

ÇAĞATAY AYDOĞAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL-2022



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PANKREAS ADENOKARSİNOM HÜCRE HATTINDA
ETKEN FLAVONOİD BİLEŞENLERİN KEMOPREVENTİF
VE GEMSİTABİN'E KARŞI GELİŞEN DİRENÇ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÇAĞATAY AYDOĞAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YILMAZ-AYDOĞAN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

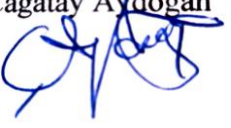
TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Çağatay Aydoğan


İTHAF

Deney sonuçlarının alınabilmesine, analiz edilebilmesine, yorumlanabilmesine ve sunulabilmesine yardımcı olan yazılımları ve eklentileri kodlayan, test eden ve güncelleyen bütün mühendislere ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, bu süreçte varlığını ve desteğini hep hissettiğim hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan'a,

Görüş ve tecrübeleriyle her zaman yol gösterici olan İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp Anabilim öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuz Öztürk'e,

İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım başta olmak üzere bütün Moleküler Tıp Anabilim Dalı akademik kadrosuna,

Zor zamanda paylaştıkları ve yardımları için İstanbul Üniversitesi DETAE Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Mehveş Poda'ya,

Tez çalışmam süresince yardım ve önerilerini esirgemeyen öğrenci arkadaşlarım M.Sc. Begüm Ceviz'e, M.Sc. İncilay Çelik'e, M.Sc. Gonca Candan'a, PhD. Allison Pınar Eronat'a, PhD. Gülçin Özkara'ya,

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35438.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. PANKREAS ANATOMİSİ, EMBRİYOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ	4
2.2. PANKREAS KANSERİ.....	7
2.2.1. Pankreatik Duktal Adenokarsinomu	8
2.2.2. PDAC'nin Tanısı Ve Biyobelirteçleri	8
2.2.3. PDAC'nin Risk Faktörleri.....	9
2.2.4. PDAC Evreleri Ve Alt Türleri	11
2.2.5. PDAC'de Metastaz.....	12
2.2.6. PDAC Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	13
2.2.6.1. PDAC'nin Cerrahi Operasyon İle Tedavisi.....	14
2.2.6.2. PDAC Tedavisinde Kemoterapi	15
2.3. GEMSİTABİN.....	19
2.3.1. Gemsitabin'in Farmakokinetiği Ve Farmakodinamiği.....	19
2.3.2. PDAC'de Gemsitabin'e Karşı Gelişen Direnç.....	22
2.4. POLİFENOLLER	24
2.4.1. Flavonoidler	25

2.4.1.1. PDAC'de Flavonoidler	27
2.5. NDRG1 GENİ.....	29
2.5.1. PDAC'de NDRG1	30
2.6. MRP5 GENİ	31
2.6.1. PDAC'de MRP5	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	33
3.2. KULLANILAN YAZILIMLAR.....	33
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN MALZEMELER	33
3.4. KULLANILAN DİĞER MALZEMELER.....	34
3.5. BESİYERİNİN VE DİĞER SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI.....	34
3.5.1. Panc-1 İçin Besiyerinin Hazırlanması	34
3.5.2. Gempitabin Solüsyonunun Hazırlanması.....	34
3.5.3. PBS Hazırlanması	35
3.5.4. Flavonoidleri İçeren Fenolikler'in Hazırlanması	35
3.6. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE YAPILANLAR.....	35
3.6.1. Hücrelerin Ekilmesi ve Çoğaltılması.....	35
3.6.2. Hücrelerin Kaldırılması ve Pasajlanması.....	35
3.6.3. Hücrelerin Dondurulması	36
3.6.4. Hücrelerin Gempitabin'e Dirençli Hale Getirilmesi.....	36
3.6.5. Hücrelerin Viyabilitelerinin CCK-8 ile Tespit Edilmesi	37
3.6.6. Yara-iyileştirme Testinin Yapılması.....	38
3.6.7. Hücrelerden Kitle RNA İzolasyonunun Yapılması	38
3.7. ELDE EDİLEN RNA'LARIN cDNA'LARA ÇEVİRİLMESİ	39
3.8. GERÇEK-ZAMANLI PZR İLE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ.....	39
3.9. KOMBİNASYON GÖSTERGESİNİN HESAPLANMASI	40
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	40
4. BULGULAR.....	41

4.1. HÜCRELERİN GEMSİTABİN'E KARŞI DİRENÇ KAZANDIRILMAYA BAŞLAMADAN ÖNCE IC50 DEĞERİNİN HESAPLANMASI.....	41
4.2. HÜCRELERİN GEMSİTABİN'E KARŞI DİRENÇ KAZANMASI.....	42
4.3. HÜCRELERDE FENOLİKLER'İN VİYABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI	46
4.4. HÜCRELERDE FENOLİKLER'İN VE GEMSİTABİN'İN KOMBİNASYON GÖSTERGELERİNİN HESAPLANMASI.....	50
4.5. HÜCRELERİN YARA-İYİLEŞTİRME TESTİ İLE MİGRASYONLARININ ÖLÇÜMÜ	53
4.5.1. 1.Yara-İyileştirme Testi	53
4.5.2. 2.Yara-İyileştirme Testi	58
4.6. NDRG1 VE MRP5 GENLERİNİN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ	63
4.6.1. NDRG1	63
4.6.2. MRP5	65
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	74
HAM VERİLER	99
FORMLAR	100
ETİK KURUL KARARI	101
PATENT HAKKI İZNİ	102
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	103
ÖZGEÇMİŞ	104

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: : İleri Seviye PDAC Hastalarında Yapılan Birinci Basamak Kemoterapi Faz III ve IV Klinik Denemeler ve Sonuçları.....	17
Tablo 2-2: Bazı Flavonoidler ve Bulunduğu Bitkiler.....	27
Tablo 3-1: Direnç Kazandırma Konsantrasyonları ve Geçen Zaman.....	37
Tablo 3-2: : Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyonunda Kullanılan Termal Profil.....	39
Tablo 4-1: : Gempitabin Verilen Panc-1 Hücrelerinin 72. Saatteki Viyabiliteleri.....	43
Tablo 4-2: : Gempitabin Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 72. Saatteki Viyabiliteleri.....	44
Tablo 4-3: Fenolikler Verilen Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar.....	46
Tablo 4-4: Fenolikler Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri, Standart Sapmalar ve Farklılık Sonuçları.....	47
Tablo 4-5: Fenolikler Verilen Panc-1 Hücrelerinin 96.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar.....	48
Tablo 4-6: Fenolikler Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 96.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri, Standart Sapmalar ve Farklılık Sonuçları.....	48
Tablo 4-7: Fenolikler Verilen Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar 2.....	49
Tablo 4-8: Fenolikler Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri, Standart Sapmalar ve Farklılık Sonuçları 2.....	50

Tablo 4-9: Fenolikler, Gensitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar.....	51
Tablo 4-10: Fenolikler, Gensitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar.....	52
Tablo 4-11: Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testi Sonucu Farklı Saatlerdeki 0. Saate Göre Kapanma Yüzdeleri 1.....	53
Tablo 4-12: Panc-1/GEM Hücrelerinde Kapanma Yüzdelерinin Panc-1 Hücrelerinininkinden Farkına İlişkin Analiz 1.....	54
Tablo 4-13: Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testi Sonucu Farklı Saatlerdeki 0. Saate Göre Kapanma Yüzdeleri 2.....	58
Tablo 4-14: Panc-1/GEM Hücrelerinde Kapanma Yüzdelерinin Panc-1 Hücrelerinininkinden Farkına İlişkin Analiz 2	59
Tablo 4-15: NDRG1'in $\Delta\Delta Ct$ değерleri ve Farklılık Analizi Sonuçları.....	63
Tablo 4-16: MRP5'in $\Delta\Delta Ct$ değерleri ve Farklılık Analizi Sonuçları.....	65
Tablo 4-17: Panc-1/GEM Hücrelerinde MRP5 ve NDRG1'in Kat Değişimleri.....	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Pankreasın Yapısı ve Kısımları.....	4
Şekil 2-2: Pankreas ve Çevresi.....	5
Şekil 2-3: Pankreasın Ekzokrin Fonksiyonlarından Sorumlu Hücreler.....	6
Şekil 2-4: Cerrahi Operasyon Mümkün Olmayan PDAC Tedavisinde Kullanılan Yaklaşımlar.....	18
Şekil 2-5: Deoksisitidinin ve Gemsitabin'in Yapıları	19
Şekil 2-6: Gemsitabin'in İntrasellüler Metabolizması.....	21
Şekil 2-7: Flavonoidlerin Genel Yapısı, Alt Grupları ve Örnek Moleküller.....	25
Şekil 4-1: Gemsitabin Verilen Panc-1 Hücrelerinin Viyabilite Grafiği	41
Şekil 4-2: GEM Verilen Direnç Kazandırılmaya Çalışılan Hücrelerin 40x Toplam Büyütmedeki Fotoğrafları.....	42
Şekil 4-3: Gemsitabin Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin Viyabilite Grafiği.....	43
Şekil 4-4: Gemsitabin (500 μ M) Verilen Hücrelerin ve Kontrol Hücrelerinin 24 s Aralıklı Olarak 40x Toplam Büyütmede Çekilen Fotoğrafları	45
Şekil 4-5: Yüksek Doz Gemsitabin (500 μ M) Verilen Hücrelerin Doz Verildiği Andaki ve 96 Saat Sonraki 40x Toplam Büyütmede Çekilen Fotoğrafları.....	45
Şekil 4-6: Fenolikler Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Viyabiliteleri.....	46
Şekil 4-7: Fenolikler Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin 96.Saatteki Viyabiliteleri.....	47

Şekil 4-8: Fenolikler Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Viyabiliteleri 2.....	49
Şekil 4-9: Fenolikler, Gemsitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri.....	50
Şekil 4-10: Fenolikler, Gemsitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri.....	51
Şekil 4-11: Panc-1 Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 1.....	54
Şekil 4-12: Panc-1/GEM Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 1.....	55
Şekil 4-13: Panc-1 Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları.....	56
Şekil 4-14: Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 1.....	57
Şekil 4-15: Panc-1 Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 2.....	59
Şekil 4-16: Panc-1/GEM Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 2.....	60
Şekil 4-17: Panc-1 Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 2.....	61
Şekil 4-18: Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 2.....	62
Şekil 4-19: NDRG1'in Kat Değişimleri.....	64
Şekil 4-20: MRP5'in Kat Değişimleri.....	66

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-FU	5-Florourasil
α	Alfa
β	Beta
b	Baz
C°	Santigrat derece
dk	Dakika
Δ Ct	Delta Ct
$\Delta\Delta$ Ct	Delta delta Ct
δ	Delta
g	Gram
μ	Mikro
κ	Kappa
kb	kilo Baz
kDa	kilo Dalton
l	Litre
m	Mili
M	Molar
s	Saat
sn	Saniye
ABCC5	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5
ACTB	Actin Beta
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat

CA19-9	Kanser Antijeni 19-9
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CDA	Sitidin Deaminaz
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	Komplemanter DNA
CMPK1	Sitidin/uridin Monofosfat Kinaz 1
Ct	Cycle Threshold (Eşik Döngüsü)
Ct-DNA	Circulating Tumor DNA (Dolaşımdaki tümör DNA'sı)
CTC	Circulating Tumor Cells (Dolaşımdaki tümör hücreleri)
DCK	Deoksisitidin Kinaz
dCTP	Deoksisitidin Trifosfat
DCTD	Deoksisitidin Fosfat Deaminaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
dNDP	Deoksinükleosit Difosfat
dNTP	Deoksinükleosit Trifosfat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal sığır serumu)
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

FOLFIRINOX	5-Florourasil, Lökovorin, İrinotekan ve Oksaliplatin içeren Kemoterapötik
GEM	Gemsitabin
GEM1P	Gemsitabin Monofosfat
GEM2P	Gemsitabin Difosfat
GEM3P	Gemsitabin Trifosfat
GTX	Gemsitabin, Dosetaksel ve Kapesitabin içeren Kemoterapötik
hCNT	Human Concentrative Nucleoside Transporter
hENT	Human Equilibrative Nucleoside Transporter
HER2	Human Epidermal Growth Factor 2
HER3	Human Epidermal Growth Factor 3
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
IC50	Yarı Maksimal İnhibisyon Konsantrasyonu
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
MDR	Multidrug Resistance (Çoklu ilaç direnci)
mFOLFIRINOX	Modifiye edilmiş FOLFIRINOX
mRNA	Messenger RNA
MRP5	Multidrug Resistance Protein 5
MSD	Membrane-spanning Domain
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NBD	Nükleotide-binding Domain
NDPK	Nükleosit-Difosfat Kinaz
NDP	Nükleosit Difosfat

NTP	Nükleosit Trifosfat
NDRG1	N-myc Downstream Regulated Gene 1
NMPK	Nükleosit Monofosfat Kinaz
NT5C	5', 3'-nükleotidaz, sitosolik
Ort	Ortalama
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (Pankreatik duktal adenokarsinom)
PS	Kanser Hastasının Performans Durumu
PTEN	Phosphatase and tensin Homolog Deleted on Chromosome 10
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCF	Relatif Merkezkaç Kuvveti
RNA	Ribonükleik Asit
RNAaz	Ribonükleaz
RRM	Ribonükleosit-Difosfat Redüktaz
S-1	5-Florourasil ve 5-kloro-2,4-dihidroksipiridine ile Oterasil Potasyum içeren Kemoterapötik
SMAD4	SMAD Family Member 4
SS	Standart Sapma
TK2	Timidin Kinaz 2
TP53	Tümör Protein P53

ÖZET

Aydoğan, Ç. (2022). Pankreas Adenokarsinom Hücre Hattında Etken Flavonoid Bileşenlerin Kemopreventif ve Gemsitabin'e Karşı Gelişen Direnç Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Pankreas kanserlerinin %85-95'ini oluşturan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hastalarının 5-yıllık sağkalım oranı %9'dur. Günümüzde genel sağlık durumu iyi olan hastalarda lokal yayılım gösteren veya metastatik PDAC tümörlerinin tedavisinde birden fazla kemoterapötici içeren ajanlar kullanılmakla beraber genel performansı düşük olan hastalarda Gemsitabin monoterapisi altın standart olmaya devam etmektedir. Gemsitabin'e artımlı maruz bırakma ile direnç kazandırılan Panc-1/GEM ve Panc-1 hücre hatlarında, bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan flavonoidleri içeren fenolik karışımın tek başına ve Gemsitabin ile birlikte viyabilite üzerindeki etkileri CCK-8 testi ile, migrasyon üzerindeki etkileri yara-iyileştirme testi ile ölçüldü. Ayrıca, bir anti-metastatik gen olan NDRG1'in ve bir ilaç atım pompası geni olan MRP5'in ekspresyonları mRNA düzeyinde gerçek-zamanlı PZR ile ölçüldü. Yaklaşık 1 yıl süren direnç kazandırma işlemi teyit edildikten sonra, fenolik karışımın dirençli ve dirençsiz Panc-1 hücrelerinin viyabiliteleri üzerindeki etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olmadığı, dirençli hücrelerde Gemsitabin ile az da olsa sinerjistik bir etkisi olduğu bulundu. Fenolik karışım hem dirençli hem de dirençsiz hücrelerin migrasyonunu, Gemsitabin anlamlı bir etkide bulunmazken, düşük dozlarda yavaşlattığı ve yüksek dozlarda durdurduğu ölçüldü. Dirençli hücrelerde NDRG1 ve MRP5 genlerinin ekspresyonları anlamlı ölçüde düşüktür. Direnç kazandırılmamış hücrelerde hem Gemsitabin hem de fenolik karışım NDRG1 ve MRP5 genlerinin ekspresyonlarını değiştirmezken, fenolik karışım dirençli hücrelerde NDRG1 ve MRP5 genlerinin ekspresyonlarını, 2 kattan daha fazla arttırırken, Gemsitabin sadece NDRG1 genininkini arttırmıştır. Fenolik karışımın Gemsitabin'e karşı direnç kazanmış pankreas kanser hücrelerinde kazanmamışlarla aynı sitotoksiteyi göstermesi, migrasyonu durdurabilmesi, NDRG1 geninin ekspresyonunu dirençli hücrelerde arttırması bu karışımın özellikle lokal yayılım gösteren Gemsitabin'e karşı dirençli PDAC tümörlerinde migrasyonu engelleme ve proliferasyonu durdurma konularında etkili olabilme potansiyelini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Panc-1, Gemsitabin, Flavonoidler, NDRG1, MRP5

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35438.

ABSTRACT

Aydoğan, Ç. (2022). Study on Chemopreventive and on Gemcitabine-based Chemoresistance Effects of Flavonoid Containing Mixture in Pancreatic Adenocarcinoma Cell Line. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

The 5-year survival rate of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which constitutes 85-95% of pancreatic cancers, is 9%. Though agents containing more than one chemotherapeutics are used in the therapy of locally advanced or metastatic tumors of patients who have high performance score, Gemcitabine monotherapy is still golden standart in the therapy of patients who are not eligible for surgical operation and combination chemotherapy. In Panc-1 cells and Gemcitabine-resistant Panc-1 cells (Panc-1/GEM) which were established by gradually increasing concentrations of GEM, the cytotoxicity and anti-migrative effects of a phenolic mixture containing flavonoids and combination of GEM and the mixture were calculated via CCK-8 assay and wound-healing assay, respectively. Additionally, the expressions of NDRG1 and MRP5 genes were evaluated by RT-PCR. It is found that the cytotoxic effects of the mixture in both cell lines are not significantly different. Furthermore, Gemcitabine and the mixture have moderate synergistics effects in Panc-1/GEM cells. The mixture has anti-migration effects in both cell lines. Importantly, in Panc-1/GEM cells, the levels of mRNAs of NDRG1 and MRP5 genes are lower than the levels of Panc-1 cells. In Panc-1 cells, GEM and the mixture does not change the levels of two genes. Both increase the levels of NDRG1, but only the mixture elevates the levels of MRP5 in resistant-cells. In conclusion, the mixture could prevent migration of pancreas cancer cells and increases NDRG1 levels in only resistant-cells and further researches are needed to elucidate potential anti-cancer, anti-proliferative and anti-migrative effects on locally advanced and GEM-resistant PDAC tumors.

Key Words: Panc-1, Gemcitabine, Flavonoids, NDRG1, MRP5

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 35438

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreas endokrin ve ekzokrin fonksiyonları olan bir sindirim salgı bezidir ve bu fonksiyonlarda meydana gelen bozulmalar, aralarında pankreas kanserinin de bulunduğu çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Standring ve ark. 2008; Lammert ve Zeeb, 2014). Pankreas kanseri agresif ve kötü prognozlu bir hastalık olup 5-yıllık sağkalım oranı %9'dur (Siegel ve ark. 2019; Chen ve ark. 2016). Pankreas kanserinin önümüzdeki yıllarda, özellikle gelişmiş ülkelerde kanser ilişkili ölümlerde birinci sıraya yükselebileceği öngörülmektedir (Rahib ve ark. 2014; Rahib ve ark. 2021; Ferlay ve ark. 2017). Bunun sebepleri, pankreas kanserinin gelişiminin uzun yıllar sürmesine rağmen asemptomatik olması, günümüzdeki yöntemlerle ileri evrelere kadar tespit edilememesi ve tedavi yöntemlerinin kısıtlı olmasıdır (Jentzsch ve ark. 2020; Yachida ve ark. 2010).

Pankreas kanserlerinin %85-95 gibi büyük bir oranını pankreasın ekzokrin bezlerinde ortaya çıkan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC)'ları oluşturmaktadır (Rawla ve ark. 2019; Jentzsch ve ark. 2020). PDAC kendine özgü semptomlar göstermediğinden ve PDAC için spesifik tanı testleri bulunmadığından PDAC hastaları erken aşamada tanı alamamaktadır (Groot ve ark. 2018; Kleeff ve ark. 2016). PDAC için onaylanmış, klinikte kullanılan tek biyobelirteç olan CA19-9'un ise büyük popülasyonlarda beklenen etkiyi yapamamış olması, PDAC'nin erken teşhisinin hala zor olduğunu göstermektedir (Goonetilleke ve Siriwardena, 2007; Xing ve ark. 2018; Zhang ve ark. 2015; Loosen ve ark. 2017). PDAC'ya sebep olan sigara kullanımı, yüksek alkol tüketimi, pankreatit, obezite, diyabet gibi çevresel risk faktörlerinden uzak durmak kanser gelişim ihtimalini azaltmaktadır (Barcellini ve ark. 2020; Becker, 2014). PDAC için çeşitli sınıflandırmalar olmakla beraber, tümörün çıkarılabilir, sınırda çıkarılabilir, lokal yayılım göstermiş veya metastatik olmasına göre 4 kategoriye ayrılabilir (Bockhorn ve ark. 2014; Abrams ve ark. 2009; Isaji ve ark. 2017).

PDAC'nin küratif potansiyeli olan tek tedavi yöntemi tümörün cerrahi operasyonla çıkarılmasıdır. Ancak hastaların %80'i cerrahi operasyonun mümkün olmadığı lokal yayılım veya metastatik evrede tanı almaktır (Kleeff ve ark. 2016; Singhi ve Wood, 2021; Mizrahi ve ark. 2020; Anderson ve ark. 2021). Günümüzde ameliyat olamayan PDAC hastalarının ana tedavi seçeneği kemoterapidir (Okasuka ve Furuse, 2020; Elsayed ve Abdelrahim, 2021). Cerrahi operasyon mümkün olmayan PDAC

hastalarında, hastanın genel sağlık ve performans durumuna göre, sırasıyla mFOLFIRINOX, Gempitabin/nab-Paklitaksel veya Gempitabin monoterapisi değeneklerinden birisi uygulanmaktadır (Taieb ve Abdallah, 2020; Okasuka ve Furuse, 2020). Monoterapi olarak, PDAC hastalarında Gempitabin (GEM) 25 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır ve hala genel durumları çoklu kemoterapötik tedavisi için uygun olmayan ileri evre PDAC hastalarında daha iyi bir monoterapi seçeneği olmadığından altın standart olarak kullanılmaya devam etmektedir (Okasuka ve Furuse, 2020; Springfield ve ark. 2019).

Bir deoksisitidin analogu olan GEM, DNA polimerazı inhibe etmek ve DNA replikasyonunu geri dönüştürülemez şekilde durdurarak kanser hücrelerini apoptoza götürmek gibi çeşitli mekanizmalarla tümör büyümesini ve proliferasyonunu durdurmaktadır (Mini ve ark. 2006; Plunkett ve ark. 1995; Huang ve ark. 1991). Yine de GEM monoterapisi, PDAC hastalarında toplam sağkalımı ancak aylar seviyesinde arttırmaktadır. Bunun en önemli sebebi ise ileri evredeki PDAC tümörlerinin GEM'e karşı kısa sürede direnç kazanmasıdır (Okasuka ve Furuse, 2020; Zeng ve ark. 2019). Bu direncin gelişmesinde GEM'in hücre içine alımının azalması, hücre dışına atımının artması, etki mekanizmasındaki değişiklikler ve DNA tamir mekanizmasındaki değişimler gibi farklı faktörlerin etkileri vardır (Wang ve ark. 2019; Zeng ve ark. 2019; Koltai ve ark. 2022).

Yıllarca yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlardan biri GEM'in tek başına ileri evre PDAC'yi tedavi etmesinin çok mümkün olmadığı ve direnç gelişimini engelleyecek ve/veya direnç kazanmış hücreleri GEM'e karşı tekrar hassas hale getirebilecek moleküllerle beraber kullanımını içeren yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Koltai ve ark. 2022). Bu yaklaşımlardan biri GEM ile birlikte farklı sitotoksik, metastaz engelleyici, direnci geri çevirebilen moleküllerin verilmesidir. Bu moleköl grupları arasında polifenoller ve bunların büyük bir kısmını oluşturan flavonoidler yer almaktadır (Thyagarajan ve ark. 2020; Gasic ve ark. 2020).

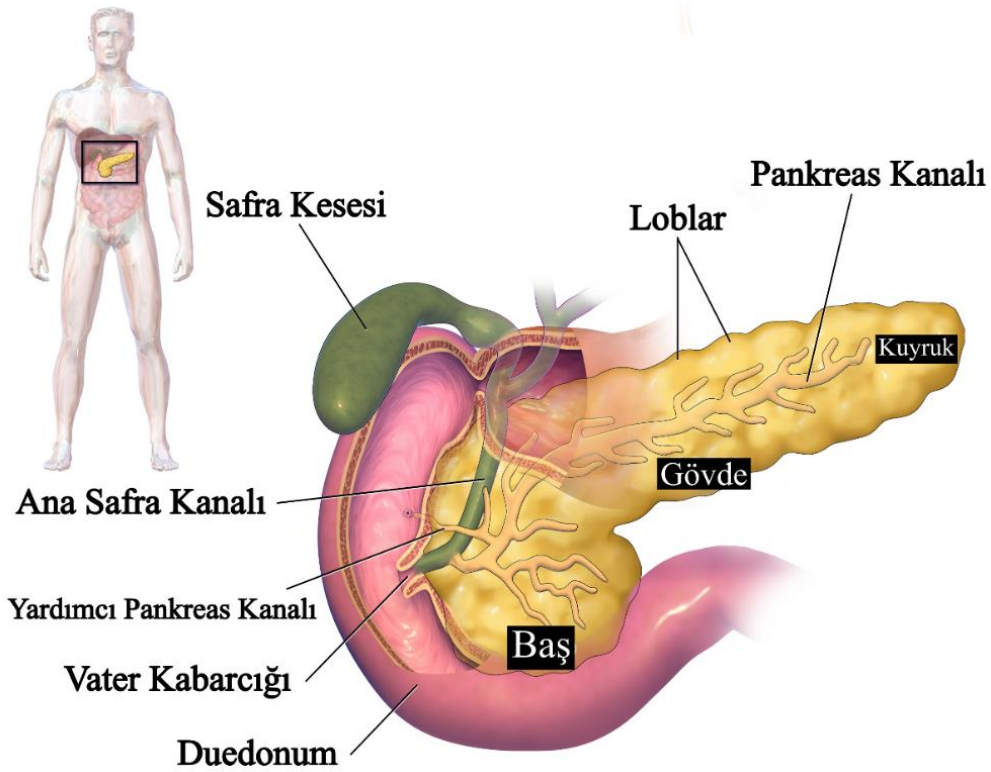
Bu çalışmada öncelikli olarak bir pankreas kanser hücre hattı olan Panc-1 hücrelerine GEM'e karşı direnç kazandırılması amaçlanmıştır. Kazandırılan bu direnç teyit edildikten sonra, çeşitli fenolik bileşenleri içeren bir karışımın hem dirençli hem de dirençsiz hücrelerdeki viyabiliteleri hesaplanmış ve GEM ile aynı anda verilmelerinin bir sinerjistik etki oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir. Daha sonra, yara-iyileştirme

testiyle bu karışımın, GEM'in ve ikisinin kombine olarak birlikte verilmesinin dirençli ve dirençsiz hücrelerin migrasyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. Son olarak, pankreas kanserinde bir anti-metastatik olan NDRG1 geninin ve siklik nükleotidlerin dışarı atılmasında sorumlu olan ve GEM'e karşı gelişen dirençte etkili olduğu düşünülen MRP5 isimli bir ilaç dışarı atım pompasının mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri dirençli ve dirençsiz hücrelerde, GEM, fenolik karışım ve ikisinin kombine uygulaması sonrası uzun süreli (72 s) etkilerini görmek için gerçek-zamanlı PZR ile analiz edilmiştir (Park ve ark. 2020; Nath ve ark. 2013; Wielinga ve ark. 2003). Çalışmamızda özetle, dirençli ve dirençsiz pankreatik adenokarsinom hücre hattında, farklı flavonoidleri içeren bir karışımın kemopreventif, migrasyon engelleyici ve belirlenmiş 2 genin (NDRG1 ve MRP5) ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri hem bireysel hem de GEM'sitabin'le kombine uygulanarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PANKREAS ANATOMİSİ, EMBRİYOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

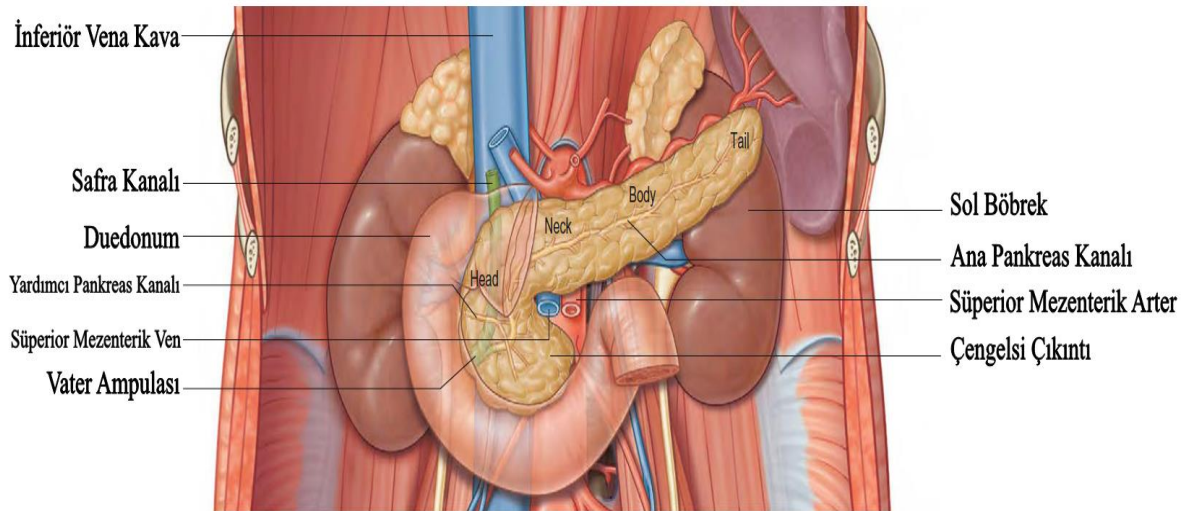
Pankreas, kelime kökeni olarak Yunanca kelimeler olan pan (tüm, hepsi) ve kreas (et, karkas) sözcüklerinden türetilmiştir. Endokrin ve ekzokrin fonksiyonları olan pankreas pembe renkli olup sindirim salgı bezlerinin en büyüğüdür. Genellikle yetişkin insanlarda 12 ila 15 cm uzunluğunda, J harfi şeklinde, yumuşak, loblara sahip ve karın içi zarının arka kısmında bulunan bir organdır (Şekil 2-1) (Agur ve ark. 2013; Gray H. Lewis WH, 2000; Standring ve ark. 2008).



Şekil 2-1: Pankreasın Yapısı ve Kısımları (Blausen 2014'ten uyarlandı)

Gestasyonun 5. haftasında pankreabilyer ilksel hücreler (anlage) oluşmaya başlar. 7. haftada ayırık durumda olan kuyruk, gövde ve boyun kısmını oluşturacak dorsal ve baş kısmını oluşturacak ventral pankreatik dokular birleşir. Ana pankreas kanalı iki kısımdaki kanal parçalarının birleşmesiyle oluşur. Asinar dokunun tamamen gelişimi ise doğumdan sonra gerçekleşir (Longnecker, Daniel S. 2021).

Pankreas anatomik ilişkilere göre 4 ana bölgeye ayrılır: Baş (head), boyun (neck), gövde (body) ve kuyruk (tail). Bu 4 bölgenin birbiriyle fonksiyonel ve anatomik olarak ufak farklılıkları vardır. Baş bölgesinden kuyruk bölgesine doğru incelen bir yapıya sahip olan pankreas yatay eksenle çok az açılı bir şekilde midenin arkasında, karın duvarının arka tarafında omurganın L1 ve L2 omurları hizasında bulunur. Pankreasın baş kısmı duodenumun 1., 2. ve 3. boğumlarının iç tarafında bulunurken hafif bir eğimle yukarıya doğru uzanan kuyruk kısmı dalağın hilum kısmına kadar ulaşır (Agur ve ark. 2013; Gray H. Lewis WH, 2000; Standring ve ark. 2008). Boyun kısmı yaklaşık 2 cm genişliğindedir ve gövdeyi baş kısmına bağlar. Boyun kısmının hemen arka kısmında alt tarafta süperior mezenterik ven ve üst tarafta portal ven bulunur (Standring ve ark. 2008). Boyun kısmının bu 2 venle yakın teması ve vena kava inferior ile abdominal aortun bu bölgede bulunması pankreas kanseri hastalarında pankreatektominin yapılıp yapılamayacağına ve eğer yapılırsa cerrahi sınırın ne olacağına dair verilen kararda oldukça önemlidir (Şekil 2-2) (Standring ve ark. 2008; Longnecker, Daniel S. 2021).



Şekil 2-2: Pankreas ve Çevresi (Standring ve ark. 2008'den uyarlandı).

Pankreasın loblu yapısının içinde kanallardan oluşmuş bir ağ yapısı bulunur. Bu kanallar tek bir ana kanal aracılığıyla asinar hücreleri tarafından üretilen sindirim enzimlerini ve kanal hücreleri tarafından üretilen bikarbonatça zengin sıvıları duodenuma aktarırlar. Kanal ağacının son kısımlarında çiçek şekilli bir yapı oluşturarak kanalın sonunu oluşturan asinar hücreleri pankreas hücrelerinin %95'ini oluşturur (Şekil 2-3) (Lammert ve Zeeb, 2014). Asinar hücreler, kanal hücreleri ve sentroasinar hücreleriyle beraber sindirim sıvılarının üretilmesinden ve salgılanmasından yani pankreasın ekzokrin fonksiyonlarından sorumludur.

