jäger D, Büchler MW, et al. Chemotherapy for pancreatic cancer. *Presse Med*. 2019;48(3 Pt 2):e159–e174.
- Steliarova-Foucher, E., Ferlay, J., Forman, D., Piñeros, M., & Kohler, B. (2014). Data availability and presentation. IARC Scientific Publications, (164 Pt 1), 116-123.
- Steven, A., Friedrich, M., Jank, P., Heimer, N., Budczies, J., Denkert, C., & Seliger, B. (2020). What turns CREB on? And off? And why does it matter? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(20), 4049–4067.
- Stevens RJ, Roddam AW, Beral V. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2007;96(3):507–509.
- Stolzenberg-Solomon RZ, Cross AJ, Silverman DT, Schairer C, Thompson FE, Kipnis V, Subar AF. et al. Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(12):2664–2675.
- Suknuntha, K., Yubolphan, R., Krueaprasertkul, K., Srihirun, S., Sibmooh, N., & Vivithanaporn, P. (2018). Leukotriene receptor antagonists inhibit mitogenic activity in triple negative breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(3), 833–837.
- Sun K., Luo J., Guo J., Yao X., Jing X., Guo F. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: A narrative review. *Osteoarthr. Cartil*. 2020;28:400–409.
- Sun X, Tang D. HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy*. 2014 Oct 1;10(10):1873–6.
- Sun, Y. P., Zheng, Y. H., Liu, W. J., Zheng, Y. L., & Zhang, Z. G. (2014). Synovium fragment-derived cells exhibit characteristics similar to those of dissociated multipotent cells in synovial fluid of the temporomandibular joint. *PloS one*, 9(7), e101896.

- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441–446.
- Sveinbjörnsson, B., Rasmuson, A., Baryawno, N., Wan, M., Pettersen, I., Ponthan, F., Orrego, A., Haeggström, J. Z., Johnsen, J. I., & Kogner, P. (2008). Expression of enzymes and receptors of the leukotriene pathway in human neuroblastoma promotes tumor survival and provides a target for therapy. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(10), 3525–3536.
- Takaori K, Bassi C, Biankin A, et al. International association of pancreatology (iap)/european pancreatic club (epc) consensus review of guidelines for the treatment of pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2016;16(1):14–27.
- Takasaki J, et al. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(2):316–322.
- Tan, B., Zhang, S., Qiang, Y., Feng, L., Liao, C., Xu, Y., & Chen, S. (2017). Investigation of the inhibition effect of Montelukast Sodium on the copper corrosion in 0.5 mol/L H₂SO₄. *Journal of Molecular Liquids*, 248, 902-910.
- Tanaka T, Kaida T, Yokoi K, Ishii S, Nishizawa N, Kawamata H, Katoh H, Sato T, Nakamura T, Watanabe M, et al. Critical relevance of genomic gains of PRL-3/EGFR/c-myc pathway genes in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019;17(1):1257–1266.
- Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799:131–140.
- Tang D, Lotze MT. Tumor immunity times out: TIM-3 and HMGB1. *Nat Immunol*. (2012) 13:808–10.
- Tesfaye AA, Wang H, Hartley ML, et al. A Pilot trial of molecularly tailored therapy for patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pancreat Cancer*. 2019;5(1):12–21.
- Tong, J., Yu, Q., Xu, W., Yu, W., Wu, C., Wu, Y., & Yan, H. (2019). Montelukast enhances cytotoxic effects of carfilzomib in multiple myeloma by inhibiting mTOR pathway. *Cancer biology & therapy*, 20(3), 381-390.
- Tong, J., Yu, Q., Xu, W., Yu, W., Wu, C., Wu, Y., & Yan, H. (2019). Montelukast enhances cytotoxic effects of carfilzomib in multiple myeloma by inhibiting mTOR pathway. *Cancer biology & therapy*, 20(3), 381-390.
- Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G. et al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1474–1486.
- Tsai, M. J., Chang, W. A., Chuang, C. H., Wu, K. L., Cheng, C. H., Sheu, C. C., ... & Hung, J. Y. (2022). Cysteinyl leukotriene pathway and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 120.
- Tsai, M.-J., Chang, W.-A., Tsai, P.-H., Wu, C.-Y., Ho, Y.-W., Yen, M.-C., Lin, Y.-S., Kuo, P.-L., & Hsu, Y.-L. (2017). Montelukast induces apoptosis-inducing factor-mediated cell death of lung cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1353–1370.
- Tsai, M.-J., Wu, P.-H., Sheu, C.-C., Hsu, Y.-L., Chang, W.-A., Hung, J.-Y., Yang, C.-J., Yang, Y.-H., Kuo, P.-L., & Huang, M.-S. (2016). Cysteinyl leukotriene receptor antagonists decrease cancer risk in asthma patients. *Scientific Reports*, 6, 23979–23991.
- Venerito, M., Kuester, D., Harms, C., Schubert, D., Wex, T., & Malfertheiner, P. (2011). Upregulation of leukotriene receptors in gastric cancer. *Cancers*, 3(3), 3156-3168.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011;378(9791):607–620.
- Vioque, J., & Walker, A. M. (1991). Pancreatic cancer and ABO blood types: a study of cases and controls. *Medicina Clinica*, 96(20), 761-764.
- Wang D., Dubois R.N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10:181–193.

