



**PANKREAS KANSERİ  
KEMOTERAPÖTİK DİRENCİNDE  
5-FLOROURASİL, LEPTİN VE LEPTİN İNHİBİTÖRÜ  
KOMBİNASYONUNUN ROLÜ**

**Filiz TAŞPINAR**

**Fizyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Dursunali ÇINAR**

**Doktora Tezi- 2019**

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

**Pankreas Kanseri Kemoterapötik Direncinde 5-Florourasil,  
Leptin ve Leptin İnhibitörü Kombinasyonunun Rolü**

**Filiz TAŞPINAR**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Dursunali ÇINAR**

**ERZURUM  
2019**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANKREAS KANSERİ KEMOTERAPÖTİK DİRENCİNDE  
5-FLOROURASİL, LEPTİN VE LEPTİN İNHİBİTÖRÜ  
KOMBİNASYONUNUN ROLÜ**

Filiz TAŞPINAR

**Tez Savunma Tarihi** : 24.06.2019

**Tez Danışmanı** : Prof.Dr. Dursunali ÇINAR (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof.Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof.Dr. Mesut Bünyami HALICI (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof.Dr. Devrim SARIPINAR AKSU (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Dr. Öğr. Üyesi Volkan GELEN (Kafkas Üniversitesi)

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN  
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi**  
**ERZURUM – 2019**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

PANKREAS KANSERİ KEMOTERAPÖTİK DİRENCİNDE  
5-FLOROURASİL, LEPTİN VE LEPTİN İNHİBİTÖRÜ  
KOMBİNASYONUNUN ROLÜ

**Filiz TAŞPINAR**

**Tez Savunma Tarihi :**

**Tez Danışmanı :** Prof. Dr. Dursunali ÇINAR

**Jüri Üyesi :**

**Jüri Üyesi :**

**Jüri Üyesi :**

**Jüri Üyesi :**

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Duygu ARIKAN**  
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi**  
**ERZURUM- 2019**

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>III</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>X</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Pankreasın Embriyolojik Gelişimi .....	4
2.2. Pankreas Histolojisi .....	5
2.3. Pankreas Anatomisi .....	10
2.3.1. Pankreasın .....	13
2.4. Pankreas Fizyolojisi .....	14
2.5. Pankreas Kanseri.....	16
2.6. Leptin Hormonu.....	24
2.7. 5-Florourasil.....	30
2.8. 5-FU'nun Kemoterapötik Direncinde Rol Alan Genler .....	34
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>41</b>
3.1. Gereçler.....	41
3.2. METOT.....	50
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>65</b>
4.1. 5-FU Sitotoksitesisi.....	65
4.2. Leptin Sitotoksitesisi.....	68

4.3. SHLA Sitotoksitesisi.....	69
4.4. Gen Ekspresyon Analizi .....	69
4.5. COMET Analizi.....	78
4.6. Akım Sitometri Analizi.....	81
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>85</b>
5.1. 5-FU, Leptin ve SHLA Sitotoksitesisi .....	87
5.2. 5-FU Sitotoksitesisi.....	87
5.3. Leptin Sitotoksitesisi.....	88
5.4. SHLA Sitotoksitesisi.....	90
5.5. 5-FU, Leptin ve SHLA'nın 5-FU Direncinde Rol Alan Genlerin Ekspresyonuna Etkisi .....	91
5.5.8. 5-FU, Leptin ve SHLA'nın Hücre Döngüsüne Etkisi.....	109
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>113</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>115</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>134</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>134</b>
<b>EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....</b>	<b>135</b>
<b>EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>136</b>

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca destek veren sözleriyle çalışmamı teşvik eden ve sabır gösteren saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Sayın Dursunali ÇINAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bilimsel bakış açısı ve katkıları için Fizyoloji Anabilim Dalı başkanı saygı değer hocam Prof. Dr. Sayın Mustafa GÜL'e saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez kapsamında çalışmamın gerçekleştirilmesinde katkıları olan Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ailesindeki Dr. Öğr. Üyesi Ayhan TANYELİ'ye, diğer tüm hocalarıma ve idari çalışanlarına teşekkür ediyorum. Akım sitometri analizlerinde yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Hande CANPINAR'a, tezin istatistiksel analizlerini yapan Dr. Öğr. Üyesi Can ATEŞ'e müteşekkirim.

Erzurum da beni hiç yalnız bırakmayan cefakâr arkadaşım Aslı KÖSEOĞLU'na ve doktora eğitim dönemim boyunca karşılaştığım zorlukları aşmamı sağlayan biricik yeğenim Nesli DOĞAN'a ve beni yalnız bırakmayan sevgili babam Ali ÖZKAYA'ya sonsuz teşekkür ediyorum. Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Mehmet Taşpınar'a ve tezimin bitmesini sabırsızlıkla bekleyen kızlarım İpek ve Nilüfer'e teşekkür ediyorum.

**Filiz TAŞPINAR**

## ÖZET

### **Pankreas Kanseri Kemoterapötik Direncinde 5-Florourasil, Leptin ve Leptin İnhibitörü Kombinasyonunun Rolü**

**Amaç:** PK hedefe odaklı tedavisi bulunmayan en agresif tümörlerden biridir. PK tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanlarından biri de 5-FU'dur. 5-FU kemoterapi sürecinde kemoterapötik direnç sıkça gelişmektedir. Bu çalışmada, PK'de, 5-FU kemoterapi direncinin üstesinden gelebilmek için 5-FU tedavisinde leptin ve leptin inhibisyonu için antagonist SHLA'nın olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA'nın sitotoksitesi MTT yöntemiyle saptanmıştır. PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA moleküllerinin kombinasyonlarının 5-FU kemoterapi direncinde rol alan genler ile apoptotik kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri RT-PZR ile belirlenmiştir. Moleküllerin genomik DNA hasarı ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri sırayla COMET ve akım sitometri testleri ile tespit edilmiştir.

**Bulgular:** AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I PK hücre serilerinin 5-FU duyarlılığı birbirinden farklı bulunmuştur. Leptin ve SHLA tek başlarına kullanıldıklarında herhangi bir sitotoksik etkisi saptanmamıştır. 5-FU (her bir hücre serisi için IC<sub>50</sub> değeri), leptin (0.1µM) ve SHLA (1000 ng)'nın 5-FU direnç genleri DPD, hENT1, TP, TS, MDR1 ve MRP5'in ekspresyonlarını değiştirdiği, bu moleküllerin PK hücrelerinde tek veya kombine kullanımının apoptozu tetikleyebildiği saptanmıştır. Ayrıca, 5-FU, leptin ve SHLA'nın tek ve kombine uygulanmasında PK hücre serilerinde DNA hasarı ve hücre döngüsü açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır (p≤0.001).

**Sonuç:** PK'da hücrelerin 5-FU duyarlılığı hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, PK tedavisinde, 5-FU kemoterapötik direncinin üstesinden gelebilmek için leptin ve/veya SHLA'nın 5-FU ile kombine edilerek kullanımının yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceği sonucuna varılmıştır. Leptin ve SHLA'nın 5-FU direnç yolağında yer alan genlerin ekspresyonları üzerindeki etkisi ile PK tedavisindeki terapötik etkileri ilk kez bu çalışmayla gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** 5-FU, kemoterapötik direnç, leptin, pankreas kanseri, SHLA



## ABSTRACT

### **The Role of Combination of 5-Fluorouracil, Leptin and Leptin Inhibitor in Chemotherapeutic Resistance of Pancreatic Cancer**

**Aim:** Pancreatic cancer is one of the most aggressive tumors without targeted therapy. One of the chemotherapy agents used in PC treatment is 5-FU. Chemotherapeutic resistance develops frequently in 5-FU chemotherapy process. The aim of this study was to investigate the possible role of leptin and its antagonist SHLA for leptin inhibition to overcome chemotherapy resistance in 5-FU treatment for PC.

**Materials and Methods:** In this study, the cytotoxicity of 5-FU, leptin and, SHLA was determined by MTT method in PC cell lines, AsPC-1, MIA PaCa-2 and Panc-I. The effects of combinations of 5-FU, leptin and SHLA in PC cell lines on expressions of genes involved in 5-FU chemotherapy resistance and apoptotic caspase 3, 8 and 9 genes were determined by RT-PCR. The impacts of molecules on genomic DNA damage and cell cycle were detected by COMET and flow cytometry, respectively.

**Results:** The sensitivity of 5-FU of PC cell lines, AsPC-1, MIA PaCa-2 and Panc-I were different from each other. No cytotoxic effects were detected when leptin and SHLA were used alone.

It has been found that 5-FU (at IC<sub>50</sub> values for each cell lines), leptin (0.1 μM) and SHLA (1000 ng) change the expressions of 5-FU resistance genes DPD, hENT1, TP, TS, MDR1 and MRP5, and that single or combinational usage of these molecules can trigger the apoptosis in PC cells. In addition, there was a significant difference between the groups in PC cell lines in terms of DNA damage and cell cycles in single and combined administration of 5-FU, leptin and SHLA ( $p \leq 0.001$ ).

**Conclusion:** 5-FU sensitivity of the cells in the PC varies according to the cell type. In this study, it was concluded that the use of leptin and/or SHLA in combination with 5-FU may be a new therapeutic approach to overcome chemotherapeutic resistance in the treatment of PC. The effects of leptin and SHLA on the expression of genes in the 5-FU resistance pathway and their therapeutic effects in treatment of PC have been demonstrated for the first time in this study.

**Key words:** 5-FU, chemotherapeutic resistance, leptin, pancreatic cancer, SHLA

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>5-FU</b>	:	5- Florourasil (5-Fluorouracil)
<b>ABC</b>	:	ATP bağlanma kaseti (ATP-binding cassette)
<b>ATP</b>	:	Adenozin trifosfat
<b>BER</b>	:	Baz eksizyon tamir (base-excision repair)
<b>BrdU</b>	:	Bromodeoksiuridin (bromodeoxyuridine)
<b>BT</b>	:	Bilgisayarlı tomografi
<b>CA</b>	:	Karsinoembriyonik antijen
<b>CH<sub>2</sub> THF</b>	:	Metiltetrahidrofolat
<b>DHFU</b>	:	Dihidrofluorourasil (dihydrofluorouracil)
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	:	Deoksinükleotit (deoxynucleotide)
<b>DPD</b>	:	Dihidropirimidin dehidrogenaz [dihydropyrimidine dehydrogenase)
<b>DSÖ</b>	:	Dünya sağlık örgütü
<b>dTMP</b>	:	Deoksitimidin monofosfat (deoxythymidine monophosphate)
<b>dTTP</b>	:	Deoksitimidin trifosfat (deoxythymidine triphosphate)
<b>dTTT</b>	:	Deoksitimidin trifosfat
<b>dUMP</b>	:	Deoksiuridin monofosfat (deoxyuridine monophosphate)
<b>dUTP</b>	:	Deoksiuridin trifosfat (deoxyuridine triphosphate)
<b>dUTPaz</b>	:	dUTP pirofosfataz (dUTP pyrophosphatase)
<b>ERCP</b>	:	Endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi
<b>EUS</b>	:	Endoskopik ultrasonografi
<b>FdUDP</b>	:	Florodeoksiüridin difosfat
<b>FdUDP</b>	:	Fluorodeoksiüridin difosfat (fluorodeoxyuridine diphosphate)

<b>FdUMP</b>	:	Florodeoksiüridin monofosfat
<b>FdUTP</b>	:	Florodeoksiüridin trifosfat
<b>FOLFIRINOX</b>	:	5-FU/lökovorin, irinotekan, oksaliplatin
<b>FUDP</b>	:	Fluorouridine difosfat (fluorouridine diphosphate)
<b>FUDR</b>	:	Florodeoksiuridin (fluorodeoxyuridine)
<b>FUMP</b>	:	Florouridin monofosfata
<b>FUR</b>	:	Fluorouridin (fluorouridine)
<b>FUTP</b>	:	Florouridin trifosfat
<b>GEM</b>	:	Gemcitabine
<b>GEP-NET</b>	:	Gastroenteropankreatik nöroendokrin tümörler
<b>hENT1</b>	:	Dengeleyici nükleozit taşıyıcı-1 (human equilibrative nucleoside transporter-1)
<b>IARC</b>	:	Uluslararası kanser ajansı (international agency for research on cancer)
<b>IC<sub>50</sub></b>	:	The half maximal inhibitory concentration
<b>JAK</b>	:	Janus kinaz
<b>LDFI</b>	:	Leu-Asp-Phe-Ile
<b>LEP</b>	:	Leptin
<b>LEPR= OBR</b>	:	Leptin Reseptörü
<b>LMA</b>	:	Düşük erime sıcaklığına sahip agaroz (low melting agarose)
<b>LPrA</b>	:	Leptin peptid reseptör antagonisti (leptin peptide receptor antagonists)
<b>MAPK</b>	:	Mitojenle aktive olan protein kinazlar
<b>MC4R</b>	:	Melanokortin 4 reseptör
<b>MDR</b>	:	Çoklu ilaç direnci (multidrug resistance),

<b>MDR-1, ABCB1</b>	:	Çoklu ilaç direnç geni-1 [multidrug resistance gene-1 (MDR-1, ABCB1)]
<b>miRNA</b>	:	Mikro ribonukleik asit
<b>MR</b>	:	Magnetik rezonans
<b>MRCP</b>	:	Magnetik rezonans kolanjiyopankreatografi
<b>MRP5, ABCC5</b>	:	Çoklu ilaç direnç proteini-5 (multidrug resistance protein)
<b>OB-Ra</b>	:	Leptin kısa reseptör
<b>OB-Rb</b>	:	Leptin uzun reseptör
<b>OPRT</b>	:	Orotat fosforibosiltransferaz (orotate phosphoribosyltransferase)
<b>PaSH</b>	:	Pankreatik stellat hücreler
<b>PC1</b>	:	Prohormon konvertaz-1 (prohormone convertase 1)
<b>PDAK</b>	:	Pankreatik duktal adenokarsinoma
<b>PD-ECGF</b>	:	Endotelial hücre büyüme faktörü (platelet-derived endothelial cell growth factor)
<b>PET</b>	:	Pozitron emisyon tomografisi
<b>P-gp</b>	:	P-glikoprotein (P-gp)
<b>PI</b>	:	Propidium Iodide
<b>PI3K</b>	:	Fosfotidilinozitol 3-kinaz (phosphoinositide 3-kinase)
<b>PK</b>	:	Pankreas kanseri
<b>PNET</b>	:	Pankreatik nöroendokrin tümörler
<b>POMC</b>	:	Proopiomelanokortin
<b>PRPP</b>	:	Fosforibozil pirofosfat (phosphoribosyl pyrophosphate)
<b>rhLep</b>	:	Rekombinant leptin
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik asit
<b>RR</b>	:	Ribonükleotit redüktaz (ribonucleotide reductase)

<b>SHLA</b>	:	Süperaktif insan leptin antagonisti (superactive human leptin antagonist)
<b>SLC</b>	:	Solüt taşıyıcılar (solute carriers)
<b>SMLA</b>	:	Süperaktif fare leptin antogonisti (superactive mouse leptin antagonist)
<b>snRNA</b>	:	Küçük nükleolar RNA (small nucleolar RNA)
<b>STAT</b>	:	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (signal transducer and activator of transcription)
<b>TBE</b>	:	Tris Borik Asit EDTA
<b>TP</b>	:	Timidin fosforilaz (thymidine phosphorylase)
<b>TK</b>	:	Timidin kinaz (thymidine kinase)
<b>TS</b>	:	Timidilat sentaz (thymidylate synthase)
<b>TÜİK</b>	:	Türkiye istatistik kurumu
<b>UDG</b>	:	Urasil DNA glikozilaz (uracil-DNA glycosylase)
<b>UK</b>	:	Uridin kinaz (uridine kinase)
<b>UMP (= OPRT)</b>	:	Uridin monofosfat sentetaz
<b>UP</b>	:	Uridin fosforilaz (uridine phosphorylase)
<b>USG</b>	:	Ultrasonografi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Pankreasın normal embriyolojik gelişimini gösterir şekil. Ventral pankreas tomurcuğu (VP) ve dorsal pankreas tomurcuğu (DP) ile birleşmesi olayı .....	4
Şekil 2.2. PK kemoterapötik direncine katkı sağlayan hücresel değişimler.....	24
Şekil 2.3. 5-FU moleküler yapısı ve hücre içi etki mekanizması .....	32
Şekil 2.4. 5-FU Metabolitlerinin RNA'ya Bağlanması .....	34
Şekil 3.1. Total RNA %1'lik agarozdaki görüntüsü.....	55
Şekil 3.2. COMET testinde kullanılan skorlama ve skorlamaya ait örnek görüntüler .....	61
Şekil 3.3. AsPC-1 hücre serisine ait akım sitometri sonuçları .....	63
Şekil 4.1. 5-FU'nun AsPC-1 hücre serisindeki sitotoksitesisi.....	66
Şekil 4.2. 5-FU'nun MIA PaCa-2 hücre serisindeki sitotoksitesisi.....	66
Şekil 4.3. 5-FU'nun Panc-I hücre serisindeki sitotoksitesisi.....	67
Şekil 4.4. Leptin molekülünün AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I hücre serilerindeki sitotoksik etkisi .....	68
Şekil 4.5. SHLA molekülünün AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I hücre serilerindeki sitotoksik etkisi .....	69
Şekil 4.6. AsPC-1 hücre serisinde DPD geni ekspresyon değişimi.....	70
Şekil 4.7. MIA PaCA-2 hücre serisinde DPD geni ekspresyon değişimi.....	71
Şekil 4.8. Panc-I hücre serisinde DPD geni ekspresyon değişimi.....	71
Şekil 4.9. AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde hENT-1 geni ekspresyon değişimi.....	72
Şekil 4.10. Panc-I hücre serilerinde hENT-1 geni ekspresyon değişimi .....	73
Şekil 4.11. TP geni ekspresyon değişimi.....	73
Şekil 4.12. TS geni ekspresyon değişimi.....	74

<b>Şekil 4.13.</b> AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde MRP1 geni ekspresyon değişimi .....	75
<b>Şekil 4.14.</b> Panc-I hücre serilerinde MDR1 geni ekspresyon değişimi .....	75
<b>Şekil 4.15.</b> AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde MRP5 geni ekspresyon değişimi .....	76
<b>Şekil 4.16.</b> Panc-I hücre serilerinde MRP5 geni ekspresyon değişimi.....	76
<b>Şekil 4.17.</b> AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimi .....	77
<b>Şekil 4.18.</b> Panc-I hücre serisinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimi ....	78
<b>Şekil 4.19.</b> AsPC-1 Hücrelerinde akım sitometri sonucu hücre döngüsü .....	81
<b>Şekil 4.20.</b> MIA PaCa-2 Hücrelerinde akım sitometri sonucu hücre döngüsü.....	82
<b>Şekil 4.21.</b> Panc-I Hücrelerinde akım sitometri sonucu hücre döngüsü.....	82

## TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Ekzokrin pankreas tümörlerinin histolojik sınıflandırılması .....	20
<b>Tablo 2.2.</b> Fonksiyonel pankreatik nöroendokrin tumor sendromları.....	21
<b>Tablo 3.1.</b> Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serileri .....	41
<b>Tablo 3.2.</b> Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler .....	42
<b>Tablo 3.3.</b> MTT testinde kullanılan gereçler.....	43
<b>Tablo 3.4.</b> Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler .....	44
<b>Tablo 3.5.</b> cDNA eldesi için gerekli malzemeler .....	45
<b>Tablo 3.6.</b> Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler .....	45
<b>Tablo 3.7.</b> RT-PZR için gerekli malzemeler.....	46
<b>Tablo 3.8.</b> COMET için gerekli malzemeler.....	47
<b>Tablo 3.10.</b> Tez kapsamında kullanılan alet/makineler .....	49
<b>Tablo 3.11.</b> cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.....	56
<b>Tablo 3.12.</b> RT-PZR için reaksiyon içeriği.....	57
<b>Tablo 3.13.</b> RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri.....	58
<b>Tablo 4.1.</b> 5-FU'un Pankreas kanseri hücre serilerinde IC50 değerleri.....	65
<b>Tablo 4.2.</b> AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serilerinde saptanan DNA hasarı..	79
<b>Tablo 4.3.</b> AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serilerinde grupların birbirlerine göre DNA hasarı açısından karşılaştırmaları .....	80
<b>Tablo 4.4.</b> AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serileride moleküllerin hücre döngüsüne olan etkileri .....	83
<b>Tablo 4.5.</b> AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serilerinde grupların hücre döngüsüne etkileri açısından karşılaştırılmaları.....	84



# 1. GİRİŞ

Pankreas Kanseri (PK), dünyada kanserle ilgili ölümlerin en yaygın nedenlerinden biridir. <sup>1</sup> PK'nın hedefe yönelik tedavisi bulunmamaktadır.<sup>2</sup> Kemoterapi, PK tedavisinde kullanılan en etkin yöntemlerden biridir. PK hastalarının büyük çoğunluğunda tedavi öncesi ve/veya tedavi sürecinde kemoterapötik direnç gelişmektedir. Kemoterapötik direncin oluşum ve gelişiminde genetik ve/veya epigenetik faktörler rol oynamaktadır.<sup>1</sup>

PK hastalarının tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri 5-FU'dur.<sup>3</sup> <sup>4</sup> 5-FU'ya karşı gelişen kemoterapötik dirençte rol oynayan ve tedavi için hedef molekül olabilecek birçok biyobelirteç adayı gen bulunmaktadır.<sup>3</sup> Bu aday genleri, genel olarak, 5-FU metabolik yolda yer alanlar, hücre membranında transporttan sorumlu olanlar, hücre döngüsünde, DNA tamirinde ve apoptoziste yer alan genler olarak özetleyebiliriz.<sup>2,3</sup>

PK'nin risk faktörlerinden biri de obezitedir. PK ve obezite arasındaki potansiyel ilişkide bir leptin molekülünün rolü olabileceği bildirilmektedir.<sup>2</sup> Leptin molekülü hücrel etki mekanizmasını hücre membranında bulunan leptin reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. PK hücre dizilerinin leptin reseptörlerini ifade ettiği saptanmıştır. Ayrıca, PK hücrelerinin leptin salgılayarak otokrin/parakrin sinyal yolağını indüklediği böylece tümör gelişimini ve hücrelerin yaşamının tetikleyebileceği belirtilmektedir. Ancak leptinin PK'deki etkisine yönelik çok az çalışma bulunduğu ve bunlar arasında da karşıt görüşlerin bulunduğu bildirilmektedir<sup>5, 6</sup>, leptinin hücre proliferasyon tetikleyici özelliğinin hücre tipine bağlı olduğu ve PK hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini bildirmektedir. Ancak, PK hücrelerine leptin uygulamasının hücrede NOTCH sinyal yolağını tetiklediği, kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu arttırdığı<sup>2,5</sup>, kanser hücrelerinin hücre proliferasyonlarını arttırdığı ve

kemoterapötik dirençte rol alan bazı moleküllerin (ABCB1) ekspresyonlarını tetiklediği bildirilmektedir.<sup>2</sup>

Mendonsa ve ark.,<sup>7</sup> leptinin proliferatif ve invaziv tetikleyici etkisinin hücre tipine göre değiştiğini, leptinin etki mekanizmasının net olarak açıklanabilmesi için daha fazla çalışmaya gerek olduğunu belirtmektedir. Harbuzariu ve ark.,<sup>8</sup> leptin-NOTCH sinyal yolağının kemoterapötik dirence katkı sunabilme potansiyeli taşımasından dolayı PK tedavisinde yeni bir hedef yolak olabileceği bildirilmektedir.