Bir araya gelerek Langerhans adacıklarını oluşturan endokrin hücreler ise pankreasın yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır (Lammert ve Zeeb, 2014; Reichart ve Rustgi, 2011). Yetişkin insan Langerhans adacıkları 4 tip hücreden oluşmaktadır: glukagon salgılayan α -hücreleri, insülin salgılayan β -hücreleri, somatostatin salgılayan δ -hücreleri ve pankreatik polipeptitleri üreten pankreatik polipeptit hücreleri (Cabrera O. ve ark. 2006). Pankreasın endokrin ve ekzokrin kısımlarının düzgün çalışması besinlerin sindirimi ve emilimi ve homeostazın sağlanması için hayati öneme sahiptir (Lammert ve Zeeb, 2014; Thompson ve ark. 2008). Pankreas, ekzokrin hücrelerin salgıladığı enzimler ve sıvılar aracılığıyla lipidlerin, karbonhidratların ve proteinlerin ince bağırsakta yıkımına yardımcı olur. Yıkılan besinlerin emilimi gerçekleştiğinde de adacıklarda bulunan endokrin hücrelerin salgıladığı hormonlar aracılığıyla vücuttaki hücrelerin bu besinleri nasıl kullanacağını ve depo edileceğini etkiler ve düzenler. Pankreasın bu fonksiyonlarındaki bozulmalar çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (Lammert ve Zeeb, 2014).



Şekil 2-3: Pankreasın Ekzokrin Fonksiyonlarından Sorumlu Hücreler (Lammert ve Zeeb, 2014'ten uyarlandı)

Pankreasın ekzokrin fonksiyonlarını yerine getirememesi durumunda ortaya çıkan “ekzokrin pankreatik yetersizlik” sonucu vücudun besinleri sindiriminde ve emiliminde sorunlar oluşur (Lammert ve Zeeb, 2014; Karpinska ve Czauderna, 2022). Bu yetersizlik, kronik pankreatit, akut pankreatit, kistik fibrozis, Shwachman-Diamond sendromu ve çeşitli mide, bağırsak ve pankreas ameliyatları sonucunda ortaya çıkabilmektedir (Karpinska ve Czauderna, 2022; Schepis ve ark. 2021). Endokrin fonksiyonların bozulması sonucu ortaya çıkan hastalıkların en bilineni ve dünyada en çok ölüme sebep olma sıralamasında 3. sırada bulunan diyabettir. Pankreas hastalıkları arasında en ciddi sağlık sorunlarına yol açan hastalıklar ise neoplazmalardır. Pankreastaki endokrin neoplazmaları yavaş büyüme hızlarına ve düşük agresyona sahip pankreatik nöroendokrin tümörlerine neden olurken, ekzokrin neoplazmaları ise pankreas kanserine neden olmaktadır (Lammert ve Zeeb, 2014; Karpinska ve Czauderna, 2022).

2.2. PANKREAS KANSERİ

Pankreas kanseri, agresif, kötü prognozlu, büyük organ tümörleri arasında, tüm vakalar göz önüne alındığında %9'luk 5-yıllık sağkalım oranı ile, en düşük sağkalıma sahip, dünya genelinde kanser ölümlerinde ise 4.sırada olan bir kanser türüdür (Siegel ve ark. 2019; Chen ve ark. 2016; Foucher ve ark. 2018; Oppong ve Bekkali, 2017; Hur ve ark. 2016; SEER, 2019). Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı daha fazla olan pankreas kanserinin medyan tanı yaşı 71'dir (Jentzsch ve ark. 2020; Rahib ve ark. 2014). Bu da yaşlanan nüfusa sahip ülkelerde önümüzdeki yıllarda daha fazla pankreas kanseri vakası olacağını göstermektedir (Wu ve ark. 2019; Siegel ve ark. 2019). Yapılan tahminler, pankreas kanserinin 2030'lu yıllarda Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser ilişkili ölümlerde 1.sıraya yükselebileceğini öngörmektedir (Rahib ve ark. 2014; Rahib ve ark. 2021; Ferlay ve ark. 2017). Avrupa'da yapılan bir çalışmaya göre pankreas kanserine yakalanmak beklenen yaşam süresini 14,7 yıl azaltmaktadır (Carrato A. ve ark. 2015). Önümüzdeki yıllarda hem yeni vaka sayısının hem de ölüm oranının artması öngörülen pankreas kanseri iki ana kategoriye ayrılır: Vakaların %85-95'ini oluşturan ve ekzokrin bezlerde ortaya çıkan pankreatik duktal adenokarsinomu ve pankreatik nöroendokrin tümörler (Rawla ve ark. 2019; Jentzsch ve ark. 2020; Ducreux ve ark. 2015).

2.2.1. Pankreatik Duktal Adenokarsinomu

Adenokarsinoma, mukus-üreten bezlerdeki hücrelerde ortaya çıkan kanserlerdir. Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), pankreastaki ekzokrin hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve tümör oluşturması sonucu ortaya çıkar (Thakur ve ark. 2021). PDAC, asinardan duktal metaplazi (acinar to ductal metaplasia) adı verilen öncül lezyonlardan veya normal duktal epitelyumun önce düşük-kademe, sonrasında yüksek-kademe pankreatik intraepitelyal neoplazilere (PanIN) dönüşmesiyle oluşan öncül lezyonlarda, genetik değişikliklerin birikimiyle malign tümör gelişimidir (Matthaei ve ark. 2011; Kim ve Hong, 2018; Ren ve ark. 2019; Connor ve Gallinger, 2022). PDAC'ın yaklaşık olarak %60'ı pankreasın baş kısmında ortaya çıkarken, gövde ve kuyruk kısmında daha kötü prognozlu olsa da daha az oranda görülmektedir (Corbo ve ark. 2012; Ghaneh ve Costello, 2008). PDAC gelişmiş hastaların çoğunda, hastalık ileri aşamalara kadar asemptomatik olarak kalmaktadır. Yapılan genetik analizler tümörün ilk oluşmasından metastatik aşamaya kadar geçen sürenin 19 yıl kadar uzun olabileceğini göstermektedir (Jentzsch ve ark. 2020; Yachida ve ark. 2010). Tüm bunlar PDAC'ye erken aşamada tanı konulmasının ve risk faktörlerinin bilinmesinin ve bunlara maruz kalmamanın önemini göstermektedir.

2.2.2. PDAC'nin Tanısı ve Biyobelirteçleri

PDAC vakalarının yaklaşık %80'i herhangi bir cerrahi operasyonun mümkün olmadığı bir dönemde tanı aldığından PDAC'yi daha erken tespit edebilmek oldukça önemlidir (Löhr, 2006; Kleeff ve ark. 2016; Singhi ve Wood, 2021). PDAC'ın kendine özgü semptomlar göstermemesi ve yeterli özgüllüğe ve duyarlılığa sahip bir biyobelirteç keşfedilememesi nedeniyle PDAC-spesifik tanı testlerinin yokluğu erken aşamada PDAC teşhisine izin vermemektedir (Groot ve ark. 2018; Kleeff ve ark. 2016). Günümüzde FDA tarafından PDAC'nin tanısı ve izlenmesinde kullanılmak üzere onaylanan tek biyobelirteç CA19-9'dur. Onaylanmasına rağmen bazı popülasyonlarda görülen düşük üretim, düşük pozitif prediktif değer, pankreasla bağlantılı diğer bazı hastalıkları PDAC'den ayıramaması ve sahip olduğu %82 medyan özgüllük ve %79 medyan duyarlılık ile, CA19-9 klinik alanda büyük popülasyonlarda beklenen etkiyi yapamamıştır (Goonetilleke ve Siriwardena, 2007; Xing ve ark. 2018; Zhang ve ark. 2015; Satake ve ark. 1994; Loosen ve ark. 2017).

Son yıllarda PDAC'yi erken tespit edebilmek için pek çok çalışma yapılmış ve pek çok yöntem ve yaklaşım denenmiştir (Dell'Aquila ve ark. 2020; Khomiak ve ark. 2020; Strum ve ark. 2022). Bunlara örnek olarak diğer karbonhidrat antijenlerin, mikro-RNA'ların, ct-DNA'ların, CTC'lerin, metabolomik değişimlerin, alternatif uç-birleştirme varyantlarının, birden çok belirtecin aynı anda kullanılmasının, ekzozomların, genetik mutasyonların ve epigenetik değişimlerin, protein ve DNA biyobelirteçlerinin, immün ve stroma biyobelirteçlerinin, mikrobiyom biyobelirteçlerinin, görüntüleme teknik ve teknolojilerinin, likit biyopsi yaklaşımlarının klinik öncesi ve klinik olarak kullanılabilirlik, uygunluk, duyarlılık ve özgüllük açısından araştırılması verilebilir (Singhi ve Wood, 2021; Dell'Aquila ve ark. 2020; Khomiak ve ark. 2020; Strum ve ark. 2022). Önümüzdeki yıllarda yapılacak çalışmalar, PDAC'nin teşhisini klinik olarak fark yaratacak kadar erken aşamaya çekebilir. Ama bu durumda bile pankreas kanserini önlemek ve risk faktörlerine maruz kalmamak ve/veya bu faktörlerin farkında olmak önemini koruyacaktır.

2.2.3. PDAC'nin Risk Faktörleri

PDAC gelişiminde etkili olan risk faktörlerinin araştırıldığı çalışmalar ve edinilen bilgiler kısıtlı olsa da bazı koşulların ve durumların pankreas kanserine yakalanma ihtimalini arttırdığı bilinmektedir (Barcellini ve ark. 2020; Becker, 2014). PDAC'de çevresel risk etkenlerinin en önemlisi olarak gösterilen sigara kullanımı vakaların yaklaşık %20'sinden sorumludur (Barcellini ve ark. 2020; Vincent ve ark. 2011). Sigara kullanımıyla PDAC arasında pozitif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Bosetti ve ark. 2012; Lynch ve ark. 2009, McGuigan ve ark. 2018). Sigara kullanımı kadar yüksek bir ilişki bildirilmemiş olsa da özellikle yüksek alkol tüketimi PDAC için bir risk faktörüdür (McGuigan ve ark. 2018; Barcellini ve ark. 2020; Jentzsch ve ark. 2020). Alkol tüketimi, bir pankreas hastalığı olan ve PDAC oluşumunda etkili olabilen kronik pankreatit gelişmesine neden olabilmektedir (Jentzsch ve ark. 2020; Midha ve ark. 2016). PDAC gelişimiyle alakası bulunan bir diğer çevresel faktör ise obezitedir (Barcellini ve ark. 2020). Beden-kitle endeksinin 30'un üzerinde olması olarak kabul edilen obezite, hiperglisemiye, insülin direncine ve kronik inflamasyona sebep olmasıyla; yüksek kalori alımıyla ve azalan fiziksel aktivite ile PDAC oluşumunu etkileyebilmektedir (Barcellini ve ark. 2020, Jentzsch ve ark. 2020). PDAC ile yüksek pozitif korelasyona sahip hatta genellikle aynı anda görülen bir diğer risk etkeni de

diyabettir (Klein, 2021; Jentzsch ve ark. 2020). Özellikle 10 yıldan uzun süreli diyabet PDAC riskini önemli ölçüde arttırırken, PDAC vakalarının %74'ünde kanser teşhisi konulmadan 2 yıl önce diyabet teşhisi konulması diyabetin ve/veya diyabete sebep olan etkenlerin PDAC'ye sebep olabileceğini göstermektedir (Andersen ve ark. 2017; Song ve ark. 2015; Klein, 2021). Tüketilen besinlerin, mesleki maruz kalımların, egzersiz eksiliğinin de PDAC oluşumunda risk faktörleri olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Jentzsch ve ark. 2020; Rawla ve ark. 2019; Klein, 2021).

Çevresel olmayan veya değiştirilemeyen risk faktörleri açısından bakıldığında PDAC ile yüksek pozitif korelasyona sahip olan yaş oldukça etkili bir risk faktörüdür (Rawla ve ark. 2019; McGuigan ve ark. 2018). PDAC'nin 40 yaşından önce görülmesi çok seyrek gerçekleşen bir durumdur ve yeni tanı konulan hastaların %90'ı 55 yaş ve üzerindedir (Midha ve ark. 2016; Wood ve ark. 2006; Rawla ve ark. 2019). Bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olsa da yaş artışının riski bu kadar arttırmasının sebebi pankreasta meydana gelen kanser-öncesi bir inflamasyonun veya lezyonun malign bir kansere dönüşmesinin uzun yıllar alması olabilir (Rawla ve ark. 2019). PDAC için bir diğer risk faktörü de cinsiyettir ve erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenmektedir (Ferlay ve ark. 2018). Daha yüksek gelişmişlik düzeyinde cinsiyetler arasındaki fark açılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda reproduktif sistem farklılıkları bu sonucu açıklayamamış ve cinsiyetler arası PDAC gelişim riski farklılığı, keşfedilmemiş genetik faktörlere veya iki cinsiyetin mesleki maruz kalma ve hayat tarzı farklılıkları gibi bazı çevresel faktörlerden farklı etkilemesine atfedilmiştir (Rawla ve ark. 2019; McGuigan ve ark. 2018). Kalıtsal genetik faktörlerin de PDAC vakalarının %5-10'undan sorumlu olduğu ve bazı genetik hastalıkların PDAC riskini arttırdığı bilinmektedir (Brand ve ark. 2007; Klein ve ark. 2002; McGuigan ve ark. 2018). PDAC için çevresel olmayan risk faktörlerine ırk, kan grubu ve bazı genetik varyasyonlar da örnek olarak verilebilir (Rawla ve ark. 2019; McGuigan ve ark. 2018). PDAC oluşumunu ve gelişimi etkileyen çevresel ve kalıtsal; bilinen ve bilinmeyen pek çok faktör mevcuttur. Bilinen faktörlere göre PDAC, belirli evrelere ve alt türlere ayrılmaktadır.

2.2.4. PDAC Evreleri ve Alt Türleri

PDAC tümörün bulunduğu evreye göre 4'e ayrılır. Evre I'de kanser pankreas ile sınırlıdır ve herhangi başka bir organa yayılmamış olan bu evredeki vakalarda cerrahi operasyon yapılabilir kabul edilir. Tümör büyüklüğü (çapı) 2 cm'den az ise IA, 2cm ila 4 cm arasında ise IB evresinde kabul edilir. Evre II'de ise kanser lokal olarak yayılmıştır ve sınırdaki ameliyat edilebilir (borderline resectable) kabul edilir. Bu evrede tümör büyüklüğü 4 cm'den fazladır ama tümör ya sadece pankreas ile sınırlıdır ya da sadece yakındaki lenf düğümlerine yayılmış durumdadır. Evre III olarak sınıflandırılan tümör, yakınlardaki damarlar ve sinirler gibi daha geniş bir alana yayılmış ve cerrahi olarak çıkarılamaz durumdadır. Evre IV'te artık primer dokusu pankreas olan tümör başka organlara metastaz yapmıştır (De La Cruz ve ark. 2014; Rawla ve ark. 2019). Klinisyenler tarafından kullanılan bir diğer evreleme sistemi süperior mezenterik arter, hepatik arter, süperior mezenterik ven ve portal vendeki tümör teması ve invazifliği göz önüne alınarak tümörün cerrahi müdahale opsiyonlarına göre yapılan sınıflandırmadır. Bu sistem için International Association of Pancreatology'nin sınıflandırma için yayınladığı standartlara göre tümör çıkarılabilir, sınırdaki çıkarılabilir, lokal yayılım ve metastatik olmak üzere yine 4 evrede sınıflandırılır (Bockhorn ve ark. 2014; Abrams ve ark. 2009; Isaji ve ark. 2017).

Son yıllarda moleküler inceleme tekniklerindeki gelişmelerle farklı moleküler PDAC sınıflandırmaları önerilmiştir. Bu sınıflandırma modellerinin geliştirilmesinde PDAC'de en çok mutasyon görülen genler olan *KRAS*, *SMAD4*, *TP53* ve *CDKN2A* gibi genlerin patolojik etkileri göz önüne alınmıştır (Primavesi ve ark. 2019; Gutierrez ve ark. 2021). Bailey ve ark. tarafından önerilen sistemde PDAC genomik analizlere göre 4 alttüre ayrılmaktadır: skuamöz, anormal biçimde farklılaşmış endokrin ve ekzokrin, pankreatik progenitör ve immünojenik (Bailey ve ark. 2016). Collison ve ark. tarafından önerilen sistemde ise PDAC klinik sonlanım ve terapötik yanıtı göre 3 alt tipe ayrılır: klasik, sözde-mezenkimal ve ekzokrin-benzeri (Barcellini ve ark. 2020; Collison ve ark. 2011). Moleküler düzeyde farklı mutasyonların birikmesi, pankreasın farklı bölgelerinde ortaya çıkması ve farklı risk faktörlerine maruz kalınması farklı alt tiplerin önerilmesine ve farklı sınıflandırmalara neden olmuş fakat hepsinde metastazın gerçekleştiği evre PDAC'nin en ileri ve son evresi olarak kabul edilmiştir (Gutierrez ve ark. 2021; Franck ve ark. 2020).

2.2.5. PDAC'de Metastaz

Metastaz, dünya genelinde kanser-ilişkili ölümlerin birinci sebebi olan çok aşamalı bir süreçtir. Primer tümörde gelişen kanser hücrelerinin kan dolaşımı aracılığıyla diğer organlara migrasyonu sonucu sekonder tümör oluşturmaya metastaz denir (Menezes ve ark. 2017). Metastaz 4 aşamaya ayrılır: migrasyon, invazyon, adhezyon ve anjiyojenez (Nagaraju ve ark. 2019). Metastaz esnasında kanser hücreleri, öncelikle intravazasyon ile kan damarına girer, kan akışında dolaştıktan sonra, ekstrasvazasyon ile metastaz bölgesine invazyon gerçekleştirir ve burada sekonder malign tümör oluşturur (Wang ve ark. 2021). Bir metastazın başarılı olabilmesi için anjiyojenezin, epitelyal-mezenkimal geçişin, invazyonun, migrasyonun, uygun bölgeye adhezyonun, sekonder bölgede çoğalmanın gerçekleşmesi gerekmektedir (Ren ve ark. 2018).

PDAC tümörlerinin metastazına bakıldığında, metastazın en çok gerçekleştiği organ karaciğerdir. Diğer yaygın metastaz bölgeleri ise periton, akciğerler, plevra, kemikler ve adrenal bezlerdir (Blastik ve ark. 2011; Yachida ve Iacobuzio-Donahue, 2009). Pankreatik kanser hücreleri tümör dokusundaki kılcal damarlara invazyondan sonra genellikle portal ven yoluyla karaciğer ve akciğer gibi organlara ulaşmaktadır. PDAC mikroçevresi, pankreatik kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu artırarak metastazı kolaylaştırmaktadır. Bu tümör mikroçevresinde bulunan ekzozomlar, tümör faktörleri, kemik-iliği-kökenli hücreler, stroma ve hücrel yapılar, metastaz-öncesi nişi değiştirerek, tümör hücrelerine metastaz yaptıkları bölge için destekleyici ortam oluşturmaktadır (Ren ve ark. 2018). Örneğin, PDAC primer tümör mikroçevresi, en çok PDAC metastazının görüldüğü organ olan karaciğerde karaciğer yıldızsı hücreleri tarafından indüklenen fibröz oluşumunu artırarak metastaz için daha uygun bir ortam oluşturmaktadır (Tien ve ark. 2009). Metastaz-öncesi nişin oluşumunda payı olan kanser kök hücreleri, metastatik olmayan PDAC’de dahi kemoterapötik ajanların etkisinden korunarak hem tümör nüksü hem de metastaz ihtimalini arttırmaktadır. PDAC’de metastazı engelleme hedefinde saf dışı bırakılması gerekenlerden biri de plastisite özelliğine sahip kanser kök hücreleridir (Li ve ark. 2020). PDAC’nin kemoterapisi sonucu tümör mikroçevresinin elemanlarından olan tümör-ilişkili fibroblastların yok edilmesi vasküler geçirgenliği arttırarak, dirençli kanser hücrelerinin kan dolaşımına girip metastaz yapmasını kolaylaştırmaktadır (Liang ve ark. 2018). PDAC metastazının gerçekleşmesi çok katmanlı ve pek çok faktörün etkili olduğu bir süreçtir. Bu faktörlere,

yaklaşık 30 tanesi keşfedilmiş olan PDAC metastaz baskılayıcı genler örnek verilebilir (Bhattacharya ve ark. 2021).

PDAC metastazında önemli bir nokta, pankreas lokalizasyonu nedeniyle, tümörün yüzeyinden ayrılan hücrelerin kan dolaşımına girmeden periton kavitesinde bulunan organ ve dokulara adhezyon ve invazyon gerçekleştirebilmesidir. PDAC hastalarına yapılan otopsilerde, peritonel metastazların hastaların yaklaşık yarısında bulunduğu göz önüne alındığında PDAC metastazlarını engellemenin ve görüntülemenin zorluğu anlaşılabılır (Avula ve ark. 2020). PDAC tümör hücrelerinin kan dolaşımına girmeden de metastaz veya karsinomatöz yapabilmesi, sadece kan dolaşımını hedefleyerek metastazı durdurmayı imkansız hale getirmekte ve invazyonu doğrudan durduracak, epitel hücrelerde hücre herhangi bir yere tutunmadığı zaman gerçekleşen anoikisi arttıracak ve epitelyal-mezenkimal geçişi tersine çevirecek yaklaşımları gerektirmektedir (Avula ve ark. 2020).

PDAC tanısının erken konulamaması, hastaların yarısının tanı konulduğunda metastatik evrede olmasına yol açarken, küratif tedavi yöntemlerini de oldukça kısıtlamaktadır (Mizrahi ve ark. 2020). Yine de PDAC tedavisi için günümüzde klinikte kullanılan onaylanmış tedaviler mevcuttur.

2.2.6. PDAC Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

PDAC, günümüzde hala tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Bu durumun önde gelen sebepleri olarak PDAC'nin lokal yayılım veya metastatik aşamaya kadar asemptomatik olması, tarama ve görüntüleme yöntemlerinin büyük popülasyonlarda kullanımının etkili ve ucuz olmaması, hastaların ancak yaklaşık %20'sine cerrahi operasyon yapılabilmesi, ameliyat olan hastalarda da rekürans oranlarının yüksek olması ve ekstrasellüler matriksi, fibroblastları, pankreatik stellat hücrelerini, miyeloid-kökenli supresör hücrelerini, regülatör T hücrelerini, tümör-ilişkili makrofajları ve kanser hücrelerini içeren oldukça özgün bir tümör mikroçevresine sahip olması öne sürülmektedir (Ducreux ve ark. 2015; Niederhuber ve ark. 2019; Yabar ve Winter, 2016; Huang ve ark. 2018; Katz ve ark. 2012; Uzunparmak ve Şahin, 2019; Ho ve ark. 2020; Thakur ve ark. 2021).

PDAC tedavisinde immünoterapi, hedeflenmiş terapi, radyoterapi yaklaşımları, kombinasyonel terapiler ile ilgili yoğun çalışmalar ve klinik denemeler devam etse de günümüzde klinik aşamada kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi operasyon ve kemoterapidir (Bear ve ark. 2020; Schizas ve ark. 2020; Anderson ve ark. 2021; Mizrahi ve ark. 2020; Elsayed ve Abdelrahim, 2021; Taieb ve Abdallah, 2020; Hall ve Goodman, 2019; Leroux ve Konstantinidou, 2021).

2.2.6.1. PDAC'nin Cerrahi Operasyon ile Tedavisi

Rezeksiyon gerçekleştirilen PDAC hastalarının 5-yıllık sağkalım oranları %10-25 aralığında olmasına rağmen cerrahi operasyon küratif potansiyeli olan tek tedavi yöntemidir (Okasha ve ark. 2017; Mizrahi ve ark. 2020; Anderson ve ark. 2021). Pankreasın baş ve boyun bölgelerindeki tümörler pankreasın, duodenumun, proksimal jejunumun, ana safra kanalının, safra kesesinin ve midenin bir kısmının rezeksiyonunu içeren pankreatikduodenotomiyle (Whipple prosedürü) ve kuyruk ve gövde bölgesindeki tümörler bazen splenektomiyle beraber yapılan distal pankreatektomiyle alınmaktadır (Torphy ve ark. 2020; Mizrahi ve ark. 2020). Son yıllarda geliştirilen daha agresif rezeksiyon (R0 veya negatif marjin ile) ve bitişik kan damarlarının rekonstrüksiyonunu içeren modern teknikler sayesinde ameliyata bağlı ölümler %3'ün altına düşerken, yeni klinik denemelerdeki medyan toplam sağkalım 54 aya kadar yükselmiştir (Torphy ve ark. 2020; Masiak-Segit ve ark. 2018; Anderson ve ark. 2021). Cerrahi operasyon tekniklerindeki gelişmeler, rezeksiyon sonrası tedavi yaklaşımlarının optimize edilmesi, sınırda rezeksiyon ve lokal yayılım gerçekleşmiş hastaların ayrımının iyi yapılması son yıllarda cerrahi müdahaleye uygun PDAC hastalarının toplam sağkalımlarını arttırmış ve rekürensi azaltmış olsa da hastaların küçük bir yüzdesine uygulanabilir olması başka tedavi yaklaşımlarını gerektirmektedir (Anderson ve ark. 2021; Torphy ve ark. 2020). Günümüzde yaygın olarak kullanılan bir diğer yaklaşım ise kemoterapidir (Grossberg ve ark. 2020). Kemoterapi neoadjuvan olarak ameliyatlardan önce veya adjuvan olarak ameliyatlardan sonra kullanılabilmeyle beraber, hastaların çoğu ameliyat olamadığı için tek başına kemoterapi tek terapi seçeneği olarak kalmaktadır (Springfeld ve ark. 2019; Okasuka ve Furuse, 2020; Elsayed ve Abdelrahim, 2021).

2.2.6.2 PDAC Tedavisinde Kemoterapi

Metastatik veya lokal yayılım göstermiş PDAC vakalarında cerrahi operasyon mümkün olmadığından, yaşam beklentisini uzatmak ve kalitesini arttırabilmek için sistemik kemoterapi uygulanabilir (Franck ve ark. 2020). Tanı konulduğunda hastaların yaklaşık yarısında PDAC metastatik durumdadır (Mizrahi ve ark. 2020). ECOG standartlarına göre zayıf performans gösteren (ECOG 3/4) hastalarda sadece destekleyici tedaviler uygulanmaktadır (Tempero ve ark. 2016; Sohal ve ark. 2018; Ducreux ve ark. 2015). Günümüzde PDAC tedavisinde kullanılan kemoterapötikler Gemsitabin (GEM), GTX, FOLFIRINOX, nab-Paklitaksel, Erlotinib, Kapesitabin ve İrinotekan'dır (Tempero ve ark. 2017; Rebelo ve ark. 2021).

GEM'in kullanımına 1990'lı yılların sonunda cerrahi operasyon mümkün olmayan PDAC hastalarında onay verilmiştir. Bu hastalarda kullanılan kemoterapötik yaklaşımlara birinci basamak kemoterapi veya palyatif kemoterapi ismi verilmektedir ve eğer hastanın performans durumu kötüye gitmezse ikinci basamak kemoterapi ile tedaviye devam edilmektedir (Springfeld ve ark. 2019; Okasuka ve Furuse, 2020). O yıllarda ve daha öncesinde, yardımcı ve destekleyici tedavi için 5-FU monoterapisinin daha etkili ve yararlı olduğuna dair yeterli çalışmaların eksikliğine karşın 5-FU monoterapisi farklı doz ve protokollerle kullanılmaktaydı (Springfeld ve ark. 2019). Randomize (Rastgellenmiş) klinik denemelerde, monoterapi olarak verildiğinde GEM verilen hastaların, 5-Flourourasil verilenlerden daha fazla klinik yanıt aldığı ve GEM'in toplam sağkalımı daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir (Burris ve ark. 1997).

1997'den sonra ileri seviye PDAC hastalarında gemsitabin monoterapisi standart tedavi yöntemi haline gelirken GEM'in Cisplatin, Oksaliplatin ve Kapesitabin gibi diğer kemoterapötikler ile kombinasyonlarının denendiği klinik denemelerde bu kombinasyonların GEM monoterapisinden daha etkili olmadığı tespit edildi (Springfeld ve ark. 2019; Heinemann ve ark. 2012).

GEM monoterapisinden daha etkili bir kemoterapötüğün faz III çalışmaları sonucu etkinliğinin gösterilmesi için 15 yıl geçmesi gerekti. Gemsitabin'den daha etkili bir monoterapi ajanı bulunamamış ancak 2011 yılında 4 tane kemoterapötik ajanı içeren FOLFIRINOX olarak isimlendirilen karışımın medyan ilerlemesiz sağkalımı ve toplam sağkalımı GEM monoterapisinden daha fazla arttırdığı bildirildi (Conroy ve ark. 2011; Franck ve ark. 2020). O günden itibaren cerrahi operasyon ihtimali olmayan PDAC

vakalarında, eğer hastanın genel sağlık durumu belirlenen standartları sağlıyorsa ilk kemoterapi seçeneği, FOLFIRINOX veya onun, toksisiteyi azaltmak için İrinotekan dozunun azaltılması veya 5-FU bolusunun hiç verilmediği, değiştirilmiş hali olan mFOLFIRINOX oldu (Lambert ve ark. 2017; Springfield ve ark. 2019; Franck ve ark. 2020). 2013'te ise, GEM ile başka bir kemoterapötik'in daha etkili kombinasyonunu bulma çalışmaları sonuç verdi ve nab-Paklitaksel adı verilen Paklitaksel'in albumin-bağlı, solvent-içermeyen ve suda çözünebilen formu olan ajan ile kombinasyonun GEM'den daha etkili olduğu ve toplam sağkalımı önemli ölçüde arttırdığı bildirildi (Von Hoff ve ark. 2013; Neesse ve ark. 2014). Tablo 2-1'de ileri evre PDAC vakalarında, birinci basamak tedavi olarak denenen faz III aşamasına geçmiş kemoterapötik rejimenler gösterilmektedir.

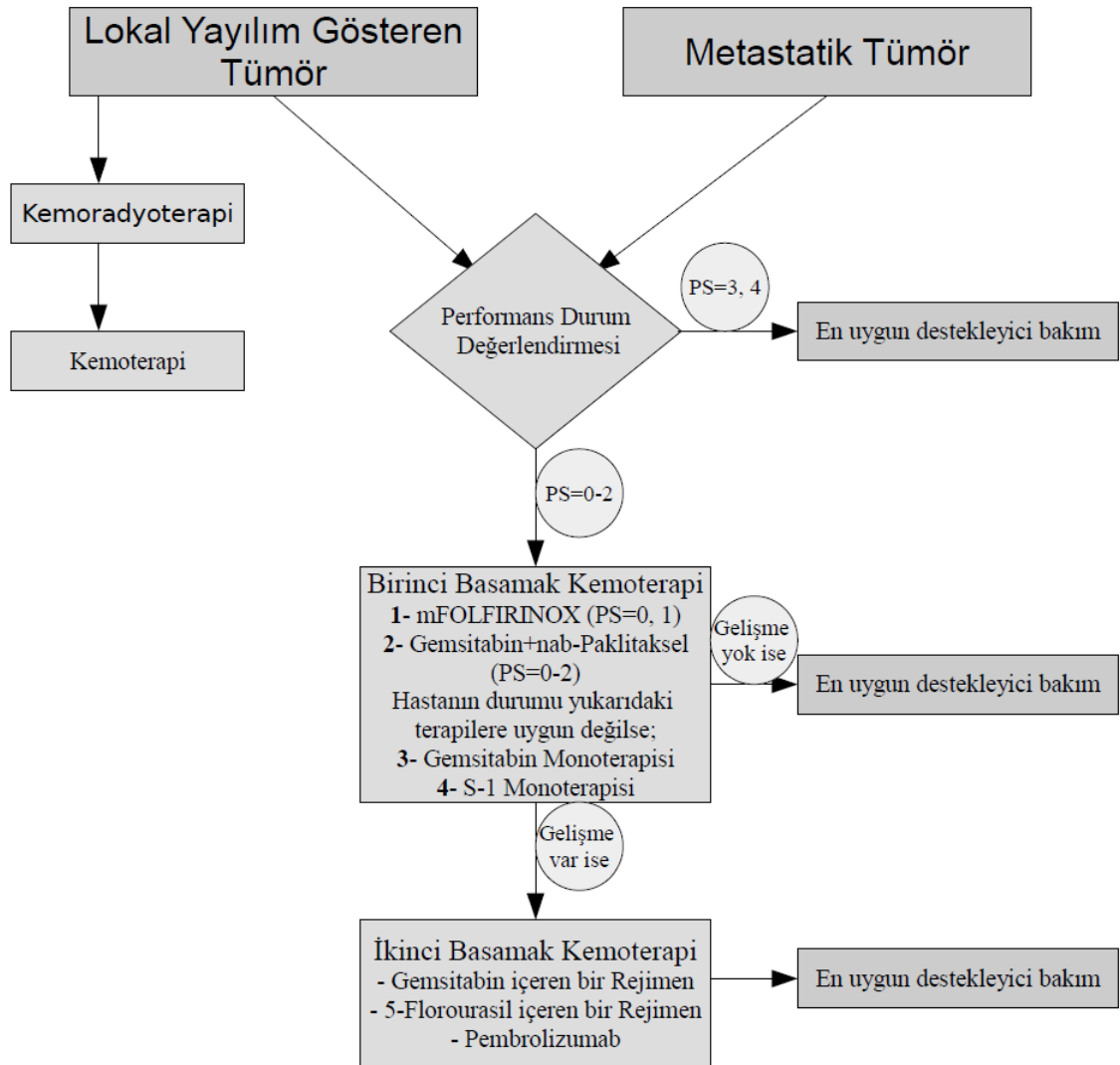
Yapılan bir diğer çalışmada S-1'in GEM'le birlikte kullanımının sağkalımı az da olsa arttırdığı gösterildi (Ueno ve ark. 2013). İleri evredeki PDAC hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere sağkalımı daha da arttırabilmek amacıyla yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmalar devam etmesine karşın faz III aşaması tamamlanmış ve daha iyi sonuçlara ulaşılmış bir çalışma bulunmadığından günümüzde genel sağlık durumu, performans durum skoru, nötrofil ve platelet sayıları, hemogloblin konsantrasyonu gibi bazı kriterlere bakılarak hastalara ya FOLFIRINOX ya Gemsitabin/nab-Paklitaksel ya da GEM monoterapisi önerilmektedir (Springfield ve ark. 2019; Franck ve ark. 2020; Okasuka ve Furuse, 2020). Birebir kontrollü rastgele çift-kör denemelerde karşılıklı denenmedikleri için yapılan meta-analiz, gözlemsel ve sistematik derleme çalışmalarda FOLFIRINOX ile GEM/nab-Paklitaksel'in sağkalımı istatistiksel olarak farklı bir oranda değiştirmedikleri gösterildi (Williet ve ark. 2021; Servetto ve ark. 2021; Chiorean ve ark. 2019). Bu alanda rastgellenmiş ileri çalışmalara ihtiyaç olmakla birlikte eğer hastanın sağlık durumu belirlenen standartları sağlamıyorsa ileri evre PDAC için uygulanan birinci basamak tedavi yöntemi hala GEM monoterapisidir (Franck ve ark. 2020; Okasuka ve Furuse, 2020). İleri evredeki PDAC hastalarında birinci basamak kemoterapiden sonra, hastanın sağlık durumu elveriyorsa ikinci basamak kemoterapi uygulaması yapılabilir (Taieb ve Abdallah, 2020; Okasuka ve Furuse, 2020; Springfield ve ark. 2019). GEM'in PDAC tedavisi için onaylanmasının üzerinden çeyrek asır geçmesinden sonra hala genel durumları iyi olmayan ileri PDAC hastalarında, daha iyi bir monoterapi seçeneği

olmadığından, tek başına olarak kullanılmasına devam edilmektedir (Okasuka ve Furuse, 2020; Springfield ve ark. 2019).