- Wang L, Brune KA, Visvanathan K, Laheru D, Herman J, Wolfgang C, Schulick R. et al. Elevated cancer mortality in the relatives of patients with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(11):2829–2834.
- Wang YT, Gou YW, Jin WW, Xiao M, Fang HY. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer.* 2016;16:212.
- Wermuth, H. R., Badri, T., & Takov, V. (2021). Montelukast. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Wikström, K., Juhas, M., & Sjölander, A. (2003). The anti-apoptotic effect of leukotriene D4 involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage. *Biochemical Journal*, 371(1), 115–124.
- Wikström, K., Öhd, J. F., & Sjölander, A. (2003). Regulation of leukotriene-dependent induction of cyclooxygenase-2 and Bcl-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 302(2), 330–335.
- Williams, J. A. (2010). Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Current opinion in gastroenterology*, 26(5), 478.
- Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, Giovannucci EL. et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(6):424–431.
- Woszczek G, et al. Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol.* 2005;175(8):5152–5159.
- Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013;144(6):1252–1261.
- Yang Y.H., Yang Y.H., Cheng C.L., Ho P.S., Ko Y.C. The role of chemoprevention by selective cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer patients-A population-based study. *BMC Cancer.* 2012;12:582.
- Yokomizo, T., Nakamura, M., & Shimizu, T. (2018). Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. *The Journal of clinical investigation*, 128(7), 2691–2701.
- Yuan, Y. M., Fang, S. H., Qian, X. D., Liu, L. Y., Xu, L. H., Shi, W. Z., ... & Wei, E. Q. (2009). Leukotriene D4 stimulates the migration but not proliferation of endothelial cells mediated by the cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of pharmacological sciences*, 109(2), 285–292.
- Zhai S, Xu Z, Xie J, Zhang J, Wang X, Peng C, Li H, Chen H, Shen B, Deng X, et al. Epigenetic silencing of LncRNA LINC00261 promotes c-myc-mediated aerobic glycolysis by regulating miR-222-3p/HIPK2/ERK axis and sequestering IGF2BP1. *Oncogene.* 2021;40(2):277–291.
- Zhang BL, He N, Huang YB, Song FJ, Chen KX. ABO blood groups and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(11):4643–4650.
- Zhang WP, Hu H, Zhang L, Ding W, Yao HT, Chen KD, Sheng WW, Chen Z, Wei EQ. Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 in human traumatic brain injury and brain tumors. *Neurosci Lett.* 2004;363:247–251.
- Zhao, Z., & Liu, W. (2020). Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Technology in cancer research & treatment*, 19, 1533033820962117.)
- Zhen DB, Coveler A, Zanon S, Reni M, Chiorean EG. Biomarker-driven and molecularly targeted therapies for pancreatic adenocarcinoma. *Semin Oncol.* 2018;45(3):107–115.
- Zhong H, Sanchez C, Spitzner D, Plambeck-Suess S, Gibbs J, Hawkins WG, Denardo D, Gao F, Pufahl RA, Lockhart AC, et al. Synergistic effects of concurrent blockade of PI3K and MEK pathways in pancreatic cancer preclinical models. *PloS One.* 2013;8(10):e77243.
- Zhou, Bin, Jian-Wei Xu, Yu-Gang Cheng, Jing-Yue Gao, San-Yuan Hu, Lei Wang, and Han-Xiang Zhan. 2017. 'Early detection of pancreatic cancer: Where are we now and where are we going?', *International journal of cancer*, 141: 231–41.
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International journal of cancer*, 143(4), 921–930.