Procaccini ve ark.'ları,<sup>9</sup> tarafından yapılan derlemede, leptinin osteoblastik hücrelerde apoptozisi indüklediği timusta ise apoptozisi inhibe ettiği, nötrofillerde apoptozisi geciktirdiği, insan periferik mononükleer hücrelerin proliferasyonunu tetikleyerek immünmodülatör rolünün olduğu rapor edilmiştir. Mantho ve ark.'ları,<sup>2</sup> leptinin kemoterapötik dirençte önemli bir rol oynayabileceği ve hedefe yönelik tedavisi bulunmayan PK'da leptin hedefli tedavi yaklaşımlarının geliştirilebileceğini önermektedir. Leptinin pleiotropik özellik gösteren çok fonksiyonlu bir molekül olması,<sup>10</sup> PK kanserinde hücrelere sitotoksik etki göstermesi<sup>6</sup> ve kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ajanı ile daha sitotoksik etki göstermesi<sup>11</sup> ve yukarıda kan ve timüs dokularında immünmodülatör özellik göstermesi kanser tedavisinde kullanılabilirliğini akla getirmiştir.

Candelaria ve ark.,<sup>12</sup> PK kemoterapötik direncinde leptin reseptör inhibitörü kullanılarak kemoterapötik direncin belirlenmesine ilişkin hiçbir bilimsel çalışmanın bulunmadığını, leptinin PK'da ve PK kemoterapötik direncindeki gerçek rolünün açığa çıkarılması gerektiğini bildirmektedir.

Leptinin kanser tipine hatta aynı kanserde bile hücre tipine göre farklı etki gösterebileceğine ilişkin veriler,<sup>6,7</sup> leptinin etkisinin tam olarak anlaşamadığını ve daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, PK hücre serilerinde, 5-FU, leptin ve leptin antagonistinin (SHLA) 5-FU kemoterapötik direncinde rol alan genlerin ekspresyonu üzerine olası etkileri ile apoptoz süreci ve hücre döngüsü üzerine olan etkileri araştırılarak leptinin PK 5-FU yanıtındaki rolünün direnç mekanizmalarında yer alan genler üzerinden açıklanması hedeflenmiştir.

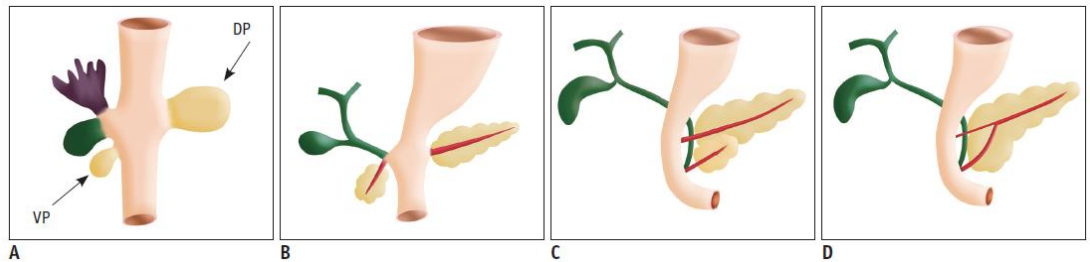
5-FU, Leptin ve leptin inhibitörlerinin kombine kullanımlarının 5-FU yanıtını nasıl etkilediklerine ilişkin veri bulunmamaktadır. Leptin ve leptin inhibitörü SHLA'nın 5-FU direncindeki etkisinin ortaya çıkarılması; 5-FU tedavisi öncesinde kullanılacak biyobelirteç/lerin tanımlanmasına, PK tedavisi için yeni hedef yolak/yolakların ortaya çıkarılmasına ve tedavi için yeni bir aday yaklaşımın geliştirilmesine katkı sunma potansiyeli taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, PK'da, 5-FU'e karşı gelişen kemoterapötik dirençte leptin ve leptin antagosintinin (SHLA) olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pankreasın Embriyolojik Gelişimi

Pankreas ilk olarak gebeliğin 5. haftasında ilkel ön bağırsağın (foregut) büyümesi olarak ortaya çıkan iki tomurcuktan yani dorsal ve ventral tomurculardan gelişir. Ön bağırsağın kaudal parçasından kaynaklanan ve endodermal hücrelerden oluşan bu dorsal ve ventral pankreas tomurukları mezenter yaprakları arasında gelişir. Dorsal pankreas tomurcuğu daha erken belirir ve ventral tomurcuğun hafif kraniyeline doğru gelişerek dorsal mezenter yaprakları arasında hızla büyür. Ventral pankreas tomurcuğu safra kanalının duodenuma girdiği yere yakın gelişir ve ventral mezenter yaprakları arasında hızla büyür.

Dorsal ve ventral pankreas tomurukları başlangıçta karşılıklı yönlerde uzanırken; gestasyonel 7. hafta itibariyle duodenumun genişlemesi, ventral pankreatik tomurcuğun duodenumun sağındaki yerleşiminden dönerek duodenumun sola yanına ve arkasına geçmesine ve yer değiştirmesine sebep olur. Bu olayla ventral tomurcuk dorsal pankreas tomurcuğu ile birleşir (Şekil 2.1). Böylece ventral tomurcuk, pankreas başının alt kısmı ve uncinat prosesusu oluştururken; dorsal pankreastan, geri kalan pankreas kısmı oluşur (pankreas başının üst kısmı, boyun, gövde ve kuyruk).<sup>13, 14</sup>



**Şekil 2.1.** Pankreasın normal embriyolojik gelişimini gösterir şekil. Ventral pankreas tomurcuğu (VP) ve dorsal pankreas tomurcuğu (DP) ile birleşmesi olayı

Fetüslerde organ gelişimi sırasında, hücrelerin koordineli polarizasyonu ile ilkin küçük delikler oluşur. Bu delikler daha sonra bir ağ örgüsü oluşturmak üzere birbirine bağlanır ve kaynaşır. Bu sayede kanallar oluşur. Bu ileri düzey bağlantılı ağ daha sonra doğum zamanında ağaçbenzeri bir yapıya dönüşmüş olur.<sup>15</sup> Pankreasın parankimi, pankreas tomurcuklarına ait endodermin oluşturduğu tübüler bir ağdan gelişir. Erken fetal dönemde, bu tübüllerin (pankreas kanalları taslağı) uçlarının çevresindeki hücre kümelerinden pankreatik asinuslar gelişmeye başlar. Pankreas adacıkları, bu tübüllerden ayrılan bir grup hücre tarafından oluşturulur ve asinuslar arasında uzanır. Pankreasın bağ dokusu ve interlobüler septası çevre splanik mezenşiminden gelişir.<sup>14, 16</sup>

## **2.2. Pankreas Histolojisi**

Pankreas hem hormon hem de sindirim enzimleri salgılayan bir salgı bezidir ve gastrointestinal sistemin bir parçasıdır. Pankreasın sindirim enzimleri üreten ve bunu bağırsağa kanallar aracılığı ile salgılayan ekzokrin kısmı ile vücutta enerji metabolizmasını ve depolanmasını kontrol eden hormonları üreten ve bunu kana salgılayan endokrin kısmı bulunmaktadır.<sup>14</sup>

Ekzokrin bölümü çeşitli sindirim enzimleri salgılayan, saf seröz bileşik alveolar veya tuboalveolar bir bezdir. Pankreasın ekzokrin işlevi, pankreatik asiner hücreler ve pankreatik ductal hücreler adlı iki hücre tipi ile yerine getirilir. Pankreas asiner hücresi, ekzokrin pankreasın fonksiyonel birimidir. Pankreatik asiner hücreler, günlük gıda maddelerinin sindirimi için besinlere cevap olarak enzimlerin sentezlenmesi, depolanması ve salgılanmasından sorumludur. Duktal hücreler ise bu enzimleri bağırsağa yönlendiren kanalları meydana getirmiştir. Aynı zamanda klorür ve bikarbonat açısından oldukça zengin bir sıvıyı da kanala salgılar.<sup>17</sup>

Ekzokrin pankreas, tek tabakalı piramidal asiner hücreler ile kaplı asini adı verilen küçük kese benzeri genişlemelerden oluşmuştur. Asiner hücreler sitoplazmaları granüllü endoplazmik retikulum ve golgi aygıtlarının oluşturduğu ayrıntılı bir sistemle doludur. Az miktarda sentroasiner hücreler asinüs lümenini çevreler. Asiner hücrelerden farklı olarak, bu hücreler daha zayıf granüllü endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı sistemleri içerir. Bu hücrelerin en önemli işlevi pankreas salgısının elektrolit içeriğini değiştirmektir. Salgılama ve iyon emilimi süreçleri aktif olduğundan, sentroasiner hücreler sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri içerir.<sup>18, 19</sup> Hem duktal hücreler hem de asiner hücreler polarize epitel hücrelerdir ve salgılarını kanala apikal membran kısmından verirler. Asiner hücrenin komşu hücrelerle kurduğu sıkı bağlantı ve adherens bağlantı türleri vardır. Bunlar sayesinde hem apikal membran bazal membrandan ayrılmış olur hem de pankreatik asiner hücre polarize yapısı sağlanmış olur.<sup>20</sup>

Ekzokrin pankreas üzüm salkımına benzer bir organizasyona sahiptir. Ekzokrin pankreasın iki esas hücre tipi asiner hücre ve duktal hücredir. Asiner hücreler bir araya gelip asini adı verilen küçük kese benzeri genişlemeleri oluşturur. Tek bir asini üzüm salkımındaki bir üzüm tanesine karşılık gelir. Bu asiniler bir kanal sistemine bağlanır. Bu kanallar duktal hücreler ile döşelidir. Duktal epitel hücreleri, asinustaki özel bir sentroasinar hücre bölgesine uzanır. Pankreatik sıvının enzimatik ve sulu komponenti iki ayrı mekanizma ile üretilir. Enzimatik kısmı asiner hücreler tarafından salgılanır, sulu komponenti ise sentrosiner hücreler tarafından salgılanır ve devamında duktal hücrelerin yüzeyinde bulunan iyon transport sistemleri ile modifiye edilir.

Asiner hücreler aktif olarak enzim yapımı ile görevli olduğundan dolayı oluşturulan sindirim enzimleri zimojen granüllerde sekresyonun uyarılmasını tetikleyecek bir uyarı gelinceye kadar saklanır. Özetle asiner hücreler sindirim enzimleri sentezler, depolar ve kanal sistemi ile bağlantılı olan lümeneye salgılayacak şekilde

özelleşmişlerdir. Asiner hücreler sindirim enzimlerini kanla salgılanmasını düzenleyen hormon reseptörleri ve nörotransmitter reseptörlerine sahiptir.<sup>21</sup>

Ekzokrin pankreas için önemli olan diğer iki hücre tipi sentroasiner hücre ve stellat hücredir. Sentroasiner hücreler salgı yapan asinuslar ile ilişkili olduğu duktal epitelinin birleşim yerlerinde konumlanmıştır. Memeli sistemleri ve zebra balığı üzerinde yapılan çalışmalar bu hücrelerin diğer sentroasiner hücreler bunun yanı sıra komşu asiner hücrelerle ve adacık hücre tipleriyle belirgin temas sağlayan uzun sitoplazmik çıkıntılara sahip olduğunu göstermiştir. Eşsiz konumlarına ve morfolojilerine ek olarak, birçok çalışmada erişkin pankreasta sentroasiner hücrelerinin multipotent progenitör hücre adayı olabileceğine dikkat çekilmiştir.<sup>22, 23</sup> Sentroasiner hücreler, bikarbonat salgılayarak kanalın distal kısmındaki içeriği düzenlemede işlev görür ve sıvı akışı için lümeni açık tutar. Sentroasiner hücrelerin birbirlerine bitişik ve hassas yerleşimi ve duktal lümeni oluşturma yeteneği hala yeterince anlaşılammıştır. Tüm omurgalılarda duktal hücrelerin özelleşmiş bir topluluğu olan bu hücreler hem endokrin hem de ekzokrin pankreasın rejenerasyonu için potansiyel hedeftirler. Sentroasiner hücrelerinde aktif olan sinyal yolları, gen ekspresyonları gibi karakteristiklerin zebra balığı ve farede pankreatik rejenerasyona katkı sağladığı gösterilmiştir. Fakat memelilerde ise pankreasta belirli yaralanma koşullarında faaliyete geçebilecek benzer karakteristiklerin sentroasiner hücrelere progenitör bir kapasite sağlayıp sağlamadığı henüz belli değildir.<sup>24, 25</sup>

Pankreatik stellat hücreler (PaSH), pankreasın kütesinin yalnızca %4'ünü oluşturmaktadır. Stellat hücreyi ilk kez 1876 yılında Alman asıllı araştırmacı Karl Wilhelm von Kupffer karaciğer dokusunda tanımlamıştır. Kupffer, bu hücreleri karaciğerde perisinüzoidal aralıktaki yıldız şekilli hücreler (Almanca; Sternzellen) olarak tasvir etmiştir. Benzer hücreler böbrek ve akciğerde de bulunmuştur.

Pankreas dokusunda da stellat hücrelerin varlığı ilk kez 1982 yılında Japon asıllı bilim adamı Watari tarafından elektron mikroskobu ile gösterilmiştir.<sup>26, 27</sup>

Bu hücrelerin keşfinden çok sonra, 1998 yılında Pankreatik stellat hücreler kemirgen ve insan dokusundan izole edilebilmesi ile kültür ortamında araştırmalara başlanabilmiştir. Pankreasın iki önemli hastalığı olan kronik pantreatit ve pankreas kanseri ile bağıntılı bir histolojik özellik olan pankreatik fibrozis tablosunun oluşmasında, stellat hücrelerin önemli bir rol oynadığı bugün bilinmektedir. Genel olarak fibrozis, ekstrasellüler matriks proteinlerinin (özellikle fibrillar kollajenlerin) yapım ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ve ortamda birikmesi olarak tanımlanır. PaSH de bu ekstrasellüler matriks proteinlerini sentezleme ve salgılama yeteneğine ayrıca bunların çoğalmaları ve göçleri üzerinde etkiye sahiptir. Buna ilave olarak, PaSH'ler ekstrasellüler proteinler üzerinde etkili yıkım enzimleri de sentezlemektedir. Pankreatik hasar sırasında stellat hücreler sessiz olarak tanımlanan durumlarından çıkarak aktif hale gelirler. Faaliyetleri belirgin derecede artmış olup yeni durumlarında yapım ve yıkım arasındaki denge ciddi derecede bozular. Yapım lehine artan bu değişim sonucu aşırı miktarda ekstrasellüler protein sentezlenir neticede patolojik fibroze neden olur.<sup>27, 28</sup>

PaSH'ler pankreatik hasar sonrasında aktive olabildikleri gibi bunun yanı sıra pankreatik kanser hücreleri tarafından da aktif hale getirilirler. Kanser hücreleri ile PaSH'lerin karşılıklı iletişim halinde olmaları sonucunda tümör mikro çevresi şekillenir ve tümörün büyümesine elverişli bir mikro ortam oluşur. Pankreatik kanserde gelişen kemoresistansta da PaSH'lerin rolü vardır. Gelişen fibrozis tümör mikro çevresini hipoksik hale getirdiği için doğrudan kanser hücresinin kemorezistansını destekler. Aynı zamanda fibrozis kanser hücrelerine etkili ilaç perfüzyonunu bozarak dolaylı yoldan da kemorezistansı arttırır.<sup>29,30</sup>



Paul Langerhans, 1869 yılında sunduğu “Pankreasın mikroskopik anatomisine katkılar” başlıklı tezinde, pankreasta çevre dokulardan farklı boyanan hücre topluluklarının varlığını keşfetmiştir. Aynı çalışmada, adacıklara ek olarak Langerhans, ilk kez ekzokrin pankreasın iç şeklindeki sentroasinar hücrelerini de tanımlamıştır. Langerhans gözleminin insan vücudunun temel işlevini ve patolojideki açısından ne kadar önemli olacağını bilmiyordu. Sadece bu olağandışı yapıların lenf bezleri olabileceğini ileri sürmüştür.<sup>31</sup> 1893 yılında Fransız patolog GustaveEduard Laguesse (1861-1927) pankreastaki bu hücre topluluklarına, Langerhans’ı onurlandırmak için, “Langerhans adacıkları” adını verdi. Ayrıca, Laguesse bu adacıkların kan glukoz seviyelerini kontrol eden maddeler içerebileceğini öne sürmüştür. 1909 yılında, Belçikalı Doktor Jean de Mayer, Langerhans adacıkları tarafından üretildiği varsayılan maddeyi “insülin” olarak adlandırmıştır.<sup>32,33</sup>

Endokrin pankreasındaki hücreler, pankreatik hücre kümeleri halinde (Langerhans adaları) organize olmuşlardır. Langerhans adacıkları pankreas hacminin yaklaşık %1-2’sini oluşturur. Bu bölüm tipik endokrin sekresyon yapan doku örneği gösterir. Hormon sentezleyen hücre grupları ve hormonun direk olarak kan dolaşımına verilmesini sağlayan pencereci kan kapillerlerinden oluşur. Endokrin hücre adacıkları sinüzoid kapillerlerden zengindir. Bu bölümden başlıca, kan glikoz seviyesini düzenleyen insülin ve glukagon salgılanır.<sup>18</sup>

Adacıkların çoğu (Langerhans adacıkları) ebat olarak büyük farklılıklar gösterir. İnsanda ortalama boyutları 100-150 mikrometre arasında olup adacıkların %70’i 50 mikrometre ile 250 mikrometre arasında ebatlara sahiptir. Daha küçük adacıklar asinar lobüller arasına dağılmış ve çok daha geniş olanları pankreasın ana ve interlobular

kanalları boyunca yerleşmiştir. Yetişkin bir insanda adacıkların sayısı 500 000- 1 000 000 arasında değişirken daha küçük canlılarda bu sayı çok daha azdır.