Tablo 2-1: İleri Seviye PDAC Hastalarında Yapılan Birinci Basamak Kemoterapi Faz III ve IV Klinik Deneme Sonuçları (Okasuka ve Furuse, 2020; Springfield ve ark. 2019)

Çalışmanın Adı-Yılı	Kullanılan Ajanlar	PDAC Evresi	Medyan İlerlemesiz Sağkalım	Medyan Sağkalım
Gemcitabine vs. 5-FU-1997 (Burris ve ark. 1997)	- Gemcitabin - 5-FU	Lokal yayılım ve metastatik	9 Hafta 4 Hafta	5,65 ay 4,41 ay
NCIC CTG PA.3-2007 (Moore ve ark. 2007)	- Gemcitabin+Erlotinib - Gemcitabin	Lokal yayılım ve metastatik	3,75 ay 3,55 ay	6,24 ay 5,9 ay
GemCap-2009 (Cunningham ve ark. 2009)	- Gemcitabin+Kapesitabin - Gemcitabin	Lokal yayılım ve metastatik		7,1 ay 6,2 ay
GEST-2013 (Ueno ve ark. 2013)	- Gemcitabin+S-1 - S-1 - Gemcitabin	Lokal yayılım ve metastatik	5,7 ay 3,8 ay 4,1 ay	10,1 ay 9,7 ay 8,8 ay
PRODIGE 4/ACCORD 11-2011 (Conroy ve ark. 2011)	- FOLFIRINOX - Gemcitabin	Metastatik	6,4 ay 3,3 ay	11,1 ay 6,8 ay
MPACT-2014 (Von Hoff ve ark. 2013; Goldstein ve ark. 2015)	- Gemcitabin+ nab-Paklitaksel - Gemcitabin	Metastatik	5,5 ay 3,7 ay	8,5 ay 6,7 ay

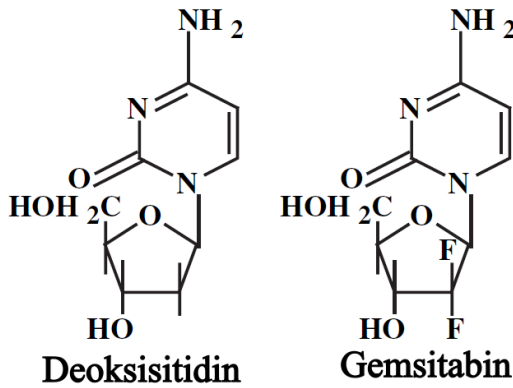
Cerrahi operasyon mümkün olmayan PDAC vakalarında uygulanan terapi yaklaşımları Şekil 2-4'te özet halde görülebilir.



Şekil 2-4: Cerrahi Operasyon Mümkün Olmayan PDAC Tedavisinde Kullanılan Yaklaşımlar (Taieb ve Abdallah, 2020; Okasuka ve Furuse, 2020)

2.3. GEMSİTABİN (GEM)

Gemsitabin (2',2'-difloro 2'deoksisitidin, dFdC) furanoz halkasının 2' karbonuna 2 tane flor atomu bağlı olan bir deoksisitidin analogudur (National Center for Biotechnology Information, 2022; Mini ve ark. 2006). GEM'in deoksisitidinden yapısal olarak farkı deoksisitidinin deoksiribozunun 2' karbonuna bağlı olan 2 hidrojen atomunun, 2 flor atomuyla değiştirilmesidir (Şekil 2-5). İlk olarak antiviral bir ilaç olarak araştırılan GEM'in *in vitro* ve *in vivo* deneylerde ortaya çıkarılan anti-tümör etkileri sebebiyle antikanser bir ilaç olarak onaylandı (Mini ve ark. 2006; Springfield ve ark. 2019). Anti-metabolit sınıfa dahil bir kanser ilacı olan GEM pankreas kanseri dışında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, meme kanseri gibi katı tümör kanserlerinin ve Hodgkin dışı lenfoma gibi kan kanserlerinin birinci basamak tedavisinde kullanılmaktadır (Wong ve ark. 2009; Moysan ve ark. 2013; Mini ve ark. 2006). GEM monoterapi olarak veya diğer anti-metabolitlerle beraber damardan veya enjeksiyon yoluyla hastalara verilebilmektedir (Alvarellos ve ark. 2014). GEM bir ön ilaç olup, farmakolojik olarak etkili olabilmesi için hücre içine alınması ve fosforillenmesi gerekmektedir (Mini ve ark. 2006; Alvarellos ve ark. 2014).



Şekil 2-5: Deoksisitidinin ve Gemsitabin'in Yapıları (Mini ve ark. 2006'dan uyarlandı)

2.3.1. Gemsitabin'in Farmakokinetiği ve Farmakodinamiği

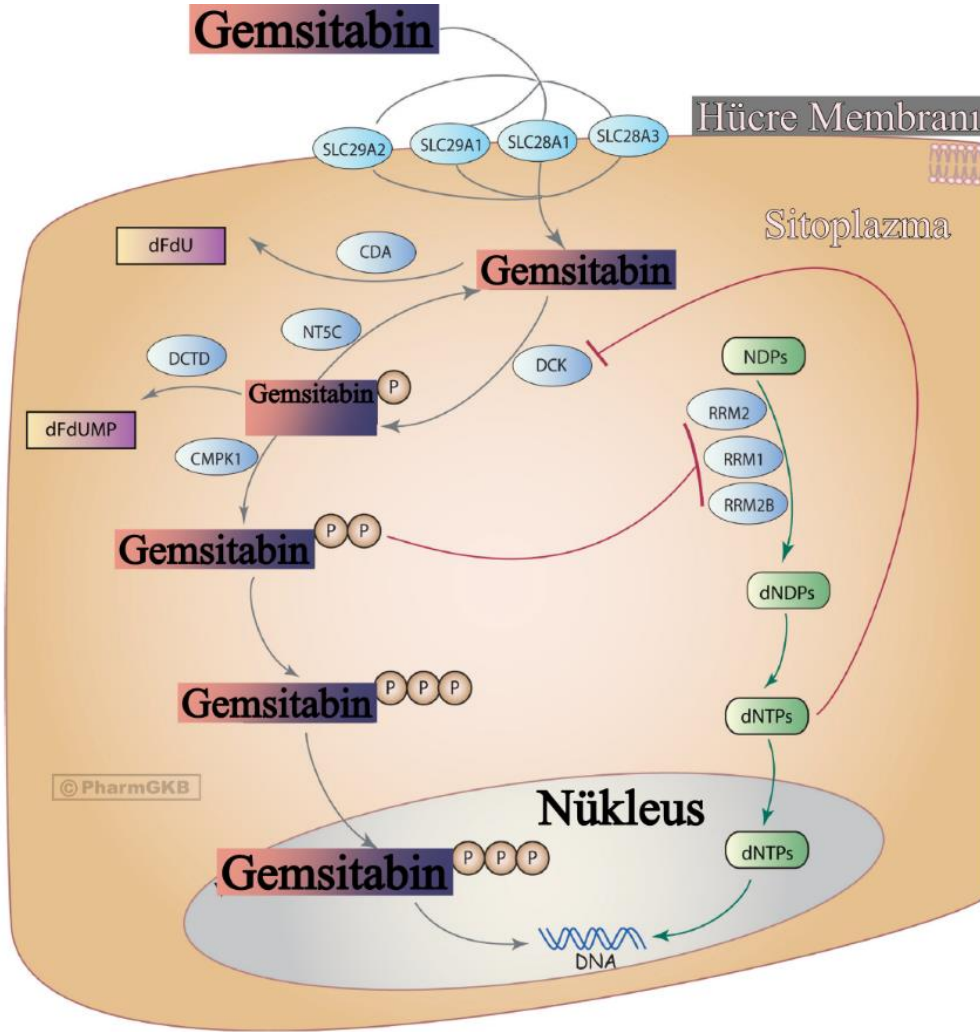
GEM hidrofilik bir molekül olduğundan hücre içine alınması, hücre membranında bulunan aktif nükleosit taşıyıcıları aracılığıyla gerçekleştirilir (Mackey ve ark. 1998; Alvarellos ve ark. 2014). İnsan nükleosit taşıyıcıları sodyum-bağımlı veya konsantretif tip olan CNT'ler ve sodyum-bağımsız veya ekilibratif tip olan ENT'ler olmak üzere iki

gruba ayrılır (Belt ve ark. 1993; Griffith ve Jarvis, 1996). GEM'in hücre içine alımı büyük oranda başta hENT1 (SLC29A1) olmak üzere hENT2 (SLC29A2), hCNT1 (SLC28A1) ve hCNT3 (SLC28A3) gibi nükleosit taşıyıcıları tarafından gerçekleştirilmektedir (Mini ve ark. 2006; Alvarellos ve ark. 2014).

Hücre içine alınan GEM, GEM'e karşı afinitesi deoksisitidine karşı olan afinitesinin yaklaşık 3'te 1'i kadar olan DCK enzimi tarafından GEM1P'ye dönüştürülmektedir. GEM'in monofosforillenmesi hız-sınırlayıcı aşamadır (Alvarellos ve ark. 2014). GEM1P'ye 2. fosfatın eklenmesi CMPK1 enzimi tarafından ve GEM2P'ye 3. fosfatın eklenmesi ise NDPK enzimi tarafından katalizlenir. GEM2P ve GEM3P Gemsitabin'in 2 aktif formudur (Alvarellos ve ark. 2014). Gemsitabin ayrıca daha az oranda TK2 enzimi tarafından da monofosforillenebilmektedir (Kroep ve ark. 2002). Ek olarak, hücre içindeki GEM'in inaktivasyonu, GEM'in CDA tarafından deaminasyonu, GEM1P'nin DCTD tarafından deaminasyonu ve GEM1P'nin NT5C tarafından defosforilasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Mini ve ark. 2006). GEM3P, DNA polimerazı inhibe etmesinin yanı sıra replikasyon aşamasında deoksisitidinin bağlanacağı yere bağlanarak dolaylı yoldan replikasyonu inhibe etmektedir (Gandhi ve Plunkett, 1990; Huang ve ark. 1991). GEM3P DNA'ya eklendikten sonra sadece bir nükleotit daha eklenmesi durumunda, GEM3P'nin DNA zincirindeki terminal-olmayan pozisyonu baz eksizyon enzimleri gibi DNA tamir enzimlerinin durumu tespit etmesini ve tamir etmesini engellemektedir (Huang ve ark. 1991; Schy ve ark. 1993; Gandhi ve ark. 1996). Bu duruma 'maskelenmiş zincir sonlanması' adı verilmektedir (Mini ve ark. 2006). GEM3P'nin bu iki etkisi, DNA sentezini geri dönüşü olmayan bir şekilde engellemekte ve GEM'in tetiklediği apoptozda başrol oynamaktadır (Mini ve ark. 2006; Plunkett ve ark. 1995; Huang ve ark. 1991).

GEM'in diğer bir aktif formu olan GEM2P ise, NDP'lerin dNDP'lere dönüşümünden sorumlu enzimler olan RRM'leri inhibe ederek dNTP'lerin oluşumu azaltmaktadır (Heinemann ve ark. 1990; Baker ve ark. 1991; Ruiz van Haperen ve ark. 1994). Burada bir diğer önemli nokta da azalan dNTP havuzu, hücre dışından GEM alımını arttırmakta, azalan dCTP'ler DCK aktivitesini arttırmakta ve DCTD aktivitesini azaltmaktadır. Bu da GEM'in 'kendi etkisini arttıran' bir davranış sergilemesine neden olmaktadır. Bu mekanizmalar GEM'in monoterapi olarak birinci basamak kemoterapide kullanılmasına yol açan farmakolojik özelliklerinin sebebidir (Alvarellos ve ark. 2014).

GEM'in hücre içine alınmasında etkili olan nükleosit taşıyıcıları ve hücre içinde GEM metabolizmasında etkili olan enzimler Şekil 2-6'da görülebilir.



Şekil 2-6: Gemcitabin'in İntrasellüler Metabolizması (Alvarellos ve ark. 2014'ten uyarlandı)

GEM monoterapisi veya diğer kombine tedavi yaklaşımlarının ileri evre PDAC tedavisinde anti-kanser etkileri kanıtlanmış olmasına ve kemoterapinin tek tedavi seçeneği olmasına rağmen, toplam sağkalımı ancak aylarla ifade edilen düzeyde arttırmasının en önemli sebebi PDAC tmörlerinin bu kemoterapi ajanlarına karşı geliştirdiği direnç veya rezistanstır (Okasuka ve Furuse, 2020; Zeng ve ark. 2019).

2.3.3. PDAC’de Gemsitabin’e Karşı Gelişen Direnç

Bir kemoterapötik ilaca karşı gelişen direnç veya kemorezistans iki kategoriye ayrılır: başlangıçta var olan intrinsik ve sonradan, kemoterapi uygulanması sonucu oluşan kazanılmış direnç (Kelderman ve ark. 2014; Zeng ve ark. 2019; Rueff ve Rodrigues, 2016). Bir kemoterapötik ajana karşı gelişen dirençte, ilacın hücre dışına atımının artması, ilacın hedefinin değişmesi, ilacı aktive veya inhibe eden enzimlerdeki değişiklikler, DNA tamir mekanizmasındaki değişimler, senesensten kaçınma, tümör heterojenitesi, epigenetik değişiklikler, tümör mikroçevresi, epitelyal-mezenkimal geçiş, mikroRNA’lar etkili olabilmektedir (Wang ve ark. 2019; Zeng ve ark. 2019). Bazı PDAC hastalarında GEM’e karşı direnç intrinsik olsa da kemorezistans genellikle kemoterapi başladıktan sonra ortaya çıkmaktadır (Amrutkar ve Gladhaug, 2017). PDAC’de GEM’e karşı gelişen direnç pek çok faktör tarafından etkilenmekte ve çok-katmanlı ve ortaya çıkarılması zor bir yapıdadır (Zeng ve ark. 2019). Bu dirençle ilgili bilgiler özetlenirse;

- Çok ilaca karşı direnç gelişimi diğer pek çok tümörde olduğu gibi pankreas kanserinde de sıklıkla ortaya çıkmaktadır (Adamska ve ark. 2017; Lee ve ark. 2012; Koltai ve ark. 2022). Daha fazla çalışmaya ihtiyaç olsa da yapılan çalışmalara göre MDR proteinleri normale göre hem kemoterapi görmüş hem de görmemiş PDAC hastalarında daha yüksek seviyededir (Lee ve ark. 2012; Gock ve ark. 2013).

- PDAC tümörlerinin mikroçevresinin stroma açısından zengin olması, yüksek hipoksik ortam, artan immünoşüpresyon gibi özellikleri ilaçların tümöre ulaşmasını engellemektedir (Koltai ve ark. 2022; Carvalho ve ark. 2021).

- GEM’in hücre içine alınmasında yardımcı olan nükleosit taşıyıcıların ekspresyonlarının yükselmesi toplam sağkalımı arttırmaktadır (Koltai ve ark. 2022; Carter ve ark. 2021). hENT1 ve hCNT3 seviyeleri düşük olan GEM verilen PDAC hastalarının sağkalım süreleri daha düşüktür (Amrutkar ve Gladhaug, 2017).

- Epitelyal-mezenkimal geçişin PDAC tümörlerinde GEM’e karşı gelişen dirençte etkili olduğu bilinse de, mekanizmasının aydınlatılması için çalışmalara ihtiyaç vardır (Hu ve Chen, 2021). GEM’e karşı dirençli hücrelerde EMT fenotip, kanser kök hücre karakteristiği ve yüksek epitelyal-mezenkimal geçiş belirteçleri görülmektedir (Wang ve ark. 2009; Quint ve ark. 2012).

- DCK ekspresyonunun veya aktivitesinin düşmesi GEM aktivasyonunun azalmasına; RRM, CDA enzimlerinin ekspresyonlarının artması GEM etkisinin azalmasına ve dolayısıyla direnç gelişimine neden olmaktadır (Amrutkar ve Gladhaug, 2017).

GEM'e karşı gelişen direncin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır ve elde edilen bilgilerin klinik aşamaya aktarılma çalışmaları devam etmektedir. Yukarıda özetlenenlerin yanında dezmozoplastik stroma, bazı yolakların tetiklediği anti-apoptoz, düşük hücre dışı pH, yüksek eksozom salınımı, mikroRNA'lardaki ekspresyon değişimleri gibi daha pek çok faktör GEM'e karşı gelişen dirençte etkilidir (Koltai ve ark. 2022; Zeng ve ark. 2019). GEM cerrahi operasyon mümkün olmayan PDAC hastalarının tedavisinde altın standart olmaya devam etmesine karşın son 25 yılda yapılan çalışmaların açıkça gösterdiği GEM'in bu hastaları tek başına tedavi etmesinin mümkün olmadığıdır. GEM'in PDAC tümörlerinin etrafındaki, fiziksel bariyerleri geçebilmek için modifiye edilmesi ve/veya nanoparçacıklar gibi yeni teknolojilerle hastalara verilmesi, GEM ile sinerjistik etki gösterebilecek moleküllerin tespit edilmesi veya direnç gelişimini geri alabilecek MDR düzenleyicileri, hücre dışı pH düzenleyicileri, dezmozoplazi engelleyicileri, sitokin inhibitörleri ve GEM mekanizmasında etkili olan enzimlerin düzenleyicileri gibi moleküllerle birlikte verilmesinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır (Koltai ve ark. 2022; Zeng ve ark. 2019). Buradaki önemli nokta, PDAC hastalarının genellikle metastatik aşamada tanı almaları ve altın standart olsa dahi GEM'in o aşamadan sonra etkisinin oldukça kısıtlı olmasıdır. Bu nedenle etkiyi arttırmak için, en azından tanı ve tespit teknolojileri gelişene kadar, GEM'in kendisinde modifikasyonlara, hastaya verilisinde değişikliklere ve diğer sitotoksik veya kazanılan direnci geri döndüren moleküllerle birlikte verilmesine dair yeni yaklaşımlara ihtiyaç devam etmektedir. Bir diğer önemli nokta da özellikle cerrahi operasyon yapılamayan ve metastaz gerçekleşmemiş yani daha lokal yayılım evresinde bulunan PDAC tümörlerinin metastaz yaparak hastalığın daha ileri aşamaya ilerlemesinin önüne geçebilmektir. Bu amaçla GEM ile birlikte verildiğinde hem GEM'e karşı kazanılan direnci bilinen veya bilinmeyen mekanizmalarla geri çevirerek tümörü tekrar GEM'e (veya diğer ajanlara) karşı hassas hale getirecek ve PDAC hücrelerinin metastazını engelleyecek molekül ve/veya moleküller denenebilir. Bunun için daha önce bilinen veya yeni sentezlenen moleküllerin öncelikle *in vitro* deneylerine ihtiyaç vardır. Son yıllarda kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılan molekül gruplarından biri olan

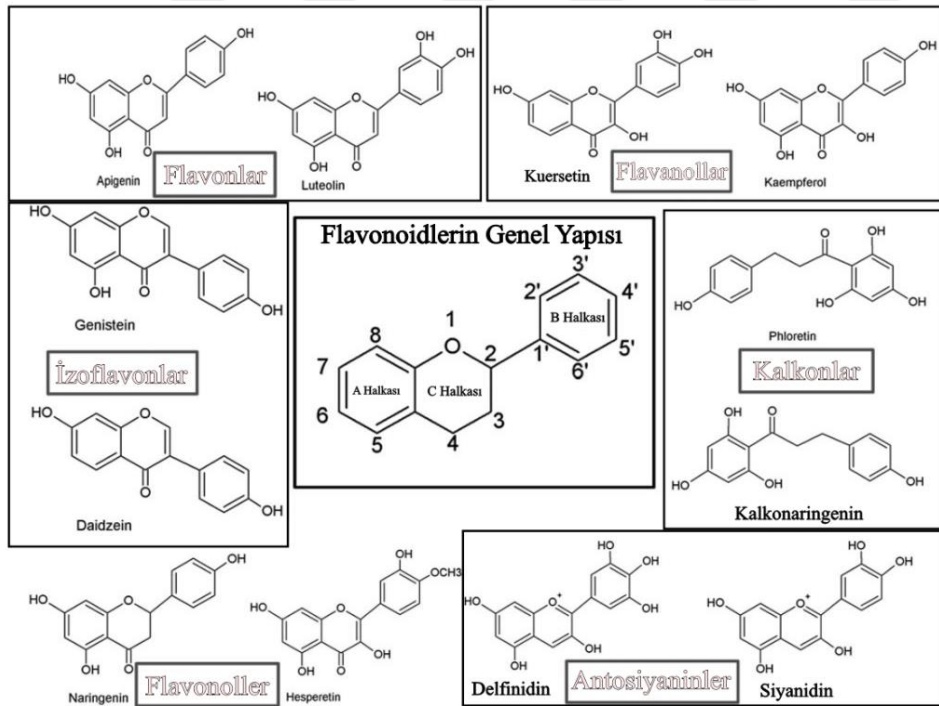
fenolik bileşenler veya polifenoller bu amaçla araştırılmaya en değer bileşenler arasında karşımıza çıkmaktadır (Gasic ve ark. 2020; Hussain ve ark. 2016, Thyagarajan ve ark. 2020).

2.4. POLİFENOLLER

Polifenoller, polihidroksi fenol olarak da bilinen bitkilerin meyve, sebze gibi çeşitli kısımlarında bulunan, diyetle alınabilen moleküllerdir (Gomez-Casti ve ark. 2013). Bitkilerde aromatik aminoasitlerin üretiminde kullanılan Shikimate yolağının ikincil metabolitleri olarak üretilen polifenoller, en az bir aromatik halka ve bir hidroksil grubu içermektedir (Santhakumar ve ark. 2018; Gonzalez-Vallinas ve ark. 2013). Polifenollerin çok çeşitli yapıları ve kimyasal özellikleri ve farklı biyolojik proteinleri etkileyebilmeleri farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmalarının mümkün olabileceğini göstermektedir (Avila-Carrasco ve ark. 2019). Kanseri de bu hastalıklardan biri olarak görülmekte ve göreceli düşük yan etkileri polifenollerin potansiyelini arttırmaktadır (Panda ve ark. 2017). Polifenollerin, anti-enflamasyon ve antioksidan özellikleri nedeniyle, PDAC dahil farklı kanser türlerinde, kanser gelişimini yavaşlatmak ve reküransı azaltmak dahil kemopreventif özelliklerine dair araştırmalar yapılmaktadır (Benzel ve Fendrich, 2018; Thyagarajan ve ark. 2020). Alımındaki eksiklikler herhangi bilinen bir yetersizliğe sebep olmadığından günlük referans alım değerleri tanımlanamayan polifenollerin, günlük diyetlerle alınan bitkisel ürünlerde bulunması ve düşük toksisiteye sahip olmasına karşın biyoyararlanımları ve biyoyararlılıkları düşüktür (Maru ve ark. 2016; Benzel ve Fendrich, 2018; Fraga ve ark. 2019). Çoğunluğu meyvelerde olmak üzere yaklaşık 10.000 tane bitkisel türevli bilinen polifenol bulunur (Maleki Dana ve ark. 2022). Polifenollerin sınıflandırılmasında 5 ila 9'a kadar alt sınıf önerilse de, kesin bir sınıflandırması bulunmayan polifenol alt sınıflarına stilbenler, fenolik asitler, lignanlar ve flavonoidler örnek verilebilir (Gasic ve ark. 2020; Manach ve ark. 2005; Maleki Dana ve ark. 2022; Nasir ve ark. 2019).

2.4.1. Flavonoidler

Flavonoidler, pek çok bitkide bulunan çiçeklerin, meyvelerin ve sebzelerin aroma ve renklerinden sorumlu olan, antibakteriyel, antiviral, antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-alerjik etkileri bulunan, ikincil bitki metabolitleridir (Pang ve ark. 2021; Abotaleb ve ark. 2018). Flavonoidler üç-elemanlı halka yapısına sahip 15 karbonlu moleküller olup, halkalarına A, B ve C isimleri verilmektedir. Bir benzen halkası olan A ile bir piron halkası olan C halkalarının oluşturduğu kroman, yine bir benzen halkası olan B halkasına bağlıdır (Abotaleb ve ark. 2018; Kikushi ve ark. 2019). Flavonoidlerin kendi içinde sınıflandırılması B halkasının C halkasının hangi karbonuna bağlı olduğuna, C halkasının satürasyon ve oksidasyon derecesine göre yapılmaktadır. B halkası C halkasının 3. karbonuna bağlı ise izoflavonlar, 4. karbonuna bağlı ise neoflavonoidler olarak adlandırılırken, 2. karbonuna bağlı ise satürasyon ve oksidasyon seviyelerine göre alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlara flavonlar, flavonoller, flavanoller, flavanonlar, flavanonollar, kateşinler, epikateşinler, antosiyaninler ve kalkonlar örnek verilebilir (Panche ve ark. 2016; Gryniewicz G., 2020) (Şekil 2-7). Bazı flavonoidlerin diyet kaynakları Tablo 2-2’de görülebilir.



Şekil 2-7: Flavonoidlerin Genel Yapısı, Alt Grupları ve Örnek Moleküller (Panche ve ark. 2016’ dan uyarlandı)

Flavonoidler, bitkilerde, insanlardaki biyoyararlanımlarını etkileyen şekilde, glikositlemiş veya glikositlememiş konjugeler olarak depolanır. Flavonoidlerin emilimi genellikle ince bağırsakta gerçekleşir ve sistemik dolaşıma girmeden önce faz II enzimleri tarafından metabolize edilir. Kalın bağırsak mikrobiyatası, ince bağırsakta emilmeyen flavonoidleri fenolik asitler gibi emilebilir moleküllere dönüştürerek biyoyararlanımlarını arttırmaktadır (Fraga ve ark. 2019). Emilimden sonra, karaciğer ve böbreklerde metilasyon, sülfasyon ve glukuronidasyon gibi metabolik değişikliklere uğrayarak sistemik dolaşıma girmekte ve hedef dokuya ulaşmaktadır. Flavonoidlerin düşük biyoyararlanıma sahip olmaları klinik öncesi araştırmalarda gözlenen etkilerin klinikte görülmesini zorlaştırmakta, biyoyararlanımı arttırabilecek veya azaltan etkenleri belirleyebilecek çalışmalara ihtiyaç doğurmaktadır (Abotaleb ve ark. 2018).

Yine de son yıllarda flavonoidlerle yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, flavonoidlerin apoptozu tetikleyebildiği, anti-metastatik etkileri olduğu, kemoterapötiklere karşı gelişen direnci etkileyebildiği, çoklu-ilaç direncini geri döndürebildiği, DNA tamir mekanizmalarını inhibe edebildiği, kanser kök hücrelerini azaltabildiği, epitelyal-mezenkimal geçişi ve anjiyogenezi durdurabildiği gösterilmiştir (Kikushi ve ark. 2019; Abotaleb ve ark. 2018; Maleki Dana ve ark. 2022). Bu çalışmalara PDAC’de dahildir.

Tablo 2-2: Bazı Flavonoidler ve Bulunduğu Bitkiler (Panche ve ark. 2016; Fraga ve ark. 2019)

Flavonoid	Bulunduğu Örnek Diyet Kaynağı
Kuersetin	sebzeler, meyveler, baharatlar, meyve suları
Genistein	sıvı yağlar, kırmızı et, soya fasulyesi
Naringenin	üzümler
Fisetin	çilek, elma, soğan, salatalık
Hesperidin	portakal, limon, lim
Luteolin	brokoli, yeşil biber, havuç, zeytin yağı, maydonoz
Apigenin	süt, çikolata

2.4.1.1. PDAC’de Flavonoidler

PDAC araştırmalarında bazı polifenollerin ve flavonoidlerin kemopreventif, anti-metastatik, kemorezistansı geri çevirici özellikleri olduğu gösterilmiştir. Polifenollerin denendiği klinik deneylerin sayısı az olmakla beraber yapılmış en az 5 tane klinik deney PubMed aramalarında bulunabilmektedir. Flavopiridolon, Oksaliptatin ve Florourasil/lökovorin (FOLFOX) ile denendiği faz I denemede, flavopiridolon güvenli ve tolere edilebilir olduğu gösterilmiştir (Rathkopf ve ark. 2009). Yine flavopiridolon, refrakter metastatik PDAC hastalarında Dosetaksel ile kombine terapisinin denendiği bir faz II denemede, kombine tedavinin düşük aktiviteli olduğu ve yüksek toksisite gösterdiği bulunmuştur (Carvajal ve ark. 2009). Cerrahi operasyon yapılamayan PDAC hastalarına genisteinin bir tür kristalin formu GEM ile beraber verildiği bir faz I denemede, olumlu farmakokinetik etkiler ve düşük toksisite bildirilmiştir (Löhr ve ark. 2016). İzoflavonların Erlotinib ve GEM ile beraber verildiği faz II çalışmada, izoflavonların hastaların sağkalımını iyileştirmediği bulunmuştur (El-Rayes ve ark. 2010). Son olarak, GEM’e karşı direnç geliştirmiş PDAC hastalarında, GEM ile birlikte verilen kurkuminin denendiği bir faz II çalışmada, kombine tedavinin güvenli ve tolere edilebilir olduğu bulunmuştur (Kanai ve ark. 2011). Faz III aşamada denenen polifenollerini içeren bildirilmiş bir klinik çalışma bulunmamaktadır. Bu alanda *in vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen bilgiler klinik aşamaya aktarılamamış olması daha fazla çalışmaya ihtiyaç

olduğunu göstermektedir. Yine de flavonoidler ile yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Flavonoidlerden çok sayıda, hem *in vitro* hem de *in vivo*, deneyleri yapılanlardan bazı örnekler aşağıdadır.

- Kuersetin farklı pankreas kanser hücre hatlarında proliferasyonu ve viabiliteyi zaman-ve doz-bağımlı bir şekilde azaltmaktadır. Kemoterapötik ajanlarla birlikte verildiğinde bu ajanların etkisini arttırmakta veya değiştirmemektedir. Kuersetin, epitelyal-mezenkimal geçişi durdurmakta, apoptozu arttırmakta ve anjiyogenezini düşürmektedir. *In vivo* deneylerde ise ortotopik pankreatik tümör ksenograftlarına sahip farelerde oral yoldan verildiğinde tümör büyümesini durdurduğu fakat GEM'in etkisini arttırmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, hayvan deneylerinde pankreatik tümörlerde anti-kanser etkisi olabilecek kadar biyoyararlanıma sahiptir (Angst ve ark. 2013; Thyagarajan ve ark. 2020; Ye ve ark. 2019; Gasic ve ark. 2020; Yu ve ark. 2017). Ayrıca kuersetinle yapılan bir çalışmada, pankreas kanser hücrelerini sürekli kuersetine maruz bırakmanın sürekli GEM'e maruz bırakmanın aksine, sağ kalan hücrelerde direnç gelişimine neden olmadığı ve hücrelerin tümör oluşturma kapasitelerini azalttığı bildirilmiştir (Fan ve ark. 2016).

- Apigeninin, kemoterapötik ajanların etkisini arttırdığı, hücre büyümesini durdurduğu, apoptozu arttırdığı *in vitro* ve *in vivo* deneylerde gösterilmiştir (Thyagarajan ve ark. 2020; Lee ve ark. 2008).