- Zhu, L., Ren, S., Daniels, M. J., Qiu, W., Song, L., You, T., ... & Wang, Z. (2021). Exogenous HMGB1 Promotes the Proliferation and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells. *Frontiers in medicine*, 8.
- Zou, J., Lei, T., Guo, P., Yu, J., Xu, Q., Luo, Y., ... & Huang, D. (2019). Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence. *Molecular medicine reports*, 19(2), 759-770.
- Zovko A., Yektaei-Karin E., Salamon D., Nilsson A., Wallvik J., Stenke L. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, inhibits the growth of chronic myeloid leukemia cells through apoptosis. *Oncol. Rep.* 2018;40:902–908.



7. EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı

EK B: Turnitin Raporu

Nazife Mercan YL TEZ

ORJİNALLIK RAPORU

%**19**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**18**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**6**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**8**

2

acikerisim.iku.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**3**

3

acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**2**

4

adudspace.adu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

5

acikerisim.erbakan.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

acikerisim.kku.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

Submitted to Eskisehir Osmangazi University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

9

Submitted to Alanya Alaaddin Keykubat
Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

10	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
11	Submitted to Imperial College of Science, Technology and Medicine Öğrenci Ödevi	<% 1
12	tgd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
13	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
14	acikerisim.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
15	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
16	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
17	ÖZGÜ SALMAN, Burçin, GÜZEL, Ali İrfan, GÜNGÖR, Tayfun, ÖZGÜ, Emre, YILDIZ, Yunus, YALÇIN, Hakan Raşit and ERKAYA, Salim. "Servikal Kanser Olgularında 18F-FDG PET/CT: Suv Max Değerleri İle Postoperatif Histopatolojinin Karşılaştırılması", DNT Ortadoğu Yayıncılık Ltd. Şti., 2015. Yayın	<% 1
18	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

28	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
29	nmapo.edu.ua İnternet Kaynağı	<% 1
30	vs1.doczz.cz İnternet Kaynağı	<% 1
31	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<% 1
32	Submitted to China Medical University, Taiwan Öğrenci Ödevi	<% 1
33	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
34	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<% 1
35	Submitted to University College London Öğrenci Ödevi	<% 1
36	Staubach, Simon. "Differential glycomics of epithelial membrane glycoproteins from urinary exovesicles reveals shifts towards complex-type N-glycosylation in classical galactosemia", Kölner UniversitätsPublikationsServer, 2012. Yayın	<% 1

37	medikalansiklopedi.blogspot.com İnternet Kaynağı	<% 1
38	www.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
39	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
40	Submitted to Istanbul Kultur University Öğrenci Ödevi	<% 1
41	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
42	fedorabg.bg.ac.rs İnternet Kaynağı	<% 1
43	silo.tips İnternet Kaynağı	<% 1
44	www.medikaynak.com İnternet Kaynağı	<% 1
45	www.nature.com İnternet Kaynağı	<% 1
46	Ayşegül BİLDİK, İrem BAYAR. "Inhibition of Apoptotic Pathways in Cancer", Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences, 2018 Yayın	<% 1
47	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

48	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
49	mdpi-res.com İnternet Kaynağı	<% 1
50	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
51	trmedbook.com İnternet Kaynağı	<% 1
52	whqlibdoc.who.int İnternet Kaynağı	<% 1
53	www.hindawi.com İnternet Kaynağı	<% 1
54	Intestinal Tumorigenesis, 2015. Yayın	<% 1
55	Liangdi Jiang, Yongwei Gu, Yue Du, Jiyong Liu. "Exosomes: Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Delivery Vehicles for Cancer", Molecular Pharmaceutics, 2019 Yayın	<% 1
56	Motonao Nakamura, Takao Shimizu. "Leukotriene Receptors", Chemical Reviews, 2011 Yayın	<% 1
57	Valérie Capra. "Cysteinyll-leukotrienes and their receptors in asthma and other	<% 1

inflammatory diseases: Critical update and
emerging trends", Medicinal Research
Reviews, 07/2007

Yayın

58

Zhang - Encyclopedia of Global Health
(globalhealth)

Yayın

<%1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografayı Çıkart

Üzerinde



8. ÖZGEÇMİŞ