Adacıklara ilave olarak izole adacık hücreleri asinar lobüller arasına dağılmış halde veya kanallarla ilişkili halde bulunabilir.<sup>14</sup>

Adacıklar içinde, insülini salgılayan  $\beta$ -hücreleri, en yoğun hücre tipidir ve adacıklar içindeki hücrelerin yaklaşık %70'ini oluşturur. Bu hücrelerin insülin içeriği kan glikoz seviyesini düşürücü etki gösterir. Alfa hücrelerinin adacıkta bulunma oranı yaklaşık %15-20'dir. Alfa hücrelerinden salgılanan glukagon, kan glikoz seviyesini düzeltir. %5-10 oranında bulunan D hücrelerinden salınan somatostatin genellikle inhibitör etkili bir hormondur. Bu hücreler dışında adacıkta az sayıda PP (F) hücresi, D-1 hücresi ve EC hücresi izole edilmiştir. PP hücrelerinden salınan pankretik polipeptid mide esas hücrelerini uyarır, safra sekresyonu ve bağırsak motilitesini artırır. D-1 hücrelerinden salınan VIP, glukagon etkisine sahiptir. Ayrıca bağırsakların sekretuar aktivitesini ve motilitesini artırır. EC hücreleri sekretin, motilin ve substans P salgırlar. Sekretin pankreastan enzim sekresyonunu uyarır, motilin mide ve bağırsak motilitesini artırır, substans P ise bir nörotransmitterdir.<sup>17</sup>

### **2.3. Pankreas Anatomisi**

Milattan Önce 3. yüzyılda kadavra üzerinde diseksiyon yapılma yasağı kaldırılması üzerine Herophilus sistematik olarak kadavra inceleme çalışmalarına başlamış ve 30 yılını bu konu üzerinde çalışmaya adanmıştır. İskenderiye tıp okulundaki kadavra çalışmaları sonucu anatomiye olan büyük katkılarından dolayı "Anatominin Kurucusu" olarak kabul edilen Herophilus pankreasın tanımını ilk kez yapmıştır.<sup>34</sup> Efesli Rufus'un (MS 100'üncü yıllarda) yazdığı "İnsan Vücut Kısımlarının Adları" eserinde, Herophilos' un kadavra incelemelerinde betimlediği organı, kemik ve kırık

yapısı bulundurmadığı için “pankreas” (Yunanca; pan (tüm) ve kreas (et)) olarak adlandırılmıştır.<sup>35, 36</sup>

Pankreas sekonder retroperitoneal bir organdır. Gri-pembe renkli ve lobuler yapıda olup, uzunluğu ortalama 15 cm (12-18 cm), kalınlığı 2-3 cm, ağırlığı 70-110 g'dır. Pankreas, bursa omentalis, mide ve colon transversumun arkasında yer alır. L1-L2 vertebralar seviyesindedir. Duodenumun oluşturduğu kavsin içinden solda dalağa kadar transvers olarak uzanır. Regio epigastrica ve regio hypochondriaca sinistra'da yer tutar. Caput (baş), collum (boyun), corpus (gövde) ve cauda (kuyruk) olmak üzere dört kısımdan oluşan bir organdır. Ayrıca processus uncinatus adlı bir de aksesuar lobu da bulunmaktadır. Caput pancreatis, duodenumun şekil olarak C harfine benzeyen kavsinin içinde konumlanmış ve çevresi de duodenum kavrine uyacak şekildedir. Caput pancreatis, pankreasın en geniş bölümüdür. Lumbal ikinci vertebranın hemen sağında yer alır. Collum pancreatis, caput pancreatis ile corpus pancreatis bölümleri arasında yer alır. Uzunluğu 2-2.5 cm olup pankreasın en kısa ve en dar bölümünü oluşturur. Corpus pancreatis, L1 ve L2 vertebralar hizasında, vücut orta hattının sol ve yukarısında yer alan parça olup, prizmaya benzer yapıdadır. Cauda pancreatis ise Corpus pancreatis'in sol tarafa devamı şeklindedir. Tamamen periton ile kaplıdır.<sup>37</sup>

Ana pankreas kanalı (duktus pankreatikus major) ilk olarak Johan Georg Wirsung (1589-1643) tarafından 1642 yılında tanımlanmıştır. Bu kanal Wirsung kanalı olarak da isimlendirilir. Farklı anatomistler aksesuar pankreas kanalından eserlerinde bahsetmiş fakat bunu anatomik bir varyasyon olarak tanımlamışlardır. Giovanni Domenico Santorini (1681-1737) aksesuar pankreas kanalını ayrı bir yapı olarak değerlendirmesi sebebi ile bu ikinci kanalı tanımlayan kişi olarak kabul edilmektedir. İkinci bir pankreas kanalının yeniden keşfi nedeniyle bu kanala Santorini kanalı denilmektedir.<sup>35</sup>

Ana (duktus pankreatikus major, wirsung kanalı) ve aksesuar (duktus pankreatikus assesorius, Santorini kanalı) pankreas kanalları genellikle birbiri ile bağlantılıdır.

Bu iki kanalın varlığı embriyolojik olarak pankreasın ventral ve dorsal çıkıntından meydana geldiğini gösterir.<sup>38</sup>

Pankreas ekzokrin salgısını duktus pankreatikus major ve duktus pankreatikus assesorius kanalları vasıtası ile duodenuma boşaltır. Duktus pankreatikus, cauda pancreatis'den başlar ve pankreasın arka yüzüne daha yakın seviyede seyrederek caput pancreatis'e kadar gelir. Caput pancreatisin alt parçası ve processus uncinatus hariç, pankreasın büyük bir bölümünün ekzokrin salgısını taşır. Karaciğerden çıkan duktus hepaticus communis aşağıya doğru inerken safra kesesinden gelen duktus sistikus ile birleşir. Böylece duktus koledokhus [biliaris] oluşur. Duktus pankreatikus major, safra kanalı ile birlikte duodenuma açılır. Duktus pancreaticus major ve duktus koledokus birlikte, duodenumun ikinci parçasının duvarını arka ve içten deler. İki kanal birleşerek bir şişkinlik olan ampulla Vater'i (ampulla hepatopancreatica) meydana getirir. Şişkinliğin ucu tekrar daralır ve papilla duodeni major'un tepesine açılarak duodenuma giriş yapar. Duktus pankreatikus son bölümü ile duktus koledokhusun son bölümleri çevresinde birer sfinkter bulunur. Ayrıca ampulla hepatopancreaticanın da etrafında bir düz kas halkası olan ve m. Sphincter ampullae (Oddi) denilen üçüncü bir sfinkter bulunur. Duktus pankreatikus accessorius kanalı tüm pankreas boyunca uzanmaz sadece caput pancreatiste bulunur. Processus uncinatus ve caput pankreatikusun alt bölümünü drenaj eder ve papilla duodeni minor'un tepesine açılarak duodenum'a giriş yapar. Papilla duodeni minör, papilla duodeni majordan 2 cm yukarıda bulunur. Pankreasın her iki kanalının çeşitli anatomik varyasyonları olabilir. Bazı kişilerde esas drenaj işini Santorini kanalı üstlenebilir veya ana kanala zarar geldiğinde bu görevi aksesuar kanal

üstlenebilir. Santorini kanalının embriyolojik dönemde hiç gelişmediği ve organda hiç mevcut olmadığı durumlar da vardır.<sup>38-40</sup>

### **2.3.1. Pankreasın Kan Desteği**

Pankreas kan desteğini çölyak ve süperiyor mezenterik arterden alır. Caput pankreatikus ve unsinat prosesus gastroduodenal arterden (hepatic arterin bir dalı) gelen süperiyor pankreatikoduodenal dallardan ve süperiyor mezenterik arterden gelen inferiyor pankreatikoduodenal dallardan kan desteği alır. Bezin geri kalan kısmı splenik arterin dallarıyla beslenir. Pankreasın venöz drenajı portal sisteme geçer. Bezin baş kısmından gelen süperiyor ve inferiyor pankreatikoduodenal venler sırasıyla, portal ven ve süperiyor mezenterik vene geçer. Bezin geri kalanından gelen venler splenik vende sonlanır.<sup>41</sup>

### **2.3.2. Pankreasın Otonomik İnervasyonları**

Pankreas ekstrensek ve intrinsik innervasyona sahiptir. Ekstrinik innervasyon, dorsal kök gangliyonlarından çıkan duyu siniri liflerini ve sempatik zincirin gangliyonlarından çıkan sempatik sinir liflerini taşıyan vagus siniri ve splenik sinirden kaynaklanır. Çölyak trunkusta bir araya geldikten sonra, ekstrinsik lifler pankreasa ana pankreas damarları boyunca seyrederek giriş yaparlar. Vagus sinirinin lifleri ya doğrudan pankreasa girer ya da bir kısmı çölyak trunkustan geçerek son olarak sinaps yapacakları organ içindeki intrinsik gangliona giderler. İntrinsik innervasyon, sıklıkla Langerhans adacıklarında yerleşik olan intrapancreatik ganglionlarda meydana gelir.<sup>13</sup>

Parasempatik sinirler n. vagus'tan, sempatik sinirler T9-T10'dan gelir. Parasempatik ve sempatik sinir lifleri, plexus çölyakus (coeliacus) ve plexus mesenterikus superiordan çıkan liflerdir. Damarlarına (vasomotor) da sadece sempatik uyarı gider.<sup>39</sup>

Pankreas, plexus coeliacus'tan ayrılan sempatik ve parasempatik sinir lifleri tarafından innerve edilir. Sinir lifleri damarlar ile birlikte pankreasa gelir. Parasempatik etki pankreas ekzokrin salgısını arttırırken, sempatik etki azaltır.

Parasempatik etki Langerhans adacıklarında bulunan beta hücreleri uyarak insülin salgılatırken, sempatik etki glukagon salgılatır. Pankreas'ın salgı yapmasında kısmen hormonların da etkisi vardır. Pankreatik sıvının salgılanmasında sinir olarak n. vagus, hormon olarak duodenum'da bulunan sekretin ve kolesistokinin hormonları sorumludur.<sup>37</sup>

#### **2.4. Pankreas Fizyolojisi**

Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin olarak iki ayrı işleve sahiptir. Endokrin hücreler, duktal sistemin yakınında yerleşik Langerhans adacıklarında bulunur ve ürettiği hormonları kan dolaşımına salgılayarak glukoz homeostazını düzenler. Pankreasın ekzokrin kısmının faaliyeti ise içeriğinde sindirim için önemli olan sindirim enzimleri, iyonlar ve su bulunan pankreatik sıvıyı gastrointestinal kanalın ince bağırsak kısmına salgılamaktır.

Ekzokrin pankreasın işlevini yerine getiren esas iki hücre asiner hücre ve duktal hücrelerdir. Asiner hücreler, sindirim enzimlerini sentezler ve onları kanallara salgılayarak duodenuma iletirler. Kanalları oluşturan küçük duktal kanalları döşeyen duktal epitel hücreler, bikarbonat, su ve kanalları koruyan mukus salgılar. Kanal sekresyonlarının temel pH'ı, sindirim enzimlerini duodenuma erişinceye kadar inaktif halde tutar. Ayrıca, pankreas sıvısının enzimler yanında önemli diğer iki bileşeni olan bikarbonat ve su, mideden duodenuma boşalan kimustaki asidi nötrale etmektedir. Bu mekanizma, pankreas enzimlerinin çalışması için duodenumun ortam pH'sının nötral pH'ya yakın olması gerektiğinden önemlidir.<sup>15</sup>

Pankreatik sıvı % 99.5 oranında su ve % 0.5 oranında solitler ihtiva eder. Solitler organik ve inorganik maddelerden oluşur. Salgılanan pankreatik sıvı hacmi günlük olarak yaklaşık 1500 ml civarında değişirken özgül ağırlığı ise 1.010 ile 1.018'dir. Pankreas uyarıldığı zaman bikarbonat iyon konsantrasyonu plazmadaki seviyesinin (24 mEq/L) yaklaşık 5 katına ulaşır ve pankreas sıvısında pH= 8.2, en fazla bikarbonat konsantrasyonu ise 140 mEq/L'dir. Bikarbonatın yüksek oluşu pankreatik sıvıyı alkali yapar. Safra ve bağırsak sıvıları da alkalidir ve bu üç salgı mide asidini nötralize ederek duodenum içeriğinin pH'sını 6.0'dan 7.0'a yükseltir.<sup>42, 43</sup>

Su ve Na, K, Cl ve bikarbonat iyonları pankreatik sıvının esas inorganik bileşenleridir. Bir öğün sırasında bu bileşenler ve bunların akışı asiner hücrelerden salgılanan pankreatik enzimlerin lümenine taşınması için gereklidir. Su ve iyon sekresyonu sadece kimüs içeriğini nötralize etmek için değil asiner hücrelerden salgılanan pankreatik enzimlerin kanal içinde akışı için de gereklidir. Su ve iyon sekresyonundaki meydana gelebilecek bozukluklar salgıların daha az alkali, daha yapışkan ve koyu özellikte olmasına ve pankreas kanallarının yoğun-yapışkan salgıyla tıkanmasına neden olur.<sup>44, 45</sup>

Pankreas salgısı bikarbonat ve su içeriğinin yanısıra üç ana tip besinin sindirimi için gerekli enzimleri de içerir. Bu besinler, proteinler, karbonhidratlar ve yağlardır. Proteinleri sindiren enzimler arasında en önemlileri, tripsin, kimotripsin ve karboksipolipeptidazdır.<sup>46</sup> Bunlar içinde en fazla bulunanı tripsindir. Karbonhidratlara etkili pankreas enzimi esas olarak pankreatik amilazdır. Bu da nişasta, glikojen ve diğer karbonhidratların birçoğunu (selüloz hariç) çoğunlukla disakkaritler ve az miktarda trisakkaritler oluşturmak üzere hidrolize eder. Yağ sindirimin başlıca enzimleri ise; 1) pankreas lipazı, nötral yağları yağ asitleri ve monogliseritlere parçalar

2) kolesterol esteraz, kolesterol esterlerini parçalar ve 3) fosfolipaz, fosfolipitlerden yağ asitlerini ayırır.<sup>43, 47</sup>

Tükrük bezleri, mide ve sindirim kanalının epitel yüzeyinden de salgılanan sindirim enzimleri de besinlerin sindirimine katkı sağlar. Bununla birlikte, ekzokrin pankreas besinlerin sindirilmesi olayının büyük kısmı için gereklidir ve yokluğunda yetersiz beslenmeyle sonuçlanan önemli bir sindirim kaybı vardır.<sup>48</sup>

Pancreas sıvısının salgılanmasındaki yetersizlik esas olarak yağ malabsorbsiyonuna (steatore), yağda eriyen vitaminlerin malabsorbsiyonuna ve kilo kaybına yol açar. Pankreatik lipaz yağ sindirimi için zorunlu olduğundan, yokluğu steatoreye (yağlı, hacimli, açık renkli dışkı) yol açar. Diğer yandan pankreatik amilaz ve tripsin karbonhidrat ve protein sindirimi için önemli olsa da gastrik ve intestinal sıvıdaki diğer enzimler bunların yokluğunu genellikle kapatırlar. Bu nedenle pancreas yetmezliği olan hastalar nadiren karbonhidrat ve protein (nitrojen kaybı) maldigestionu gösterir. Ekzokrin fonksiyonların bozulması kendini pancreas yetmezliği ile gösterir. Çocuklarda kistik fibrosiste, akut pankreatitin bazı durumlarında, kronik pankreatitin sıklıkla ilerleyen dönemlerinde, pankreas rezeksiyonu ve pancreas karsinomasının bazı olgularında pankreatik ekzokrin yetmezlik gelişebilir.<sup>49</sup>

## **2.5. Pankreas Kanseri**

Uluslararası Kanser Ajansı [International Agency for Research on Cancer (IARC)] tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 raporunda dünya genelinde 2018 yılında 18.1 milyon yeni kanser vakası (nonmelanom cilt kanseri hariç tutulduğunda 17 milyon kişi) ve 9.6 milyon kansere bağlı ölüm (nonmelanom cilt kanseri hariç tutulduğunda 9.5 milyon kansere bağlı ölüm) olacağı öngörülmektedir. Erkeklerde öngörülen kanser vakası (9.5 milyon) kadınlardakine göre (8.6 milyon) daha fazladır. Aynı şekilde erkeklerde öngörülen kansere bağlı ölüm (5.5 milyon) kadınlardakine göre (4.2 milyon)



daha fazladır. Pankreas kanseri için dünya genelinde 2018 yılında 458.918 yeni kanser vakası ve 432.242 kansere bağlı ölüm vakası olacağı öngörülmektedir.<sup>50</sup>

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2017 yılı ölüm nedeni istatistiklerine göre ülkemizde ölüm vakalarının %39.7'sini oluşturan dolaşım sistemi hastalıkları ilk sıradayken bunu %19.6 ile iyi ve kötü huylu tümörler, %12 ile solunum sistemi hastalıkları izlemiştir. Kötü huylu tümörlere dayalı gerçekleşen ölün sayısı 2017 yılında 31.024 kişidir. Ölüm nedeni istatistikleri yaş gruplarına göre incelendiğinde; iyi ve kötü huylu tümörlerin ise en fazla (22 bin 982 kişi) 65-74 yaş grubunda olduğu görülmüştür. Pankreasın kötü huylu tümörü nedeniyle 2017 yılında 4920 ölüm vakası görülmüş ve kötü huylu tümörler nedeni ile gerçekleşen tüm ölümler içinde % 6 lık bir oranla yerini almıştır.<sup>51</sup>

2015 yılına ait Türkiye Birleşik Veri tabanına göre yaş aralığına ve cinsiyete göre ilk ve en sık görülen ilk on kanser türü belirlenmiştir. Pankreas kanserinin görülme oranları erkeklerde 50-69 yaş aralığında % 2.4'lik bir oranla ilk on kanser arasında dokuzuncu sırada iken kadınlarda aynı yaş aralığında bu oran % 2.0 ile onuncu sıradadır. 70 yaş ve üzerinde erkeklerde pankreas kanseri % 2.1 oranla ilk on kanser arasında sekizinci sırada iken kadınlarda % 3.7 ile beşinci sırada görülmektedir.<sup>52</sup>

Pankreas kanserinin görülme sıklığı ve mortalite oranları gelişmiş ülkelerde daha fazladır. Pankreas kanseri için tahmini 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık % 5'tir. Sigara içme, pozitif aile öyküsü ve genetik, diabetes mellitus, obezite, diyet faktörleri, alkol kullanımı, fiziksel hareketsizlik gibi belirli risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen, pankreas kanserinin nedenleri hala yeterince bilinmemektedir.<sup>53</sup>

Pankreas kanseri tanısında; karsinoembriyjenik antijen (CA) 19-9, CA 72-4, CA 50, CA 242 gibi tümör markırları kullanılmaktadır. Pankreas kanserinin erken tanısında, tümör lokalizasyonunda, invazyonu saptamada, taramada ve evrelemede;

endoskopik ultrasonografi (EUS), magnetik rezonans kolanjiyopankreatografi (MRCP), magnetik rezonans (MR), bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emisyon tomografisi (PET), biyopsi (perkütan veya endoskopik), endoskopik yaklaşımlar (pankreatoskopi, endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi (ERCP), optikal endomikroskopi, intraduktal ultrasonografi (USG), enhanced USG, elastografi gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır.<sup>54</sup>

### **2.5.1. Pankreas Kanserlerinin Terminolojisi ve Sınıflandırılması**

Literatürde pankreasın endokrin neoplazilerinin isimlendirilmesine ilişkin ciddi karışıklıklar vardır. 19. yy başlarında klinik vakalar ve otopsilerden rapor edilen ve dönemin imkânları doğrultusunda yapılan incelemeler sonucu bu lezyonların Langerhans adacıklarındaki hücrelerden kaynaklandıkları inancıyla “basit adacık hücresi tümörleri” (simple cell adenoma) olarak tanımlanmıştır.<sup>36</sup>

Daha sonra elde edilen bulgular ışığında bunların duktal epitelde yer alan pluripotent hücrelerden köken alabileceği öne sürüldüğü zaman “adacık hücre tümörleri” terimi yerine “pankreatik endokrin tümörleri” terimi tercih edilmeye başlanmıştır.

Bu tümörlerin difüz nöroendokrin sisteminin parçası olan hücrelerden kaynaklanabileceği düşüncesiyle “pankreas nöroendokrin tümörleri” terimi de önerilmiştir.<sup>58</sup>

Gastroenteropankreatik nöroendokrin tümörler (GEP-NET) için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2010 yılı sınıflandırma sistemi de bu tümörleri tanımlamak için “nöroendokrin” teriminin kullanılmasını önermiştir.

Pankreasın nöroendokrin neoplazilerinin adlandırılmasındaki karışıklık, sadece hücrelerin kökenine ilişkin belirsizlikten değil, aynı zamanda klinik davranışlarındaki çeşitlilikten de kaynaklanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan ve büyüme anlamında olan

“tümör” teriminin kullanımı üzerine de bir anlaşmazlık vardır. Kimileri, bu lezyonların aslında doğada neoplastik olduğuna işaret ederek “pankreas endokrin / nöroendokrin neoplazileri” terimini önermektedir. Bununla birlikte, kimileri de bu tümörlerin neredeyse hepsinin uzun yıllar sonra bile metastaz yapma potansiyeline sahip olduklarından malign olduğunu iddia edip bu nedenle de pankreasın tüm endokrin tümörleri için “pankreas endokrin/nöroendokrin karsinomları (PEC/PNEC)” terimini önermektedir. DSÖ 2010’un GEP-NET’lerin sınıflandırma sistemine göre bu lezyonlar için “pankreas nöroendokrin tümörleri” (PNET’ler) terimi kullanılmıştır. Sınıflandırmada PNEC terimi, yüksek proliferatif oranları olan kötü diferansiye tümörleri tanımlamak için ayrılmıştır.