- Luteolinin, pankreas kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediği, invazyonu durdurduğu ve epitelyal-mezenkimal geçişi düzenlediği bildirilmiştir (Thyagarajan ve ark. 2020; Ye ve ark. 2019).

- Fisetinin kemodirençli pankreatik kanser hücrelerinde apoptotik, antiproliferatif, anti-invazif etkileri gösterilmiştir (Kashyap ve ark. 2019; Murtaza ve ark. 2009).

2.5. NDRG1 GENİ

NDRG1 (N-myc downstream-regulated gene 1 protein), 8. kromozomun uzun kolunun 8q24.3 olarak isimlendirilen bölgesinde bulunan, 60kb uzunluğunda, transkripsiyon sunucu oluşan 3 kb mRNA'nın 43kDa moleküler ağırlığa sahip, 394 tane aminoasitli bir proteine transle olduğu bir gendir (Park ve ark. 2020; Bhattacharya ve ark. 2021; Sun ve ark. 2013). NDRG1'in bir üyesi olduğu NDRG ailesi proteinleri α/β hidrolaz enzim grubuna dahil olsa da, NDRG1 proteininde hidrolitik katalitik bir bölge olmadığından hidrolitik enzim aktivitesi göstermemektedir (Bae ve ark. 2013). NDRG1 fosforillenen bir protein olup 10'dan fazla fosforillenme bölgesine sahiptir (Bandyopadhyay ve ark. 2006). Ayrıca, NDRG1 3 tane HIF-1 bağlanma bölgesine sahip olup bunların biri promotör bölgede ve diğer ikisi 3' ucundaki transle edilmeyen bölgededir (Toffola ve ark. 2009). NDRG1, kalsiyum, demir şelatörleri ve nikel gibi metal iyonları tarafından aktive edilmektedir (Zhou ve ark. 1998; Kovacevic ve ark. 2008). NDRG1, insan dokularının büyük çoğunluğunda eksprese olurken, hücrelerde plazma membranında, mitokondrilerde, sitoplazmik filamentlerde ve nükleoplazmada bulunmaktadır (Lachat ve ark. 2002; Bae ve ark. 2013;). NDRG1 proteini, hücre farklılaşması, stres-yanıtı, apoptoz, lipid sentezi ve gelişim gibi farklı fizyolojik olaylarla ilişkilendirilmektedir (Park ve ark. 2020). Bazı dokularda, mRNA seviyesinde bulunup protein olarak tespit edilememesi, translasyonel ve transkripsiyonel seviyede regüle edildiği şeklinde yorumlanan NDRG1 geninin ekspresyonu nitrik oksit, hücre içi kalsiyum seviyesi, hipoksi, demir tükenmesi, androjen hormonu, ağır metal iyonları, A ve D vitaminleri gibi biyolojik uyaranlara yanıt olarak değişmektedir (Park ve ark. 2020; Fang ve ark. 2014; Lachat ve ark. 2002). Adından da anlaşılabilceği gibi N-myc ve C-myc genlerinin ekspresyonlarının artması NDRG1 ekspresyonunu azaltmaktadır (Li ve ark. 2003; Gerhard ve ark. 2010).

NDRG1, farklı kanser türlerinde onkogenik yolları, tümör büyümesini ve metastazı baskılayan bir proteindir (Park ve ark. 2020). Meme, prostat, kolon ve pankreas kanserlerinde metastatik supresör olarak bilinen NDRG1, metastazı baskılamakta ve hastaların prognozunu arttırmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde hücre proliferasyonunu, migrasyonu, invazyonu ve anjiyogenezini azalttığı bildirilen NDRG1'in, anahtar sinyal yollarıyla ilişkisi bulunmaktadır (Menezes ve ark. 2017; Bae ve ark. 2013). NDRG1, pankreatik duktal adenokarsinomda metastaz baskılayıcı olarak kabul edilen genlerden biridir (Bhattacharya ve ark. 2021).

2.5.1. PDAC’de NDRG1

PDAC’de yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda NDRG1 ile ilgili bulunanlar özetlenecek olursa;

- Orta seviye farklılaşmış pankreas kanser hücrelerinde ekspresyonu normale göre yüksekken, az farklılaşmış pankreas kanser hücrelerinde ise normalden daha azdır (Angst ve ark. 2006).
- Pankreatik kanser hücrelerinde, NDRG1 EGFR, HER2 ve HER3 gibi büyüme faktör reseptörlerini baskılamaktadır (Kovacevic ve ark. 2016).
- İnvazyonu engellemektedir (Maruyama ve ark. 2006).
- Fare ksenograft modellerinde, mikrovasküler yoğunluğu ve tümör-kaynaklı anjiojenezi ve VEGF ve IL-8 gibi anjiojenizde önemli rolleri olan molekülleri protein düzeyinde azaltmaktadır (Maruyama ve ark. 2006).
- Pankreas kanser hücrelerinde, onkogenik sinyalleri azaltarak hücre membranındaki tümör baskılayıcı E-kaderin ekspresyonunu arttırmaktadır (Menezes ve ark. 2019).
- PDAC’de metastaz baskılayıcıdır (Kim-Fuchs ve ark. 2014; Maruyama ve ark. 2006).
- NDRG1 ekspresyonu iyi prognoz ile pozitif korelasyona sahiptir (Maruyama ve ark. 2006).
- Pankreas kanser hücrelerinde, tümör baskılayıcı olan SMAD4 ve PTEN genlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır (Kovacevic ve ark. 2013; Park ve ark. 2020).
- NDRG1, pankreatik kanser hücrelerinde, ekspresyonunun fazla olması, Akt-mTOR sinyal yolağını baskılamakta ve HIF1 α seviyelerini düşürmektedir. Ayrıca NDRG1 dolaylı yoldan da olsa aerobik glikolizi düzenlemektedir (Liu ve ark. 2017).
- NDRG1 ekspresyonun artması pankreas kanser hücrelerinde hücre proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu azaltırken, düşmesi ise üçünü de arttırmaktadır. NDRG1, anti-onkojen etki göstermekte ve tümör oluşumunu çeşitli yollarla susturarak düşürmektedir (Cen ve ark. 2017).

- Bazı apoptoz genlerinin ekspresyonunu arttırmakta ve anjiojenezi engellemektedir (Angst ve ark. 2011).

- NDRG1 nükleer faktör- κ B sinyal yolağını inhibe ederek anjiojenezi, tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı baskılamaktadır (Hosoi ve ark. 2009).

2.6. MRP5 GENİ

ABCC5 olarak da bilenen MRP5 geni ATP bağlayan kaset taşıyıcıları ailesine ait bir ilaç atım pompası genidir (Nath ve ark. 2013). MSD0 içermeyen MRP5, iki MSD ve iki NBD ile MRP'lerin kısa MRP'ler olarak kabul edilen alt grubundadır (Slot ve ark. 2011). Özellikle cAMP ve cGMP gibi siklik nükleotidlerin taşınmasında görevli olan MRP5, epitelyal hücrelerin bazolateral membranında bulunmaktadır (Wielinga ve ark. 2003; Jedlitschky ve ark. 2000;). Ayrıca, glutatyon, folik asit ve glukuronit konjugeleri de MRP5 tarafından taşınabilmektedir (Borst ve ark. 2007). 3. Kromozomun uzun kolunda q27.1 pozisyonunda bulunan MRP5, 1437 bazdan oluşan bir gen olup 165 kDa moleküler ağırlığa sahip bir protein kodlar (Wang ve ark. 2021). MRP5'in PDAC'de kemoterapötiklere karşı gelişen dirençte etkili olabilmektedir (Hagmann ve ark. 2011).

2.6.1. PDAC'de MRP5

PDAC ile ilgili *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda MRP5 ile ilgili bulunanlar özetlenirse;

- Hem normal pankreas hem de PDAC dokularının karşılaştırıldığı bir çalışmaya göre, MRP5 mRNA seviyeleri PDAC dokusunda önemli ölçüde daha fazladır (König ve ark. 2005).

- Pankreas kanser hücre hatlarında, 3 gün boyunca düşük dozda GEM'e maruz kalan hücrelerde MRP5 mRNA seviyeleri değişmezken, yüksek dozda 1 saat maruz kalanlarda MRP5 seviyelerini arttırmaktadır. Ayrıca, GEM'e direnç kazandırılan hücre hatlarından bazılarında MRP5 seviyeleri değişmezken bazılarında önemli ölçüde artmıştır. Dirençli hücreler GEM'e maruz kaldığında MRP5 protein seviyeleri artmaktadır. Hem 5-FU hem GEM hem de ikisinin birlikte verildiği direnç kazandırılmamış pankreas kanser hücrelerinde, MRP5 seviyeleri önemli ölçüde yükselmiştir. MRP5 geni susturulan hücrelerde, GEM'in sitotoksik etkileri artarken, MRP5'in ekspresyonunun transfeksiyon

ile arttırıldığı hücrelerde, GEM'in özellikle yüksek dozlarının sitotoksitesi azalmaktadır (Hagmann ve ark. 2010).

-Pankreas kanser hücre hattında MRP5'in susturulması, GEM'in sitotoksik etkisini arttırmaktadır (Hagmann ve ark. 2011).

- 5-FU, MRP5 ekspresyonunu pankreas kanser hücrelerinde azaltmaktadır (Harbuzariu ve Gonzalez-Perez, 2018).

- Pankreas kanser hücre hatlarında, 5-FU'ya uzun süre maruz kalmak MRP5 ekspresyonunu arttırmaktadır ve MRP5 geni susturulan hücrelerde 5-FU'nun sitotoksik etkisi artmaktadır (Nambaru ve ark. 2011).

- Pankreas kanser hücrelerinde, MRP5 seviyesini arttıran ajanlar GEM'in antitümör etkisini arttırmaktadır (Duong ve ark. 2014).

- Pankreas kanser hücre hattında, GEM hem doz- hem de zaman-bağımlı olarak MRP5 mRNA ve protein seviyelerini arttırmaktadır (Kohan ve Boroujerdi, 2015).

- Pankreas kanser hücrelerinde, MUC1, MRP5'in de dahil olduğu ilaç atım pompası genlerinin ekspresyonunu arttırarak GEM ve Etoposit'e karşı gelişen direnci arttırmaktadır (Nath ve ark. 2013).

- Kurkumin pankreas kanser hücre hatlarında, MRP5 seviyelerini düşürerek 5-FU'nun hücrelerdeki sitotoksik etkisini arttırmaktadır (Li ve ark. 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

İnkübatör (Thermo Scientific BB 15), çevrik ışık mikroskobu (Olympus CKX41), mikroskop kamerası (Jenoptik ProgRes®CFscan), laminar hava akım kabini (Nuair), vorteks (Velp Scientifica ZX3), sıvı azot tankı, su banyosu (Mettler WNB), spektrofotometreler (Thermo Scientific Multiskan Spectrum ve NanoDrop™ 2000), +4 C° buzdolabı (Bosch, Beko), -20 C° buzdolabı (Bosch, Beko), -80 C° buzdolabı (ESCO Lexicon® II ULT Freezer), santrifüjler (Heraeus Biofuge Pico, Hettich ROTINA 38 ve Neuartion iFuge M08), otomatik hücre sayım ve viyabilite analiz cihazı (Beckman Coulter, Vi-Cell Xr), PZR cihazı (Bio-Rad T100), gerçek-zamanlı PZR cihazı (Roche LightCycler® 480 II), 10 µl mikropipet (Eppendorf Research Plus), 100 µl mikropipet (Eppendorf Research Plus), 1000 µl mikropipet (Eppendorf Research Plus), serolojik pipet kontrol cihazı (pipetör) (Greiner), hassas terazi.

3.2. KULLANILAN YAZILIMLAR

Grafiklerin ve resimlerin düzenlenmesinde PhotoScape X ve ImageJ (v1.52a), grafiklerin çizilmesinde ve istatistiksel analizde Graphpad Prism (v8.0.1), hücrelerin fotoğraflanmasında ProgRes® CapturePro Software (v2.10.0.1), gerçek-zamanlı PZR'nin uygulanmasında ve analizinde The LightCycler® 480 Software (v1.5.1), spektrofotometrik okumalarda Thermo Scientific SkanIt Software for Microplate Readers, hücre sayımlarında Vi-Cell XR Software (v2.03).

3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN MALZEMELER

ATCC'den alınmış Panc-1 hücre hattı, 25 cm² taban alanına sahip delikli kapaklı flasklar (Sarstedt), 75 cm² taban alanına sahip delikli kapaklı flasklar (Sarstedt, Biofil), 6-kuyucuklu kapaklı plakalar (Sarstedt, Greiner Bio-One), 96-kuyucuklu kapaklı plakalar (Sarstedt, Greiner Bio-One), çeşitli hacimlerde (1 ml, 5 ml ve 10 ml) serolojik pipetler (Sarstedt, Biofil), 0,22 µm por büyüklüğüne sahip şırınga filtreleri (Millipore), 15 ml'lik konik tabanlı Falcon tüpler (Biofil), 50 ml'lik konik tabanlı Falcon tüpler (Biofil), 1,5 ml'lik eppendorf tüpler, hücre kazıyıcılar (Sarstedt), Vi-Cell tüpleri (Beckman Coulter), 25'lik enjektörler, PBS (Amresco), çeşitli büyüklüklerdeki (10 µl, 100µl ve 1 ml) pipet uçları, FBS (Hyclone), Trypsin-EDTA(%0,25) (Hyclone), yüksek

glukoz (4,5 g/L) ve L-glutamin içeren DMEM (Multicell ve BioSera), DMSO (Glentham Life Sciences), CCK-8 (Abbkine), Gempitabin hidroklorit (Sigma-Aldrich), 100x Penisilin-Streptomisin, Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific), kriyoviyaller (Greiner Bio-One), distile su.

3.4. KULLANILAN DİĞER MALZEMELER

0,2 ml'lik PCR tüpleri, 0,5 ml'lik PCR tüpleri, 96-kuyucuklu gerçek-zamanlı PZR plakaları ve optik yapışkan kapatıcıları (Roche), RNA izolasyon kiti (EXIQON miRCURY™ Isolation Kit – Cell and Plant), cDNA sentez kiti (NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5x)), Taqman problemleri ve gerekli primerleri içeren gen ekspresyon testi ((ThermoFisher Scientific Hs00608387_m1 (NDRG1), Hs00981089_m1 (MRP5)) ve (Roche RealTime ready Catalog Assay (ACTB H.Sapiens))), qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience).

3.5. BESİYERİNİN VE DİĞER SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

3.5.1. Panc-1 İçin Besiyerinin Hazırlanması

DMEM besiyeri enjektör yardımıyla çekilerek 50 ml konik tabanlı tüpe, 0,22 µm por büyüklüğüne sahip uygun filtreden geçirilip son hacmi 44,5 ml olacak şekilde aktarıldı. Üzerine 0,5 ml 100x Penisilin-Streptomisin ve 5 ml FBS filtreden geçirilerek ilave edildi. Elde edilen besiyeri +4 C°'de saklandı. Besiyeri her tükendiğinde yukarıdaki adımlar tekrarlandı. Deneylerde farklı oranda FBS kullanılması gerektiğinde DMEM ve FBS miktarları ilgili orana göre ayarlandı. Aksi belirtilmediği sürece bütün aşamalarda %10 FBS içeren DMEM kullanıldı.

3.5.2. Gempitabin Solüsyonunun Hazırlanması

Gempitabin hidroklorit 59,9 mg tartıldıktan sonra ana stok elde etmek için 1 ml DMSO içinde çözdürüldü ve 0,2 M Gempitabin'e eşdeğer Gempitabin hidroklorit çözeltisi elde edildi. Gempitabin ana stoktan, yine DMSO kullanılarak 5 µM, 20 µM ve 50 µM son konsantrasyonlar olacak şekilde alıgotlandı. -80 C°'de saklanan gempitabin solüsyonları bir kere eritilip kullanıldıktan sonra atıldı ve deney boyunca alıgotlanmış olanlar 0,22 µm por büyüklüğüne sahip uygun filtreden geçirilerek kullanıldı.

3.5.3. PBS Hazırlanması

500 ml steril suya tablet formunda 5 tane PBS atıldı ve vorteks yapılarak iyice çözünmesi sağlandı.

3.5.4. Flavonoidleri İçeren Fenolikler'in Hazırlanması

Karışımın içinde bulunan luteolin, apigenin, pinosembrin gibi maddelerin her biri %60 etanol içerisinde, konsantrasyon 500 µg/ml olacak şekilde çözündürüldü ve -20 C°'de saklandı. İlgili maddeler deneye başlamadan hemen önce, daha önce belirlenen oranlarda (patent aşamasında, İ.Ü. BAP 28301, İ.Ü. BAP 22858) karıştırılıp yine belirli oranda besiyeri eklenerek buradan sonra Fenolikler olarak isimlendirilecek karışım elde edildi.

3.6. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE YAPILANLAR

3.6.1. Hücrelerin Ekilmesi ve Çoğaltılması

Hücre kültüründe yapılan bütün adımlar sterilizasyon kurallarına uyularak ve uygun hava akımına sahip kabinlerin içerisinde gerçekleştirildi. Sıvı azot tankından alınan, içinde Panc-1 hücreleri bulunan kriyoviyal tüp dondurma çözeltisi eriyene kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra önceden 37 C°'ye ısıtılmış olan besiyerinden 1 ml eklendi ve 15'lik konik tabanlı tüpe alındı. 300 RCF'de 6 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pelet halinde bulunan hücreler 1,5 ml besiyeri eklenerek yavaşça kaldırıldı ve pipetaj yapılarak besiyerinin içinde homojen olarak dağılmaları sağlandı. Sonrasında hücreler, önceden inkübatöre konularak 37 C° sıcaklığa ulaşması sağlanan 6-kuyucuklu plakanın 1 kuyucuğuna son hacim 1,5 ml olacak şekilde aktarıldı ve hücrelerin ekimi tamamlandı. Ekilen hücreler 37 C° sıcaklığa, %5 CO₂ içeren nemli bir iç ortama sahip inkübatörde tutularak çoğalmaları sağlandı. Hücrelerin besiyerleri her 2-3 günde 1 kere değiştirildi ve hücre doluluk oranı %80-90 aralığına ulaştığında hücreler önce 25'lik sonra da 75'lik flaska aktarıldı. Daha sonraki aşamalarda hücreler hep 75'lik flasklarda çoğaltıldı.

3.6.2. Hücrelerin Kaldırılması ve Pasajlanması

Öncelikle hücrelerin besiyerleri tamamen çekildi ve hücreler konulan besiyeri hacminin yarısı kadar PBS ile iyice yıkandı ve PBS de çekilerek atıldı. Daha sonra 6-kuyucuklu plaka için 0,5 ml, 25'lik flask için 1 ml ve 75'lik flask için 2 ml olacak şekilde tripsin-EDTA ilave edildi. Tripsin-EDTA eklendikten sonra hücreler tekrar inkübatöre

kaldırıldı ve 5-6 dk beklenerek yüzeyden tamamen ayrılmaları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücrelere tripsin-EDTA miktarının 2 katı kadar besiyeri eklendikten sonra hücreler 15'lik konik tabanlı tüpe alındı. Pipetaj yapılarak homojenize edilen hücrelerin belirli miktarı (50 µl-200 µl) Vi-Cell tüplerine alınıp dilüe edilerek Vi-Cell cihazında hücrelerin sayısı hesaplandı. Konik tabanlı tüpteki hücreler 300 RCF'de 6 dk santrifüj edildi. Supernatant atılırken pelettteki hücreler nazıkçe kaldırılarak homojen dağılımları sağlandıktan sonra istenilen oranda (1/2, 1/3, 1/4 vb.) yeni bir flaska pasajlandı.

3.6.3. Hücrelerin Dondurulması

Santrifüj aşamasına kadar 'hücrelerin kaldırılması ve pasajlanması'ndaki adımlar tekrarlandıktan sonra pelettteki hücreler, %5 DMSO içeren dondurma çözeltisi ile kaldırıldıktan sonra kriyoviyallere 1 ml ve 2-2,5 milyon hücre olacak şekilde aktarıldı. Kriyoviyaller Mr. Frosty'ye alındıktan sonra 2 s -20 C°'de, 24 s -80 C°'de tutuldu ve sonrasında Mr. Frosty'den alınarak sıvı azot tankına yerleştirildi.

3.6.4. Hücrelerin Gemsitabin'e Dirençli Hale Getirilmesi

Bu aşamada hücreler her zaman 75'lik flaska pasajlandı ve her pasajda hücrelerin en az 2 milyonu donduruldu. Bir aksilik olduğunda bu dondurulan hücreler açılarak direnç kazandırmaya devam edildi. Kullanılan yaklaşım hücreleri çok düşük dozlardan itibaren Gemsitabin'e sürekli maruz bırakmak yerine daha yüksek dozlarda aralıklarla maruz bırakmak şeklindedir.

75'lik flaskta bulunan hücreler %90-95 doluluk oranına ulaştığında, normal besiyeri çekilerek yerine ilgili dozda Gemsitabin içeren besiyeri konuldu. Hücreler 72 saat boyunca Gemsitabin içeren besiyerinde inkübe edildikten sonra, besiyeri çekilip hücreler 5 ml PBS ile yıkandı. PBS atıldıktan sonra normal (içinde Gemsitabin içermeyen) besiyeri konuldu. Bu aşamadan sonra hücreler ölmeye devam ettiğinden 2 günde 1 besiyerlerinin değiştirilmesi suretiyle ölü hücreler uzaklaştırıldı. Her besiyeri değişiminden sonra hücrelerin doluluk oranı ve morfolojik durumları mikroskopta kontrol edildi. Bu kontroller sırasında önceden belirlenen bölgelere bakılarak herhangi bir dirençli koloninin oluşup oluşmadığı, yani hayatta kalan hücre veya hücrelerin çoğalarak sayılarını arttırıp arttırmadığı, kontrol edildi. Dirençli kolonilerin ve bu hücrelerdeki toplam hücre sayısının yaklaşık 5 milyonu geçtiği tahmin edildiğinde hücreler dondurulmak ve yeniden ekilmek üzere kaldırıldı. Bu hücreler normal Panc-

1'lerden daha hassas olduğundan yıkama ve peletten kaldırma adımları olabilecek en yavaş şekilde gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler yeni flaskta %90-95 doluluk oranına tekrar ulaştığında bir sonraki doz verilerek adımlar tekrar edildi. Bir sonraki doz hücrelerin tamamının ölmesini engelleyebilmek için en fazla önceki dozun 3 katı olarak belirlendi. Tablo 3-1'de verilen dozların konsantrasyonları ve hücreler bir flaska ekildikten (bir önceki dozdan gelen ya da sıvı azottan açılan hücreler) sonra o hücreleri kaldırıma kadar geçen zaman görülebilir. 50 μ M seviyesinde hücreler sıvı azottan açıldıktan sonra bir üst doz uygulandı. Hücrelere 1. dozun verilmesinden, 300 kat daha yüksek konsantrasyona sahip olan 8. Doz verildikten sonra ilk defa kaldırılmalarına kadar geçen süre yaklaşık olarak 12 aydır. Gempitabin'e karşı dirençli hale gelmiş bu hücreler Panc-1/GEM olarak isimlendirildi.

Tablo 3-1: Direnç Kazandırma Konsantrasyonları ve Geçen Zaman

Doz Sırası	Konsantrasyon (μ M)	Geçen Zaman (Hafta)
1	0,5	3
2	1	4
3	2	3,5
4	4	3,5
5	10	5,5
6	20	6
7	50	7
8	150	4

3.6.5. Hücrelerin Viyabilitelerinin CCK-8 ile Tespit Edilmesi

Hücreler 96-kuyucuklu plakaya, her bir kuyucukta 100 μ l'de 10.000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat inkübatörde bekletildi. Hücrelerin tutunduğu mikroskopta teyit edildikten sonra besiyerleri çekilerek farklı dozlarda Gempitabin, Fenolikler veya ikisinin kombinasyonunu içeren besiyeri verildi ve hücreler inkübatöre geri konuldu. Her bir doz 4 tekrarlı olarak çalışıldı. Ölçüm saatlerinden 2 saat önce, blank ve kontroller dahil bütün kuyucuklara, ışık almayan kabinde 10 μ l CCK-8 eklendikten sonra hücreler yeniden inkübatöre konuldu. Ölçüm zamanı geldiğinde, spektrofotometrede 620 nm

referans dalga boyu olmak üzere, 450 nm dalga boyunda (formazan kristallerinin ışıma yaptığı dalga boyu) bütün plakadaki kuyucukların ölçümü yapıldı. Elde edilen değerler, Excell’de referans ve blank değerleri göz önüne alınarak, yaşayan hücrelerdeki NADH aktivitesiyle doğru orantılı olarak oluşan formazan kristallerinin miktarlarını her bir kuyucuk için göreceli olarak hesaplamakta kullanıldı. Böylece her bir kuyucuktaki hücrelerin viyabiliteleri, kontrol hücrelerinininkini %100 kabul ederek hesaplandı.

3.6.6. Yara-iyileştirme Testinin Yapılması

6-kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 2 milyon hücre ve besiyeri hacmi 1 ml olacak şekilde hücreler ekildi. Hücrelerin proliferasyonlarını yavaşlatmak için %3 FBS içeren DMEM kullanıldı. Hücreler %90-95 doluluğa ulaştığında besiyeri %0,5 FBS içeren DMEM ile değiştirildi. %0,5’lik besiyerinde 24 saat kalan hücrelerle yara-iyileştirme testi gerçekleştirildi ve test esnasında %0,5 FBS içeren DMEM kullanıldı. Yara oluşturmak için 10 µl standart pipet ucu kullanıldı. Yukarıdan aşağıya doğru tek bir hamlede yara açıldıktan sonra hep aynı yerin fotoğrafını çekebilmek için kuyucuğun orta kısmında belirli bir bölgeye dışarıdan işaret konuldu. Sonra besiyeri çekilip atıldı ve kalkan hücrelerden kurtulabilmek için kuyucuklar 500 µl PBS ile 2 kere yıkandı. Yıkamanın ardından hemen ilgili dozları içeren besiyeri eklendi ve 0. saat fotoğrafları çevrik mikroskop ve mikroskop kamerası aracılığıyla 40X toplam büyütmede çekildi. Her kuyucuğun aynı bölgesini fotoğraflama işlemi 4., 8., 24. ve 48. saatlerde de yapıldı. Bu işlem yapılırken besiyeri değiştirilmedi ve hücrelerin hızlı bir şekilde inkübatöre geri dönmesi sağlandı.

Çekilen fotoların analizi ImageJ uygulamasında, bu uygulama için yazılan bir eklenti (<https://github.com/AlejandraArnedo/Wound-healing-size-tool/wiki>, Suarez-Arnedo ve ark. 2020) yardımıyla gerekli ayarlamalar yapılarak gerçekleştirildi. Her bir kuyucuk için yaranın her bir saatteki kapanma yüzdesi o kuyucuğun 0. saatteki yara açıklığı baz alınarak hesaplandı ve ortalamlar alındı.

3.6.7. Hücrelerden Kitle RNA İzolasyonun Yapılması

Hücreler 6-kuyucuklu plakaya 1 kuyucukta 2 milyon hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edilerek tutunmaları sağlandı. Belirlenen dozlar 3 tekrarlı olacak şekilde verildikten sonra hücreler 72 saat inkübatörde tutuldu. 72. saatin sonunda besiyerleri çekildi ve hücreler 500 µl PBS ile yıkandı ve RNA izolasyon kitinde (EXIQON miRCURY™ Isolation Kit – Cell and Plant) belirtilen aşamalar kitte bulunan solüsyonlar ile kitte belirtildiği şekilde adım adım gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonları NanoDrop™ 2000 cihazında ölçüldü ve RNA'lar -80 C°'de saklandı.

3.7. ELDE EDİLEN RNA'LARIN KİTLE cDNA'LARA ÇEVİRİLMESİ

Bir önceki aşamada konsantrasyonları ölçülen RNA'lardan toplam miktar 1 µg olacak şekilde hesaplanan hacimlerde alınarak 0,2 ml'lik PZR tüplerine konuldu ve toplam hacmin 16 µl olması için RNAaz ve DNAaz içermeyen distile su eklendi. Daha sonra her bir tüpe 4 µl cDNA sentez kitinin (NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5x)) solüsyonu eklendi ve bütün tüpler sırasıyla 5 dk 25 C°'de, 30 dk 42 C°'de ve 5 dk 85 C°'de inkübe edildikten sonra 4 C°'de 30 dk bekletildi. Elde edilen cDNA'lar -20 C°'de saklandı.

3.8. GERÇEK-ZAMANLI PZR İLE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

96-kuyucuklu gerçek-zamanlı PZR plakasına, her bir kuyucukta, 1 µl NDRG1, MRP5 ve β-Actin Taqman prob ve primerleri, 2 µl cDNA'lar, 7 µl distile su ve 10 µl Jena'nın qPCR ProbesMaster'ı olacak şekilde eklendi. Hemen ardından plakanın üstü optik yapışkan kapatıcı ile sıkıca kapatıldı ve Tablo 3-2'deki termal profilin kullanıldığı gerçek-zamanlı PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3-2: Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyonunda Kullanılan Termal Profil

cDNA denatürasyonu ve Taq polimerazın aktivasyonu	95 C°'de 2 dk	1 kere
Denatürasyon	95 C°'de 15 sn	35 döngü
Primer bağlanması ve uzaması	60 C°'de 1 dk	

Cihazın mutlak nicelleştirme (absolute quantification) özelliği ve ikinci türev maksimumu (2nd derivative maximum) algoritması yardımıyla Ct değerleri elde edildi. Daha sonra 3 gen için de bütün ΔCt değerleri ayrı ayrı hesaplandı ve doz uygulaması yapılan hücrelerin ΔCt değerlerinden, kontrol hücrelerinin ΔCt değerlerinin ortalaması çıkartılarak her bir örneğin $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. Son olarak kat değişim değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle hesaplandı ve ortalamalar ile standart sapmalar belirlendi. Kat değişimi değerlerinde eşik (cut-off) değerleri 2,0 ve 0,5 olarak kabul edildi.

3.9. KOMBİNASYON GÖSTERGESİNİN HESAPLANMASI

A molekülü veya ilacının belirlenen bir etkiyi (örneğin IC50) oluşturduğu konsantrasyona K_A , aynı etkiyi B molekülünün oluşturduğu konsantrasyona K_B ve bu etkiyi iki molekülün aynı anda oluşturduğu konsantrasyonlara A molekülü için C_A ve B molekülü için C_B dersek, kombinasyon göstergesi (veya endeksi) $(C_A / K_A + C_B / K_B)$ formülü ile hesaplandı.

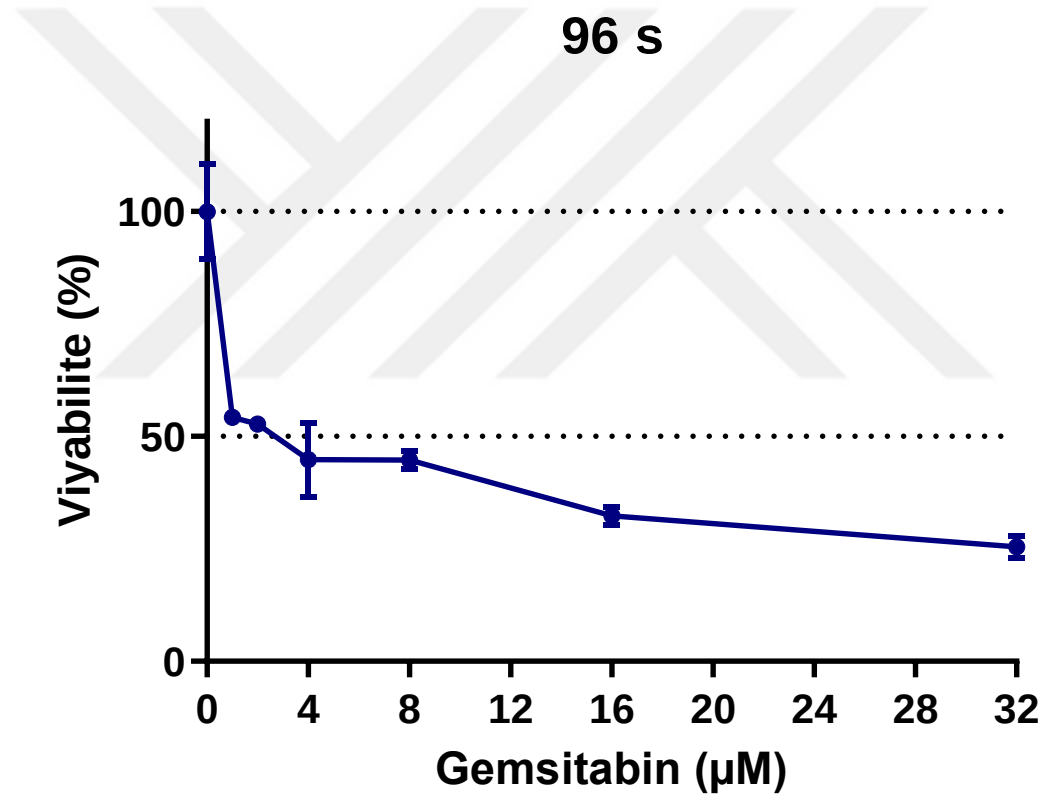
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler Graphpad Prism programıyla yapılmış olup birbirinden bağımsız grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında iki grup olduğunda bağımsız grup t testi, daha fazla grup olduğunda tek yönlü ANOVA testi ve bağımlı iki grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında ise bağımlı örneklem t testi kullanıldı. Tüm testler iki yönlü yapılmış olup 0,05'ten küçük p değerlerinde testin sonucu istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRELERİN GEMSİTABİN'E KARŞI DİRENÇ KAZANDIRILMAYA BAŞLAMADAN ÖNCE IC50 DEĞERİNİN HESAPLANMASI

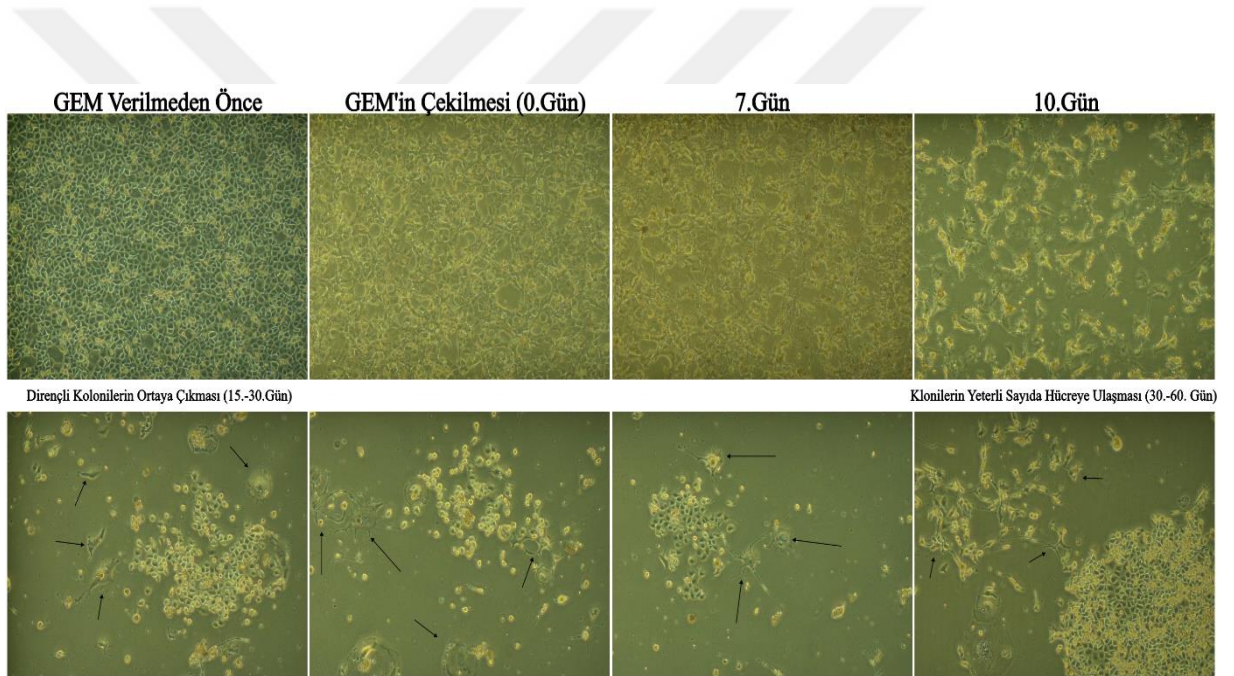
Panc-1 hücrelerinin GEM'e karşı direnç kazanabilmesi için verilecek ilk doz GEM'in belirlenmesi amacıyla yapılan uzun süreli (96 saat) CCK-8 testinin kontrol ortalamasının %100 viyabilitede kabul edildiği sonuçları Şekil 4-1'deki gibidir. Bu sonuçlara göre hesaplanan IC50 değeri 2,5 μ M olup verilecek ilk doz 0,5 μ M olarak belirlendi.



Şekil 4-1: Gemsitabin Verilen Panc-1 Hücrelerinin Viyabilite Grafiği

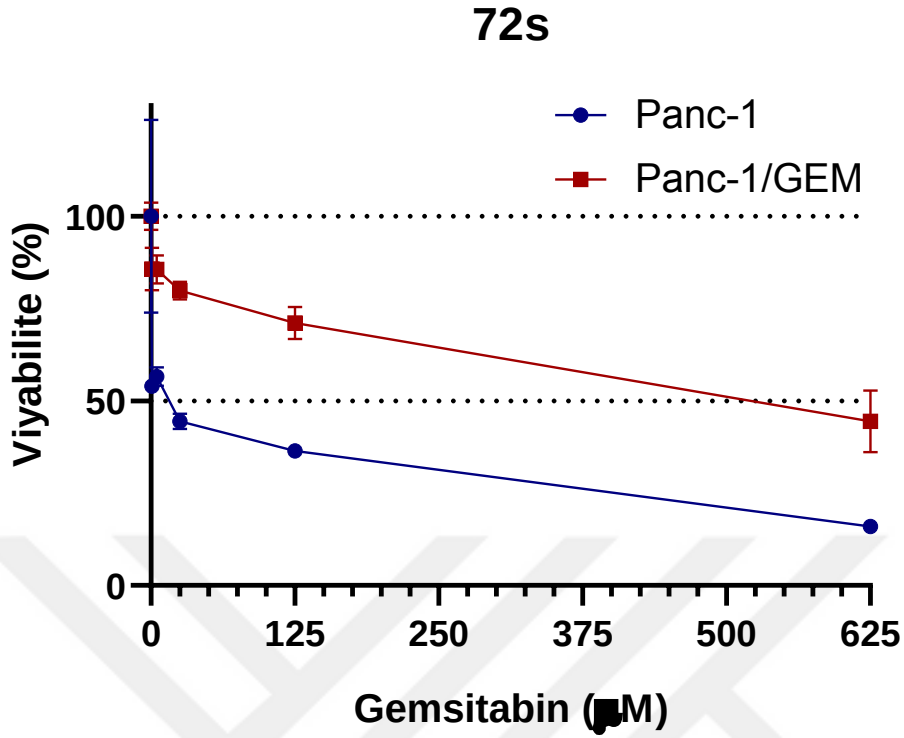
4.2. HÜCRELERİN GEMSİTABİN'E KARŞI DİRENÇ KAZANMASI

Hücreler belirlenen dozda GEM içeren besiyeriyle 72 saat inkübe edildikten sonra dirençli ilk kolonilerin ortaya çıkması 15-30 gün zaman almakta ve eğer bu sürede bazı hücreler çoğalarak koloni oluşturmaya başlamadıysa hücrelerin ya tamamı ölmekte ya da milyon seviyelerine ulaşmaları aylar sürecektir kadar az hücre kalmaktadır. Şekil 4-2’de Hücrelerin son doz GEM verilmeden önce %95 doluluk oranında, GEM çekildikten hemen sonra, 7 gün sonra ve 10 gün sonraki durumları ve ilk kolonilerin ortaya çıktığı ve bu kolonilerin hedeflenen sayıya ulaştığı zamanki durumlarını gösteren fotoğraflar vardır. Oklarla gösterilen hücreler, hala tutunmaya devam eden morfolojileri oldukça değişmiş, çoğalmayan ve dirençli kolonilere dahil olmayan hücrelerden bazılarını göstermektedir (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: GEM Verilen Direnç Kazandırılmaya Çalışılan Hücrelerin 40x Toplam Büyütmedeki Fotoğrafları

Hücrelerin GEM’e karşı direnç kazandırılması için verilen son doz olan 150 μM ’de çoğalmaya başlamasından sonra, kazanılan direnci teyit edebilmek için hücrelere yüksek dozların da dahil olduğu farklı dozlarda GEM verilerek, Panc-1 ve Panc-1/GEM hücrelerinin, tamamen aynı şartlarda ve aynı zamanda viyabiliteleri 72. saat için ölçüldü (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Gemcitabin Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin Viyabilite Grafiği

Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de verilen dozlardaki hücrelerin viyabilite ortalamaları ve standart sapma değerleri görülmektedir. Bu değerlere göre Panc-1 hücrelerinin IC50 değeri yaklaşık 16 μM iken Panc-1/GEM hücrelerinininki ise yaklaşık 555 μM ’dir. Panc-1/GEM hücrelerinin bütün dozlardaki viyabiliteleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Panc-1 hücrelerinininkinden yüksektir (Tablo 4-2).

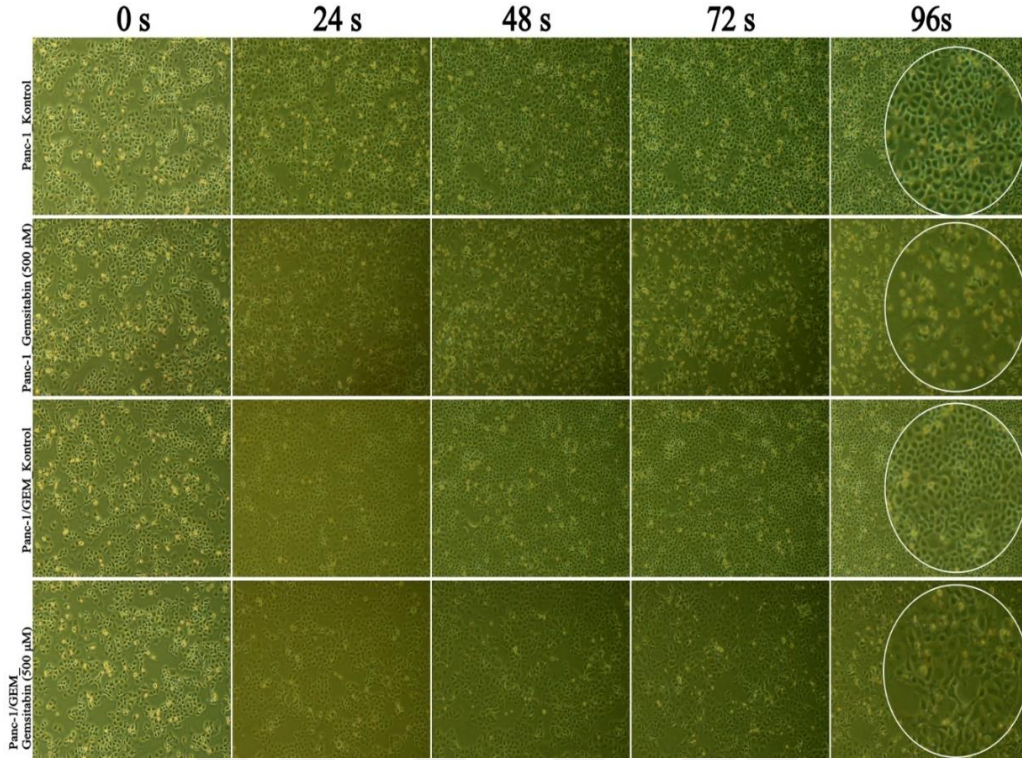
Tablo 4-1: Gemcitabin Verilen Panc-1 Hücrelerinin 72. Saatteki Viyabiliteleri

Doz (μM)	Ort Viyabilite (%)	SS
1	54,02	1,43
5	56,57	2,55
25	44,45	2,05
125	36,45	1,67
625	15,94	0,56

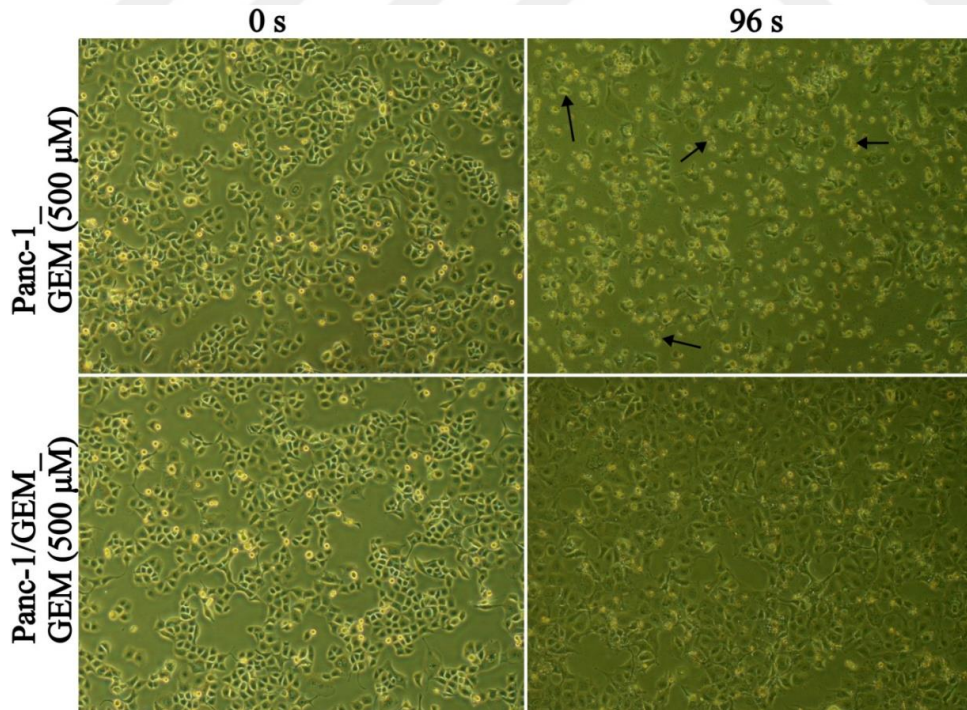
Tablo 4-2: Gemsitabin Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 72. Saatteki Viyabiliteleri

Doz (μ M)	Ort Viyabilite (%)	SS	Viyabilite Panc-1 Hücrelerinden Fazla mı?
1	85,76	5,78	Evet ($p<0,001$)
5	85,60	3,86	Evet ($p<0,001$)
25	79,88	2,34	Evet ($p<0,001$)
125	71,17	4,35	Evet ($p<0,001$)
625	44,42	8,37	Evet ($p<0,001$)

Ayrıca hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin ve hücre doluluk oranlarının gözlenebilmesi için 6-kuyucuklu plakalara aynı sayıda ve aynı anda ekilen iki hücre hattından hücrelerin aynı noktadan 24 saat arayla fotoğrafları çekildi. Kontrol hücrelerine normal besiyeri ve diğer hücrelere içinde yüksek dozda GEM içeren besiyeri verildikten hemen sonra çekilen 0. saat fotoğraflarında hücrelerin büyüklükleri, doluluk oranları ve kendilerine özgü şekilleri 2 farklı hücre hattında ve toplam 4 kuyucukta da birbirine benzerdir. 48. saatte iki hücre hattının da kontrol hücreleri yaklaşık %90-95 doluluk oranında iken, GEM verilen Panc-1 hücrelerin morfolojilerinde uzantılar oluşturma ve normale göre daha büyük hücreler gözlenmekle beraber bazı hücrelerin öldüğü bazılarının da plakaya tutunmayı bıraktığı görülmektedir. Panc-1/GEM hücreleri ise çoğalmayı bıraksalar da tutunmaya devam etmekle beraber morfolojik olarak kontrolle benzerdir. 72. saatte ise artık Panc-1 hücrelerinin yüksek oranda ölü hücreler arası boşluğun arttığı ve tutunamayan hücrelerin sayısının arttığı görülmektedir. Hem şekil 4-4'te hem de sadece 0. ve 96. saatte GEM verilen hücreleri gösteren şekil 4-5'te de görüldüğü gibi Panc-1/GEM hücrelerinin büyük bir kısmı tutunmaya devam etmektedir ve hücreler 0. saate göre daha büyük, hücrelerin membranları daha belirsiz durumdadır. Panc-1 hücrelerinde ise tutunan hücreler, okla gösterilen ölü hücreler ve hücre parçacıklarının arasında zorlukla görülebilmekte, tutunmaya devam eden hücrelerin birbirleriyle temasının azaldığı ve hücrelerin normalden büyük ve çeşitli uzantılar yaptığı gözlenmektedir.



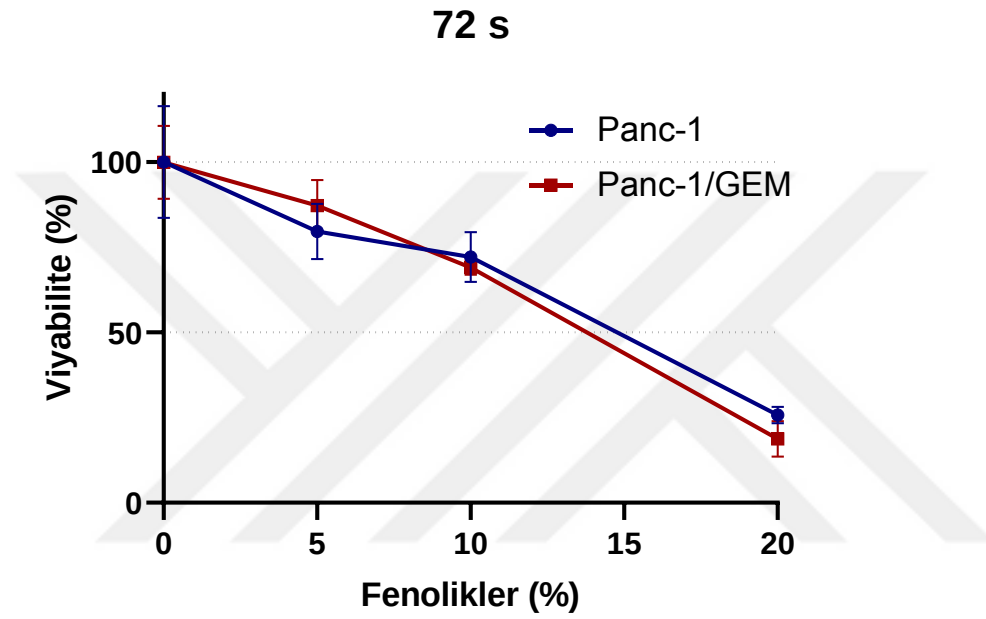
Şekil 4-4: Gempitabin (500 µM) Verilen Hücrelerin ve Kontrol Hücrelerinin 24 s Aralıklı Olarak 40x Toplam Büyütmde Çekilen Fotoğrafları



Şekil 4-5: Yüksek Doz Gempitabin (500 µM) Verilen Hücrelerin Doz Verildiği Andaki ve 96 Saat Sonraki 40x Toplam Büyütmde Çekilen Fotoğrafları

4.3. HÜCRELERDE FENOLİKLER'İN VİYABİLİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

İki hücre hattına da aynı anda ve aynı şartlar altında %100 olarak hazırlanan Fenolikler belirli oranlarda verilerek ölçülen 72. ve 96. saatlerdeki, kontrol ortalamasının %100 kabul edildiğindeki, viyabilitelerinin grafiği Şekil 4-6' ve Şekil 4-7'de ve ortalama değerler ile standart sapmalar Tablo 4-3, Tablo 4-4, tablo 4-5 ve Tablo 4-6'da görülebilir.



Şekil 4-6: Fenolikler Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Viyabiliteleri

Tablo 4-3: Fenolikler Verilen Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar

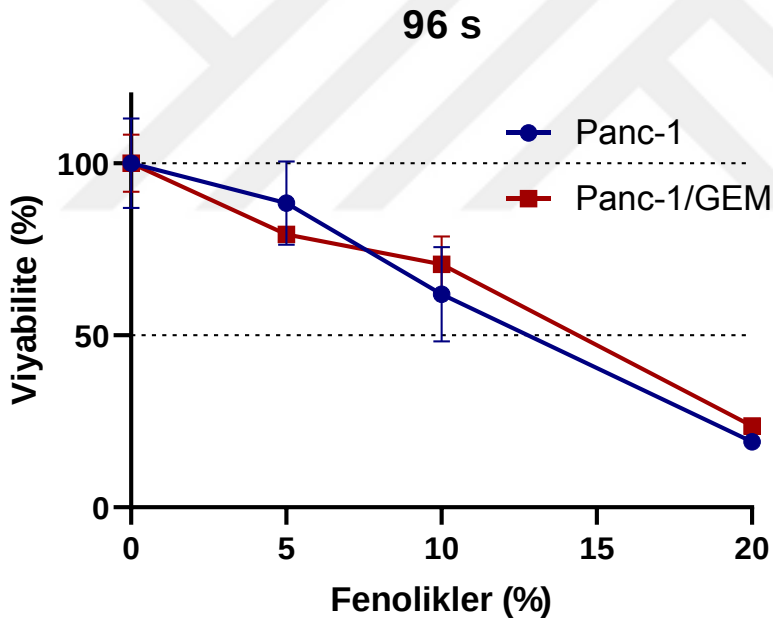
Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS
5	79,64	8,07
10	72,19	7,29
20	25,74	2,41

Ek olarak Tablo 4-4 ve Tablo 4-6'da Fenolikler'in iki hücre hattındaki viyabilite değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı olup olmadığına dair yapılan

analizin vardır. Buna göre hem 72. hem de 96. saatte verilen bütün dozlardaki viyabiliteler anlamlı ölçüde birbirinden farklı değildir.

Tablo 4-4: Fenolikler Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri, Standart Sapmalar ve Farklılık Sonuçları

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS	Viyabilite Panc-1 Hücrelerinden Farklı mı?
5	87,23	7,53	Hayır (p=0,34)
10	69,06	2,13	Hayır (p=0,49)
20	18,74	5,23	Hayır (p=0,11)



Şekil 4-7: Fenolikler Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin 96.Saatteki Viyabiliteleri

Tablo 4-5: Fenolikler Verilen Panc-1 Hücrelerinin 96.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS
---------	--------------------	----

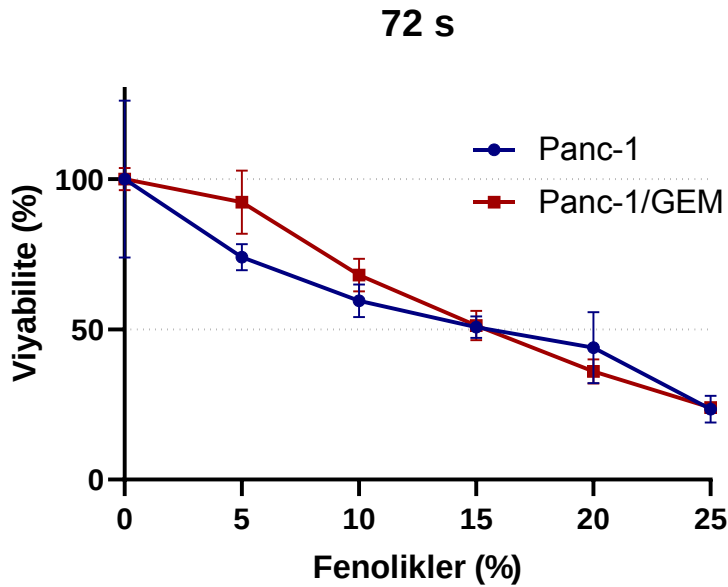
5	88,44	12,09
10	61,93	13,71
20	19,08	1,70

Tablo 4-6: Fenolikler Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 96.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri, Standart Sapmalar ve Farklılık Sonuçları

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS	Viyabilite Panc-1 Hücrelerinden Farklı mı?
5	79,33	2,33	Hayır (p=0,20)
10	70,66	8,14	Hayır (p>0,99)
20	23,68	1,43	Hayır (p=0,11)

Bu verilere göre Fenolikler'in Panc-1/GEM hücrelerindeki 96.saatteki IC50 değeri yaklaşık %14 ve Panc-1 hücrelerindeki IC50 değeri yaklaşık %13'tür.

Ayrıca IC50 değerini daha net hesaplamak için 72. saat deneyi daha fazla doz ile tekrarlandı ve sonuçlar Şekil 4-8, Tablo 4-7 ve Tablo 4-8'dedir.



Şekil 4-8: Fenolikler Verilen Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Viyabiliteleri 2

Tablo 4-7: Fenolikler Verilen Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar 2

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS
5	74,03	4,35
10	59,53	5,40
15	50,71	3,64
20	43,94	11,84
25	23,46	4,48

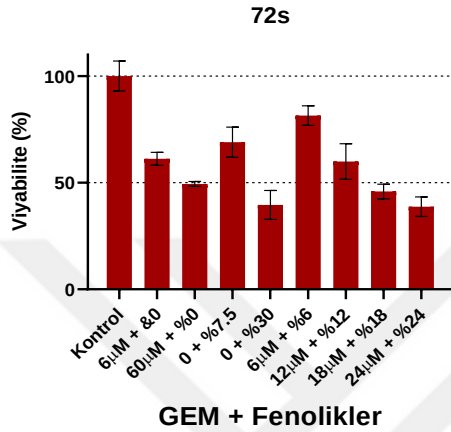
Tablo 4-8: Fenolikler Verilen Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri, Standart Sapmalar ve Farklılık Sonuçları 2

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS	Viyabilite Panc-1 Hücrelerinden Farklı mı?
5	92,31	10,52	Hayır (p=0,06)
10	68,08	5,38	Hayır (p=0,06)
15	51,28	4,87	Hayır (p>0,99)
20	35,98	4,01	Hayır (p=0,34)
25	23,97	1,65	Hayır (p=0,69)

Fenoliklerin viyabiliteye olan etkileri her iki hücre hattında bütün dozlarda istatistiksel olarak birbirinde farklı değildir. Bu sonuçlardan ve çizilen grafiklerden Fenolikler'in iki hücre hattı için de 72. saatteki IC50 değeri yaklaşık %15,5 olarak hesaplandı.

4.4. HÜCRELERDE FENOLİKLER'İN VE GEMSİTABİN'İN KOMBİNASYON GÖSTERGELERİNİN HESAPLANMASI

Fenolik'ler ile GEM arasında sinerjistik bir etki olup olmadığını araştırmak için ikisinin birlikte verildiği Panc-1 hücrelerinin viyabiliteleri 72. saatte ölçüldü. Sonuçlar sayısal olarak Tablo 4-9'da grafik olarak Şekil 4-9'dadır.



Şekil 4-9: Fenolikler, Gemsitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri

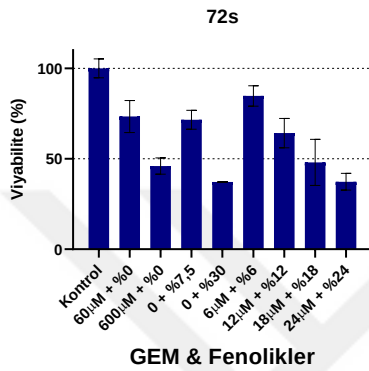
Bu ölçümlerde, kombinasyon göstergesini net hesaplayabilmek için, tek verildiklerinde hesaplanan IC50 değerinin bir altında bir de üstünde bir değerde verilerek bu deney plakasına özgü değerler hesaplandı.

Tablo 4-9: Fenolikler, Gemsitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1 Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS
6µM + %0	61,18	3,02
60µM + %0	49,41	1,13
0 + %7,5	68,98	7,04
0 + %30	39,56	6,76
6µM + %6	81,45	4,60
12µM + %12	59,91	8,32
18µM + %18	45,87	3,43
24µM + %24	38,71	4,61

Bu değerlerden hesaplanan IC50 değerleri Gemsitabin için 54 μ M, Fenolikler için %21,7 ve ikisi birlikte verildiğinde 17,0 μ M + %17,0 olarak hesaplandı. Buna göre hesaplanan kombinasyon göstergesi 1,09'dur.

Fenolikler ile Gemsitabin arasında sinerjistik bir etki olup olmadığını araştırmak için ikisinin birlikte verildiği Panc-1/GEM hücrelerinin viyabiliteleri 72. saatte ölçüldü. Sonuçlar sayısal olarak Tablo 4-10'da grafik olarak Şekil 4-10'dadır.



Şekil 4-10: Fenolikler, Gemsitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri

Tablo 4-10: Fenolikler, Gemsitabin ve İkisinin Birlikte Verildiği Panc-1/GEM Hücrelerinin 72.Saatteki Ortalama Viyabiliteleri ve Standart Sapmalar

Doz (%)	Ort Viyabilite (%)	SS
60µM + %0	73,36	8,85
600µM + %0	45,94	4,48
0 + %7,5	71,56	5,22
0 + %30	37,20	0,17
6µM + %6	84,71	5,64
12µM + %12	64,19	8,14
18µM + %18	47,98	12,73
24µM + %24	37,29	4,62

Bu değerlerden hesaplanan IC50 değerleri GEM için 578 μ M, Fenolikler için %22,5 ve ikisi birlikte verildiğinde 18,2 μ M + %18,2 olarak hesaplandı. Buna göre hesaplanan kombinasyon göstergesi 0,84'tür.

4.5. YARA-İYİLEŞTİRME TESTİ İLE HÜCRE MİGRASYONLARININ ÖLÇÜMÜ

4.5.1. 1. Yara-İyileştirme Testi

Yara-iyileştirme testi 2 farklı dozda yapıldı. 1. testte hücrelere, Panc-1 hücrelerinin IC50 değerlerine yakın olan, 15 µM GEM tek başına, %15 Fenolikler tek başına ve bu ikisi birlikte verildi. Bu teste elde edilen ortalama kapanma yüzdeleri ve bu yüzdelerin ilgili hücre hattının kontrol grubuyla o saat için farklı olup olmadığına dair p-değerleri 4 farklı saat için Tablo 4-11'dedir. Kontrol hücrelerine sadece besiyeri verilirken, GEM hücrelerine sadece Gemsitabin, Fenolikler hücrelerine Fenolikler ve Birlikte hücrelerine GEM ve Fenolikler'in ikisi birlikte yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda olacak şekilde besiyerinin içinde verildi.

Tablo 4-11: Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testi Sonucu Farklı Saatlerdeki 0. Saate Göre Kapanma Yüzdeleri 1

Hücre hattı-Verilen Madde	4. Saat Kapanma (% ±SS)	8. Saat Kapanma (% ±SS)	24. Saat Kapanma (% ±SS)	48. Saat Kapanma (% ±SS)
Panc-1-Kontrol	7,77 ±4,83	16,80 ±4,32	25,39 ±3,34	32,41 ±5,72
Panc-1-GEM	10,51 ±2,81 (p=0,440)	12,90 ±3,28 (p=0,281)	17,86 ±3,45 (p=0,053)	31,98 ±3,87 (p=0,919)
Panc-1-Fenolikler	-0,02 ±0,38 (p=0,049)	-0,08 ±0,28 (p=0,003)	-2,02 ±4,22 (p<0,001)	1,33 ±1,03 (p<0,001)
Panc-1-Birlikte	-0,68 ±1,07 (p=0,042)	0,21 ±1,53 (p=0,003)	-2,56 ±3,11 (p<0,001)	-1,43 ±8,54 (p=0,005)
Panc-1/GEM-Kontrol	11,90 ±1,23	16,69 ±2,42	24,93 ±2,54	35,41 ±3,52
Panc-1/GEM-GEM	8,481 ±0,87 (p=0,017)	11,55 ±1,28 (p=0,031)	18,94 ±1,89 (p=0,030)	31,86 ±4,62 (p=0,349)
Panc-1/GEM-Fenolikler	1,49 ±1,38 (p<0,001)	2,38 ±1,25 (p<0,001)	-0,35 ±1,22 (p<0,001)	0,32 ±1,74 (p<0,001)

Panc-1/GEM-Birlikte	-0,268 ± 0,85 (p<0,001)	-0,454 ± 0,72 (p<0,001)	-0,95 ± 1,07 (p<0,001)	-0,97 ± 1,47 (p<0,001)
----------------------------	----------------------------	----------------------------	---------------------------	---------------------------

Bu sonuçlara göre Fenolikler ve Gemsitabin ile Fenolikler iki hücre hattında da bütün saatlerde kapanma yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı olarak düşürmektedir. Gemsitabin ise Panc-1 hücrelerinde bütün saatlerde bir etkisi yokken Panc-1/GEM hücreleri üzerinde erken saatlerde az da olsa istatistiksel olarak anlamlı olarak kapanma yüzdesini düşürmüştür.

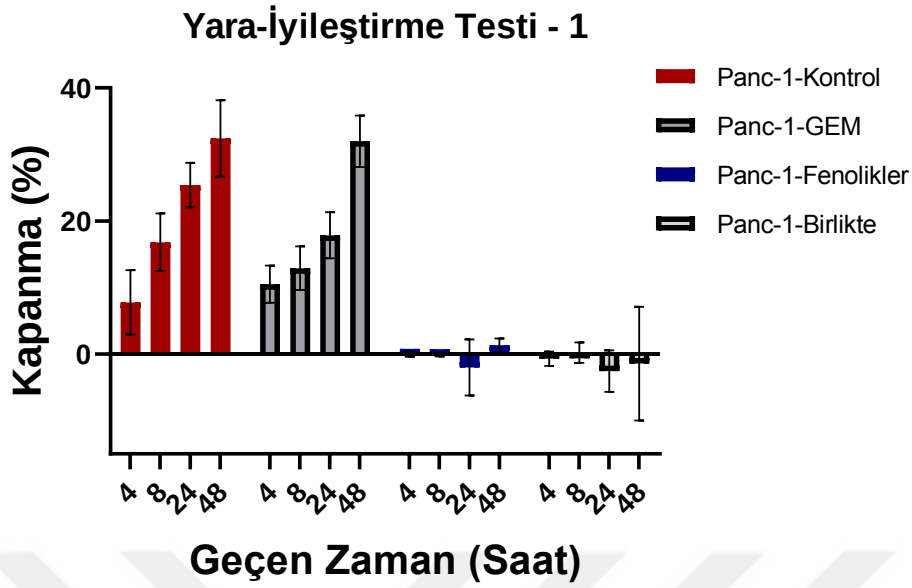
Panc-1 hücrelerinin kapanma yüzdelerinin Panc-1/GEM hücrelerinininkinden istatistiksel olarak farklı olup olmadığına dair yapılan testin sonuçları Tablo 4-12'dedir.