Diğer yanlış bir isim “karsinoid” (kanser benzeri) terimidir. Bu terim ilk olarak 1907’de Oberndorfer tarafından ortaya atılmış ve farklı tanımlamalar için kullanılmıştır. Karsinoidler arasında biyolojik ve morfolojik heterojenitenin çok fazla oluşu DSÖ’nün GI/PNET’in 2000/2004 sınıflandırmasında NET ve NEC terimlerinin kullanımını ihtiyacını doğurmuş bununla birlikte karsinoid terimi sınıflamada içinde kalarak iyi farklılaşmış gastroenteric NET’lerin eşanlamlısı olarak kullanılmıştır. DSÖ’nün 2010 GEP-NET sınıflaması, DSÖ 2004 sınıflandırmasındaki “iyi farklılaştırılmış NET” e karşılık gelen NET’leri (grade 1) tanımlamak için karsinoid terimini korumuştur. Bununla birlikte, PNET’ler arasında karsinoid teriminin kullanımı, serotonin salgılayan (tüm serotonin üreten NET’lerin %1’inden daha azını temsil eden) ve “karsinoid sendromuna” neden olan PNET’ler için kullanımı sınırlanmıştır.<sup>59, 60</sup>

## 2.5.2. Pankreasın Ekzokrin Tümörleri

Pankreasın ekzokrin dokusunda görülen tümörlerin Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırılması Tablo 2.1’de verilmiştir.<sup>55</sup>

**Tablo 2.1.** Ekzokrin pankreas tümörlerinin histolojik sınıflandırılması

<b>EPİTELYAL</b>	
<u>Bening</u>	<u>Malign</u>
Seröz kistadenom	Duktal adenokarsinom
Müsinöz kistadenom	Müsinöz nonkistik karsinom
İntraduktal papiller-müsinöz kistadenom	Taşlı yüzük hücreli karsinom
Matüre teratom	Adenoskuamöz hücreli karsinom
	Andiferansiye (anaplastik) karsinom
<u>Borderline</u> (Kesin olmayan malinite potansiyeli)	Osteoklast benzeri dev hücreli andiferansiye karsinom
Müsinöz kistik neoplazi-orta derece displazi	Mikst duktal-endokrin karsinom
İntraduktal papiller-müsinöz neoplazi-orta derecede displazi	Seröz kistadenokarsinom
Solid-psödopapiller neoplazi	Müsinöz kistadenokarsinom
	-Non-invaziv
	-İnvaziv
	İntraduktal papiller-müsinöz karsinom
	-Non-invaziv
	-İnvaziv
	Asiner hücreli karsinom
	Asiner hücreli kistadenokarsinom
	Mikst asiner-endokrin karsinom
	Pankreatoblastom
	Solid psödopapiller karsinom

## NON-EPİTELYAL TÜMÖRLER

### SEKONDER TÜMÖRLER

### 2.5.3. Pankreasın Endokrin Tümörleri

Nöroendokrin tümör bilindiği üzere nöral ve endokrin yapılarda ortaya çıkan geniş bir neoplazi ailesinin bütününe ifade eden kapsayıcı bir tanımdır. Bu neoplazilerin yerleşimleri sinir pleksusları ve ekstraadrenal paragangliolarını (paraganglioma); tiroid, paratroid ve adrenal bezler gibi saf endokrin organları (sırasıyla, medüller tiroid karsinomu, paratiroid adenomları veya karsinomlar ve feokromositoma); ve çeşitli organlardaki difüz endokrin sistem diye ifade edilen sistemin özelleşmiş yapı ve elemanlarını (adacık hücre tümörleri, karsinoidler, büyük hücreli ve küçük hücreli karsinomalar) kapsamaktadır.<sup>56</sup>

Pankreatik nöroendokrin tümörler (PNET) pankreasta ortaya çıkan bir grup endokrin tümördür ve nöroendokrin tümörler içinde en yaygın olanlardır. Fonksiyonel PNET grubu insulinoa, gastrinoma, VIPoma, glukagonoma gibi hormonal hipersekresyon belirtileri gösteren tümörlerdir (Tablo 2.2). Nonfonksiyonel PNET grubu pankreatik nöroendokrin tümörler içinde en geniş grubu oluşturur ve hormonal aşırılığın belirtilerini göstermezler; aksine normal dokuları istila ederek ve metastaz yaparak morbidite ve mortaliteye neden olurlar.<sup>57</sup>

**Tablo 2.2.** Fonksiyonel pankreatik nöroendokrin tumor sendromları

Tümör	Semptomlar
İnsulinom	Hipoglisemi
Gastrino	İleri peptik ülserasyon
VIPoma	Sulu diyare, hipokalemi, aklorhidri
Glukagon	Glukoz intoleransı, nekrolitik gezici eritem,
Somatost	Hiperglisemi, kolelityazis, steatore, aklorhidri

#### 2.5.4. Pankreas Kanserinde Kemoterapi

PK hastalarının tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulanabilmektedir.<sup>1</sup> Ancak PK hastalarına PK'nın karakteristik özellikleri nedeniyle (yeri, hücresel özellikleri gibi) geç tanı konulmaktadır<sup>61</sup> PK hastalarında tanı konulduğunda ise lokal olarak ilerlemiş olması, cerrahiye uygun olmaması<sup>62</sup> ve genelde metastaz başladığından dolayı cerrahi operasyonda da sınırlılıkları vardır. Bu nedenle, kemoterapi öncesi cerrahi uygulama hastaların yalnızca %20'den daha azına yapılabilmektedir<sup>63</sup>. PK'de cerrahi yaklaşım yaşam oranını %5'lerden %20-25'lere kadar çıkarmasına rağmen<sup>2</sup> cerrahi yapılanların büyük çoğunluğunda nüks geliştiğinden,<sup>64</sup> cerrahi yapılsın veya yapılsın PK hastalarının tedavisinde kemoradyoterapi (neoadjuvan)<sup>63</sup> ya da yalnızca kemoterapötik tedavi uygulanmaktadır<sup>65</sup>. Tüm kanserlerde olduğu gibi PK tedavisinde de başarı oranı birbirinden farklılık gösteren birçok kemoterapötik yaklaşım vardır.<sup>62, 64, 65</sup> Ayrıca, PK kemoterapisinde başarı, pankreasın yapısı, kanser dokusunun mikroçevresi<sup>62</sup> ile PK'nın genetik ve epigenetik açıdan yüksek heterojenitesi<sup>63</sup> nedeniyle zordur. Bugüne kadar ki uygulamalar maalesef güvenilir sonuçlar vermemektedir<sup>63</sup> ve son yıllardaki artan araştırmalara ve yeni tedavi protokollerine rağmen başarı oranının maalesef değişmediği bildirilmektedir.<sup>62</sup> En iyi kemoterapi uygulamalarında bile yaşam oranı 1 yılı geçmemektedir.<sup>64</sup>

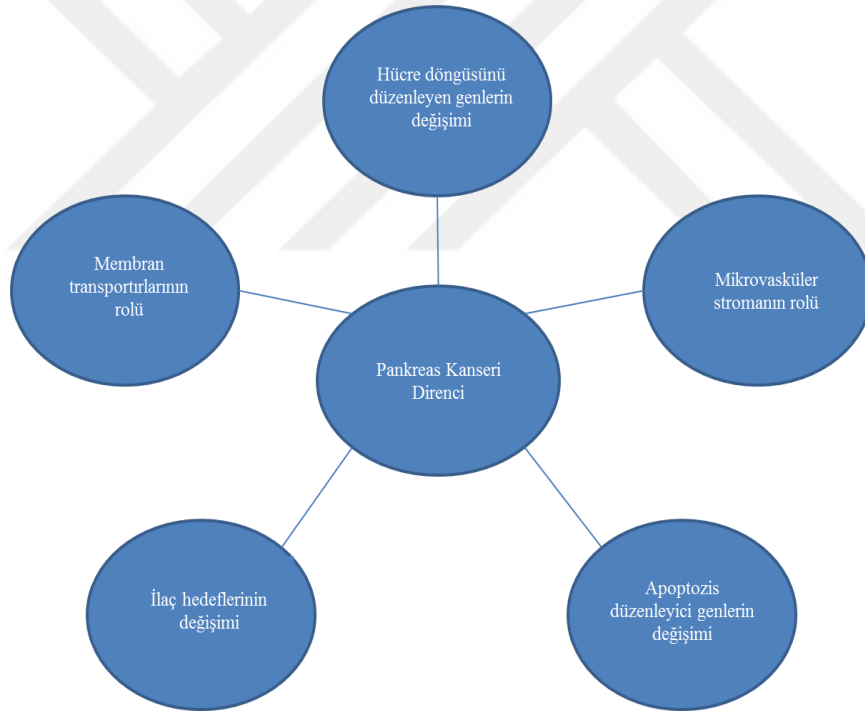
PK tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar gemsitabin (Gemcitabine), kapesitabin (Capecitabine), erlotinib, sisplatin/oksalipatin (cisplatin/oxaliplatin), taksanlar (taxanes) ve 5-FU olarak özetlenebilir.<sup>1, 63</sup>

PK tedavisinde ilk kullanılan ajan 5-FU'dur ancak gemsitabinin kullanımının 5-FU'ya göre yaşam süresini arttırmasından sonra gemsitabinin monoterapisi ilk kemoterapötik yaklaşım olmuştur.<sup>66</sup> Genel olarak gemsitabin 5-FU'ya göre yaşam

süresi açısından üstünlüğü olmasına rağmen son yıllarda hem gemsitabin hem de 5-FU temelli kombinasyon tedavilerinin kullanımı artmıştır.<sup>62</sup> Yıllarca Gemsitabin içeren kombinasyon yaklaşımlarının gemsitabinin tek başına uygulanmasına herhangi bir üstünlük sağlamaması<sup>62</sup> başka kemoterapötik yaklaşımların doğmasına neden olmuştur.<sup>64</sup> Bir çalışmada 5-FU/Lökovorin, irinotekan, oksaliptin (FOLFIRINOX) kombinasyonunun tek başına gemsitabin kullanımına göre sağ kalımı arttırdığının saptanması gemsitabin kullanımı yerine 5-FU içeren FOLFIRINOX gibi yaklaşımların önemini arttırmıştır.<sup>63, 64</sup> Günümüzde gemsitabinin tek veya başka ajanlarla kombinasyonu yerine 5-FU içeren kombine kemoterapötik yaklaşım önerilmektedir.<sup>64</sup> Bu tez çalışmasında da bu nedenle 5-FU kemoterapötik direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kemoterapide, tedavi başlangıcında veya sonrasında kemoterapiye karşı direnç gelişebilmektedir.<sup>1</sup> Tedavinin başlangıcında saptanan kemoterapötik dirence kalıtsal ve/veya primer direnç tedavi sürecinde gelişen direnç ise kazanılmış direnç olarak tanımlanmaktadır. Tedavide karşılaşılan bu dirençler tedavinin başarısını azaltmakta ve ortadan kaldırmaktadır. Etkili bir kemoterapötik tedavi için PK biyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların ve biyobelirteçlerin tanımlanması ve bu biyobelirteçlerin fonksiyonel etkileşimlerinin belirlenmesi önemlidir.<sup>62</sup> Ancak PK kanser biyolojisi günümüzde tam olarak açıklanamamıştır. PK gelişimine, progresyonuna ve kemoterapötik dirence neden olan unsurları onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamirinde rol alan genler ve epigenetik faktörler (miRNA, histon asetilasyonu, DNA metilasyonu gibi) mikroçevre, apoptoza direnç ve kullanılan ajanın hücrel metabolizmasında rol alan faktörler olarak sınıflandırılabilir.<sup>3, 62, 65, 67</sup> Bu faktörler hücrel mekanizmalar üzerinden gösterildiğinde genel olarak Şekil 2.2'deki gibi özetlenebilir.<sup>65</sup> Bu şekilde özetlenen mekanizmalarda yer alan genlerde meydana

gelen genetik ve epigenetik değişimler kanserin oluşmasına, gelişmesine ve kemoterapötik dirence neden olabilmektedir. Bu genler içerisinde PK için prognostik ve/veya prediktif biyobelirteç özelliği bulunan gen bulunmamaktadır.<sup>65</sup> PK tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajana göre direnç genleri ve direnç yolları değişebilmektedir. Ancak literatürde PK'da 5-FU kemoterapötik direncinde potansiyel hücrenel mekanizmaları araştıran çok az çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında 5-FU kemoterapötik direncinin seçilmesinin nedenlerinden biri de son yıllarda kemoterapötik önemi tekrar artan<sup>64</sup> ancak direnç mekanizması hakkında az ve çelişkili sonuçları bulunan 5-FU'unun kemoterapötik direncine ait potansiyel mekanizmaların açıklanmasına katkı sunmaktadır.



**Şekil 2.2.** PK kemoterapötik direncine katkı sağlayan hücrenel değişimler

## 2.6. Leptin Hormonu

Friedman 1994 yılında fare obez (ob) genini ve onun insan homologunu ilk kez pozisyonel klonlama tekniği ile izole etmeyi başarmıştır. Ob geninin mutasyonu sonucu



farede kalıtsal obezite ve diyabetes mellitus gelişmektedir. Bu çalışmada ob geni ürününün adipoz dokuda etkili olup vücut yağ depolarının miktarını düzenlemede rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.<sup>68</sup>

Friedman 1995 yılında ob geninin ürününü saflaştırmış ve bu proteine Yunanca leptos kökünden gelen ve ince anlamına gelen “leptin” adını vermiştir. Farede ob geni mutasyonunda dolaşımda leptin bulunmamakta ve obezite gelişmektedir. Friedman bu çalışmasında rekombinant leptin uygulaması ile bu farelerde kilo kaybı sağlamayı başarmış ve leptinin ob geninin bir ürünü olduğunu, adipoz dokudan salgılandığını ve plazmada bulunduğunu göstermiştir.<sup>69</sup>

Monogenik obezitenin ana nedenleri leptin ve melanokortin yollarının enerji homeostazisi üzerine etkileridir. Monogenik obezite tek mutasyon ile obezitenin meydana gelmesidir ve genellikle nadir gözlenen ve çocukluk çağında başlayan obezite çeşididir. Bazı genlerdeki mutasyonların insandaki obezitenin monogenik formlarına yol açtığı bilinmektedir. Bunlar, Leptin (LEP) hormonu kodlayan genler, Leptin Reseptörü (LEPR= OBR) kodlayan genler, Proopiomelanokortin (POMC) prohormonu kodlayan genler, Prohormon konvertaz 1 (PC1) kodlayan genler, Melanokortin 4 reseptör (MC4R) kodlayan genlerdir.<sup>70</sup>

Leptin, esasen beyaz adipoz dokudaki olgun adipositler tarafından üretilen ve kahverengi adipoz doku, merkezi sinir sistemi<sup>71</sup>, iskelet kası, plasenta, ovaryum, kemik iliği ve mide gibi diğer dokularda daha az miktarda üretilen bir hormondur. Dolaşımdaki leptin, beyine geçerek temel olarak gıda alımını, iştah davranışları ve enerji harcamasını düzenlemede çalışır.<sup>72</sup> Bununla birlikte, elde edilen bulgular ışığında beyin gelişimi, nörogenez, nöronal koruma, ruh hali ve stres düzenlemesi, üreme ve üreme davranışları dahil olmak üzere diğer bir çok nörofizyolojik işlevler de leptinle ilişkilendirilmiştir.<sup>71</sup>

Leptin fizyolojik olarak gıda alımının düzenlenmesinde önemli bir düzenleyicidir.<sup>73</sup> Leptin antiobezite etkisini başlıca enerji alımını azaltarak (iştahın azaltılarak daha az gıda alınması) ve enerji harcanımını artırarak (sempatik sinir sistemi aktivasyonu, termogenezis, artmış oksijen tüketimi) göstermektedir.<sup>74</sup> Ancak mevcut veriler, leptinin öncelikle vücut ağırlığındaki artışları sınırlamak yerine vücut ağırlığındaki azalmaya karşı koruma amaçlı çalıştığını göstermektedir. Adipoz dokudan yağ depolarıyla orantılı olarak salgılanan leptin hormonu, enerji homeostazının kontrolünde önemli bir rol oynar. Yağ depoları tükendiğinde, leptin düşer, iştah artışına ve yağ depolarını önceki seviyelerine döndürmek için azalan enerji harcamasına neden olur.<sup>75</sup> Obezitede ise leptin kendisinden beklenen etkileri gösterememiştir. Çünkü obezite hipotalamik anatomi ve fizyolojide birtakım değişiklikler yaratır. Bu değişiklikler leptin direncinin potansiyel araçlarını ortaya çıkarır. Bunlar, leptin sinyal inhibitörlerinin leptin kaynaklı ekspresyonunu, hipotalamik enflamatuar sinyalleri ve gliozis ve endoplazmik retikulum stresini içerir.<sup>75</sup>

Leptin glukoz homeostasisinde de anahtar bir role sahiptir. Leptinin, esasen hipotalamus üzerindeki etkileriyle glukoz homeostazını etkilediği bildirilmiş olmasının yanı sıra, leptinin periferik eylemleri de söz konusudur. Leptin, doğrudan glukoz metabolizmasını etkileyebilir veya iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusunda insülinin etkileriyle etkileşime girebilir. Ayrıca, bu periferik dokuların yanı sıra, pankreas  $\beta$  hücresi leptin için kilit bir hedeftir. Leptin reseptörleri pankreas  $\beta$  hücresinde bulunur ve leptin bu endokrin hücrelerden insülin sekresyonunu doğrudan inhibe eder. Leptinin insülin üzerindeki etkileri de uzun vade de ortaya çıkar, çünkü bu hormon insülin geni ekspresyonunu da inhibe eder. İlave olarak,  $\beta$  hücre kütlesi, proliferasyon, apoptoz veya hücre büyüklüğündeki değişiklikler yoluyla da leptinden etkilenebilir.  $\beta$ -hücresindeki bütün bu farklı fonksiyonlar, bu hormonun endokrin pankreasında aktif hale

gelebileceği sinyal yollarının çeşitliliğinin bir sonucu olarak leptin tarafından tetiklenir. Bu nedenle, leptin, pankreas  $\beta$ -hücreleri popülasyonunun farklı modülasyon seviyeleri nedeniyle glikoz homeostazına katılabilir.<sup>76</sup>

Leptin bir hormon olmasının yanısıra bir sitokin (adipokin) olarak da işlev görebilen ve birden fazla etkiyi ortaya çıkarabilen pleiotropik bir moleküldür. Nötrofiller, monositler, lenfositler gibi hemen hemen tüm immün hücreler leptin reseptörünü eksprese eder ve bu reseptör klas I sitokin reseptörleri ailesine aittir. Leptin, anjiyogenezi, hematopoezi, doğuştan ve adaptif bağışıklığı düzenler ve monosit/makrofajların aktivasyonuna yol açar ve çeşitli immün hücrelerin apoptozunu önler.<sup>10</sup>

Leptin ve leptin reseptörünün ilk safhada enerji dengesi, metabolizma ve yiyecek alınımına cevaben nöroendokrin yanıtların düzenlenmesinde yer aldığı yönünde tanımlaması yapılmıştır. Daha sonra yapılmış çalışmalarla leptinin yara iyileşmesi, anjiyogenez ile kemik kütlesi düzenlenmesinde<sup>77</sup> önemli olduğu gösterilmiştir.<sup>78</sup>

Leptin reseptörü, sitokin ailesine olan aşırı benzerliği nedeniyle klas 1 sitokin reseptör ailesinden sayılmaktadır. Leptin IL-6 ve IL-11 ile yüksek oranda benzerlik gösterirken, leptin reseptörleri de IL-6 ile homoloji göstermektedir. Bilinen leptin reseptörlerinin tümü aynı genin varyantlarıdır. Buna göre leptin reseptörleri Ob-Rb (Leptin uzun reseptörler) ve Ob-Ra (Leptin kısa reseptörler) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Leptin etkilerini merkezi sinir sisteminde yer alan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak gösterir. Uzun form leptin reseptörü yüksek oranda hipotalamusta ve diğer beyin bölgelerinde ifade edilir. Burada enerji homeostasisini ve nöroendokrin fonksiyonları düzenler ve kendisi ana leptin reseptörü olarak kabul edilir. Ob-Rb reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta (nükleus arkuatus) bulunmalarına rağmen vücudun diğer dokularında da

(akciğer, böbrek, karaciğer, iskelet kası, kalp, testis, hematopoetik hücreler, yağ dokusu) daha az miktarlarda saptanmışlardır. Kısa form leptin reseptörleri ise intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok azdır veya yoktur. Ob-Ra reseptörlerinin bulunduğu başlıca dokular ise böbrek, akciğer, plexus koroideus ve beyin kapillerleridir. Beyin kapillerleri ve plexus koroideus'da Ob-Ra reseptörlerinin bol olarak bulunur.<sup>74,79</sup> Her ne kadar Ob-Ra bir miktar sinyal kapasitesine sahip olabilse de, kısa izoformların işlevi, plazmadaki leptin bağlanması ve taşınması, kan-beyin bariyeri boyunca leptin taşınması veya renal leptin klirensi ile ilişkilendirilmiştir.<sup>76</sup>

Leptin reseptörünün altı isoformu (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re and OB-Rf) vardır. Leptin reseptörü enzime bağlı reseptörlerdendir. Bu reseptörlerin kendileri enzimatik aktivite göstermez ama ilgili enzimler aracılığıyla sinyal iletir. Leptin, reseptörüne (Ob-Rb) bağlandığında reseptörle ilişkisi olan ve kendisi reseptör olmayan bir tirozin kinaz olan *janus kinaz-2*'nin (JAK-2) otofosforilasyonunu ortaya çıkarır. Ardından, JAK-2 reseptörün (Ob-Rb) intrasellüler domainin tirozin rezidülerini fosforiller. Fosforillenen tirozin rezidülerinin çeşidine bağlı olarak farklı tipte intrasellüler yanıtlar tetiklenir.<sup>80</sup> Hücre içi sinyaller, *sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü* (STAT) proteinlerin fosforilasyonunu da kapsar. Bu da leptinin hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive ederek protein sentezini başlatır. JAK2'nin fosforilasyonu, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) ve fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI3K) gibi diğer hücre enzim yollarının aktivasyonuna da yol açar. Leptinin bazı etkileri bu hücre içi enzimlerin aktivasyonu sonucunda hızlı bir şekilde gerçekleşirken, diğer etkileri yeni protein sentezini gerektirir ve daha yavaş olarak gerçekleşir.<sup>81</sup>