Tablo 4-12: Panc-1/GEM Hücrelerinde Kapanma Yüzdelerinin Panc-1 Hücrelerinininkinden Farkına İlişkin Analiz 1

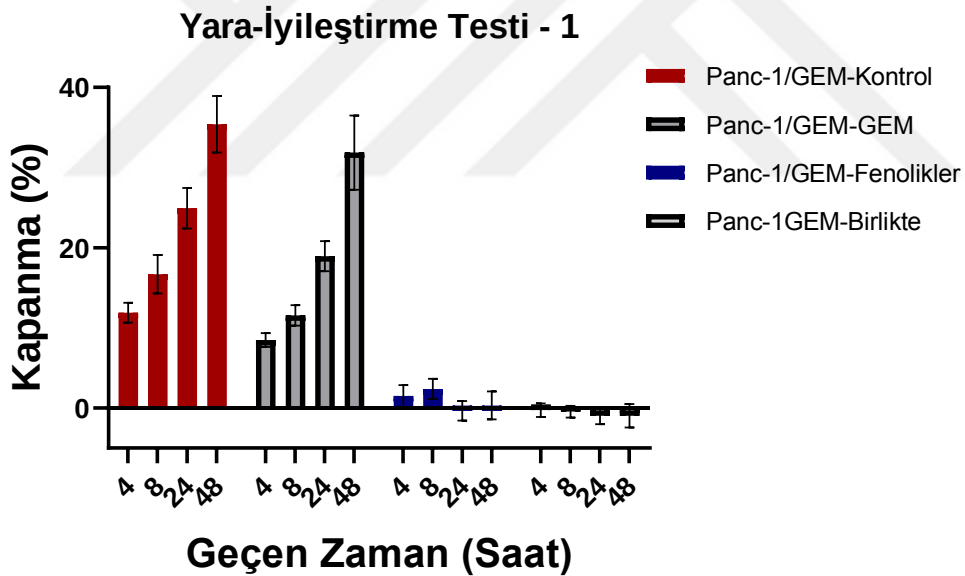
Verilen Madde	4. Saat	8. Saat	24. Saat	48. Saat
GEM	Hayır (p=0,299)	Hayır (p=0,544)	Hayır (p=0,659)	Hayır (p=0,974)
Fenolikler	Hayır (p=0,143)	<u>Evet (p=0,030)</u>	Hayır (p=0,558)	Hayır (p=0,437)
Birlikte	Hayır (p=0,625)	Hayır (p=0,534)	Hayır (p=0,444)	Hayır (p=0,931)

Tablo 4-12'deki sonuçlara göre Fenoliklerin 8. saati hariç verilen maddelerin iki hücre hattının migrasyonları üzerinde istatistiksel anlamda farklı bir etkisi yoktur.

Panc-1 hücrelerin ortalama kapanma yüzdelerinin tamamı tek grafik olarak Şekil 4-11'de görülebilir. Panc-1/GEM hücrelerinininkiler ise Şekil 4-12'dedir.

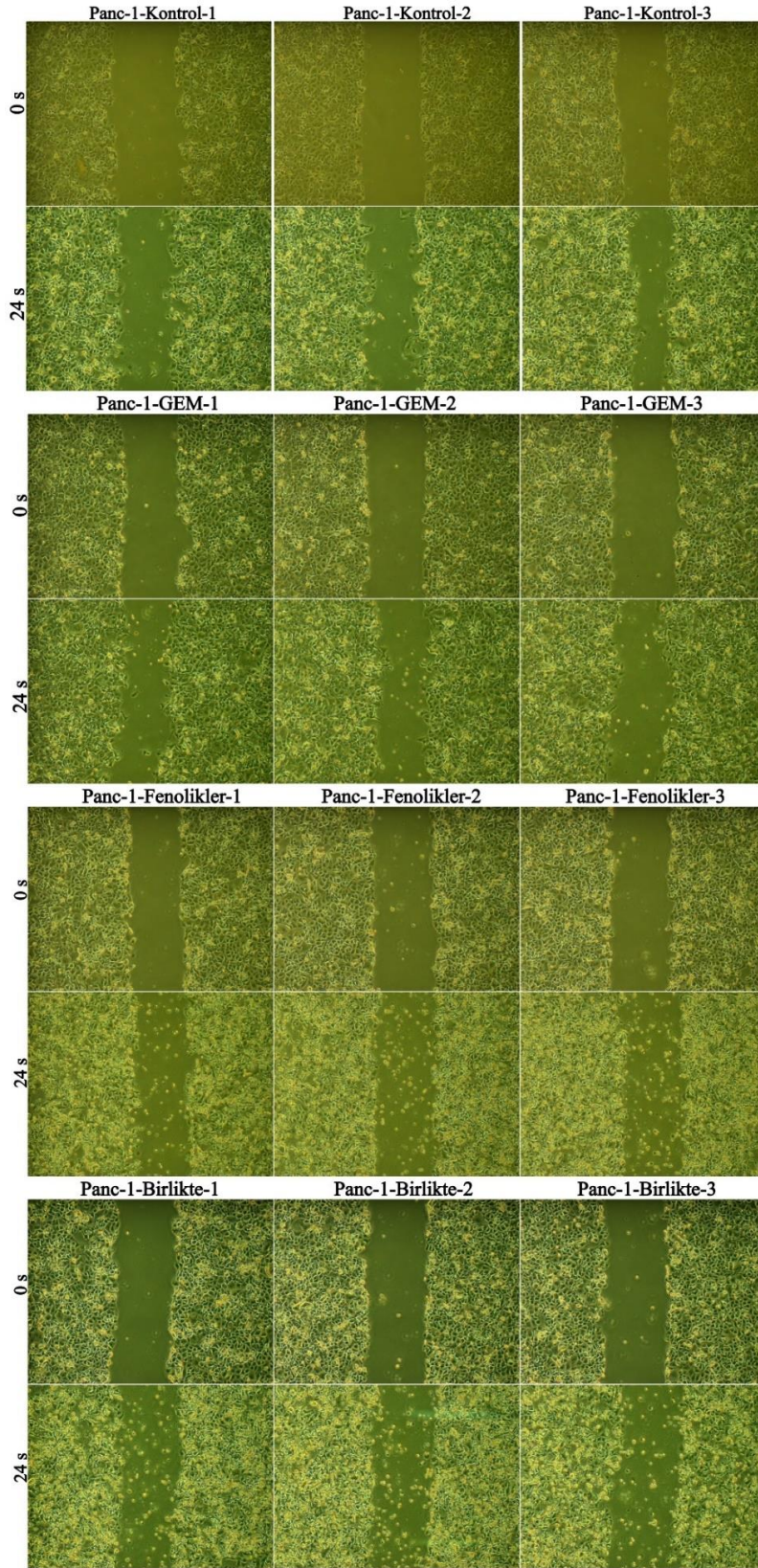


Şekil 4-11: Panc-1 Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 1

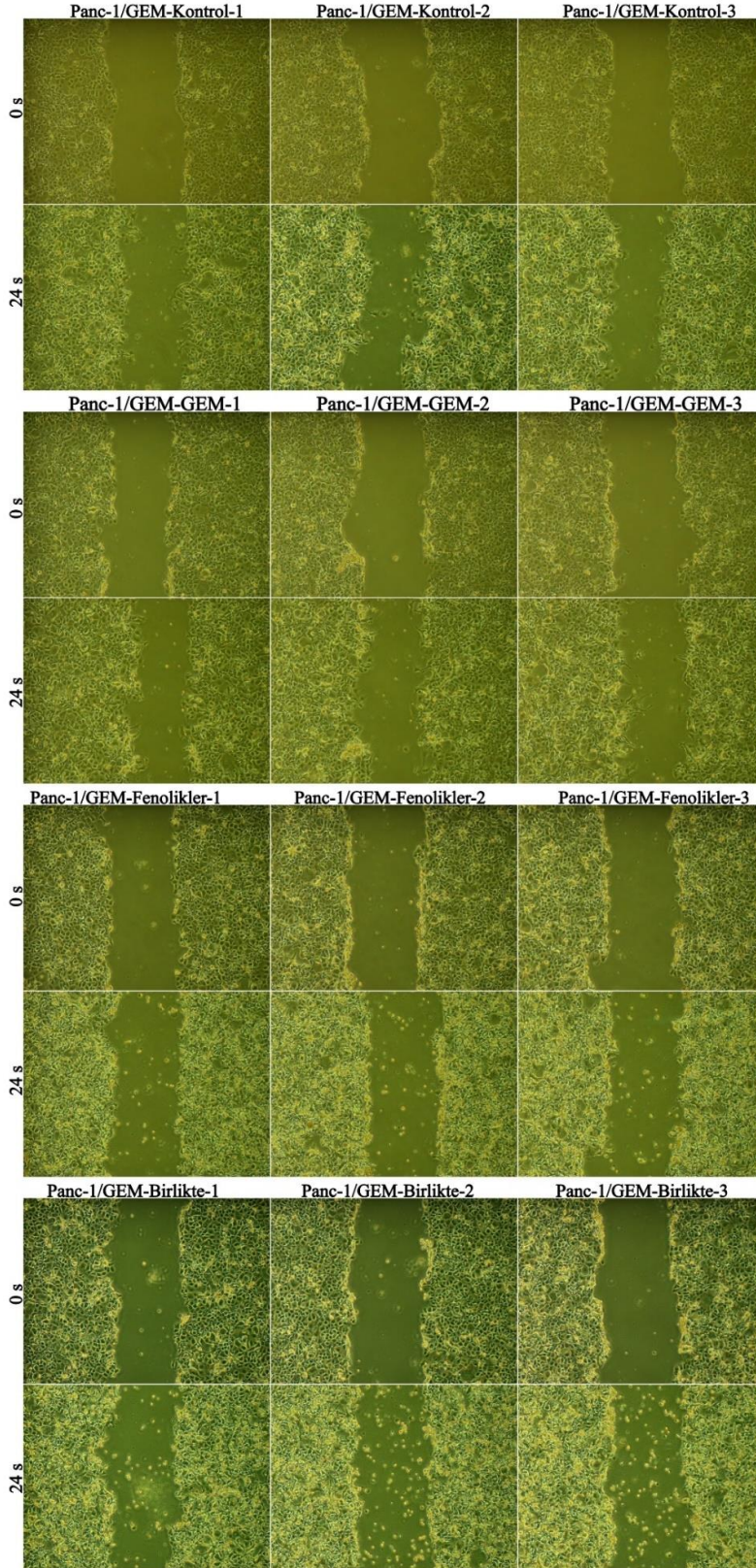


Şekil 4-12: Panc-1/GEM Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 1

Ek olarak, bu hücrelerin normal besiyeri ve belirtilen konsantrasyonları içeren besiyeri verildikten hemen sonraki (0 s) ve 24.saatteki hesaplamalarda kullanılan fotoğraflar 3 tekrarlı olmak üzere Panc-1 hücreleri için Şekil 4-13'te ve Panc-1/GEM hücrelerin için Şekil 4-14'tedir.



Şekil 4-13: Panc-1 Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 1



Şekil 4-14: Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 1

4.5.2. 2. Yara-İyileştirme Testi

2. testte ise hücrelere, Panc-1 hücreleri için IC50 değerlerinden daha düşük olan, 5 µM Gemsitabin tek başına, %7,5 Fenolikler tek başına ve bu ikisi birlikte verildi. Bu teste elde edilen ortalama kapanma yüzdeleri, bu yüzdelerin ilgili hücre hattının kontrol grubuyla o saat için farklı olup olmadığına dair analiz sonuçlarının p-değerleri 4 farklı saat için Tablo 4-13'te verilmiştir.

Tablo 4-13: Panc-1 ve Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testi Sonucu Farklı Saatlerdeki 0. Saate Göre Kapanma Yüzdeleri 2

Hücre hattı-Verilen Madde	4. Saat Kapanma (% ±SS)	8. Saat Kapanma (% ±SS)	24. Saat Kapanma (% ±SS)	48. Saat Kapanma (% ±SS)
Panc-1-Kontrol	13,45 ±4,14	35,67 ±4,18	55,09 ±2,19	52,96 ±4,20
Panc-1-GEM	13,69 ±1,96 (p=0,932)	35,2 ±2,02 (p=0,870)	45,97 ±2,49 (p=0,009)	45,56 ±2,27 (p=0,055)
Panc-1-Fenolikler	-3,09 ±2,77 (p=0,005)	-0,07 ±2,75 (p<0,001)	17,19 ±3,49 (p<0,001)	13,33 ±1,74 (p<0,001)
Panc-1-Birlikte	-2,96 ±0,65 (p=0,003)	-0,01 ±1,01 (p<0,001)	17,19 ±3,34 (p<0,001)	11,82 ±3,71 (p<0,001)
Panc-1/GEM-Kontrol	4,99 ±1,40	21,41 ±1,41	40,90 ±5,46	40,23 ±7,75
Panc-1/GEM-GEM	7,21 ±3,70 (p=0,385)	21,74 ±1,62 (p=0,806)	36,66 ±7,15 (p=0,369)	44,27 ±2,11 (p=0,433)
Panc-1/GEM-Fenolikler	-3,33 ±0,23 (p<0,001)	-1,15 ±1,05 (p<0,001)	9,65 ±3,26 (p=0,001)	7,37 ±5,17 (p=0,004)
Panc-1/GEM-Birlikte	-0,57 ±3,33 (p=0,056)	2,10 ±3,54 (p<0,001)	12,65 ±4,28 (p=0,002)	12,65 ±4,31 (p=0,006)

Bu sonuçlara göre bu teste de Fenolikler ve GEM + Fenolikler iki hücre hattında da bütün saatlerde kapanma yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı olarak düşürmektedir. GEM ise Panc-1 hücrelerinin 24.saat hariç bütün saatlerde ve Panc-1/GEM hücrelerinin bütün saatlerde kapanma yüzdelerini anlamlı ölçüde değiştirmemiştir.

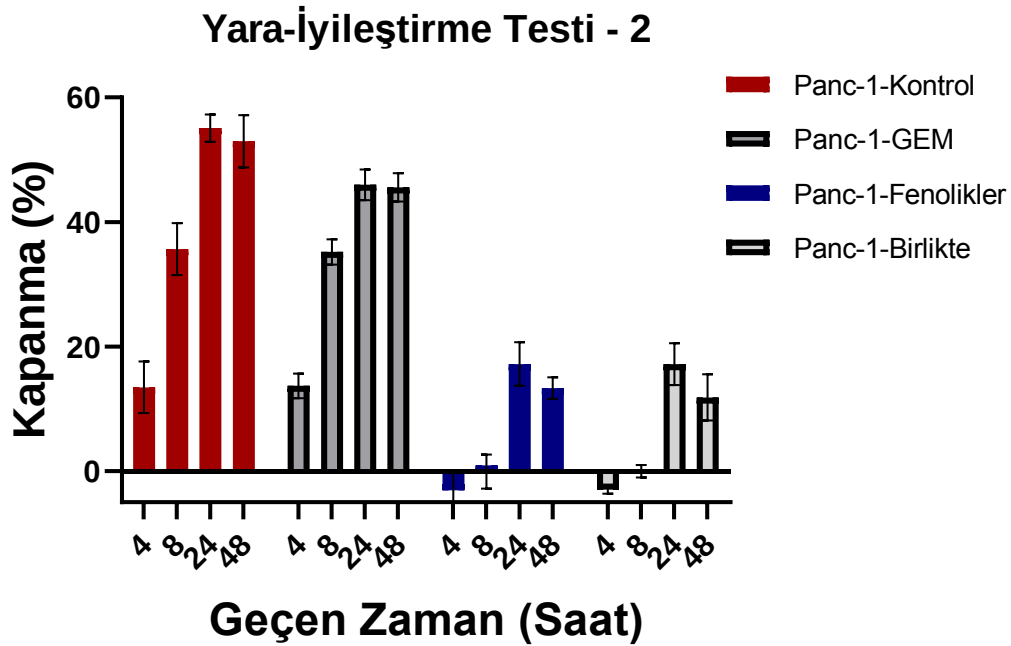
Bu dozlar için Panc-1 hücrelerinin kapanma yüzdelerinin Panc-1/GEM hücrelerinininkinden istatistiksel olarak farklı olup olmadığına dair yapılan testin sonuçları Tablo 4-14'tedir.

Tablo 4-14: Panc-1/GEM Hücrelerinde Kapanma Yüzdelerinin Panc-1 Hücrelerinininkinden Farkına İlişkin Analiz 2

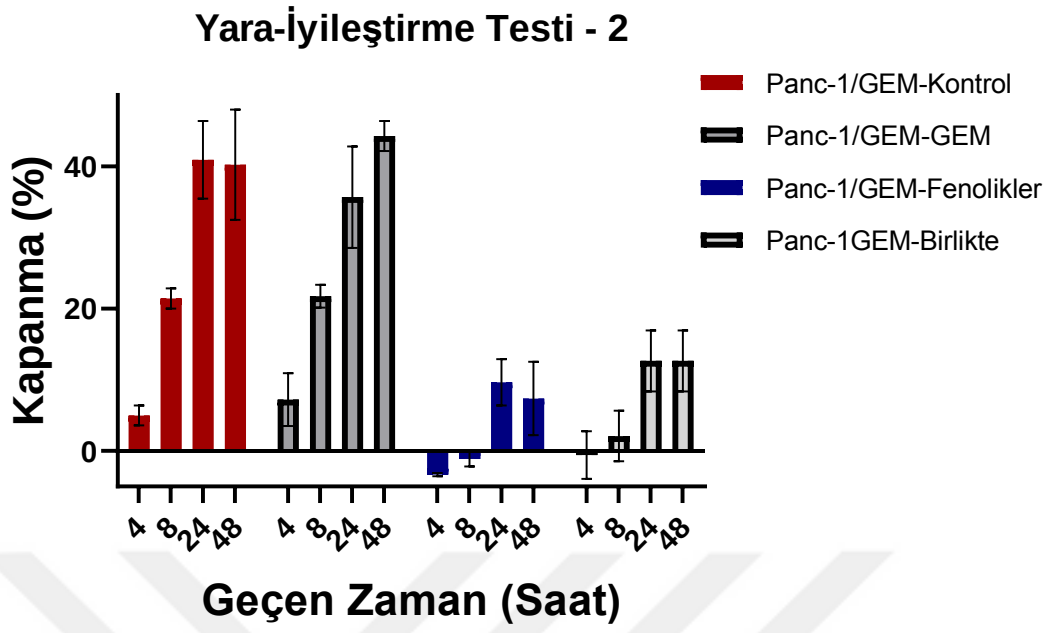
Verilen Madde	4. Saat	8. Saat	24. Saat	48. Saat
GEM	Hayır (p=0,055)	<u>Evet (p<0,001)</u>	Hayır (p=0,078)	Hayır (p=0,510)
Fenolikler	Hayır (p=0,892)	Hayır (p=0,560)	Hayır (p=0,052)	Hayır (p=0,132)
Birlikte	Hayır (p=0,291)	Hayır (p=0,337)	Hayır (p=0,221)	Hayır (p=0,814)

Tablo 4-14'teki sonuçlara göre gemsitabin'in 8. saati hariç verilen maddelerin iki hücre hattının migrasyonları üzerinde istatistiksel anlamda farklı bir etkisi yoktur.

Panc-1 hücrelerin ortalama kapanma yüzdeleri 4 farklı saat için tamamı tek grafik olarak Şekil 4-15'te görülebilir. Panc-1/GEM hücrelerinininkiler ise Şekil 4-16'dedir.

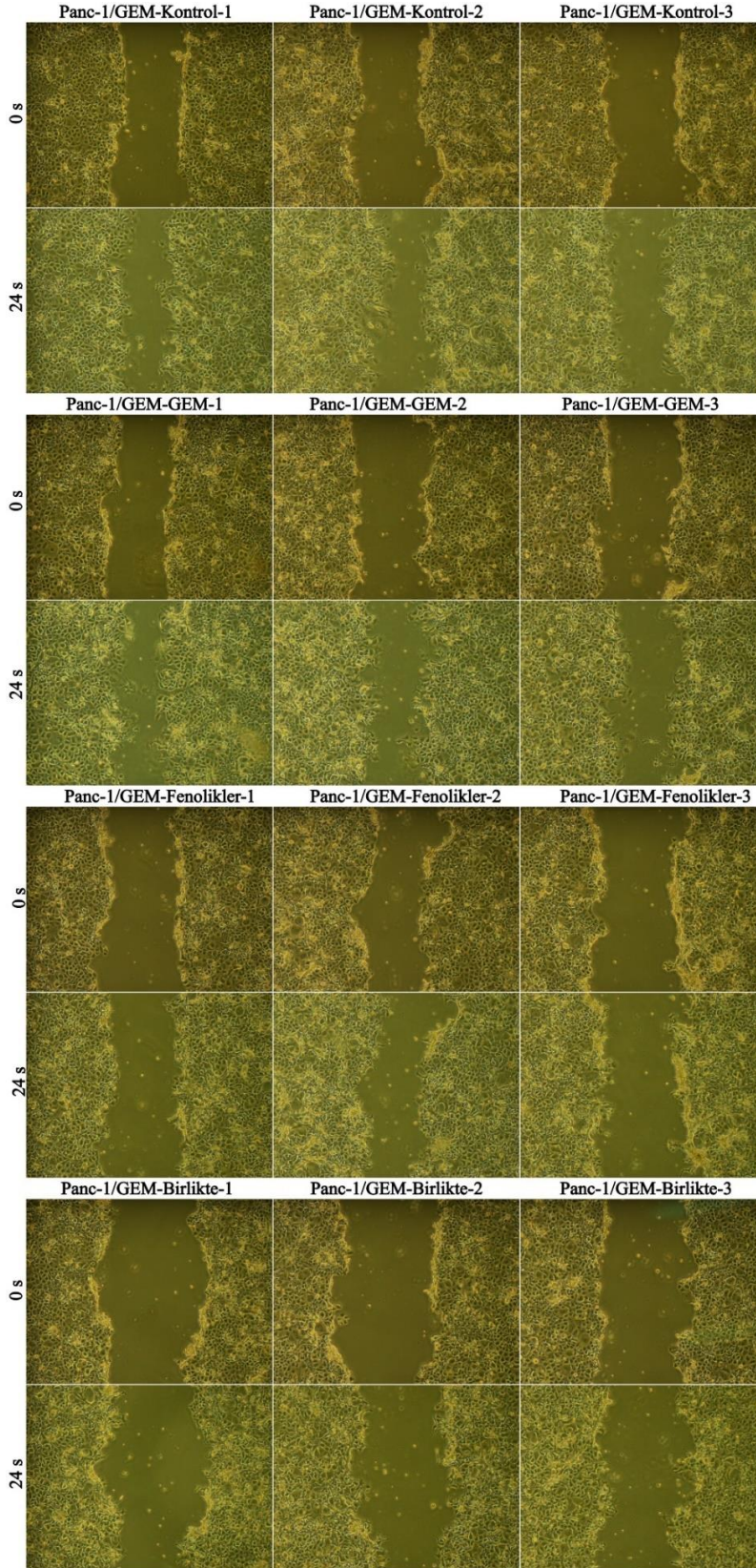


Şekil 4-15: Panc-1 Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 2

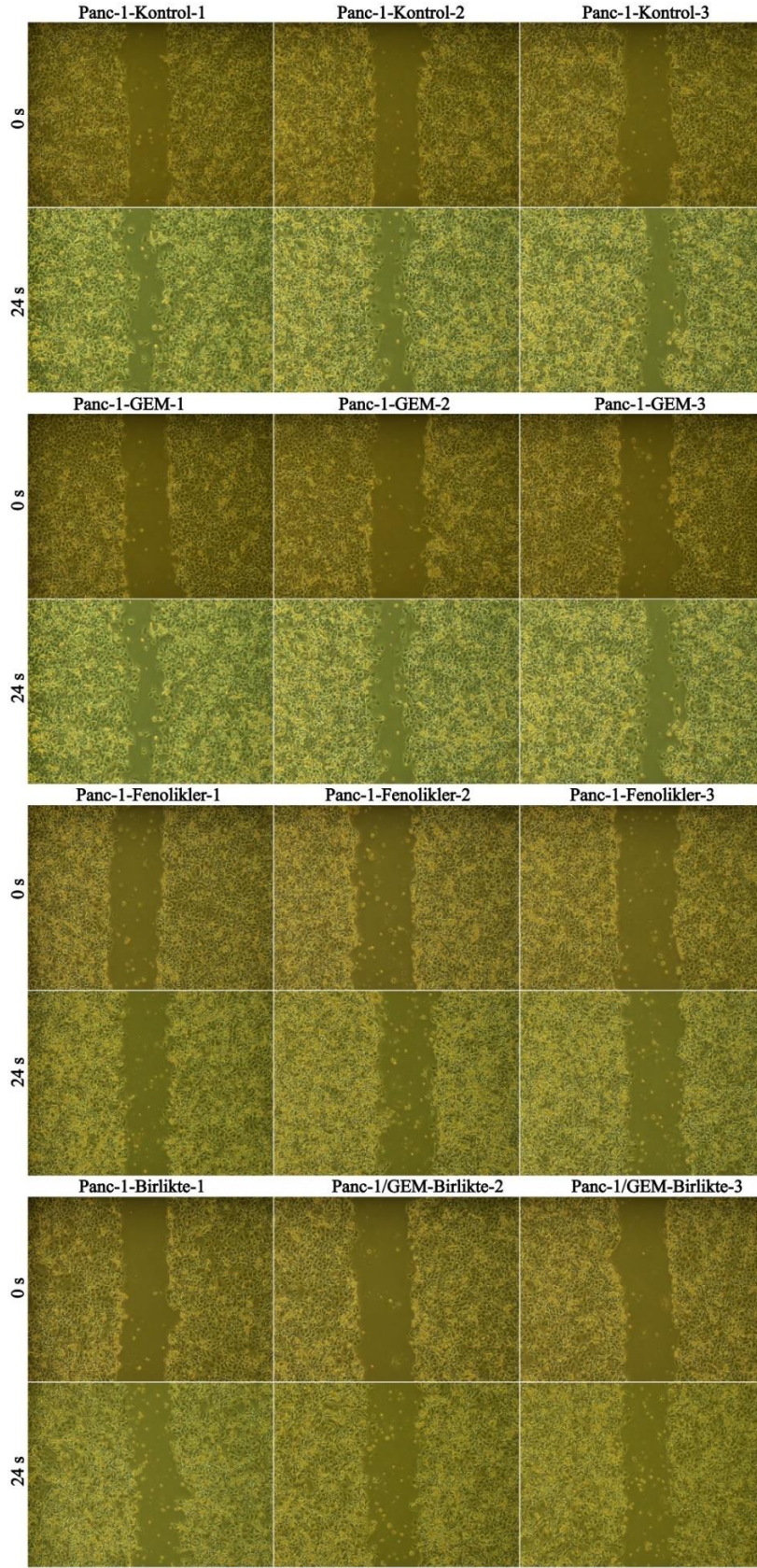


Şekil 4-16: Panc-1/GEM Hücrelerinin Ortalama Kapanma Yüzdeleri 2

Ayrıca, 0. ve 24.saatlerdeki hesaplamalarda kullanılan fotoğrafları 3 tekrarlı olmak üzere Panc-1 hücreleri için Şekil 4-17’de ve Panc-1/GEM hücrelerin için Şekil 4-18’dedir.



Şekil 4-17: Panc-1 Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 2



Şekil 4-18: Panc-1/GEM Hücrelerinin Yara-İyileştirme Testinde Kullanılan 0. ve 24. Saatlerdeki Fotoğrafları 2

4.6. NDRG1 VE MRP5 GENLERİNİN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

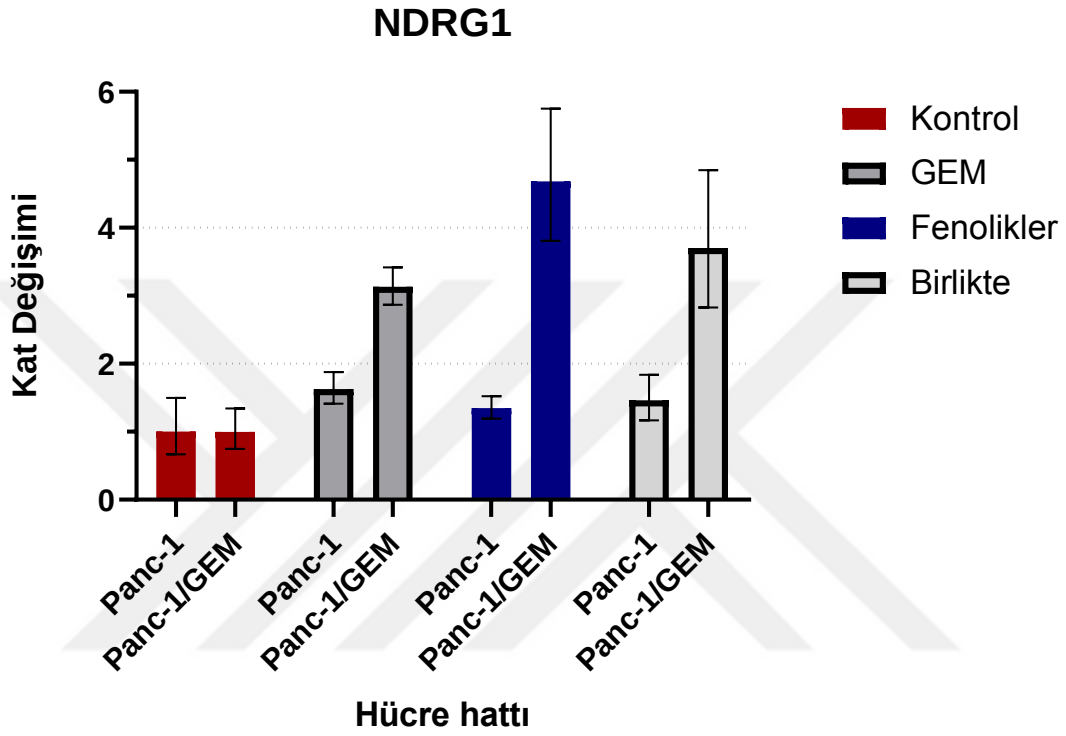
Ekspresyonların belirlenmesi için hücelere, normal besiyeri ve içinde 15 μ M GEM tek başına, %15 Fenolikler tek başına ve ikisinin birlikte bulunduğu besiyerleri hücelere verildikten ve hücreler tamamen aynı şartlarda 72 saat inkübe edildikten sonra beta-Aktin geni referans alınarak delta Ct değerleri ve hücrelerin normal besiyeri verilenlerin (kontrol hücrelerinin) delta Ct değerlerinin ortalaması referans alınarak delta delta Ct değerleri hesaplandı (Tablo 4-15 ve Tablo 4-16). Bu delta delta Ct değerlerinden belirlenen konsantrasyonlara ilişkin hesaplanan kat değişim değerleri NDRG1 için Şekil 4-18’de ve MRP5 için ise Şekil 4-19’dadır.

4.6.1. NDRG1

Tablo 4-15: NDRG1’in $\Delta\Delta$ Ct değerleri ve Farklılık Analizi Sonuçları

Hücre Hattı-Verilen Madde	Ort $\Delta\Delta$ Ct $\pm$ SS	Kontrolden Farklı mı?
Panc-1-Kontrol	0 $\pm$ 0,58	
Panc-1-GEM	-0,70 $\pm$ 0,21	Hayır (p=0,119)
Panc-1-Fenolikler	-0,43 $\pm$ 0,18	Hayır (p=0,277)
Panc-1-Birlikte	-0,55 $\pm$ 0,33	Hayır (p=0,227)
Panc-1/GEM-Kontrol	0 $\pm$ 0,424	
Panc-1/GEM-GEM	-1,65 $\pm$ 0,13	Evet (p=0,003)
Panc-1/GEM-Fenolikler	-2,23 $\pm$ 0,30	Evet (p=0,002)
Panc-1/GEM-Birlikte	-1,89 $\pm$ 0,39	Evet (p=0,003)

Bu $\Delta\Delta Ct$ değerlerine göre NDRG1 mRNA seviyelerinde, Panc-1 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yokken Panc-1/GEM hücrelerinde bütün koşullarda anlamlı bir azalma vardır.



Şekil 4-18: NDRG1'in Kat Değişimleri

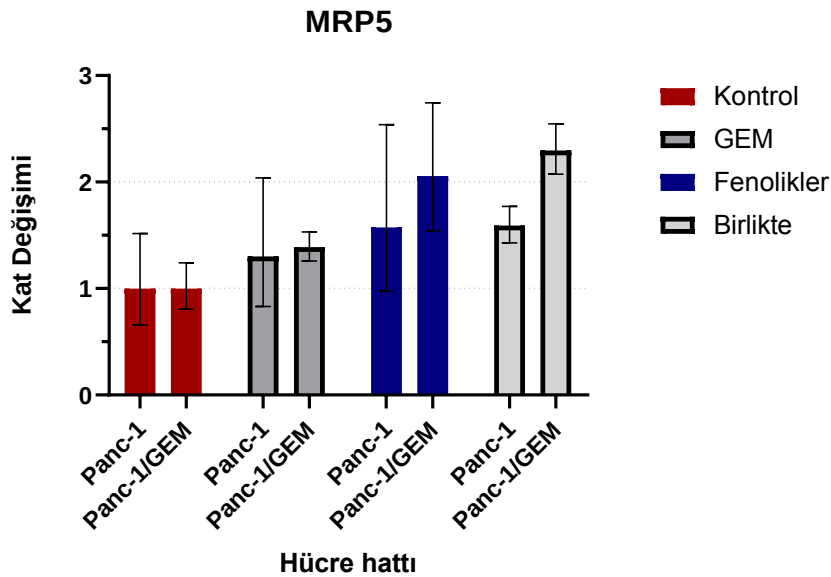
NDRG1'in Panc-1 hücrelerindeki ekspresyon artışı, 3 durumda da 2 kat olarak kabul edilen eşik değerinin altındadır. Panc-1/GEM hücrelerinde ise Gemsitabin ve birlikte hücrelerinde 2'nin üstünde, Fenolikler verilen hücrelerde ise 4'ün üstündedir. NDRG1 mRNA seviyelerinde her iki hücre hattında da azalma yoktur.