Serum leptin konsantrasyonu obez bireylerde ( $31.3 \pm 24.1$  ng/ml) normal kilolu bireylerde ( $7.5 \pm 9.3$  ng/ml) ölçülen serum leptin seviyelerine göre yüksek bulunmuş ve vücut yağ kütlesi arttıkça serum leptin seviyesinin de arttığı gösterilmiştir.<sup>82</sup> Dolaşımdaki leptin seviyeleri esas olarak adipoz dokuda depolanan enerji miktarını göstermesine ve dolayısıyla obeziteyi yansıtmalarına rağmen, insülin seviyeleri ve alkol alımı da dolaşımdaki leptin seviyelerinin artması ile ilişkilendirilmiştir.<sup>83</sup> Leptin hormonu sirkadyen bir ritim ile salgılandığı ve geceyarısı ile sabah erken saatleri arasında en yüksek seviyede iken öğlen ve öğleden sonrasına kadar en düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir.<sup>84</sup>

### **2.6.1. Leptin ve Kanserle İlişkisi**

Obezite ve/veya Tip 2 Diyabet, adipokinler, enflamatuar mediatörler ve değiştirilmiş mikrobiyom dahil olmak üzere, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik faktörler, pankreas kanserinin ilerlemesinde ve farklı moleküler mekanizmalar aracılığı ile de metastazında rol oynar.<sup>85</sup>

Enerji fazlalığının vücutta trigliserit olarak depolamasının yanı sıra adipoz doku, çeşitli organlarda enerji metabolizmasını düzenleyen birtakım faktörler salgılar. Adiponektin, leptin, resistin ve ghrelini içeren bu adipokinler, glukoz ve lipit metabolizmasında önemli bir rol oynar. Bunlar arasında adiponektin ve leptin en önemlileridir ve obezite ile ilişkili pankreas kanserlerinde çalışmaların odak noktasıdır.<sup>85</sup>

Artmış leptin konsantrasyonu ile pankreas kanseri arasında bir ilişki vardır.<sup>86</sup>

### **2.6.2. Süperaktif insan leptin antogonisti (SHLA)**

Leptinin protümörijenik olduğunun bildirilmesi, leptin antagonistlerinin geliştirilmesi ve bunların kanser tedavisinde kullanılarak yeni bir tedavi yaklaşımının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Laboratuvar ortamında çeşitli leptin antagonistleri

üretilmiştir. Leptin reseptör antagonitlerine Allo-aca, D-ser, LDFI (Leu-Asp-Phe-Ile), leptin peptid reseptör antogonisti [leptin peptide receptor antagonists (LPrA)], süperaktif fare leptin antogonisti [superactive mouse leptin antagonist (SMLA)] ve süperaktif insan leptin antogonisti [superactive human leptin antagonist (SHLA)] örnek verilebilir. SMLA ve SHLA, 23. pozisyonda aspartat amino asidi yerine lösün amino asidi getirilerek elde edilmektedir. Bu antagonistlerin OB-R'ye normal leptinden 60 kat daha afinitesinin olduğu belirtilmektedir.<sup>12</sup> Bu tez çalışmasında insan kökenli PK hücre serileri kullanıldığından leptin antagonistleri olarak SHLA seçilmiştir. Leptin antagonistlerin kemoterapötik yanıtı olan cevabına ilişkin hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

## **2.7. 5-Florourasil**

5-FU, birçok kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır.<sup>87</sup> Heterosiklik aromatik organik bir bileşik olan 5-FU'nun 5. Sıradaki karbon atomuna florür atomu bağlanmıştır ve bu yapısı nedeniyle urasil bazının analogu olarak görev yapmaktadır. 5-FU, urasil bazının analogu olarak RNA ve DNA'nın yapısına katılarak hücrel sitotoksositeye neden olmaktadır.<sup>87</sup>

5-FU'nun kanser tedavisinde kullanımında ilaç direnci gelişebilmektedir. Gelişen ilaç direnci tedavi başarısını azaltmakta ve uygulamada birtakım sınırlılıkların doğmasına neden olmaktadır. İlaç direncinin üstesinden gelmek ve tedavi başarısını arttırmak için bir takım yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır. 5-FU temelli tedavinin başarısının artırılması amacıyla 5-FU'nun anti-tümör ajanları ve diğer moleküllerle kombine kullanımını içeren kemoterapötik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır. 5-FU kemoterapötik direncine neden olan genetik faktörlerin belirlenmesi direncin üstesinden gelebilmeyi ve/veya direncin prediktif

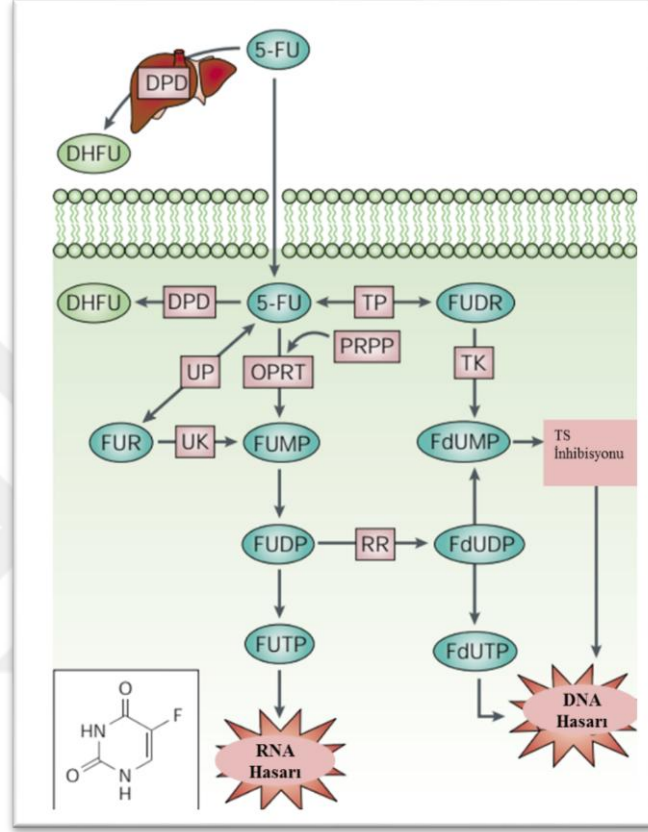
olarak kullanımını sağlayacaktır. Bu amaçla öncelikle 5-FU'un metabolik yolağı ve etki mekanizmasının ayrıntılı bir biçimde tanımlanması gerekmektedir.

### 2.7.1. 5-FU Etki Metabolizması

5-FU, urasil gibi hücre membranını kolaylıkla geçerek hücre içerisine girer. 5-FU, hücre içerisinde 3 ana metabolite dönüşür. Bunlardan biri Florodeoksiüridin monofosfat [(Fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP)], Fluorodeoksiüridin trifosfat [Fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP)] ve Fluorouridine trifosfat [Fluorouridine triphosphate (FUTP)]. Bu ana metabolit RNA sentezini ve Timidilat sentaz [(Thymidylate synthase (TS)]'ın fonksiyonunu bozar (Şekil 2.3)<sup>88</sup> 5-FU'nun Dihidropirimidin dehidrogenaz [Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)] aracılı Dihidrofluorourasil [Dihydrofluorouracil (DHFU)]'e dönüşmesi hız sınırlayıcı bir adımdır. 5-FU'nun %80'ine kadar olan kısmı karaciğerde DPD tarafından yıkılır.<sup>65, 87</sup>

5-FU'nun FUMP'a dönüşmesi iki yolla olmaktadır (Şekil 2.3)<sup>88</sup>. Birinci yolda Fosforibozil pirofosfat'ın [Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP)] kofaktör olarak yer aldığı Orotat fosforibosiltransferaz [orotate phosphoribosyltransferase (OPRT)] ile olan direkt dönüşüm, ikincisi ise Uridin fosforilaz [Uridine phosphorylase (UP)] ve Uridin kinaz [Uridine kinase (UK)] enzimlerinin fonksiyonları ile dolaylı olarak Fluorouridin [Fluorouridine (FUR)] üzerinden gerçekleşen yoldur. FUMP oluşuktan sonra Fluorouridine difosfata [Fluorouridine diphosphate (FUDP)] dönüşür. FUDP, aktif metabolit FUTP'ye veya Ribonükleotit redüktaz [ribonucleotide reductase (RR)] tarafından Fluorodeoksiüridin difosfat [Fluorodeoxyuridine diphosphate (FdUDP)]'a dönüşür. FdUDP ya fosforlanarak FdUTP veya defosforile edilerek FdUMP'ye dönüşür. Alternatif aktivasyon yolağında, Timidin fosforilaz [Thymidine phosphorylase (TF)] 5-FU'nun Florodeoksiüridin [Fluorodeoxyuridine (FUDR)]'e dönüşümünü katalizler ve FUDR sonrasında Timidin kinaz [Thymidine kinase (TK)] tarafından fosforlanarak

FdUMP'ye dönüşür. FdUMP, TS ile stabil bir kompleks oluşturarak Deoksitimidin monofosfat [Deoxythymidine monophosphate (dTMP)] üretimini inhibe eder (Şekil 2.4)<sup>88</sup> Hücrede, DNA replikasyonu ve tamirinde gerekli olan en önemli temel molekül olan dTMP'nin azalması hücre ölümüne neden olmaktadır.



**Şekil 2.3.** 5-FU moleküler yapısı ve hücre içi etki mekanizması

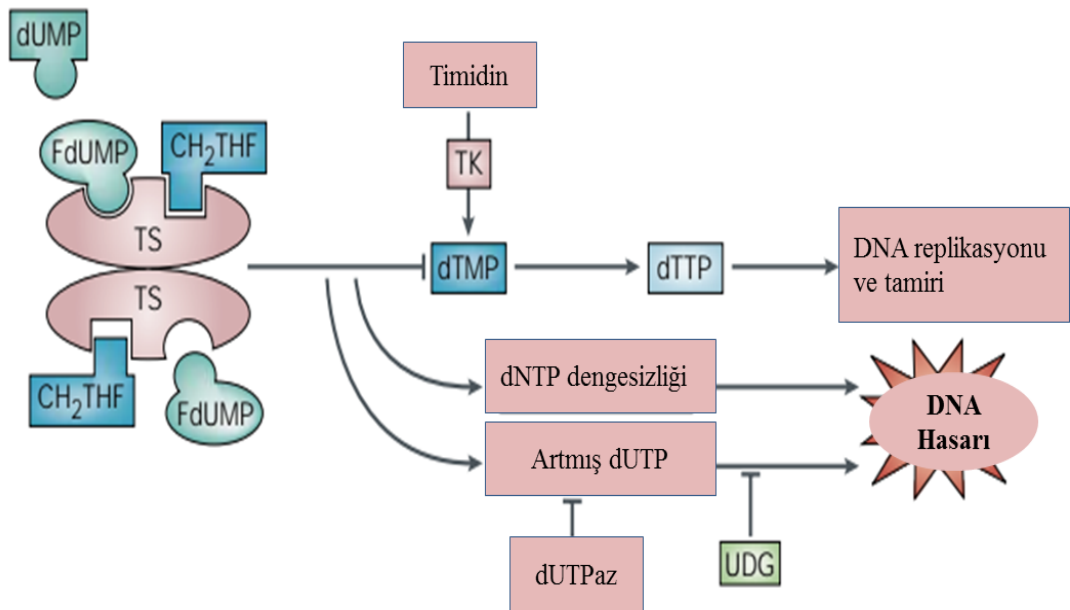
TS, Deoksiuridin monofosfat [Deoxyuridine monophosphate, (dUMP)]'in, metilen tetrahidrofolattan [(5,10- methylene tetrahydrofolate (CH<sub>2</sub>-THF)] aldığı metil grubu ile dTMP'a dönüşümünü katalizler.

5-FU'nun aktif metaboliti olan FdUMP, TS enziminin aktif bölgesine bağlanır ve böylece FdUMP, TS ve CH<sub>2</sub>THF birlikte üçlü bir kombinasyon yapar. Bu stabil yapı TS'nin dUMP'den dTMP dönüşümünü katalizlemesini önler. Bu durum, deoksiuridin trifosfat [deoxyuridine triphosphate (dUTP)]'nin artışına ve deoksinükleotit [Deoxynucleotide, (dNTP)] havuzunda miktar açısından bir dengesizliğe neden olur.



Her iki durumda DNA hasarı ile sonuçlanır. dUTP aracılı DNA hasarının düzeyi dUTP'yi dUMP'ye dönüştüren dUTP pirofosfataz [(dUTP pyrophosphatase (dUTPaz)]'ın ve genomik DNA'dan glikosilaz aktivasyonu ile urasil bazını çıkaran Urasil DNA glikozilaz [Uracil-DNA glycosylase (UDG)]'ın düzeyine bağlıdır. dUTPaz ile dUTP'nin hücre içerisindeki miktarının artışı önlenir ve böylece dUTP aracılı DNA hasarı etkisi azaltılır. UDG ise bir baz eksizyon tamir [Base-Excision Repair, (BER)] enzimidir ve yanlış eşleşmiş urasil bazını DNA'dan çıkarır. Ancak hücre içerisinde dUTP/deoksitimidin trifosfat [deoxytimidine triphosphate (dTTP)] oranı yüksek ise urasil tekrar DNA yapısına katılır ve tamir süreci tekrar başlar. Bu süreç dUTP'nin oranının düşmesine kadar devam eder ancak süreç her defasında başarısızlıkla sonuçlanır büyük DNA hasarı ve nihayetinde hücre ölümü gerçekleşir.

TK, TS inhibisyonu sonucu dTMP'in azalmasını engellemek, nükleotit havuzunda miktar açısından denge oluşturabilmek için bir nükleotit olan deoksitimidinin (timidin, deoksitimidin T) fosforilasyonu dTMP oluşumunu katalizler. Bu özelliği ile TK, pirimidin sentezinin kurtarma (salvage) yolağında yer almaktadır. dTMP sentezi DNA oluşumu için hız kısıtlayıcı bir basamaktır.



#### **Şekil 2.4. 5-FU Metabolitlerinin RNA'ya Bağlanması**

5-FU ana metabolitlerinden biri olan FUTP, RNA yapısına girerek RNA aracılı toksisiteye neden olur. FUTP bu toksisiteyi ribozomal RNA'ların olgunlaşmasını bozarak, küçük nükleolar RNA [small nucleolar RNA (snRNA)] protein komplekslerinin aktivitesini inhibe ederek [U2 snRNA üzerinden splicing (kırılma) mekanizmasının inhibisyonu] ve transfer RNA'nın post-transkripsiyonel modifikasyonlarını bozarak gerçekleştirebilir. Bu RNA çeşitleri yalancı uridin bazı içerirler ve 5-FU uridinden (urasil nükleoziti) yalancı uridin oluşmasını inhibe eder.

5-FU'nun hücre içi metabolizmasında yer alan ve yukarıda belirtilen faktörlerin fonksiyonları 5-FU tedavisinde 5-FU'ya karşı direnç gelişmesinde önemli rol oynamaktadır.<sup>3, 65</sup> 5-FU metabolizmasında önemli rolü olduğu bildirilen genler DPD, Dengeleyici nükleozit taşıyıcı-1[Human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1)], TP, TS, çoklu ilaç direnç geni-1 [Multidrug Resistance Gene-1 (MDR-1, ABCB1)]'in ve çoklu ilaç direnç proteini-5 [Multidrug Resistance Protein (MRP5, ABCC5)] olarak bildirilmektedir.<sup>3, 63, 65, 87</sup>

Bu tez çalışmasında PK tedavisinde 5-FU'nun kemoterapötik direnci ve bu dirençte rol alabilecek aday genlerin ekspresyonlarının araştırılması hedeflenmiştir.

#### **2.8. 5-FU'nun Kemoterapötik Direncinde Rol Alan Genler**

PK tedavisinde 5-FU'nun kemoterapötik direnci ve bu dirençte rol alan genler arasında DPD geni, hENT1 geni, TP geni, TS geni ile MDR1 VE MRP5 geni yer almaktadır.

##### **2.8.1. DPD Geni**

Kromozom 1p21.3'te lokalize DPD geni, urasil ve timidin katabolizmasında rol oynar.<sup>89</sup> Kanser hastalarında sistemik olarak alınan 5-FU'in %80'ine adar olan kısmı karaciğerde DPD tarafından katabolize olur.<sup>65, 87, 90</sup>

Ayrıca, 5-FU hücre içerisine girdiğinde kısmen 2-foluroalenine parçalanmasını katalizler.<sup>91</sup> PK'daki DPD ekspresyon seviyesinin kolorektal ve gastrik tümörlere göre yüksek olduğu<sup>92</sup> ve DPD genindeki ekspresyon eksikliğinin yüksek 5-FU toksisitesine neden olduğu belirtilmektedir.<sup>93, 94</sup> Ancak DPD ekspresyonu ile 5-FU toksisitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı kanser çalışmalarında çelişkili sonuçların var olduğu da belirtilmektedir.<sup>94</sup> Genel olarak yüksek DPD seviyesi 5-FU'nun metabolize olmasını hızlandırır ve düşük DPD seviyesinin daha iyi bir yaşam süresinin oluşmasına katkı sağlayabileceği beklenmektedir.

### **2.8.2. hENT1 Geni**

PK da gelişen ilaç direncinde en yaygın mekanizma sitotoksik ilacın hücre içerisinde birikmesinin önlenmesi veya azalması sonucu gelişmektedir. Bu mekanizma ile ilacın taşınımı hücre dışına doğru artabileceği gibi hücre içerisine alınımı da azalabilir. Her iki durumda da kemoterapötik direnç gelişebilir. Bu yolla gelişen dirençte, ABC ilaç taşıyıcıları ile Solüt taşıyıcılar [Solute Carriers (SLC)] olarak isimlendirilen membrana bağlı taşıyıcılar rol almaktadır. ABC taşıyıcılar, ilacı hücreden dışarı pompalayarak, SLC'ler ise hücrenin içerisine ilaçların ve diğer moleküllerin girişini düzenleyerek dirençte primer rol alırlar.<sup>95</sup> SLC'ler, hücrenin nükleotit ihtiyacını karşılanmasının sağlandığı kurtarma yolağı (salvage pathyay) isimli alternatif yolda nükleozitler ve nükleobazların hücre içerisine alınımı sağlarlar.<sup>95</sup> SCL, SLC28 ve SLC29 olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Bunların gempitabinin ve 5-FU'nun hücre içerisine alınımında sorumlu olduğu düşünülmektedir.<sup>96</sup> SLC28 alt ailesi SLC28A1 konsantratif nükleozid taşıyıcıları 1 [concentrative nucleoside transporters 1, (CNT)], CNT2 ve CNT3 olmak üzere 3 üyeden, SCL29 ise SCL29A1 dengeliyici nükleozit taşıyıcıları 1 [equilibrative nucleoside transporters 1 (ENT1)], ENT2, ENT3 ve ENT4 olmak üzere 4 üyeden oluşmaktadır.<sup>96</sup> hCNT (human CNT)'ler nükleozitleri sodyum

bağımlı aktif taşıyıcıyla hENT (human ENT)'ler nükleozitleri kolaylaştırılmış difüzyonla hücre içerisine alırlar.<sup>95</sup>

Nükleozit taşıyıcılar arasında en iyi tanımlananı hENT1 üyesidir.<sup>95</sup> hENT1 geni 6p21.1 bölgesinde lokalize genden eksprese, hücre membranında bulunan bir nükleozit taşıyıcıdır. 5-FU'nun hENT1 substratı olmadığı bildirilse de<sup>97</sup> hENT1 ile nükleozitlerin hücre içerisine alınımı 5-FU direncinde rol alabilir. Çünkü nükleotit sentezinin “de novo” yolağı inhibitörü olan 5-FU ve onun metabolitlerinin hücre içi taşınımına hENT1 gibi nükleozit taşıyıcıların katkısı olabileceğı bildirilmektedir.<sup>3, 95, 98</sup> PK'da hENT1 ekspresyonunun araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmakla beraber.<sup>98-102</sup> hENT1 ekspresyonu 5-FU kemoterapötik direnç arasındaki ilişkinin araştırıldığı prelinik ve klinik çok daha az çalışma bulunmaktadır.<sup>98, 100, 101, 103</sup> Ancak bu çalışmaların sonuçları arasında da çelişkili sonuçlar bulunmaktadır.<sup>96</sup>

### **2.8.3. TP Geni**

TP geni, platelet derive endotelial hücre büyüme faktörü [platelet-derived endothelial cell growth factor” (PD-ECGF)] olarak bilinen, 22q13'te lokalize bir gendir.<sup>104</sup> Primidin kurtarma yolağında yer alan TP, 5-FU'nun FUDR'e dönüşümünü katalizler ve FUDR'de TK tarafından fosforlanarak FdUMP'ye dönüşür.<sup>3,87,88</sup> TP ayrıca, DNA veya RNA degradasyonu sırasında oluşan primidin nükleozidlerinin geri kazanımı ile bir pirimidin nükleozidinde yer alan deoksiriboz yapısının bir diğeri primidin bazına aktararak yeni primidin nükleozidlerinin oluşmasını ve kapesitabin gibi 5-FU öncülü kemoterapötiklerin 5-FU'a dönüşümünü katalizler.<sup>104, 105</sup> TP, makrofajlar, stromal hücreler, glia hücreleri ve sindirim sistemi yolağında yer alan bir doku ve organda eksprese olmaktadır.<sup>105</sup> TP, hücre içerisinde hem sitoplazma hem de nükleusta bulunmaktadır.<sup>104</sup>