4.6.2. MRP5

Tablo 4-16: MRP5'in $\Delta\Delta Ct$ değerleri ve Farklılık Analizi Sonuçları

Hücre Hattı-Verilen Madde	Ort $\Delta\Delta Ct \pm SS$	Kontrolde Farklı mı?
Panc-1-Kontrol	0,00 $\pm$ 0,60	
Panc-1-GEM	-0,38 $\pm$ 0,65	Hayır (p=0,497)
Panc-1-Fenolikler	-0,65 $\pm$ 0,69	Hayır (p=0,284)
Panc-1-Birlikte	-0,67 $\pm$ 0,16	Hayır (p=0,135)
Panc-1/GEM-Kontrol	0,00 $\pm$ 0,31	
Panc-1/GEM-GEM	-0,47 $\pm$ 0,14	Hayır (p=0,075)
Panc-1/GEM-Fenolikler	-1,04 $\pm$ 0,42	Evet (p=0,026)
Panc-1/GEM-Birlikte	-1,20 $\pm$ 0,15	Evet (p=0,004)

Bu sonuçlara göre anlamlı sınırına çok yakın olsa da fenolikler verilen Pan-1 hücrelerinde ve GEM ve Fenolikler verilen Panc-1/GEM hücrelerinde $\Delta\Delta Ct$ 'lerde anlamlı bir düşüş vardır.



Şekil 4-19: MRP5'in Kat Değişimleri

MRP5'in Panc-1 hücrelerindeki ekspresyon artışı, 3 durumda da 2 kat olarak kabul edilen eşik değerin altındadır. Panc-1/GEM hücrelerinde ise GEM verilenlerde 2'nin altında, Fenolikler verilen ve birlikte verilen hücrelerde ise üstündedir. NDRG1 mRNA seviyelerinde her iki hücre hattında da azalma yoktur.

Ayrıca, Panc-1/GEM hücrelerinde, bu hücreleri GEM'e dirençli hale getirirken bu iki genin ekspresyonlarında herhangi bir değişim olup olmadığını görmek için bu hücre hattındaki ekspresyonlar Panc-1 hücre hattının kontrolleri referans alınarak kat değişimleri hesaplandı. Bu sonuçlar Tablo 4-17'dedir.

Tablo 4-17: Panc-1/GEM Hücrelerinde MRP5 ve NDRG1'in Kat Değişimleri

Hücre Hattı	NDRG1 Geometrik Ort $\pm$ SS	MRP5 Geometrik Ort $\pm$ SS
Panc-1	1,00 $\pm$ 0,44	1,00 $\pm$ 0,38
Panc-1/GEM	0,39 $\pm$ 0,12 (2,72 kat azalma (p=0,030))	0,46 $\pm$ 0,10 (2,24 kat azalma (p=0,045))

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın birincil amacı hem bu çalışmada hem de sonraki projelerde kullanılmak üzere Panc-1 hücrelerinin Gemsitabin'e karşı direnç kazandırılmasıydı. Direnç kazandırma işlemi tamamlandıktan, CCK-8 testi ve gözlemlerle teyit edildikten sonra polifenolik molekülleri içeren Fenolikler olarak isimlendirilen karışımın, Gemsitabin'in ve bu ikisinin birlikte verildiği hücrelerdeki viyabilite ve migrasyon değişimleri ölçüldü. Sonra, Gemsitabin'e direnç kazandırılmış pankreas kanser hücrelerinde belirlenen 2 genin mRNA düzeyindeki seviye değişimleri ve Fenolikler ile Gemsitabin'in bu genlerin mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri araştırıldı.

PDAC tümörlerinde yapılan klinik deneylerde tek başına Gemsitabin'den daha etkili bir ajanın bulunamamış olması ve Gemsitabin'in cerrahi operasyon yapılamayan ve genel sağlık durumları çoklu kemoterapötiklere uygun olmayan PDAC hastalarında etkili olmasına rağmen hızlı gelişen direnç nedeniyle toplam sağkalımı azaltması -en azından başka tedaviler ve erken tanı testleri bulunana kadar- bu direncin mekanizmalarının araştırılmasını, gelişiminin yavaşlatılmasını ve durdurulmasını, direnç geliştikten sonra geri çevrilebilmesini, oldukça önemli hale getirmektedir (Koltai ve ark. 2022; Okasuka ve Furuse, 2020). Bunun için Gemsitabin'e karşı dirençli hale getirilen Panc-1'de dahil olmak üzere pankreas kanser hücrelerinde çok sayıda klinik öncesi araştırma gerçekleştirilmiştir (Jin ve ark. 2018; Chen ve ark. 2017; Zheng ve ark. 2013; Wang ve ark. 2015). Bu çalışmada kullanılan direnç kazandırma yöntemi yüksek bir dozdan başlayarak Gemsitabin'e 3 gün gibi kısa bir süre maruz bırakıp hayatta kalan hücrelerin çoğalmasının beklenmesi şeklindedir. Kullanılan bir diğer yöntem hücreleri sürekli Gemsitabin bulunan bir besiyerinde bırakmaktır. Gemsitabin'in etki mekanizmasındaki ana unsurun DNA replikasyonunu durdurmak olması ve Panc-1 hücrelerinin en optimal koşullarda ikiye katlanma süresinin 52 saat olması direnç gelişimdeki ilk dozun belirlenmesi için viyabilitenin 96.saatte ölçülmesinin sebepleridir (Mini ve ark. 2006; Plunkett ve ark. 1995; Lieber ve ark. 1975; Deer ve ark. 2010). Buradaki amaç ilk dozun olabildiğince yüksek olmasını sağlarken dirençli hücrelerin sayıca çok az kalmalarını engellemektir. Böylece Şekil 4-2'de görüldüğü gibi Gemsitabin çekildikten sonra günlerce süren hücrelerin ölmesinden sonra dirençli bir veya birkaç hücrenin çoğalmasıyla oluşan kolonilerin sayısının daha fazla olması sağlandı. Her doz artışında seçici olarak daha dirençli hücreler elde edilse de en fazla 3 katlık artışlarla hücrelerin kaybedilmesinin

önüne geçildi. 8. doz artımından sonra ilk doz ile son doz arasındaki fark 300 kat olduğunda benzer çalışmalarda 10, 40 ve 64 kat artış bildirildiğinden sonraki aşama deneylere geçildi (Wang ve ark. 2015; Chen ve ark. 2017; Jin ve ark. 2018).

Hücrelerin direnç kazandığının onaylanması için CCK-8 testi ile Gempitabin'in sitotoksitesinin ölçümü ve plakada aynı bölgenin 24 saat aralıklarla fotoğraflanması yaklaşımı kullanıldı. 72. saatte yapılan CCK-8 testinde bulunan sonuçlara göre bütün dozlarda Panc-1/GEM hücreleri Panc-1 hücrelerinden daha fazla viyabiliteye sahipti. Diğer bir deyişle, Gempitabin Panc-1/GEM hücrelerine karşı Panc-1 hücreleri kadar sitotoksik etki göstermedi. Gempitabin'in Panc-1 hücrelerindeki IC50 değeri yaklaşık 16 μ M hesaplandı. Bu değer daha önceki çalışmalarda 72.saat için bildirilen değerler 10 μ M ve 58 μ M ve 48.saat için 15 μ M gibi değerlerle benzerdir (Moon ve ark. 2015; Huanwen ve ark. 2009; Arora ve ark. 2011). Bu değerlerde ufak farklılıkların olmasının sebepleri olarak, Panc-1 hücrelerinin farklı pasaj sayıları ve yüksek mutasyon kabiliyeti, Gempitabin'in saflık derecesinin ve saklanma süresinin ve çözöldüğü solüsyonların farklı olması ve ölçme metodlarındaki farklılıklar öne sürülebilir. Tamamen aynı şartlarda yapılan testlerde elde edilen sonuçlardan hesaplanan Panc-1 ve Panc-1/GEM hücrelerinde Gempitabin'in IC50 değerleri arasındaki fark yaklaşık 35 kattır. Daha önce Panc-1 hücreleriyle yapılan üç farklı Gempitabin'e direnç kazandırma çalışmasında, bu fark MTT ve benzeri testlerle ölçülen çalışmalarda 24.saat için yaklaşık 4 kat ve 48.saat için yaklaşık 6 kat ve SRB testiyle ölçülen diğer çalışmada 96.saat için yaklaşık 40 kat olarak bildirilmiştir (Jin ve ark. 2018; Wang ve ark. 2015; Wang ve ark. 2019). Bu değerlere ve yüksek doz verilen Panc-1/GEM hücrelerinin 96. saatteki morfolojik durumuna ve hücre yoğunluk oranlarına bakıldığında, PANC-1/GEM hücrelerinin 555 μ M'lık IC50 değeri ile Gempitabin'e karşı direnç kazandığı kabul edildi. Burada dikkat çeken bir diğer nokta da en son verilen 150 μ M'luk dozdan sağ kalıp çoğalan dirençli hücrelerin IC50 değerinin bunun oldukça üzerinde olmasıdır. Bu durum yine Gempitabin'in etkisini 72 saatte bile tam olarak gösterememesinden kaynaklanabilir. Panc-1 hücrelerinde 625 μ M gibi yüksek bir dozda dahi yaklaşık %16'lık viyabilite de bunu desteklemektedir. Burada önemli bir diğer nokta Gempitabin verilen ama hala hayatta ve tutunmaya devam eden hücrelerin diğer hücrelerle tutunması ve Gempitabin DNA replikasyonunu engellediği için hücrelerin normale göre daha çok büyümesi ve uzantılar oluşturmalarıdır. Hücrelerin birbiriyle temasını kaybetmemesi direnç gelişimini artırabileceği gibi direnç gelişimi de hücrelerin birbiriyle temas kurmasını artırıyor olabilir.

Farklı molekülleri içeren Fenolikler olarak isimlendirilen karışımın hücrelerdeki 72. ve 96. saatler için viyabilite sonuçlarına bakıldığında, Fenolikler sitotoksik bir etkiye sahiptir. Kanser kemoprevansiyonu; antioksidan aktivite göstermek, DNA tamir mekanizmalarını etkilemek, gen ekspresyonlarını değiştirmek, hücre proliferasyonunu durdurmak, apoptozu tetiklemek gibi mekanizmalar aracılığıyla etkili olarak kanser oluşumunu, gelişimini ve reküransı durduran veya yavaşlatan biyolojik veya doğal ajanların sürekli olarak alınması olarak tanımlanabilir. Yani malignite oluşumunu yavaşlatmak, durdurmak ve azaltmak için birtakım ajanların kronik olarak alınması kemoprevansiyondur (Steward ve Brown, 2013). Kanser hücrelerinde gözlenen viyabiliteyi azaltma etkisi de kemoprevansiyon olduğundan Fenolikler'in pankreatik kanser hücreleri için kemopreventif olduğu söylenebilir. Fenolikler'in iki hücre hattında hem 72. hem de 96. saatte verilen bütün dozlarda sitotoksik etkisi istatistiksel anlamda farklı değildir. Bu Panc-1/GEM hücrelerinin Gemsitabin'e direnç kazanmasına neden olan etkenlerin Fenolikler'in sitotoksitesini etkilemediğini göstermektedir. Genel Bilgiler kısmında bahsedilen Gemsitabin'e karşı dirençte etkisi olan etmenler çeşitli seviyelerde etki göstererek toplam direnci oluşturmaktadır. Bu mekanizmalardan çok ilaca karşı gelişen direnç, ilaç atım pompası proteinleri yardımıyla hücrenin içine giren ilaç moleküllerinin tekrar dışarı atılmasının artması sonucu ortaya çıkar. Pankreas kanserlerinde sık görülen bu durumun Panc-1/GEM hücrelerinde de gelişme ihtimali bulunmaktadır (Adamska ve ark. 2017; Koltai ve ark. 2022). Bunun için ileri çalışmalara ihtiyaç olmakla beraber Fenolikler ya bu çok ilaca karşı gelişen direnç mekanizmasından etkilenmemekte ya da bu mekanizmaya etki ederek hem dirençli hem de dirençsiz hücrelerde benzer sitotoksik etkiyi gösterebilmektedir. Bu aşamada Fenolikler'in yüzdeyle ifade edilmesinin sebebi birden fazla ve farklı konsantrasyonlarda madde içeren bu karışımın patent işlemleri için bildirilen değerlerin %100 olarak kabul edilmesi ve dilüe edilerek kullanılmasıdır. 96. saatte Fenolikler'in IC50 yüzdesi Panc-1 hücrelerinde 13 ve Panc-1/GEM hücrelerinde ise 14 olarak ölçüldü. 72. saat için ise daha hassas ölçüm için yapılan deneye göre iki hücre hattı için de %15,5 olarak hesaplandı.

Fenolikler ile Gemsitabin'in aynı anda verilmesinin nasıl bir etki gösterdiğini bulmak için kombinasyon göstergesi veya endeksinin hesaplanmasına dayanan "Chou-Talalay metodu" sabit oranlı yaklaşımla kullanıldı. Bu aşamada tek başına verildiklerindeki IC50 değerleri olarak daha önceden hesaplanan değerler değil tamamen aynı şartlarda olması için yeniden hesaplanan IC50 değerleri kullanıldı (Chou ve Talalay,

1984; Chou, T.C. 2011). Bunun için, 72 saat Panc-1 hücrelerindeki IC₅₀'leri göz önünde tutularak, 1 µM GEM ve %1 Fenolikler sabit olarak seçildi ve hücrelere 6'nın katları olacak şekilde verildi. Kombinasyon göstergesi denklemine göre Gemsitabin ve Fenolikler için hesaplanan değerler Panc-1 ve Panc-1/GEM hücreleri için sırasıyla 1,09 ve 0,84'tür. Bu değerler önerilen tanıma göre yorumlanırsa, Gemsitabin ve Fenolikler Panc-1 hücreleri için yaklaşık olarak aditif ve Panc-1/GEM hücreleri için orta seviyede sinerjistikdir (Chou, T.C. 2011). Yani Panc-1 hücrelerinde Gemsitabin ve Fenolikler'in aynı anda verilmesinin etkisi, ikisinin tek tek verildiklerindeki etkinin toplamı kadardır. Başka bir deyişle ikisinin birlikte verilmesi sinerjistik değildir. Panc-1/GEM hücrelerinde ise Gemsitabin ve Fenolikler'in orta düzeyde de olsa bir sinerjistik etkisi vardır. İki hücre hattında etkilerin az da olsa farklı olmasının ve Panc-1/GEM hücrelerinde sinerjistik çıkmasının sebebi, dirençsiz hücrelerdeki etkiye bakıldığında Gemsitabin'in etki mekanizmalarını etkileyip sinerji oluşturmadığı gözlemlendiğinden, Gemsitabin'e karşı gelişen dirençte etkili olan mekanizmalardan en az birini büyük oranda ya da birkaçını küçük oranlarda geri çevirerek Panc-1/GEM hücrelerinin Gemsitabin'e karşı olan hassasiyetini arttırması olabilir. Bu sinerjiyi farklı saatler için teyit edebilmek ve hangi hücre içi mekanizmalardan kaynaklandığını bulabilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Birden fazla polifenolik molekülü bir arada kullanmanın avantajlarından biri de farklı yolak ve mekanizmalara aynı anda etki etmek olduğundan, Fenolikler'in PDAC'de kullanılan diğer kemoterapötiklerle de sinerjistik etkisi olup olmadığı araştırmaya değerdir.

Yara-iyileştirme testi hücrelerin açılan bir boşluğu çoğalarak değil migrasyon ile ne kadar kapattıklarının ölçüldüğü bir test olduğundan, verilen maddelerin kanser hücrelerinin migrasyon yeteneklerini ne kadar etkilediği göreceli olarak ölçülebilir. Bu çalışmada 2 farklı dozda yara-iyileştirme testi yapıldı. Birincisinde Panc-1 hücrelerinin 72. saatteki Gemsitabin ve Fenolikler'in tek tek verildiğindeki IC₅₀ değerleri, 2.sinde de bu değerlerin sırasıyla 3'te 1'i ve yarısı kullanıldı. Böylece hem yüksek hem de orta seviye dozların etkileri incelendi. Burada Panc-1/GEM hücrelerine Panc-1 hücreleriyle aynı konsantrasyonda GEM verilmesindeki sebepler öncelikle orta veya uzun süreli sitotoksitenin değil kısa vadede migrasyonun ölçülmesi ve neredeyse 1mM seviyesindeki bir dozun migrasyonu engellemesinin ileri aşama deneyler için bir anlam ifade etmemesidir. Yapılan yüksek dozlu deneye göre, Panc-1 hücrelerinde Gemsitabin'in migrasyon üzerindeki etkisi yokken veya bu etki normal besiyerinin sebep

olduğu etkiden anlamlı ölçüde farklı değilken, Fenolikler'in ve ikisinin (GEM+Fenolik) birlikte verilmesinin etkisi anlamlı ölçüde migrasyonu yavaşlatmak hatta durdurmak olmuştur. Hücrelerin 24. saatteki fotoğraflarında bakıldığında, kontrol ve GEM verilen hücrelerde yara hattının değişmeye başladığı görülürken diğer hücrelerde, hattın aynı kaldığı ve plakaya tutunamayan hücrelerin varlığı gözlenmektedir. Bu durum Fenolikler'in hücrelerin plakayla olan temaslarını etkileyerek migrasyonu engellediğini gösterebileceği gibi Gempitabin'den çok daha hızlı etki ederek 24.saat gibi erken evrelerde dahi hücreleri öldürdüğüne işaret edebilir. İkinci teste daha düşük doz kullanılmasının sebeplerinden biri de bu durumu kontrol etmektir. 1. teste Panc-1/GEM hücrelerine bakıldığında, Panc-1 hücreleriyle benzer sonuçlar görülmekle birlikte sadece GEM verilen hücrelerin erken saatlerde kontrole göre daha az kapandığı görülmektedir. Buna neden olan etken direnç kazanmış hücrelerde, Gempitabin'e karşı oluşan direnci sağlayan mekanizmalardan birinin, tekrar Gempitabin ile karşılaşıldığında aktifleşerek artı bir etki olarak migrasyonu az da olsa yavaşlatması olabilir. Tamamen aynı şartlarda ve aynı plakalarda bulunan iki hücre hattının kapanma yüzdeleri karşılaştırıldığında verilen bütün maddeler için Fenolikler'in 8. saati hariç anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu fark anlamlı olsa da iki yüzde değerine (Panc-1 için -0,08, Panc-1/GEM için 2,38) bakıldığında çok da önemli olmadığı görülebilir. Fenolikler bu iki hücre hattına da aynı etkiyi yapmakta yani dirençli hücrelerin migrasyonunu da engelleyebilmektedir. 2. deneyin sonuçları 1. deneyle paraleldir. Temel farklar fotoğraflarda görüldüğü gibi Fenolikler verildiğinde plakaya tutunamayıp veya ölüp kalkan hücrelerin sayısının azlığı, 24.saatten sonra kapanmanın durmuş gibi gözükmesi ve Fenolikler verilen hücrelerde 24. ve 48. saatlerde az da olsa bir miktar kapanmanın gerçekleşmesidir. Buradan, yüksek dozda Fenolikler'in hücreleri kısa sürede etkileyerek hücrelerin daha fazla kalkmalarına neden olduğu ama daha az dozunda erken saatlerde migrasyonu durdurabildiği ve yavaşlatabildiği sonucu çıkarılabilir. Bu karışımın hücrelerin migrasyonunu hangi etki mekanizmalarıyla durdurduğunun belirlenmesi daha ileri araştırma gerektirmektedir. 24. saatten sonra kapanmanın kontrol hücrelerinde dahi durması, 1. testle benzerlik göstermediğinden bu teste özgü koşullardaki bir değişkenden kaynaklanıyor olabilir. Bu bilgiler polifenollerin kanser hücreleri üzerinde anti-migratif ve kemopreventif etkileri olduğuna dair literatüre bir katkı daha sunmaktadır.

Son olarak hücrelerde, önceden seçilen iki genin mRNA seviyelerindeki değişimler incelendi. NDRG1 mRNA düzeyleri, Panc-1 hücrelerinde verilen maddelerle

anlamlı ölçüde değişmezken, Panc-1/GEM hücrelerinde 3 kattan fazla 5 kattan az olacak şekilde artmıştır. Prognoz ile pozitif korelasyona sahip NDRG1 geni tümör baskılayıcıların ekspresyonlarını arttırdığı invazyonu azalttığı ve anti-metastatik etkilerinden dolayı seviyesindeki yükselme PDAC tedavisi için olumludur (Kim-Fuchs ve ark. 2014; Maruyama ve ark. 2006; Cen ve ark. 2017). Panc-1 gibi az farklılaşmış hücre hatlarında normalden daha düşük NDRG1 bulunduğu göz önüne alındığında (Angst ve ark. 2006), Panc-1 hücrelerinde NDRG1 seviyesinin artırılmasının önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Gempitabin, Fenolikler ve ikisinin birlikte verilmesi NDRG1'in seviyelerini Panc-1/GEM hücrelerinde arttırmıştır. Çalışmamızın bu aşamadaki en önemli bulgusu, NDRG1 seviyelerindeki en büyük artışın fenolikler tek başına uygulandığında gözlenmesi, ikisi birlikte uygulandığında ise birbirlerinin etkisini azaltmasıdır. Gempitabin'e karşı dirençte etkili olan mekanizmalardan veya yollardan biri hücre içine yüksek konsantrasyonda bir veya birkaç maddenin girmesinden sonra NDRG1'in ekspresyonunu artırması olabilir. NDRG1'i etkileyen ve NDRG1'in etkilendiği hücre içi sinyal yolları ve moleküllerle ilgili çalışmaların sayısı arttığında direnç mekanizmasıyla ortak noktaların aydınlatılabilme ihtimali artacaktır. Yine de Fenolikler'in, özellikle metastatik olmayan ve lokal yayılım gösteren Gempitabin'e direnç kazanmış tümörlerin metastaz ihtimalini NDRG1 gibi anti-metastatik genleri etkileyerek düşürebilmesi olasıdır. MRP5 geninin ekspresyon seviyelerini incelediğimizde ise Fenolikler ve Gempitabin + Fenoliklerle muamelenin Panc-1/GEM hücrelerinde MRP5 ekspresyonunu yaklaşık 2 kat arttırdığı (düşük bir anlamlılıkla) gözlenmiştir. Öte yandan Gempitabin tek başına MRP5 geninin ekspresyonunu hem dirençli hem de dirençsiz hücrelerde değiştirmedini saptadık. Önceki çalışmalarda Gempitabinin farklı pankreas kanser hücre hatlarında MRP5 ekspresyonu üzerinde farklı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Hagmann ve ark. 2010; Kohan ve Boroujerdi 2015). Kohan ve Boroujerdi Capan-2 pankreas kanser hücre hattında Gempitabin'in yüksek oranda MRP5'in mRNA seviyesini arttırdığını göstermiştir (Kohan ve Boroujerdi, 2015). Panc-1 hücreleri kullanılarak ksenograft oluşturulan bir başka çalışmada ise, Gempitabin MRP5 seviyelerini değiştirmedini bildirilmiştir (Guo ve ark. 2020). Bu çalışmalara göre farklı pankreas kanser hücre hatlarında ve dolayısıyla farklı hastalardaki ilaç atım pompalarının ekspresyonlarının farklılık gösterebileceği ve Gempitabin'e yanıtta bu farklılıkların önemli olduğu söylenebilir. Fenolikler'in özellikle Panc-1/GEM hücrelerinde düşük düzeyde de olsa MRP5 seviyesini artırması, Fenolikler'in etkisini azaltan etmenlerden

biri olarak sayılabilir. Panc-1 ve Panc-1/GEM hücreleri arasında NDRG1 ve MRP5 ekspresyonlarını karşılaştırdığımızda ise, iki genin de dirençli hücrelerde anlamlı bir şekilde daha düşük düzeyde eksprese olduğunu saptadık. Bu bulgumuz Gemsitabin'e karşı gelişen direncin NDRG1'in seviyesinde azalmaya ve hücrelerin metastaz yapma yeteneğini artışa neden olabileceğine işaret etmektedir. İlaç atım pompası genlerinin ekspresyonlarının artması ilaç moleküllerinin etkisini azalttığı için direnç kazanılmasında etkilidir. Öte yandan MRP5 ekspresyonunun azalması Gemsitabin'e karşı afinitesi daha yüksek olan başka bir ilaç atım pompası gen ekspresyonunun aşırı artması sonucu da olabilir. Bu noktada, daha kesin sonuçlara ulaşmak için ilaç atım pompaları ve Gemsitabin'e karşı gelişen dirençle ve bu pompaların çoklu inhibe edilmesiyle ilgili araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak bu çalışmada, Panc-1 hücrelerine Gemsitabin'e karşı direnç kazandırılmış, polifenolikleri içeren Fenolikler isimli karışımın iki hücre hattında da benzer sitotoksositeye sahip olduğu ve dirençli hücrelerde az da olsa Gemsitabin ile sinerjistik bir etkisi olduğu, iki hücre hattının da migrasyonlarını azaltabildiği ve dirençli hücrelerde NDRG1'in ekspresyonunu 4 kattan fazla arttırabildiği bulunmuştur. Bu çalışmanın ve yapmayı planladığımız Fenolikler'in farklı pankreas kanser hücre hatlarındaki kemopreventif, anti-proliferatif ve anti-migratif etkilerinin ve farklı kemoterapötiklere karşı gelişen direnç üzerindeki etkilerinin araştırılacağı ilerideki çalışmalarımızın bulguları pankreas kanseri tedavisinde doğal biyoaktif maddelerle daha etkin kemoteropötik yaklaşımlar için umut vaat ettiği/ edeceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abotaleb, M., Samuel, S.M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A. ve ark. (2018). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)*, 11(1), 28.
- Abrams R.A., Lowy A.M., O'Reilly E.M., Wolff R.A., Picozzi V.J. ve Pisters PW (2009). Combined modality treatment of resectable and borderline resectable pancreas cancer: expert consensus statement. *Annual Surgery Oncology*, 16, 1751–56.
- Adamska, A., Domenichini, A. ve Falasca, M (2017). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1338.
- Agur, A.M.R., Lee, M.J. ve Grant, J.C.B (2013). *Grant's Atlas of Anatomy*. 13.th ed. London, UK: Lippincott Williams and Wilkins.
- Alvarellos M.L., Lamba J., Sangkuhl K., Thorn C.F., Wang L., Klein D.J ve ark. (2014). PharmGKB summary: gemcitabine pathway. *Pharmacogenet Genomics*, 24(11), 564-74.
- Andersen, D.K., Korc, M., Petersen, G.M., Eibl, G., Li, D., Rickels, ve ark. (2017). Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes*, 66, 1103–1110.
- Anderson, E.M., Thomassian, S., Gong, J., Hendifar, A. ve Osipov, A (2021). Advances in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treatment. *Cancers*, 13, 5510.
- Arora, S., Bhardwaj, A., Srivastava, S.K., Singh, S., McClellan, S. ve ark. (2011). Honokiol Arrests Cell Cycle, Induces Apoptosis, and Potentiates the Cytotoxic Effect of Gemcitabine in Human Pancreatic Cancer Cells. *PLOS ONE*, 6(6), e21573.
- Angst, E., Sibold, S., Tiffon, C., Weimann, R., Gloor, B., D Candinas, D. ve ark. (2006). Cellular differentiation determines the expression of the hypoxia-inducible protein NDRG1 in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 95, 307–313.
- Angst, E., Dawson, D.W., Stroka, D., Gloor, B., Park, J., Candinas, D. ve ark. (2011). N-myc downstream regulated gene-1 expression correlates with reduced pancreatic cancer growth and increased apoptosis in vitro and in vivo. *Surgery*, 149(5), 614-24.

Angst, E., Park, J.L., Moro, A., Lu, Q.Y., Lu, X., Li, G. ve ark. (2013). The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Pancreas*, 42(2), 223-9.

Amrutkar, M. ve Gladhaug, I.P. (2017). Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)*, 16;9(11):157.

Avila- Carrasco, L., Majano, P., Sánchez- Toméro, J.A., López- Cabrera, R.S.M., Aguilera, A., ve Mateo, G.G. (2019). Natural plants compounds as modulators of epithelial- to- mesenchymal transition. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 715.

Avula, L.R., Hagerty, B. ve Alewine, C. (2020). Molecular mediators of peritoneal metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 39(4):1223-1243.

Bae, D.H., Jansson, P.J., Huang, M.L., Kovacevic, Z., Kalinowski, D., Lee, C.S. ve ark. (2013). The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *Journal of Clinical Pathology*, 66(11), 911-7.

Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.M., Gingras, M.C. ve ark. (2016). Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. *Nature*, 531, 47–52.

Baker, C.H., Banzon, J., Bollinger, J.M. ve ark. (1991). 29-Deoxy-29-methylenecytidine and 29-deoxy-29,29-difluorocytidine 59-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34: 1879–1884.

Bandyopadhyay, S., Wang, Y., Zhan, R., Pai, S.K., Watabe, M., Iizumi, M. ve ark. (2006). The tumor metastasis suppressor gene Drg-1 down-regulates the expression of activating transcription factor 3 in prostate cancer. *Cancer Research*, 66(24), 11983-90.

Barcellini, A., Peloso, A., Pugliese, L., Vitolo, V. Ve Cobianchi, L (2020). Locally Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Challenges and Progress. *OncoTargets and Therapy*, 13, 12705-12720.

Bear, A.S., Vonderheide, R.H. ve O'Hara M.H. (2020). Challenges and Opportunities for Pancreatic Cancer Immunotherapy, *Cancer Cell*, 38(6), 788-802.

- Becker, A.E. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World Journal Gastroenterology*, 20 (32), 11182.
- Belt, J.A., Marina, N.M., Phelps, D.A. ve ark. (1993). Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Advances in Enzyme Regulation*, 33, 235–352.
- Benzel, J. ve Fendrich, V. (2018). Chemoprevention and Treatment of Pancreatic Cancer: Update and Review of the Literature. *Digestion*, 97(4), 275-287.
- Bhattacharya, A., Santhoshkumar, A., Kurahara, H. Ve Harihar, S. (2021). Metastasis Suppressor Genes in Pancreatic Cancer: An Update. *Pancreas*, 50(7), 923-932.
- Blastik, M., Plavec, E., ve Zalatnai, A. (2011). Pancreatic carcinomas in a 60-year, institute-based autopsy material with special emphasis of metastatic pattern. *Pancreas*, 40(3), 478–480.
- Blauesen.com staff (2014). “Medical gallery of Blauesen Medical 2014”. *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436. – Own work, CC BY 3.0.
- Bockhorn, M., Uzunoglu, F.G., Adham, M., Imrie, C., Milicevic, M., Sandberg, A.A. ve ark. (2014). Borderline resectable pancreatic cancer: a consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*, 155, 977–88.
- Borst, P., de Wolf, C. Ve van de Wetering, K. (2007). Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflügers Arch*, 453, 661–673.
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D.T., Petersen, G., Bracci, P.M., Ji, B.T. ve ark. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annual Oncology*, 23(7), 1880–1888.
- Brand, R.E., Lerch, M.M., Rubinstein, W.S., Neoptolemos, J.P., Whitcomb, D.C., Hruban R.H. ve ark. (2007). Participants of the Fourth International Symposium of Inherited Diseases of the Pancreas. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut*, 56(10), 1460-9.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R. ve ark. (1997). Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 2403–2413.
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O ve Caicedo, A. (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2334–2339
- Carrato, A., Falcone, A., Ducreux, M., Valle, J.W., Parnaby, A., Djazouli, K. ve ark. (2015). A Systematic Review of the Burden of Pancreatic Cancer in Europe: Real-World Impact on Survival, Quality of Life and Costs. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 46, 201–211.
- Carvajal, R.D., Tse, A., Shah, M.A., Lefkowitz, R.A., Gonen, M., Gilman-Rosen, L. Ve ark. (2009). A phase II study of flavopiridol (Alvocidib) in combination with docetaxel in refractory, metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology*, 9(4), 404-9.
- Carvalho, T.M.A., Di Molfetta, D., Greco, M.R., Koltai, T., Alfarouk, K.O., Reshkin, S.J. ve ark. (2021). Tumor Microenvironment Features and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Insights into Targeting Physicochemical Barriers and Metabolism as Therapeutic Approaches. *Cancers*, 13, 6135.
- Carter, C.J., Mekki, A.H., Morris, D.L. (2021). Role of human nucleoside transporters in pancreatic cancer and chemoresistance. *World Journal of Gastroenterology*, 28;27(40), 6844-6860.
- Cen, G., Zhang, K., Cao, J., ve Qiu, Z. (2017). Downregulation of the N-myc downstream regulated gene 1 is related to enhanced proliferation, invasion and migration of pancreatic cancer. *Oncology Reports*, 37, 1189-1195.

Chen, W., Zheng, R., Baade, P.D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F. ve ark. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66, 115–32.

Chen, S., Wang, Y., Zhang, W., Dong, M. ve Zhang, J. (2017). Sclareolide enhances gemcitabine-induced cell death through mediating the NICD and Gli1 pathways in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer. *Molecular Medicine Reports*, 15, 1461-1470.