Bu genin ekspresyonunun ateroskleroz, romatoid artrit, sedef gibi birçok inflamatuvar hastalıkta ve özellikle kanserde arttığı bildirilmiştir. TP ekspresyonunun, kanser hücrelerinin anjiyogenez ve metastazının tetiklenmesinde ve anti-apoptotik süreçlerini tetiklediği belirtilmektedir. Çeşitli kanserlerde taksan, kapesitabin ve siklofosfamid gibi kemoterapi ajanlarının kullanımında TP ekspresyonu arttığı ve TP artışının zayıf prognozla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle TP ekspresyonunun azaltılması veya TP inhibitörlerinin kullanımı ile TP protein inhibisyonu yaparak kanser tedavisinin etkinliğinin artırılabilmesine yönelik terapötik yaklaşımlar önerilmesine rağmen bu konuda oldukça çelişkili sonuçların var olduğu da vurgulanmaktadır.<sup>104</sup> Çünkü TP inhibisyonunun tersine TP aktivitesinin artması 5-FU ve benzeri ajanların kullanımında daha fazla FDUR'e oluşmasını ve FdUMP oluşmasını sağlayacak ve böylece 5-FU ve benzeri ajanların etkinliğinin artması sağlanabilecektir. Bu nedenle TP aktivitesinin önemi kullanılacak kemoterapötik yaklaşımın içeriğine bağlı olarak değişecektir. TP ekspresyonu ve 5-FU duyarlılığını araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.<sup>105-107</sup>

#### **2.8.4. TS Geni**

TS geni 18p11.32'de lokalizedir ve proteini dimerik yapıdaki sitozolik bir proteindir. 5-FU terapötik mekanizmasında ana hedef molekül olan TS<sup>87, 95</sup> kofaktör olarak CH<sub>2</sub>-THF kullanarak dUMP'nin dTMP'ye metilasyonunu katalizler. Bu reaksiyon dTMP (timidilat)'nin hücre içi "de novo" kaynağını sağlar ve bu yüzden DNA sentezinin hız sınırlayıcı basamaklarından biridir.<sup>87, 108</sup> 5-FU metaboliti FdUMP, TS proteini üzerinde dUMP'nin bağlanacağı yere bağlanarak TS-CH<sub>2</sub>-THF- FdUMP üçlü kompleksi oluşturur ve bu yapı TS'nin dTMP oluşturmasını engeller. TS geninin aşırı ekspresyonun 5-FU direncine neden olacağı beklenir.<sup>108</sup> Çünkü 5-FU'nun inhibisyonu artan TS miktarına karşılayamaz ise 5-FU inhibisyonu terapötik etki için

yetersiz kalacaktır. Hücre, TS miktarını TS'ye özgü bir feedback (geri bildirim) mekanizmasıyla kontrol altına alır. Bu mekanizmada artmış TS proteinleri kendi mRNA'larına bağlanarak onların translasyonunu inhibe eder ve böylece hücre içi TS'nin aşırı üretimini de kontrol etmiş olur.<sup>88,108</sup> Eğer TS inhibisyonu yapılırsa, hücre içerisinde dUMP artar. dUMP pirimidin monofosfat ve difosfat kinazlarca sırayla fosforlanarak dUTP'ye dönüşür ve böylece hücre içerisinde dUTP artar. DNA polimerazlar subtrat olarak dUTP ve dTTP'leri eşit etkinlikle kullanabildiği için hem dUTP hem de fdUTP DNA'nın yapısına katılarak DNA hasarına neden olur. Baz eksizyon tamir enzimi UDG, DNA hasarını önlemek amacıyla yanlış eşleşmiş urasil bazını ve fdUTP'yi çıkarır ve böylece DNA'da aprimidinik bir bölge oluşur. Eğer hücre içerisinde dTTP oranı halen düşük orandan kalır ise (yüksek dUTP/dTTP varlığında) dUTP tekrardan DNA'nı yapısına katılır ve UDG'nin yaptığı tamir süreci (DNA'nın urasilden ve 5-FU metabolitinden tamiri) başarıyla gerçekleştirilemez. UDG tarafından sürdürülen tamir süreci her defasında aynı durum ile sonlanacağından bu sürece futil (futile) süreç denmektedir ve sonunda DNA hasarı ve hücre ölümü gerçekleşmektedir.<sup>108</sup>

TS inhibisyonu, 5-FU temelli kemoterapötik yaklaşımlarda ana hedeflerden biridir. Ancak TS hedefli tedavilerde karşılaşılan direnç mekanizmaları a) artmış TS ekspresyonu, b) tedavi ajanı ile TS ekspresyonun artması, c) BER tamir mekanizmasının aktivitesinin artması, d) dUTPase aktivitesinin artması, e) 5-FU anabolize eden UMP kinazın ekspresyonunun azalması (fUTP nin RNA'ya katılımı azalır) f) folat taşıyıcılarının ekspresyonunun azalması ile antifolat alımının azalması, g) mitotik hücre döngüsünün ve h) apoptotik sinyallerin bozulması şeklinde özetleyebiliriz.<sup>108</sup>

#### **2.8.5. MDR1 ve MRP5 genleri**

PK'de primer kemoterapötik dirençte rol alan mekanizmalardan biri de ilaç taşınım mekanizmasıdır.<sup>63</sup> Organizmada moleküllerin vücutta dağılımının düzenlenmesinde<sup>109</sup> ve ilaçların ve onların metabolitlerinin hücre içerisine alınımında hücre membranında bulunan ABC pompa proteinleri önemli rol oynar.<sup>62, 63</sup> Hücrenin çoklu ilaç direnci [(Multidrug Resistance, (MDR)] fenotipini kazanmasını sağlayan bu pompa proteinleri, fonksiyonlarını, ilaç ve metabolitlerinin hücre içi konsantrasyonu azaltma ve dışa doğru atma şeklinde iki yönlü yapabilmektedir. ABC proteinleri bu fonksiyonlarını ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak, hücre membranından aktif taşıma ile yapmaktadır. Tanımlanan 49 adet ABC proteini,<sup>62</sup> ABC, MD/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20 ve White olarak 7 alt sınıfta incelenir. Organizmada birçok dokuda eksprese olan ABC proteinlerinin özellikle kanser dokusunda aşırı eksprese olduğu ve bu sayede kemoterapötik dirence yol açtığı bildirilmektedir.<sup>63</sup> PK primer kemoterapötik direncinde MDR1 ve MRP5'in rol alabilecekleri belirtilmektedir.<sup>3, 62, 63, 65</sup> Kromozom 7q21.12'de lokalize olan MDR1 geni ve kodladığı P-glikoprotein (P-gp) ABC transport proteinleri ailesi içerisinde en çok çalışılan ve en çok tanınan proteindir.<sup>62, 109</sup> P-gp'nin 200'den fazla molekülün hücre içine ve dışına taşınmasından sorumlu olduğu belirtilmektedir.<sup>63, 110</sup>

PK hücre serilerinde yaptıkları çalışmada, hücre serisine göre MDR1 ekspresyonunun değiştiği ve MDR1 ekspresyonunun 5-FU direnci ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. MDR1 ile 5-FU ilişkisini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır ve MDR1'in kemoterapötik dirençteki rolünün tam olarak açıklanamadığı bildirilmektedir.<sup>65</sup>

PK'de kemoterapötik dirençte rol aldığı bildirilen bir diğer ABC transport proteini MRP5'dir.<sup>62</sup> MRP5 geni kromozom 3q27.1'de lokalizedir ve tıpkı diğer ABC transport proteinleri gibi görev yapar. MRP5, siklik nükleotitlerin hücre dışına

çıkarılmasından sorumludur. MRP5 geni 5-FU direnci arasındaki ilişkiyi de inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. MRP5 geni aşırı eksprese olan PK hücre serisinde 5-FU direnci geliştiği belirtilmektedir.<sup>111-113</sup>

Literatürde, MDR fenotipi ile 5-FU arasındaki ilişkiyi ABC proteinleri üzerinden araştıran çok az çalışma bulunmaktadır. Genellikle gemsitabin direncinde ABC proteinlerinin rolü araştırılmış ve ancak yine de MDR fenotipinin oluşmasına neden olan genlerin PK'daki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır<sup>63, 67</sup>





### 3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasının deneyleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığına sunulan ve 28.09.2017 tarihinde onaylanan protokole (Karar No: 25) uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Hücre Serileri

Tez çalışmasında 3 adet pankreatik kanser hücre serisi kullanılmıştır (Tablo 3.1)

**Tablo 3.1.** Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serileri

Özellik	AsPC-1 (ATCC CRL-1682)	MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420)	PANC-1 (ATCC CRL-1469)
<b>Organizma</b>	İnsan	İnsan	İnsan
<b>Cinsiyet, yaş Doku</b>	Bayan, 62 Pankreas* (Metastatik bölgeden köken almış)	Erkek, 65 Pankreas	Erkek, 56 Pankreas/Dukt
<b>Hastalık</b>	Adenokarsinom	Karsinom	Epiteloid Kanser
<b>Yüzey tutunumu</b>	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
<b>Besi yeri</b>	DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin- Streptomisin	DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin- Streptomisin	DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin- streptomisin
<b>Besiyeri yenileme süresi</b>	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez
<b>Pasaj metodu</b>	%0.05 Trypsin + %0.1 EDTA	%0.05 Trypsin + %0.1 EDTA	%0.05 Trypsin + %0.1 EDTA
<b>Ayırma oranı</b>	1:3- 1:6	1:3- 1:8	1:2- 1:4
<b>Biyogüvenlik düzeyi</b>	1	1	1
<b>Dondurma Solüsyonu</b>	%50 FBS, %45 büyüme medyumu %5 DMSO	%50 FBS, %45 büyüme medyumu %5 DMSO	%95 büyüme medyumu, %5 DMSO

### 3.1.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
5-FU	Sigma	F6627 (5gr), HPLC
Leptin	Sigma	Leptin insan, L4146
SHLA	MyBiosource	MBS400098, SHLA rekombinant protein, super leptin reseptör antagonisti
Besi yeri	Capricorn Scientific	DMEM-HA (DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine) Lot No: CP18-2472
Fötal Bovine Serum	Biological Industries	European grade, 0.1µM filtre edilmiş (Lot No: 1407738)
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific	100X, PS-B, Lot No: CP14-1209 (100 ml)
L-Glutamine	Capricorn Scientific	200 mM, GLN-B (100 ml)
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific	DBPS içinde, Lot No: C17-1635 (100 ml)
Flask (25cm <sup>2</sup> )	Biologix	Polystrene, 07-8025
Flask (75cm <sup>2</sup> )	Biologix	Polystrene, 07-8075
15 ve 50 ml Tüp	Biologix	10-9151 (15 ml), 10-0502 (50 ml)
96 kuyuklu plak	Costar	CLS3599
12 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-12
6 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-6
Dondurma tüpleri	Corning	430659
Transfer pipeti	Biologix	30-135A1 (3ml)
Hücre sayım lamı	Neubauer Haemocytometry	68052-14, 68052-15
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applichem	A3672,0100
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417, Tablet, (pH: 7.4) (Ca <sup>++</sup> ve Mg <sup>++</sup> içermeyen)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA):Applichem marka, No: 6381-92-6	Vivantis	PC0706
Serolojik Pipet: Greiner bio-one, 5 ve 10 ml’lik, Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%75’lik): Riedel-de Haen, No: 64-17-5,	Greiner Cellstar	P7615 (5 ml) ve P7740 (10 ml)
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0.2; 0.5; 1.5; 2 ml’lik) tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler

### 3.1.3. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid]

#### (MTT) Sitotoksisite Testi

MTT testi için gerekli malzemeler Tablo 3.3’de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** MTT testinde kullanılan gereçler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M5655-1g
MTT stok solüsyonu		5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü ve filtre edilerek (0.20 µm’lik) kullanıldı
MTT çalışma solüsyonu (96 kuyucuklu plakta bir kuyucuk için)		10 µl MTT solüsyonu (5 mg/1 ml)90 µl besi yeri karıştırılır ve her bir kuyucuğa eklenir
DMSO	Appllichem	A3672.0100
96 kuyuklu plak	Costar	CLS3599
MTT lizis solüsyonu	Triton-X (Sigma) HCl (0.1 N Fischer Scientific) İsopropanol (Merck)	Her bir kuyucuğa hazırlanan solüsyondan 100 ml eklenir. 100 ml lizis solüsyonu hazırlanması: Triton X (T8787) (1 ml) HCl (AC 12420-0010) 0.1 N (10 ml) İsopropanol (109634) (89 ml)
Filtre	Sartorius Minisart	16532; 0.22 µm’lik
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0.2; 0.5; 1.5; 2 ml’lik), Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.4. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler Tablo 3.4.'de verilmiştir.

**Tablo 3.4.** Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Trizol	Thermo-Scientific	1029608
Kloroform	Sigma	24216
İsopropanol (=Propanol-2)	Merck	109634
Etil Alkol	Sigma	3221
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0.2; 0.5; 1.5; 2 ml'lik) tüpler, Polietilen santrifüj tüpler
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758-50 ml %0.1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH <sub>2</sub> O)'ya 0.1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklavlanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.5. cDNA İzolasyonu

cDNA eldesi için gerekli malzemeler Tablo 3.5’de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** cDNA eldesi için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
cDNA izolasyon kiti	GeneAll	HyperScriptFirst Strand Synthesis Kit/601-005
Steril Tüpler	Biologix	0.2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
PZR makinesi	Rotor Gene	Gerçek zamanlı PZR aleti cDNA sentezinde kullanılmıştır.
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler Tablo 3.6’de verilmiştir.

**Tablo 3.6.** Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Tris baz	Vivantis	PR 0612
Borik asit	Vivantis	PR 0607
EDTA	Vivantis	PC 0706
10XTBE solüsyon (pH:7.5)		Tris baz (54 gr), borik asit (27.5) ve 20 ml EDTA (0.5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
Agaroz % 1’lik agaroz	Vivantis	PC 0701 1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 2.5 µl Etidyum bromür (10 mg/ml) karıştırıldı.
Etidyum Bromür	Vivantis	PC 0707
Brom fenol mavisi	Ambresco	115-39-9
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.7. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)

RT-PZR için gerekli malzemeler Tablo 3.7’de verilmiştir.

**Tablo 3.7.** RT-PZR için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
GeneAll® RealAmp SYBR qPCR Master mix	GeneAll	801-020
Steril Tüpler	Biologix	0.2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.8. Tek Hücre Elektroforezi (COMET)

COMET testi için gerekli malzemeler Tablo 3.8.'de verilmiştir.

**Tablo 3.8.** COMET için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Lam	Isotherm	25.4*76.2 mm (1.0mm-2mm kalınlık)
Lamel	Laborant	24 *60 mm (0.13-0.16 mm kalınlık)
Normal Melting Agaroz (NMA)	Vivantis	PC 0701
Low Melting Agaroz (LMA)	Sigma	A9414
Tris baz	Vivantis	PR 0612
Borik asit	Vivantis	PR 0607
EDTA	Vivantis	PC 0706
TBE Solüsyonu		
NaCl	Merck	106404
NaOH	Sigma	06203
Triton-X 100	Sigma	T8787
Na Lauril Sarkozinat	Sigma	Y0001772
DL- Dithiothreitol (DTT)	Vivantis	PC0705
Cam malzemeler		100, 200, 500 ve 100 ml'lik erlen ve mezürler Dikey şaleler
Pipet uçları	Biologix	10, 100, 1000µl büyüklükte
TBE Solüsyonu		Tris baz : 54 gr Borik asit : 27.5 EDTA (0.5M) : 20ml (0.5M EDTA : 18.61gr EDTA+ 2gr NaOH + 80 ml dH2O) Steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.

Lizing stok solüsyon	NaCl : 146.1 gr EDTA : 37.2 gr Tris : 1.2 gr
Lizing çalışma solüsyon	Lizing stok solüsyon : 99 ml Triton X : 1 ml Na lauril sarkosinat : 1 gr DTT (65 ml için) : 0.09 gr Solüsyon + çalışma öncesi taze hazırlanmış ve soğuması için 4°C’de saklanmıştır.
Lamların Hazırlanması	Lamlar %1’lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile oda sıcaklığında kaplanmıştır. 100 ml PBS içerisinde hazırlanmış %1’lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz bir şale içerisine aktarılmıştır. Temiz lamlar, şale içerisinde ortalama 55-65°de tutulan NMA’ya yaklaşık 4 saniye batırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
Etidyum bromür (8 µg/ml)	Vivantis Hazırlanan COMET preparatlarının görüntülenmesinde 10 mg/ml kosatrasyondan (8 µg/ml) olarak hazırlanan Etidyum Bromür kullanılmıştır.
Soğutucu Bloklar (Akü)	
Alimünyum Folyo	Koroplast veya diğer muhtelif markalar

### 3.1.9. Akım (Flow) Sitometri

Akım sitometri için gerekli malzemeler Tablo 3.9’de verilmiştir.

**Tablo 3.9.** Akım sitometri için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Etil Alkol	Sigma	3221
RNase	Sigma	R6513
Propidium Iodide	Sigma	81845
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları



### 3.1.10. Çalışmada Kullanılan Alet/Makineler

Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan alet/makineler Tablo 3.10'da verilmiştir

**Tablo 3.9.** Tez kapsamında kullanılan alet/makineler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Laminar Kabin	Metisafe	Clas II
CO2'li incubator	Memmert	UNB 200
İnverted Mikroskop	Olympus	CKX31
Soğutmalı Santrifüj	Universal	320R (mikro ve 15ml'lik falkon rotorlarıyla)
Vortex	MRC	SI-100
Hassas Terazı	Dikoman	FGH
Hassas terazı	Radwag	220.R2
Isıtmalı plak	MRC	HSD-135
Mikrofüj	INOVIA	MINO-10K
Translimünatör	MRC	UV-26
Elektorforez Tankı	SCIE-PLAS	SVG-SYS Vari-gel
Güç Kaynağı	Consort	EV231
Mikrodalga Fırın	Arçelik	MD 574
Su banyosu	MRC	WBO-100
Biodrop		
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
BioDrop		
Spektrofotometre		
RT-PZR	Rotor Gene	
Azot tankı	International Cryogenics	35 ve20 lt'lik
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Akım Sitometri	Beckman Coulter	EPICS XL MCL,

## 3.2. METOT

### 3.2.1. Hücre Kültürü

AsPC-1, MIA PaCa-2, Panc-1 hücre serileri 37°C'de, CO<sub>2</sub>-li inkübatörde, steril kültür ortamında, standart kültür şartlarında çoğaltılmıştır. Hücreler, tez çalışmaları kapsamında yapılan tüm deneylerde düşük pasaj sayısına sahipken gerçekleştirilmiştir. AsPC-1 için pasaj sayısı 10'un altında iken, MIA PaCa ve Panc-1 için 20'nin altından olan hücrelerde çalışmalar tamamlanmıştır. Standart kültür işlemleri için aşağıda belirtilen süreçler takip edilmiştir.

Hücreler yukarıda belirtilen besi yeri kullanılarak kültür flaskları içerisinde ekilmiş ve çoğaltılmıştır. Flask içerisinde hücre yoğunlukları %70-80 oranına ulaştığında, hücrelerin üzerindeki besi yeri atılarak flasklar 1-2ml PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 25 cm<sup>2</sup>'lik flaska 0.4 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska 1 ml Tripsin/EDTA eklenmiş, böylece yapışmış olan hücrelerin tripsinasyon işlemi ile birbirlerinden ve flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler steril serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüplerine toplanmıştır. Tüpler 1500 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün üst kısmı atılmış ve hücre peletinin yoğunluğu da dikkate alınarak ortalama 2ml besi yeri eklenmiştir. Mikropipet yardımıyla (1000µl'lik) hücrelerin besi yeri ile karışması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve ardından pasaj ve diğer test süreçlerine geçilmiştir. Hücrelerin dondurularak stoklama yapılması sürecinde ise uygun sayıdaki hücre populasyonunun üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve sonrasında özel dondurma tüplerine (cryovial tüp) aktarılmıştır. Bu tüpler, buz içerisinde -20°C'de 1 saat ve -80°C'de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen bulunan tanklara aktarılmıştır.

### 3.2.2. Sitotoksosite Testi

Tez çalışmasında kemoterapötik etkileri araştırılan 5-FU, Leptin ve SHLA'nın olası sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde ve inhibitör dozlarının ( $IC_{50}$ ) saptanmasında MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT yönteminde aşağıda yer alan protokol izlenmiştir.

MTT yöntemi her bir madde için 3 kez ve her bir deneyde 4 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

İlgili moleküllerin uygun konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle uygun çözücüler kullanılarak ana ve ara stoklar hazırlanmıştır.

5-FU için DMSO kullanılarak 200.000  $\mu$ M, Leptin için DMSO kullanılarak 3000  $\mu$ M ve SHLA için steril  $dH_2O$  kullanılarak 500.000 ng olacak biçimde ana stoklar hazırlanmıştır. Çözücü olarak DMSO kullanılan 5-FU ve Leptin'in hücrelere uygulanacak en yüksek konsantrasyonun da DMSO oranının %5'in altında tutulması sağlanmıştır.

Çoğaltılan hücreler tripsinasyon ve sayım işlemleri sonucunda 96'lık plağın her bir kuyucuğuna  $8 \times 10^3$  olacak biçimde ekilmiştir. Ekim sonrası hücreleri plak tabanına yapışması ve uyum süreci için hücreler bir gece  $37^\circ C$ 'de  $CO_2$ 'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda her bir hücre tipinin yer aldığı plaklar hücrelerin hücre döngülerinin eşitlenmesi amacıyla 8 saatlik serum açlığına bırakılmıştır. Bu işlem sayesinde hücreler senesens sürecine girmeden hücre döngülerinin eşitlenmesi sağlanmıştır. Serum açlık süresinin 8 saat olarak seçilmesinin nedeni, çalışılan hücrelerin serum açlık sürelerinin 8 saati aştığı durumlarda hücre morfolojilerinin değiştiğinin ve ölüm süreçlerini başlattıklarının tespit edilmesinden dolayıdır.