Chiorean, E.G., Cheung, W.Y., Giordano, G., Kim, G., Al-Batran, S.E. (2019). Real-world comparative effectiveness of nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX in advanced pancreatic cancer: a systematic review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11, 1758835919850367.

Chou, T.C. (2011). The mass-action law-based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development. *American Journal of Cancer Research*, 1(7), 925-54.

Chou, T.C. ve Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55.

Collisson, E.A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W.J., Truitt, M., Gu, S. ve ark. (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature Medicine*, 17(4), 500-3.

Connor, A.A. ve Gallinger, S. (2022). Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nature Reviews Cancer*, 22, 131–142.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y. Ve ark (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364:1817–25.

Corbo, V., Tortora, G. ve Scarpa, A (2012). Molecular pathology of pancreatic cancer: From bench-to bedside translation. *Current Drug Targets*, 13, 744–752.

Cunningham, D., Chau, I., Stocken, D.D., Valle, J.W., Smith, D., Steward, W. Ve ark. (2009). Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus

capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 5513–8.

De La Cruz, M.S., Young, A.P. ve Ruffin, M.T. (2014). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *American Family Physician*, 89(8), 626-632.

Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L. ve ark. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425-35.

Dell'Aquila, E., Fulgenzi, C., Angela M., Minelli A., Citarella F., Stellato M. ve ark. (2020). Prognostic and predictive factors in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 11, 924-941.

Ducieux, M., Cuhna, A.S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goere, D. ve ark. (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annual Oncology*, 26 (Suppl. 5), v56–v68.

Duong, H.Q., Yi, Y.W., Kang, H.J., Hong, Y.B., Tang, W., Wang, A. ve ark. (2014). Inhibition of NRF2 by PIK-75 augments sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *International Journal of Oncology*, 44(3), 959-69.

El-Rayes, B.F., Philip, P.A., Sarkar, F.H., Shields, A.F., Ferris, A.M., Hess, K. Ve ark. (2011). A phase II study of isoflavones, erlotinib, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *Investigational New Drugs*, 29(4), 694-9.

Elsayed, M. ve Abdelrahim, M. (2021). The Latest Advancement in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Therapy: A Review Article for the Latest Guidelines and Novel Therapies. *Biomedicines*, 9(4), 389.

Fan, P., Zhang, Y., Liu, L., Zhao, Z., Yin, Y., Xiao, X. ve ark. (2016). Continuous exposure of pancreatic cancer cells to dietary bioactive agents does not induce drug resistance unlike chemotherapy. *Cell Death and Disease*, 7(6), e2246.

Fang, B.A., Kovacevic, Z., Park, K.C., Kalinowski, D.S., Jansson, P.J., Lane, D.J ve ark. (2014). Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1845, 1–19.

Ferlay, J., Partensky, C. ve Bray, F (2016). More Deaths from Pancreatic Cancer than Breast Cancer in the EU by 2017. *Acta Oncologica*, 55, 1158–1160.

Foucher, E.D., Ghigo, C., Chouaib, S., Galon, J., Iovanna, J. ve Olive, D. (2018). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strong Imbalance of Good and Bad Immunological Cops in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 9, 1044.

Fraga, C.G., Croft, K.D., Kennedy, D.O. ve Tomás-Barberán, F.A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function*, 10(2):514-528

Franck, C., Müller, C., Rosania, R., Croner, R.S., Pech, M. ve Venerito, M. (2020). Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Moving Forward. *Cancers (Basel)*, 12(7), 1955.

Gašić, U., Ćirić, I., Pejčić, T., Radenković, D., Djordjević, V., Radulović, S. ve ark. (2020). Polyphenols as Possible Agents for Pancreatic Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 9(6), 547.

Gandhi, V. ve Plunkett, W. (1990). Modulatory activity of 29,29-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Research*, 50, 3675–3680.

Gandhi, V., Leghai J., Chen, F., Hertel, L.W. ve Plunkett, W. (1996). Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Research*, 56(19), 4453-9.

Gerhard, R., Nonogaki, S., Fregnani, J.H., Soares, F.A. ve Nagai, M.A. (2010). NDRG1 protein overexpression in malignant thyroid neoplasms. *Clinics (Sao Paulo)*, 65(8), 757-62.

Ghaneh, P., Costello, E. ve - Neoptolemos, J.P. (2008). Biology and management of pancreatic cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 84, 478 497.

Gray, H. ve Lewis, W.H. (2000). *Gray's Anatomy of Human Body*. 20th ed. New York, NY.

- Gock, M., Linnebacher, M., Nauheimer, D., Schmidt, J., Klar, E. ve Eisold, S. (2013). Influence of chemotherapeutic treatment on expression of human multidrug resistance protein (ABCC, ABCB) family members in pancreatic cancer cell lines. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*, 2, 719–725.
- Goldstein, D., El-Maraghi, R.H., Hammel, P., Heinemann, V., Kunzmann, V., Sastre, J. Ve ark. (2015). Nab-paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 413, 107.
- Gomez-Casati, D.F., Zanol M. I., ve Busi M.V. (2013). Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases. *BioMed Research International*, 2013, 1.
- Gonzalez-Vallinas, M., Gonzalez-Castej, M., Rodriguez-Casado A. ve Ramirez de Molina A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71(9), 585–99.
- Goonetilleke, K. ve Siriwardena, A (2007). Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 33, 266–270.
- Griffith, D.A. ve Jarvis, S.M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286, 153–181.
- Grossberg, A.J., Chu, L.C., Deig, C.R., Fishman, E.K., Hwang, W.L., Maitra, A. ve ark. (2020). Multidisciplinary standards of care and recent progress in pancreatic ductal adenocarcinoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(5), 375-403.
- Groot, V.P., Rezaee, N., Wu, W., Cameron, J.L., Fishman, E., Hruban, R.H. ve ark. (2018). Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Annals of Surgery*, 267, 936–945.
- Gryniewicz G. Isoflavone research towards healthcare applications. *Journal Cancer Metastasis Treat*, 6, 48.

Guo, H., Liu, F., Yang, S. ve Xue, T. (2020). Emodin alleviates gemcitabine resistance in pancreatic cancer by inhibiting MDR1/P-glycoprotein and MRPs expression. *Oncology Letters*, 20(5), 167.

Gutiérrez, M.L., Muñoz-Bellvís, L. ve Orfao, A. (2021). Genomic Heterogeneity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Clinical Impact. *Cancers (Basel)*, 13(17), 4451.

Hagmann, W., Jesnowski, R. ve Löhr, J.M. (2010). Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia*, 12(9), 740-7.

Hagmann, W., Faissner, R., Schnölzer, M., Löhr, M. ve Jesnowski, R. (2011). Membrane drug transporters and chemoresistance in human pancreatic carcinoma. *Cancers (Basel)*, 3(1), 106-25.

Hall, W.A. ve Goodman, K.A (2019). Radiation therapy for pancreatic adenocarcinoma, a treatment option that must be considered in the management of a devastating malignancy. *Radiation Oncology*, 14, 114.

Harbuzariu, A. ve Gonzalez-Perez, R.R. (2018). Leptin-Notch axis impairs 5-fluorouracil effects on pancreatic cancer. *Oncotarget*, 9(26), 18239-18253.

Heinemann, V., Haas, M. ve Boeck, S. (2012). Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 843–53.

Heinemann, V., Xu, Y.Z., Chubb, S., Sen, A., Hertel, L.W., Grindey, G.B. ve ark. (1990). Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Molecular Pharmacology*, 38(4), 567-72.

Ho, W.J., Jaffee, E.M. ve Zheng, L. (2020). The tumour microenvironment in pancreatic cancer. Clinical challenges and opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17, 527–540.

Hosoi, F., Izumi, H., Kawahara, A., Murakami, Y., Kinoshita, H., Kage, M. Ve ark. (2009). N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and

angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of inhibitor of kappaB kinase beta expression. *Cancer Research*, 69(12), 4983-91.

Hu, X. ve Chen, W. (2021). Role of epithelial-mesenchymal transition in chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *The World Journal of Clinical Cases*, 9(19), 4998-5006.

Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Research*, 51(22), 6110-7.

Huang, L., Jansen, L., Balavarca, Y., Babaei, M., van der Geest, L., Lemmens, V. ve ark. (2018). Stratified survival of resected and overall pancreatic cancer patients in Europe and the USA in the early twenty-first century: A large, international population-based study. *BMC Medicine*, 16, 125.

Huanwen, W., Zhiyong, L., Xiaohua, S., Xinyu, R., Kai, W. ve Tonghua, L. (2009) Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Molecular Cancer*, 8, 125.

Hur, C., Tramontano, A.C., Dowling, E.C., Brooks, G.A., Jeon, A., Brugge, W.R. ve ark. (2016). Early Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Survival Is Dependent on Size. *Pancreas*, 45, 1062–1066.

Hussain, S.A., Sulaiman, A.A., Balch, C., Chauhan, H., Alhadidi, Q.M. ve Tiwari, A.K. (2016). Natural Polyphenols in Cancer Chemoresistance. *Nutrition and Cancer*, 68(6), 879-91.

Isaji, S., Mizuno, S., Windsor, J.A., Bassi, C., Fernández-Del Castillo, C., Hackert, T. ve ark. (2018). International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology*, 18(1), 2-11.

Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D: The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 30069–30074.

- Jentzsch, V., Davis, J. ve Djamgoz, M.B.A. (2020). Pancreatic Cancer (PDAC): Introduction of Evidence-Based Complementary Measures into Integrative Clinical Management. *Cancers*, 12(11), 3096.
- Jin, H., Zhao, Y., Zhang, S., Yang, J., Zhang, X. ve Ma, S. (2018). Hyperthermia inhibits the motility of gemcitabine-resistant pancreatic cancer PANC-1 cells through the inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 7274-7280.
- Kanai, M., Yoshimura, K., Asada, M., Imaizumi, A., Suzuki, C., Matsumoto, S. ve ark. (2011). A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(1), 157-64.
- Karpinska, M. ve Czauderna, M. (2022). Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology*, 13, 807632.
- Kashyap, D., Garg, V.K., Tuli, H.S., Yerer, M.B., Sak, K., Sharma, A.K. ve ark. (2019). Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential. *Biomolecules*, 9(5), 174.
- Katz, M.H., Fleming, J.B., Bhosale, P., Varadhachary, G., Lee, J.E., Wolff, R. ve ark. (2012). Response of borderline resectable pancreatic cancer to neoadjuvant therapy is not reflected by radiographic indicators. *Cancer*, 118, 5749–5756.
- Kelderman, S., Schumacher, T.N. ve Haanen, J.B. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Molecular Oncology*, 8, 1132–1139.
- Khomiak, A., Brunner, M., Kordes, M., Lindblad, S., Miksch, R.C., Öhlund, D. Ve ark. (2020). Recent Discoveries of Diagnostic, Prognostic and Predictive Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(11), 3234.
- Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X. ve Okazaki M. (2019). Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *American Journal of Cancer Research*, 9(8), 1517-1535.

Kim, J.Y. ve Hong, S.M. (2018). Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 41, 603–610.

Kim-Fuchs, C., Winterhalder, S., Winter, A., Malinka, T., Born, D., Schafer, S. ve ark. (2014). The silencing of N-myc downstream regulated gene-1 in an orthotopic pancreatic cancer model leads to more aggressive tumor growth and metastases. *Digestive Surgery*, 31, 135–142.

Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V. ve ark. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16022.

Klein, A.P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(7), 493–502.

Klein, A.P., Beaty, T.H., Bailey-Wilson, J.E., Brune, K.A., Hruban, R.H. ve Petersen, G.M. (2002). Evidence for a major gene influencing risk of pancreatic cancer. *Genetic Epidemiology*, 23(2), 133–149.

Kohan, H.G. ve Boroujerdi, M. (2015). Time and concentration dependency of P-gp, MRP1 and MRP5 induction in response to gemcitabine uptake in Capan-2 pancreatic cancer cells. *Xenobiotica*, 45(7), 642-52.

Koltai, T., Reshkin, S.J., Carvalho, T.M.A., Di Molfetta, D., Greco, M.R., Alfarouk, K.O. ve ark. (2022). Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. *Cancers*, 14, 2486.

Kovacevic, Z., Fu, D. ve Richardson, D.R. (2008). The iron-regulated metastasis suppressor, NdrG-1: identification of novel molecular targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1981–1992.

Kovacevic, Z., Chikhani, S., Goldie, Y.L., Sutharshani Sivagurunathan, L. ve Richardson, D.R. (2013). *Antioxidants and Redox Signaling*, Mar 2013, 874-887.

Kovacevic Z., Menezes, S.V., Sahni, S., Kalinowski, D.S., Bae, D.H., Lane, D.J. ve ark. (2016). The metastasis suppressor, N-myc downstream-regulated gene-1 (NDRG1),

down-regulates the ErbB family of receptors to inhibit downstream oncogenic signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 1029–1052.

König, J., Hartel, M., Nies, A.T., Martignoni, M.E., Guo, J., Büchler, M.W. ve ark. (2010). Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *International Journal of Cancer*, 115(3), 359-67.

Kroep, J.R., Loves, W.J., van der Wilt, C.L., Alvarez, E., Talianidis, I., Boven, E., ve ark. (2002). Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(6), 371-6.

Lachat, P., Shaw, P., Gebhard, S., van Belzen, N., Chaubert, P. ve Bosman, F.T. (2002). Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochemistry and Cell Biology*, 118(5), 399-408.

Lambert, A., Gavaille, C. ve Conroy, T. (2017). Current status on the place of FOLFIRINOX in meta-static pancreatic cancer and future directions. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 10, 631–45.

Lammert, E. ve Zeeb, M. (2014). *Metabolism of Human Diseases*. Vienna, Springer.

Lee, S.H., Ryu, J.K., Lee, K.Y., Woo, S.M., Park, J.K., Yoo, J.W. ve ark. (2008). Enhanced anti-tumor effect of combination therapy with gemcitabine and apigenin in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 259(1), 39-49.

Lee, S.H., Kim, H., Hwang, J.H., Lee, H.S., Cho, J.Y., Yoon, Y. S. ve ark. (2012). Breast cancer resistance protein expression is associated with early recurrence and decreased survival in resectable pancreatic cancer patients. *Pathology International*, 62, 167-175.

Leroux, C. ve Konstantinidou, G. (2021). Targeted Therapies for Pancreatic Cancer: Overview of Current Treatments and New Opportunities for Personalized Oncology. *Cancers*, 13, 799.

Li, J. ve Kretzner, L. (2003). The growth-inhibitory NdrG1 gene is a Myc negative target in human neuroblastomas and other cell types with overexpressed N- or c-myc. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 250, 91–105.

Li, Y., Revalde, J.L., Reid, G. ve Paxton, J.W. (2011). Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(3), 603-10.

Li, Y.J., Wu, J.Y., Wang, J.M. ve Xiang, D.X. (2020). Emerging nanomedicine-based strategies for preventing metastasis of pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release*, 320, 105-111.

Liang C., Shi S., Meng Q., Liang D., Ji S., Zhang B. ve ark. (2018). Do anti-stroma therapies improve extrinsic resistance to increase the efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75,1001–1012.

Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M. ve Todaro G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer*, 15(5), 741-7.

Liu, W., Zhang, B., Hu, Q., Qin, Y., Xu, W., Shi, S. ve ark. (2017). A new facet of NDRG1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Suppression of glycolytic metabolism. *International Journal of Oncology*, 50(5), 1792-1800.

Longnecker, D.S. (2021). Anatomy and Histology of Pancreas.

Loosen, S.H., Neumann, U.P., Trautwein, C., Roderburg, C. ve Luedde, T. (2017). Current and future biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Tumor Biology*, 39(6), 1010428317692231.

Löhr, J.M., Karimi, M., Omazic, B., Kartalis, N., Verbeke, C.S., Berkenstam, A. ve ark. (2016). A phase I dose escalation trial of AXP107-11, a novel multi-component crystalline form of genistein, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable pancreatic cancer. *Pancreatology*, 16(4), 640-5.

Löhr, M. (2006). Is it possible to survive pancreatic cancer? *Nature Reviews Gastroenterology*, 3, 236–237.

Lynch, S.M., Vrieling, A., Lubin, J.H., Kraft, P., Mendelsohn, J.B., Hartge, P., ve ark. (2009). Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *American Journal of Epidemiology*, 170(4), 403-13.

Mackey, J.R., Mani, R.S., Selner, M., Mowles, D., Young, J.D., Belt, J.A. ve ark. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Research*, 58(19), 4349-57.

Maleki Dana, P., Sadoughi, F., Asemi, Z. ve Yousefi, B. (2022). The role of polyphenols in overcoming cancer drug resistance: a comprehensive review. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 1.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. ve Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230–242.

Maru, G.B., Hudlikar, R.R., Kumar, G., Gandhi, K. ve Mahimkar, M.B. (2016). Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: from experimental models to clinical trials. *World Journal of Biological Chemistry*, 7, 88–99.

Maruyama, Y., Ono, M., Kawahara, A., Yokoyama, T., Basaki, Y., Kage, M. ve ark. (2006). Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. *Cancer Research*, 66, 6233–6242.

Masiak-Segit, W., Rawicz-Pruszyński, K., Skórzewska, M. ve Polkowski, W.P. (2018). Surgical treatment of pancreatic cancer. *Polish Journal of Surgery*, 90, 45–53.

Matthaei, H., Schulick, R.D., Hruban, R.H. ve Maitra, A. (2011). Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8, 141–150.

McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R.C., Jones, C., Coleman, H.G., McCain, R.S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846-4861.

Menezes, S.V., Sahni, S., Kovacevic, Z. ve Richardson, D.R. (2017). Interplay of the iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 with epidermal growth factor receptor (EGFR) and oncogenic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 292(31), 12772-12782.

Menezes, S.V., Fouani, L., Huang, M.L.H., Geleta, B., Maleki, S., Richardson, A. ve ark. (2019). The metastasis suppressor, NDRG1, attenuates oncogenic TGF- β and NF- κ B signaling to enhance membrane E-cadherin expression in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 40(6), 805-818.

Midha, S., Chawla, S. ve Garg, P.K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*, 381, 269–277.

Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. ve Mazzei T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 17 Suppl 5, v7-12.

Mizrahi, J.D., Surana, R., Valle, J.W. ve Shroff, R.T. (2020). Pancreatic cancer. *Lancet*, 395(10242), 2008-2020.

Moon, S.U., Kim, J.W., Sung, J.H., Kang, M.H., Kim, S.H., Chang, H. ve ark. (2015). p21-Activated Kinase 4 (PAK4) as a Predictive Marker of Gemcitabine Sensitivity in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cancer Res Treat.* 2015 Jul;47(3):501-8.

Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S. ve ark. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, 25, 1960–6.

Moysan, E., Bastiat, G. ve Benoit, J.P. (2013). Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A review of several promising chemical modifications. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 430–444.

Murtaza, I., Adhami, V.M., Hafeez, B.B., Saleem, M. ve Mukhtar, H. (2009) Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-kappaB. *International Journal of Cancer*, 125, 2465–2473.

- Nagaraju, G.P., Benton, L., Bethi, S.R., Shoji, M. ve El-Rayes, B.F. (2019). Curcumin analogs: Their roles in pancreatic cancer growth and metastasis. *International Journal of Cancer*, 145(1), 10-19.
- Nambaru, P.K., Hübner, T., Köck, K., Mews, S., Grube, M., Payen, L. ve ark. (2011). Drug efflux transporter multidrug resistance-associated protein 5 affects sensitivity of pancreatic cancer cell lines to the nucleoside anticancer drug 5-fluorouracil. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(1), 132-9.
- Nasir, A., Bullo, M.M.H., Ahmed, Z., Imtiaz, A., Yaqoob, E., Safdar, M. Ve ark. (2020). Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:8, 1375-1387.
- Nath, S., Daneshvar, K., Roy, L., Grover, P., Kidiyoor, A., Mosley, L. ve ark. (2013). MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. *Oncogenesis*, 2, e51.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 60750, Gemcitabine. Erişim 06.07.2022, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60750>.
- Neesse, A., Michl, P., Tuveson, D.A. ve Ellenrieder, V. (2014). Nab-paclitaxel: novel clinical and experimental evidence in pancreatic cancer. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 52, 360–6.
- Niederhuber, J., Armitage, J., Doroshow, J., Kastan, M. ve Tepper, J. (2019). *Abeloff's Clinical Oncology*, 6th ed. Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherland.
- Okasha, H., Elkholy, S., El-Sayed, R., Wifi, M.N., El-Nady, M., El-Nabawi, W. ve ark. (2017). Real time endoscopic ultrasound elastography and strain ratio in the diagnosis of solid pancreatic lesions. *World Journal of Gastroenterology*, 23(32), 5962-5968.
- Okusaka, T. ve Furuse, J. (2020). Recent advances in chemotherapy for pancreatic cancer: evidence from Japan and recommendations in guidelines. *World Journal of Gastroenterology*, 55(4), 369-382.

- Oppong, K.W. ve Bekkali, N.L.H. (2017). Pancreatic ductal adenocarcinoma epidemiology and risk assessment: Could we prevent? Possibility for an early diagnosis. *Endoscopic ultrasound*, 6, 58–S61.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal Of Nutritional Science*, 5, e47.
- Panda, A. K., Chakraborty, D., Sarkar, I., Khan, T., ve Sa, G. (2017). New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *Journal of Experimental Pharmacology*, 9, 31–45.
- Pang, X., Zhang, X., Jiang, Y., Su, Q., Li, Q. ve Li Z. (2021). Autophagy: Mechanisms and Therapeutic Potential of Flavonoids in Cancer. *Biomolecules*, 11(2), 135.
- Park, K.C., Paluncic, J., Kovacevic, Z. ve Richardson, D.R. (2020). Pharmacological targeting and the diverse functions of the metastasis suppressor, NDRG1, in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 157, 154-175.
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y.Z., Heinemann, V., Grunewald, R. ve Gandhi, V. (1995). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol Seminars in Oncology*, 22, 3–10.
- Primavesi, F., Stättner, S., Schlick, K., Kiesslich, T., Mayr, C., Klieser, E. ve ark. (2019). Pancreatic cancer in young adults: changes, challenges, and solutions. *OncoTargets and Therapy*, 12, 3387-3400.
- Quint, K., Tonigold, M., Di Fazio, P., Montalbano, R., Lingelbach, S., Rückert, F. ve ark. (2012). Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial mesenchymal transition. *International Journal of Oncology*, 41, 2093–2102.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M. ve 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, 2913–2921.
- Rahib, L., Wehner, M.R., Matrisian, L.M. ve Nead, K.T. (2021). Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Network Open*, 4, e214708.

- Rawla, P., Sunkara, T. ve Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10-27.
- Rathkopf, D., Dickson, M.A., Feldman, D.R., Carvajal, R.D., Shah, M.A., Wu, N. Ve ark. (2009). Phase I study of flavopiridol with oxaliplatin and fluorouracil/leucovorin in advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 15(23), 7405-11.
- Rebelo, R., Polónia, B., Santos, L.L., Vasconcelos, M.H. ve Xavier, C.P.R. (2021). Drug Repurposing Opportunities in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pharmaceuticals*, 14, 280.
- Reichert, M. ve Rustgi, A.K. (2011). Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 4572–4578.
- Ren, B., Cui, M., Yang, G., Wang, H., Feng, M., You, L. Ve ark. (2018). Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 108.
- Ren, B., Liu, X. ve Suriawinata, A.A. (2019). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions. *The American Journal of Pathology*, 189, 9–21.
- Rueff, J. ve Rodrigues, A.S. (2016). Cancer drug resistance: A brief overview from a genetic viewpoint. *Methods in Molecular Biology*, 1395, 1-18.
- Ruiz van Haperen, V.W., Veerman, G., Boven, E., Noordhuis, P., Vermorken, J.B., Peters ve G.J. (1994). Schedule dependence of sensitivity to 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) in relation to accumulation and retention of its triphosphate in solid tumour cell lines and solid tumours. *Biochemical Pharmacology*, 48(7), 1327-39.
- Santhakumar, A. B., Battino, M., ve Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 49–65.
- Satake, K., Takeuchi, T., Homma, T. ve Ozaki, H. (1994). CA19-9 as a Screening and Diagnostic Tool in Symptomatic Patients. *Pancreas*, 9, 703–706.

Schepis, T., De Lucia, S.S., Nista, E.C., Manilla, V., Pignataro, G., Ojetti, V. ve ark. (2021). Microbiota in Pancreatic Diseases: A Review of the Literature. *Journal of Clinical Medicine*, 10, 5920.

Schizas, D., Charalampakis, N., Kole, C., Economopoulou, P., Koustas, E., Gkotsis, E. ve ark. (2020). Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update. *Cancer Treatment Reviews*, 86, 102016.

Schy, W.E., Hertel, L.W., Kroin, J.S., Bloom, L.B., Goodman, M.F. ve Richardson, F.C. (1993). Effect of a template-located 2',2'-difluorodeoxycytidine on the kinetics and fidelity of base insertion by Klenow (3'-->5'exonuclease-) fragment. *Cancer Research*, 53(19), 4582-7.

Servetto, A., Santaniello, A., Napolitano, F., Foschini, F., Marciano, R., Mozzillo, E., ve ark. (2021). Use of FOLFIRINOX or Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for the Treatment of Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: A Single Institution Observational Study. *Cancers*, 13, 4939.

Siegel, R.L., Miller, K.D. ve Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69, 7–34.

Singhi, A.D. ve Wood, L.D. (2021). Early detection of pancreatic cancer using DNA-based molecular approaches. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18, 457–468.

Slot, A.J., Molinski, S.V. ve Cole SP. (2011). Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochemical*, 7, 50(1), 179-207.

Springfeld, C., Jäger, D., Büchler, M.W., Strobel, O., Hackert, T., Palmeri D.H. ve ark. (2019). Neoptolemos JP. Chemotherapy for pancreatic cancer. *La Presse médicale*, 48(3 Pt 2), e159-e174.

Sohal, D.P.S., Kennedy, E.B., Khorana, A., Copur, M.S., Crane, C.H., Garrido-Laguna, I. ve ark. (2018). Metastatic pancreatic cancer: ASCO clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, 36, 2545–2556.

- Song, S., Wang, B., Zhang, X., Hao, L., Hu, X., Li, Z. ve ark. (2015). Sun, S. Long-Term Diabetes Mellitus Is Associated with an Increased Risk of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 10, e0134321.
- Standring, S., Borley, N. R., ve Gray, H. (2008). *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 40th ed., anniversary ed. [Edinburgh]: Churchill Livingstone/Elsevier.
- Steward, W.P. ve Brown, K. (2013). Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*, 109(1), 1-7.
- Sturm, N., Ettrich, T.J. ve Perkhofer, L. (2022). The Impact of Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma on Diagnosis, Surveillance and Therapy. *Cancers (Basel)*, 14(1), 217.
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PloS One*, 15(7), e0232565.
- Sun, J., Zhang, D., Bae, D.H., Sahni, S., Jansson, P., Zheng, Y. ve ark. (2013). Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors. *Carcinogenesis*, 34(9), 1943-54.
- Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) Research Data (1973–2015), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, released April 2019.
- Taieb, J. ve Abdallah, R. (2020). How I treat pancreatic cancer. *ESMO Open*, 4, e000818.
- Thyagarajan, A., Forino, A.S., Konger, R.L. ve Sahu, R.P. (2020). Dietary Polyphenols in Cancer Chemoprevention: Implications in Pancreatic Cancer. *Antioxidants (Basel)*, 9(8), 651.
- Tempero, M., Malafa, M., Al-Hawary, M., Asbun, H., Behrman, S., Benson, A. ve ark. (2016). *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Pancreatic Adenocarcinoma*. Jen kintown, PA, USA: NCCN Guidel.

Tempero, M.A., Malafa, M.P., Al-Hawary, M., Asbun, H., Behrman, S.W., Benson, A.B. ve ark. (2017). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Pancreatic Adenocarcinoma, V 1.2020. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15, 1028–1061.

Thakur, G., Kumar, R., Kim, S.B., Lee, S.Y., Lee, S.L. ve Rho, G.J. (2021). Therapeutic Status and Available Strategies in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomedicines*, 9(2), 178.

Thompson, J.L., Manore, M.M. ve Vaughan, L.A. (2008). *The science of nutrition*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Thyagarajan, A., Forino, A.S., Konger, R.L. ve Sahu, R.P. (2020). Dietary Polyphenols in Cancer Chemoprevention: Implications in Pancreatic Cancer. *Antioxidants (Basel)*, 9(8), 651.

Tien, Y.W., Wu, Y.M., Lin, W.C., Lee, H.S. ve Lee, P.H. (2009). Pancreatic carcinoma cells stimulate proliferation and matrix synthesis of hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 51, 307–14.

Toffoli, S., Delaive, E., Dieu, M., Feron, O., Raes, M. ve Michiels, C. (2009). NDRG1 and CRK-I/II are regulators of endothelial cell migration under Intermittent Hypoxia. *Angiogenesis*, 12(4), 339-54.

Torphy, R.J., Fujiwara, Y. ve Schulick, R.D. (2020). Pancreatic cancer treatment: better, but a long way to go. *Surgery Today*, 50(10), 1117-1125.

Ueno, H., Ioka, T., Ikeda, M., Ohkawa, S., Yanagimoto, H., Boku, N. ve ark. (2013). Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *Journal of Clinical Oncology*, 31(13), 1640-8.

Uzunparmak, B. ve Sahin, I.H (2019). Pancreatic cancer microenvironment: A current dilemma. *Clinical and Translational Medicine*, 8, 2.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H. ve Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet*, 378(9791), 607–620.

- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore M ve ark. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369, 1691– 703.
- Wang, B., Shen, C., Li, Y., Zhang, T., Huang, H., Ren, J. Ve ark. (2019). Oridonin overcomes the gemcitabine resistant PANC-1/Gem cells by regulating GST pi and LRP/1 ERK/JNK signalling. *OncoTargets and Therapy*, 12, 5751-5765.
- Wang, C., Zhang, W., Fu, M., Yang, A., Huang, H. ve Xie, J. (2015). Establishment of human pancreatic cancer gemcitabine-resistant cell line with ribonucleotide reductase overexpression. *Oncology Reports*, 33(1), 383-90.
- Wang, J.Q., Yang, Y., Cai, C.Y., Teng, Q.X., Cui, Q., Lin, J. Ve ark. (2021). Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, 54, 100743.
- Wang, S.S., Xu, J., Ji, K.Y. ve Hwang, C.I. (2021). Epigenetic Alterations in Pancreatic Cancer Metastasis. *Biomolecules*, 11, 1082.
- Wang, X., Zhang, H. ve Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141-160.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A. ve ark. (2009). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Research*, 69, 2400–2407.
- Wielinga, P.R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J.H., Wijnholds, J., Borst, P. (2003) Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 17664–17671.
- Williet, N., Petrillo, A., Roth, G., Ghidini, M., Petrova, M., Forestier, J. ve ark. (2021). Gemcitabine/Nab-Paclitaxel versus FOLFIRINOX in Locally Advanced Pancreatic Cancer: A European Multicenter Study. *Cancer*, 13, 2797.
- Wong, A., Soo, R.A., Yong, W.P. ve Innocenti, F. (2009). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metabolism Reviews*, 41, 77–88.

- Wu, W., He, X., Yang, L., Wang, Q., Bian, X., Ye, J. Ve ark. (2018). Rising trends in pancreatic cancer incidence and mortality in 2000–2014. *Clinical Epidemiology*, 10, 789–97.
- Xing, H., Wang, J., Wang, Y., Tong, M., Hu, H., Huang, C. ve ark. (2018). Diagnostic Value of CA 19-9 and Carcinoembryonic Antigen for Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2018, 8704751.
- Yabar, C.S. ve Winter, J.M. (2016). Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterology Clinics of North America*, 45, 429–445.
- Yachida, S., ve Iacobuzio-Donahue, C.A. (2009). The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(3), 413–422.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B. ve ark. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature Cell Biology*, 467, 1114–1117.
- Ye, Q., Liu, K., Shen, Q., Li, Q., Hao, J., Han, F. ve ark. (2019). Reversal of Multidrug Resistance in Cancer by Multi-Functional Flavonoids. *Frontiers in Oncology*, 9, 487.
- Yu, D., Ye, T., Xiang, Y., Shi, Z., Zhang, J., Lou, B. Ve ark. (2017). Quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, decreases invasiveness and metastasis, and reverses IL-6 induced epithelial-mesenchymal transition, expression of MMP by inhibiting STAT3 signaling in pancreatic cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4719-4729.
- Zeng, S., Pöttler, M., Lan, B., Grützmann, R., Pilarsky, C. ve Yang, H. (2019). Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4504.
- Zhang, Y., Yang, J., Li, H., Wu, Y., Zhang, H. ve Chen, W. (2015). Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8, 11683–11691.

Zheng, C., Jiao, X., Jiang, Y. ve Sun, S. (2013). ERK1/2 activity contributes to gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Journal of International Medical Research*, 41(2), 300-6.

Zhou, D., Salnikow, K. ve Costa, M. (1998). Cap43, a novel gene specifically induced by Ni²⁺ compounds. *Cancer Research*, 58, 2182–2189.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PANKREAS ADENOKARSİNOM HÜCRE HATTINDA ETKEN
FLAVONOİD BİLEŞENLERİN KEMOPREVENTİF VE GEMCİTABİN'E
KARŞI GELİŞEN DİRENÇ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 6	% 5	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	www.guvenplus.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Bili Wang, Can Shen, Yang Li, Ting Zhang, Hui Huang, Jun Ren, Zhengjun Hu, Jian Xu, Bin Xu. " Oridonin overcomes the gemcitabine resistant PANC-1/Gem cells by regulating GST pi and LRP/1 ERK/JNK signalling ", OncoTargets and Therapy, 2019 Yayın	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