Serum açılışı süreci sonunda, farklı konsantrasyonları hazırlanmış olan 5-FU, Leptin ve SHLA molekülleri hücrelere uygulanmıştır. Yukarıda belirtilen ana stoklardan 5-FU için büyüme besi yeri içerisinde 25, 50, 100, 150, 250, 350, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları; Leptin için, 0.01, 0.1, 0.2 ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları, SHLA için 10, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları hazırlanmıştır

Hazırlanan konsantrasyonlar farklı hücre tiplerinin ekildiği 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 100  $\mu\text{l}$  büyüme besi yeri içerisinde olacak biçimde verilmiştir.

Madde uygulanmasından 72 saat sonunda MTT süreci başlatılmıştır. 24 ve 48. saat morfolojik değerlendirme sonunda inhibitör konsantrasyonun tespit edileceği sürenin 72. saat olduğuna karar verilmiştir. Bu nedenle toplam inkübasyon süresi 72 saat olarak seçilmiştir.

72 saat sonunda hücrelerin üzerindeki medium atılmış ve her bir kuyucuğa MTT çalışma solüsyonunda 100 $\mu\text{l}$  [10  $\mu\text{l}$  MTT (5 mg/ml) +90  $\mu\text{l}$  besi yeri] eklenmiştir.

MTT çalışma solüsyonunun eklenmesinden sonra hücreler 37°C'de, CO<sub>2</sub> inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir.

Üç saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri atılmış ve her bir kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  lizing solüsyonu eklenerek yaşayan hücrelerce oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi sağanmıştır.

Formazan kristallerinin çözünmesinden sonra plak okuyucu spektrofometrede plakların her bir kuyucuğunun 570 nm'deki absorbans değerleri tespit edilmiştir.

Elde edilen absorbans değerleri excel ve Graphad Prism programları kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır.

### 3.2.3. RNA İzolasyonu

IC<sub>50</sub> değerleri saptanan 5-FU, Leptin ve SHLA moleküllerinin, hücrelerde, 5-FU kemoterapi direncinde rol alan genler ile hücre ölüm yollarında rol alan genlerin ekspresyonları üzerinde meydana getireceği olası değişikliklerinin saptanması amacıyla gen ekspresyon analizi yapılmıştır.

Bu amaçla ilgili moleküller IC<sub>50</sub> değerlerinde tek tek, ikili ve üçlü kombinasyonları hücrelere uygulanmış ve IC<sub>50</sub> değeri saptanan sürede inkübe edildikten sonra total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Total RNA izolasyonu için izlenen Trizol temelli izolasyon protokolü aşağıda yer almaktadır.

Moleküller yukarıda belirtilen IC<sub>50</sub> değerlerinde hücrelere uygulanmıştır. Bu uygulama için oluşturulan gruplar sırasıyla hiçbir molekül uygulanmayan kontrol grubu, 5-FU, Leptin, SHLA, 5-FU+Leptin, 5-FU+SHLA, Leptin+SHLA, 5-FU+Leptin+SHLA olmak üzere 8 farklı grup oluşturulmuştur.

25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ortalama 1x10<sup>6</sup> yoğunlukta ekilen hücreler flask tabanına tutunması ve uyum için bir gece (16/24 saat) inkübe edildikten sonra 8 saat serum-açlığına bırakıldı. Serum açlığı sonrasında IC<sub>50</sub> değerlerinde tek ve kombine edilen moleküller hücrelere verildi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı.

72. saatin sonunda hücreler tripsine edilerek, toplandı ve hücreler 1500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak üzerine 2 ml steril soğuk PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenerek, 1000µl'lik pipet yardımıyla pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Bu basamaktan sonraki işlemler aksi belirtilmedikçe buz üzerinde devam edilmiştir.

PBS içeren 15ml'lik falkon tüpler 1500 rpm'de 5 dakika +4°C'de tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atılarak tüpün içerisinde bulunan hücelere 1000 µl soğuk Trizol eklendi ve mikropipet yardımıyla homojenize edildi. Bu karışım 15 ml'lik steril tüpe alındı.

Trizol ile hücre karışımı 5 dk oda sıcaklığında nükleproteinlerin kompleksinin tamamen parçalanması için bekletildi. Bekleme sonrası örnekler +4°C'de, 3500 rpm'de, 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant kısım pellet kısma yaklaşımadan yalnızca üst kısım alınarak steril 1.5 ml'lik yeni bir steril tüpe aktarıldı. Pelet kısmı ise atıldı.

Yeni tüpe aktarılmış süpernatant üzerine 200 µl soğuk kloroform ilave edilmiş ve tüpler 15 saniye (sn) kuvvetli bir şekilde vortekslenmiştir.

Vorteks sonrası tüpler 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra örnekler 12000 x g'de +4°C'de, 15dk. santrifüj edildi.

Santrifüj aşaması sonrasında karışım üç fazlı bir yapı halini almakta; altta kloroformlu faz, ortada hafif beyazımsı interfaz ve en üste RNA'nın bulunduğu şeffaf faz üstte kalan şeffaf faz mikropipet yardımıyla dikkatlice alınarak 1,5 ml'lik temiz steril bir ependorf tüpe aktarıldı.

Yeni steril tüpe aktarılan bu süpernatant kısma 500 µl izopropil alkol eklenmiş ve pipet yarımdaya iyice karıştırılmıştır. Bu karışım 15-30°C'de 10 dk inkübe edildi ve inkübasyonun ardından +4°C'de, 12000 g'de, 10 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası tüpün üstü tamamen atıldıktan sonra tüpün alt kısmında beliren beyazımsı jel benzeri pelet üzerine 1 ml %75'lik etil alkol eklendi ve ardından hafif vortex yardımı ile vortekslenerek peletin kalkması ve yıkanması sağlandı.

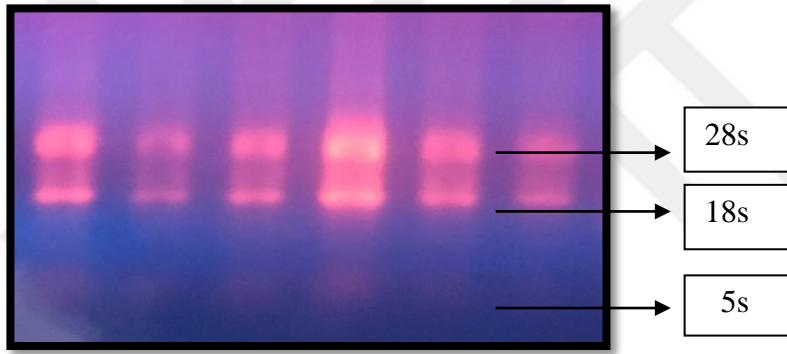
Pelet kalktıktan sonra tüpler +4°C'de, 7500 X g'de, 5dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası bu basamak iki defa tekrarlanır.

İkinci santrifüj sonrasında tüpün üst kısmı atılarak tüpler hücre kültürü laminar kabinde 12- 15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya alınmıştır.

Tüplerin kurutulması sonrası RNA 30-50 µl DEPC'li su ile çözülmüştür. Ayrıca elde edilen total RNA'nın görüntülenmesi için 3-5 µl RNA başka bir steril tüpe alınmış ve tüm RNA'lar cDNA sentezi yapılana kadar -80°C'ye kaldırılmıştır.

### **RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi**

Total RNA'ların kalitatif değerlendirilmesi (parçalanma olup olmadığının anlaşılması gibi) amacıyla total RNA'lardan ortalama 3-5 µl RNA agaroz jel (%1'lik) elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme sonrası elde edilen görüntülerde 28S, 18S ve 5S RNA net bir şekilde saptanmıştır (Resim 3.1).



**Şekil 3.1.** Total RNA %1'lik agarozdaki görüntüsü

### **RNA'nın kantitatif değerlendirilmesi**

Total RNA'nın kantitatif değerlendirilmesinde BioDrop marka cihaz kullanılmıştır. Ortalama 1.5-2 µl total RNA'nın 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri saptanmıştır. Bu değerlerle RNA'nın hem miktarı hem de saflığı saptanmıştır. 1 optik dansite RNA için 40 µg/ml dir.

### 3.2.4. cDNA (Complementer DNA) İzolasyonu

Hücrelerden elde edilen total RNA'dan ekspresyon analizi yapmak için öncelikle bu RNA'lardan cDNA elde edilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi için GeneAll HyperScriptFirst Strand Synthesis Kit (Katalog: 601-005) kullanılmıştır. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak her bir gruba ait örneklerin 1µg RNA'sından cDNA elde edilmiştir. cDNA sentezi için izlenen protokol aşağıda yer almaktadır Tablo (3.11).

**Tablo 3.10.** cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri

Reaktifler	Miktar
Primer (50 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Total RNA (1µg)	(Miktar örneğe göre değişir)
dH <sub>2</sub> O	14 µl'ye tamamlanmıştır

0.2ml'lik steril tüp içerisinde hazırlanan reaksiyon içeriği 65°C 5 dk ısıtıcı blokta inkübe edilmiş ve bu sürecin hemen ardından örnekler 1 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.

Bu tüp içerisine 2 µl 10x revers transkriptaz (RTaz) buffer, 0.1 M, 2 µl DTT, 1 µl ters transkriptaz enzimi ve 1 µl Rnaz eklenerek 5 sn santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası tüpler PZR aletine ait bloklara yerleştirilmiş ve 55 °C 60 dakika ve 85°C 5 dk inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PZR'da kullanılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.



### 3.2.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)

Elde edilen cDNA'larda tez çalışmasında araştırılması planlanan genlerin ekspresyonlarının saptanması amacıyla RT-PZR yapılmıştır. Bu amaçla GeneAll® RealAmp SYBR qPCR Master mix kullanılmıştır (Tablo 3.12). Hedef genlere karşı kontrol geni olarak ACTB Beta Aktin geni üç hücre serisi için de kullanılmıştır. Ekspresyonu araştırılan genlerin RT-PZR'da kullanılan primer dizileri Tablo 3.13'de verilmiştir.

Her örnek için 3 bağımsız tekrar yapılmıştır.

Ekspresyonlar arası rölatif farklılığın saptanmasında  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülasyonu kullanılmış buradan ekspresyonlar arası kat değişimleri saptanmıştır. RT-PZR'in etkinlik değeri genel olarak 0.98-0.99'dur. Reaksiyon içerikleri hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır.

**Tablo 3.11.** RT-PZR için reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon Döngüsü
Tampon (2X) SYBR qPCR master miks	10 µl	1-95°C 5' denatürasyon (1 döngü) 2-95°C 15"
Primer (DPD, hENT1, TP, TS MDR1 ve MRP5, ACTB)	Forward: 0.5 µl (10pmol/µl) Reverse : 0.5µl (10pmol/µl)	3-55°C (54-61°C, gene göre değişkenlik gösterdi) 50" 4-72°C 30" 40 döngü (2'den 4'e) Meting Curve (erime eğrisi) Analizi
dH2O	7 µl	Ramp: 50-99 (0.5°C artış, her basamakta 3 saniye)
cDNA	2 µl	90 °C 5 saniye
Toplam	20 µl	

**Tablo 3.12.** RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri

<b>Gen</b>	<b>Primer Dizi (5' → 3')</b>	<b>Ürün Büyüklüğü (bp)</b>
DPD-F	CAATGAGATGCCTGAAATGTG	386
DPD-R	GGAAGCACAACTTATACTTGCAG	
hENT1-F	AAACCGAGAACACCATCACCA	440
hENT1-R	AAAGAAGGGCAGAGCATCCAG	
TP-F	GCATGGATCTGGAGGAGACC	368
TP-R	CACATCTCTGGCTGCATATAGGA	
TS-F	GAGTTGCTGTGGTTTATCAAGGG	423
TS-R	GATGTTGAAAGGCACACCGA	
MDR1-F	AGTCGGAGTATCTTCTTCCA	459
MDR1-R	TGAATGTAAGCAGCAACCAG	
MRP5-F	TGGGTATAGAAGTGTGAGGGAG	510
MRP5-R	CACACGATGGACAGGATGAG	
CASP3-F	ATGGAAGCGAATCAATGGAC	177
CASP3-R	AGTTTCTGAATGTTCCCTGAG	
CASP8-F	GATGTTATTCCAGAGACTCCAG	110
CASP8-R	GGTAGGTAATCAGCAAATCCA	
CASP9-F	GGCTCTTCCTTTGTTCATCTCC	210
CASP9-R	TCACCAAATCCTCCAGAACCA	
ACTB-F	CTGTGCTATCCCTGTACGCC	270
ACTB-R	CCATCTCTTGCTCGAAGTCCA	

### 3.2.6. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Tez çalışması sırasında izole edilen total RNA ve elde edilen cDNA'ların kalitatif değerlendirilmesinde %1'lik agaroz jel hazırlanarak elektroforetik yürütme yapılmıştır.

### 3.2.7. Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)

5-FU, Leptin ve SHLA moleküllerinin hücrelerde meydana getireceği genomik DNA hasarının tespitinde tek hücre elektroforezi testi (COMET) gerçekleştirilmiştir. Bu test için izlenen protokol aşağıda yer almaktadır. Bu testin hücre kültürü kısmından sonraki aşamaları ilgili laboratuvar ortamı karartılarak (loş sayılan bir görünüm) gerçekleştirilmiştir. COMET tesiti için izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

Hücrelerimiz 25cm<sup>2</sup>'lik flaslara 1X10<sup>6</sup> konsantrasyonda ekildikten ve yukarıda MTT başlığı altında belirtilen serum açlığı uygulaması yapıldıktan sonra 5-FU, Leptin ve SHLA molekülleri IC<sub>50</sub> değerlerinde tek tek ve kombine halinde hücrelere verilmiştir. Hücreler 37°C'de, CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler tripsine edilip, 15ml'lik tüplere standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak toplanmıştır.

Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine transfer pipeti ile 2 ml PBS eklenmiştir.

PBS ile karışan hücrelerin 18 µl'si (ortalama 100.000 hücre) 36 µl %0.75'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz [Low melting agarose (LMA)] ile karıştırılıp oda ısısında bekleyen ve normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile kaplı lamaların üzerine yayılarak üzerleri ince lameller (tüm lamı kaplayan) ile kaplanmıştır. Bu aşamadaki işlemden, hücreler, alındıkları hacmin 2 katı kadar LMA ile karıştırılıp lam üzerine yayılarak işlem yapılmalıdır. Lam üzerine toplamda 100 µl' hacimden daha fazla bir hücre LMA karışımının aktarılmasına dikkat edilmiştir.

Üzeri hücre ve agaroz karışımıyla kaplanan lamalar buz üzerine alınarak 20 dakika donmaları beklenmiştir. Agaroz lam üzerinde donduktan lam ve lamel arasında su buharı benzeri oluşumlar meydana gelir ve bu aşamadan sonra lameller dikkatlice

kaldırılmış ve lamalar daha önce hazırlanmış olan ve +4°C’de şale içerisinde bekleyen soğuk lizing solüsyonunda 1 saat bekletilmiştir.

Bekleme sonunda bu solüsyona 14 µl (20 µg/ml) Proteinaz K eklenerek örnekler şale içerisinde 37°C’ lik etüve kaldırılmış ve 2 saat inkübe edilmiştir.

İki saat sonunda lamalar soğuk Tris Borik Asit EDTA (TBE) nötral solüsyonunda 20 dakika bekletilir ve ardından 25V’ta 20 dakika yürütülür. Yürütme işlemi süresince elektoroforez tankının üstüne soğuk aküler ve buz parçaları konularak TBE solüsyonunun ısınması engellenmiştir.

Yürütme işlemi sonunda elektroforez tankından alınan lamalar karanlıkta, oda ısısında kurutulduktan sonra her bir lamel 50 µl etidyum bromid (8µg/ml) ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar floresan mikroskopta (Euromexx, Onion, OX Range, AE3199) ilgili filtrede incelenmiştir. Her bir hücre DNA görüntüsü kuyruk uzunluğu ve kafa bölgesine göre değerlendirilmiş ve hasar miktarına göre 0 (hasarsız), 1 (az hasarlı), 2 (orta hasarlı), 3 (hasarlı), 4 (çok hasarlı) olarak kategorize edilmiştir (Şekil 3.2). Her bir preparat için 300 hücre sayılmıştır.



Hasarsız, 0



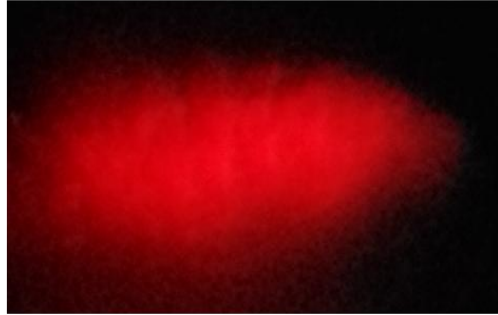
Az Hasarlı, 1



Orta Hasarlı, 2



Hasarlı, 3



Çok Hasarlı, 4

**Şekil 3.2.** COMET testinde kullanılan skorlama ve skorlamaya ait örnek görüntüler

### 3.2.8. Akım (Flow) Sitometri

5-FU, Leptin ve SHLA moleküllerinin hücrelerin hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin saptanması amacıyla akım sitometri testi uygulanmıştır. Bu amaçla izlenen protokol aşağıda yer almaktadır. Hücrelerimiz 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara 1X10<sup>6</sup> konsantrasyonda ekildikten ve yukarıda MTT başlığı altında belirtilen serum açlığı uygulaması yapıldıktan sonra 5-FU, Leptin ve SHLA molekülleri IC50 değerlerinde tek ve kombine halinde hücrelere verilmiştir. Hücreler 37°C'de, CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat

inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tripsine edilip, 15ml'lik tüplere standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak toplanmıştır.

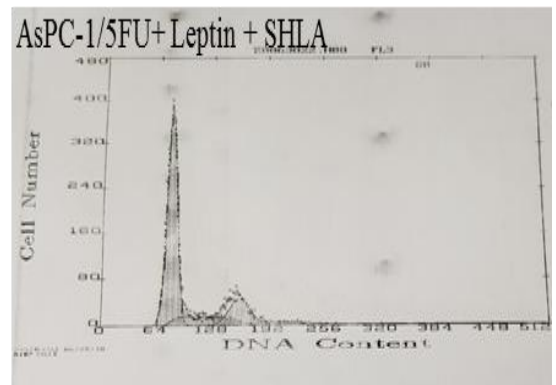
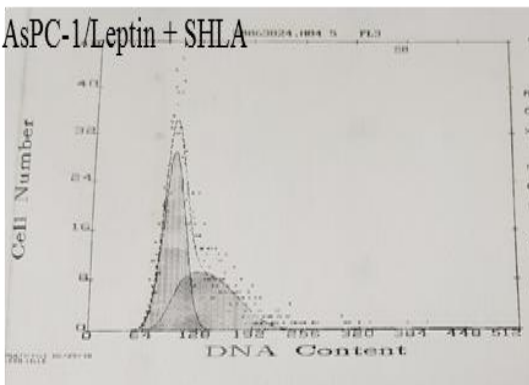
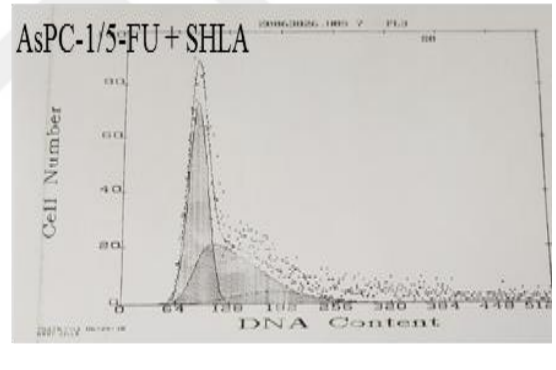
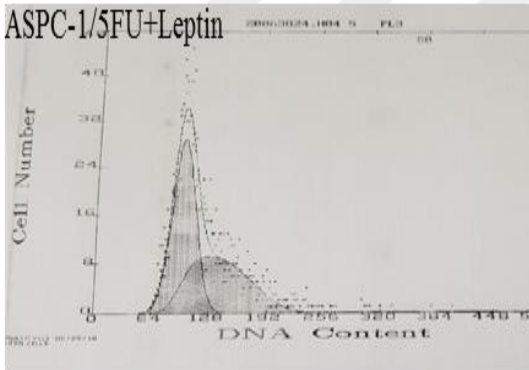
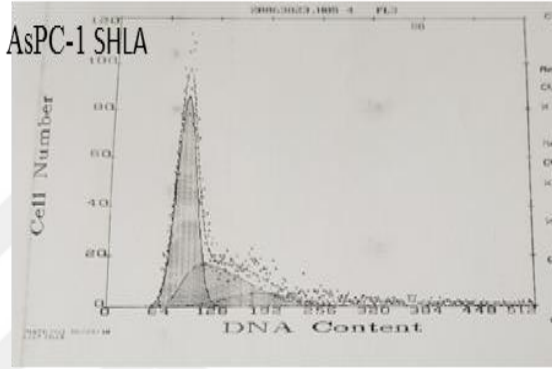
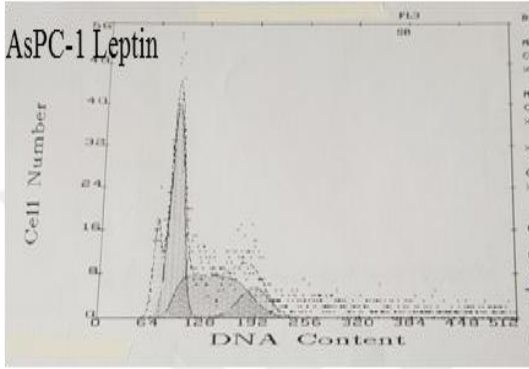
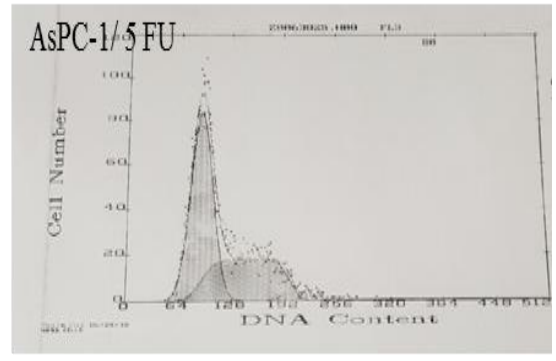
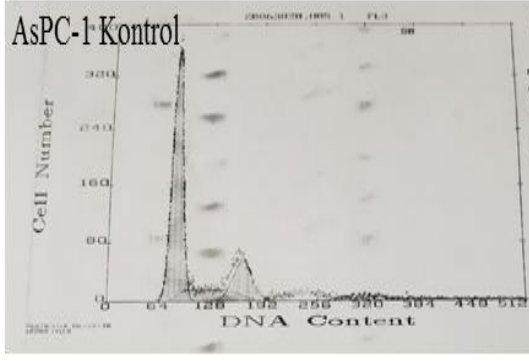
Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılmış ve hücrelerin üzerine transfer pipeti ile 3 ml steril PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenerek tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası üst kısım tekrar atılmış ve hücrelerin üzerine bir önceki aşamada olduğu gibi 3 ml PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenerek pipetle hafifçe karıştırılarak yıkama işlemi yapılmıştır. Ardında tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst süpernatant kısım atılmış ve hücrelerin üzerine 2 ml steril PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenmiştir. Fiksasyon için vorteks üzerinde alınan tüplerin üzerine toplamda 2-3 ml soğuk %99'luk alkol hafif vorteks altında damla damla bırakılarak hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon işlemi sonrasında hücre akım sitometrisi süreci başlatılana kadar +4°C'de saklanmıştır.

Akım sitometrisi ölçüm süreci başladığında öncelikle ortamdaki alkolü uzaklaştırmak için 2 ml daha PBS ilave edilmiş ve 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 70 µl RNase ve 50 µl Propidium Iodide (PI) eklenerek mikropipet yardımıyla karışması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda örnekler 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler 37 µm'lik nylon mesh'den süzölmüş ve akım sitometri cihazında (EPICS XL MCL, Beckman Coulter) 10000 hücre sayılarak hücre döngüsü ve DNA analizi yapılmıştır. G0/G1, sentez ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı ile apoptotik hücre oranı iki değişkenli DNA histogramları MCYCLE (Phonex Sys) programı kullanılarak analiz edilmiştir. AsPC-1 hücre serisine ait akım sitometri sonuçları örnek olarak aşağıda verilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. AsPC-1 hücre serisine ait akım sitometri sonuçları

### 3.2.9. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı tipte bir araştırma olan araştırmada değişkenlere ilişkin frekanslar ve yüzdeler verilmiş ve bu veriler çeşitli grafikler yardımıyla görsel olarak da özetlenmiştir. Kategorik değişkenlerin gruplardaki dağılımlarının test edilmesinde ki-kare ya da Fisher'in exact testi kullanılmış, sonuçlar frekans dağılımları ve yüzdelerin tanımlayıcı istatistik olarak kullanıldığı tablolarla ifade edilmiştir. Çalışmada istatistiksel anlamlılık sınırı olarak  $p < 0.05$  alınmıştır.





## 4. BULGULAR

Tez kapsamında çalışılan 5-FU, Leptin ve SHLA moleküllerinin AsPC-1, MIA PaCa-2, Panc-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile saptanmıştır.

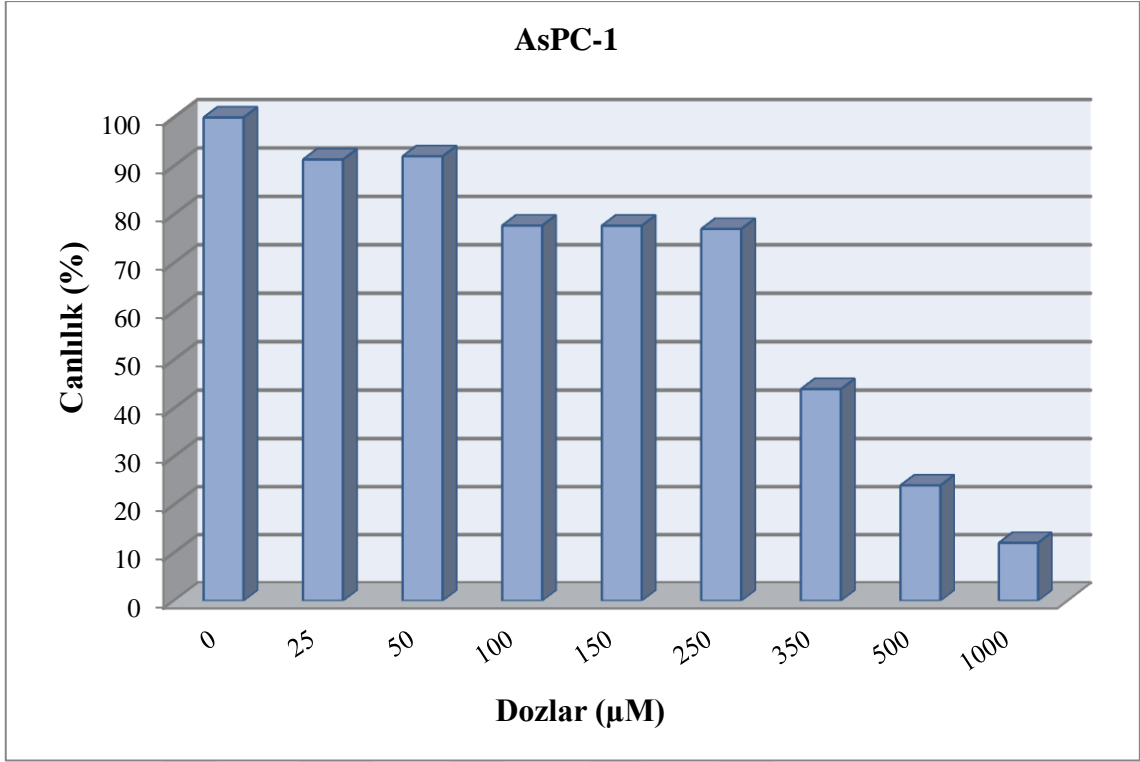
### 4.1. 5-FU Sitotoksitesi

Sitotoksite testi sonucu her 3 hücre serisinde de 72. saatte yalnızca 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değeri saptanmıştır (Tablo 4.1). 5-FU'nun dozlarına göre hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkileri Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Aynı inkübasyon süresinde Leptin ve SHLA moleküllerinin IC<sub>50</sub> değerinin saptanabileceği bir sitotoksiteleri bulunmamaktadır.

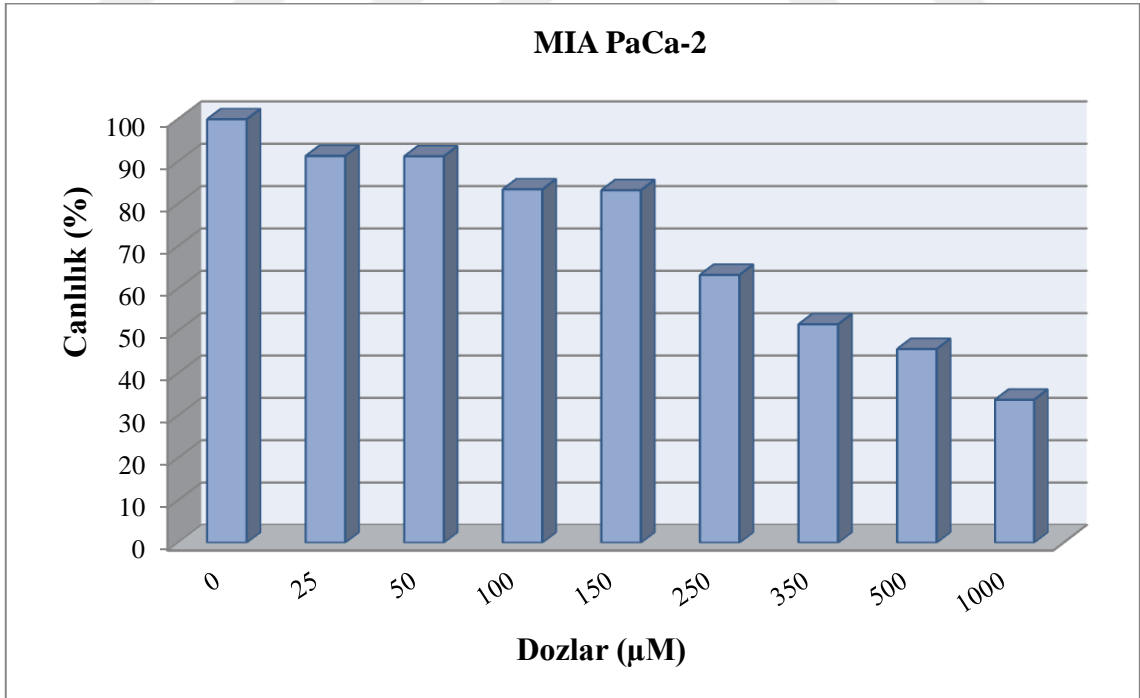
Bu test her bir hücre serisi için 3 kez ve her bir testte 4 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

**Tablo 4.1.** 5-FU'un Pankreas kanseri hücre serilerinde IC<sub>50</sub> değerleri

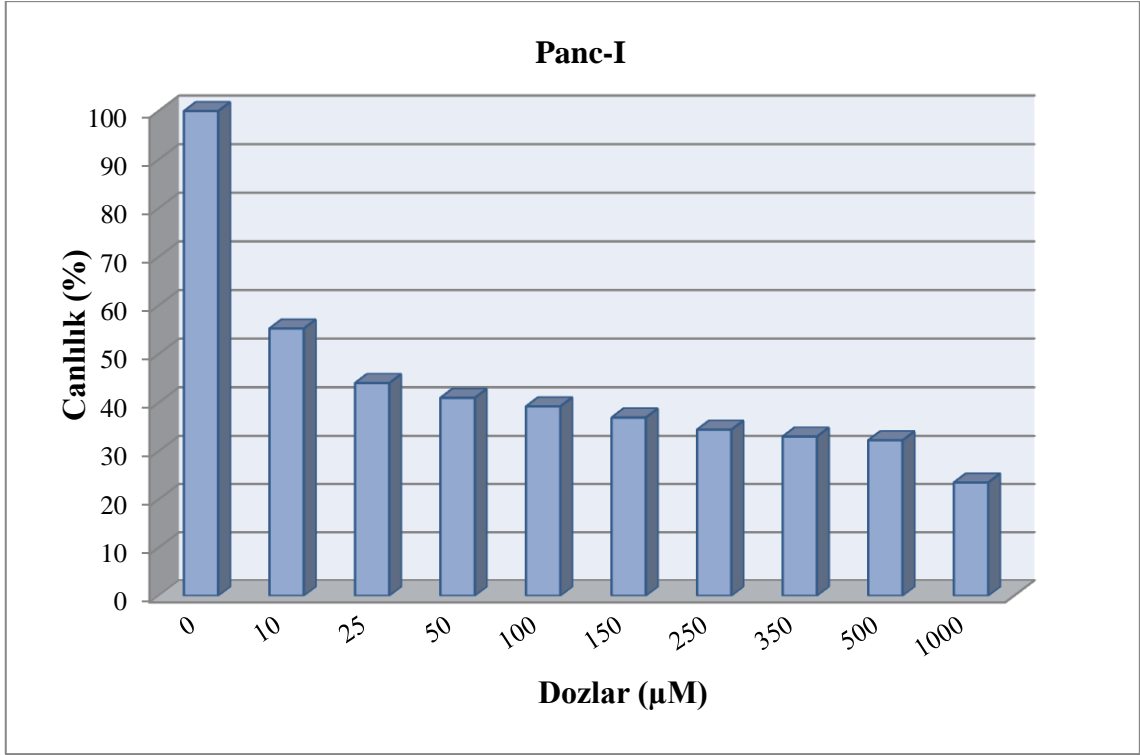
Hücre Serisi	IC <sub>50</sub> değeri (µM)
AsPC-1	330.56
MIA PaCA-2	450.98
Panc-I	12.50



**Şekil 4.1.** 5-FU'nun AsPC-1 hücre serisindeki sitotoksitesi



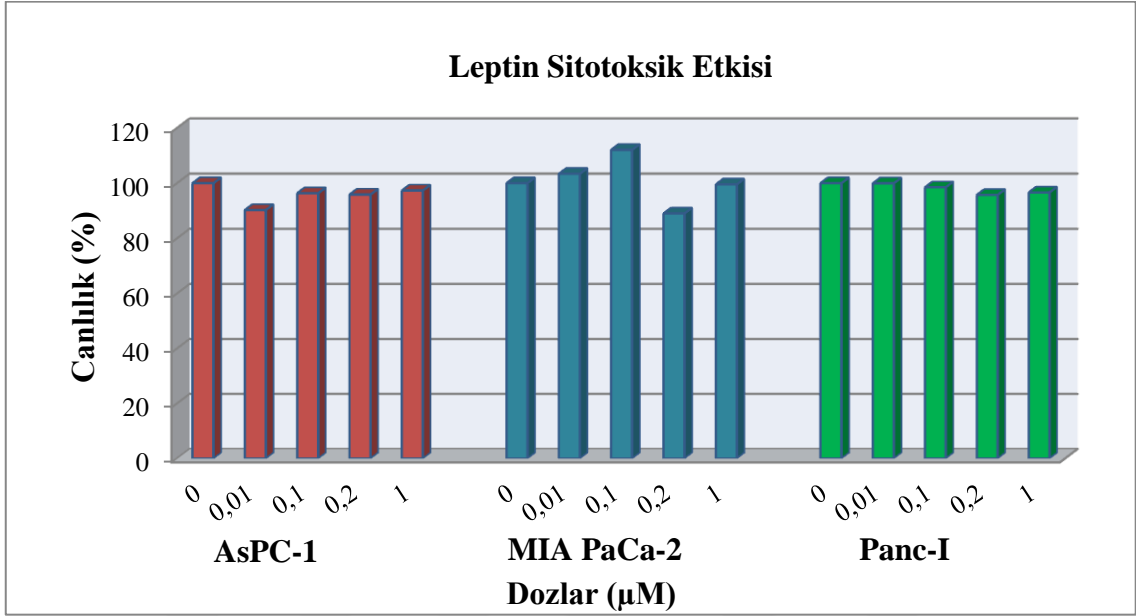
**Şekil 4.2.** 5-FU'nun MIA PaCa-2 hücre serisindeki sitotoksitesi



**Şekil 4.3.** 5-FU'nun Panc-I hücre serisindeki sitotoksitesisi.

## 4.2. Leptin Sitotoksitesi

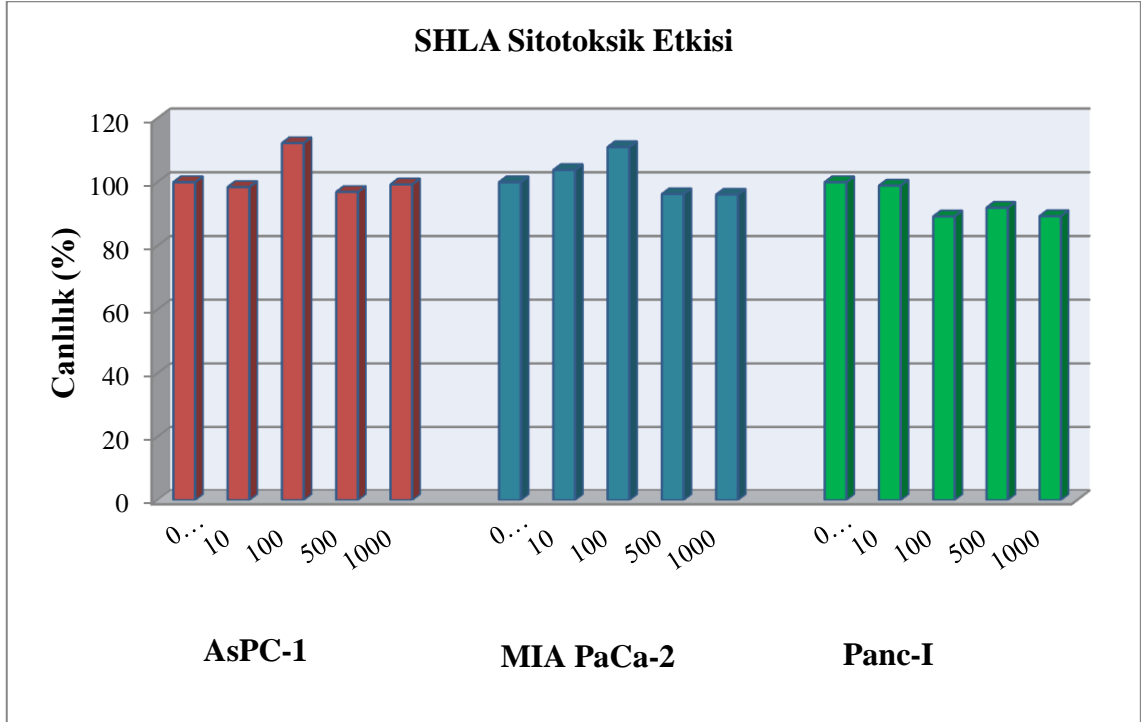
Leptin molekülünün hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 4.4’de verilmiştir. Bu sitotoksosite sonucuna göre, tez kapsamında yapılacak diğer testlerde Leptin’in uygulama dozu 0.1  $\mu$ M olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Leptin molekülünün AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I hücre serilerindeki sitotoksik etkisi

### 4.3. SHLA Sitotoksitesi

SHLA molekülünün hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 4.5’de verilmiştir. Bu sitotoksosite sonucuna göre, tez kapsamında yapılacak diğer testlerde SHLA’ın uygulama dozu 1000 ng olarak belirlenmiştir



Şekil 4.5. SHLA molekülünün AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I hücre serilerindeki sitotoksik etkisi

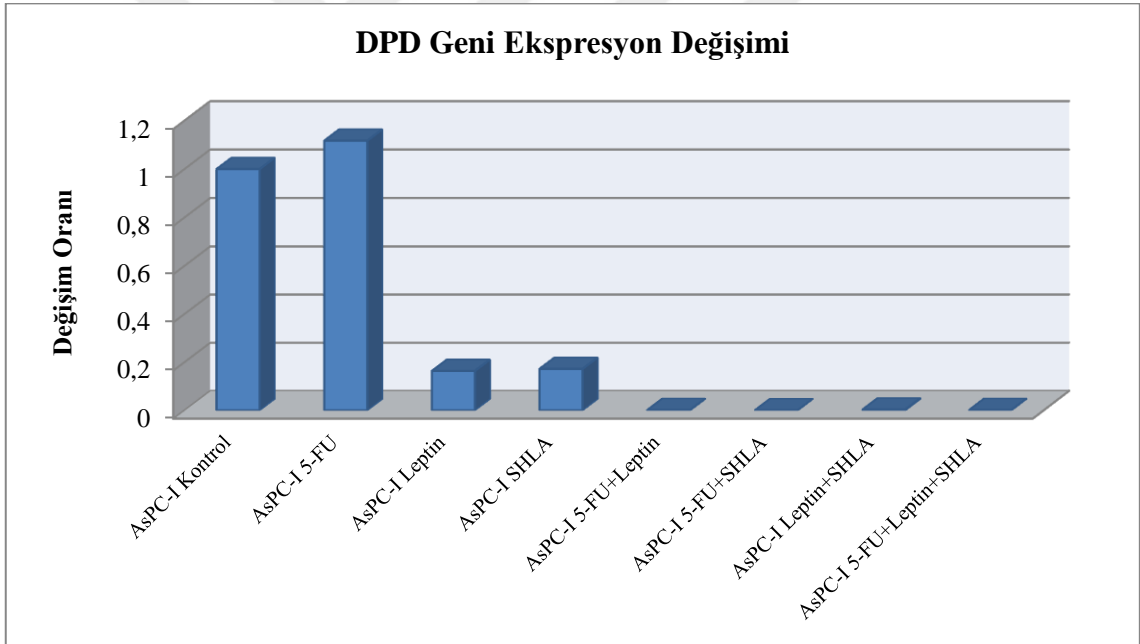
### 4.4. Gen Ekspresyon Analizi

IC<sub>50</sub> değeri belirlenen 5-FU molekülü ile sitotoksik etkileri bulunmayan Leptin (0.1 µM) ve SHLA (1000 ng) moleküllerinin tek tek ve kendi aralarındaki kombinasyonları hücrelere sunulduktan sonra hücrelerdeki 5-FU kemoterapötik direncinde rol alan genler ile apoptoz yolağında rol alan Kaspaz 3,8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişiklikleri RT-PZR ile saptanmıştır. AsPC-1 için “Kontrol, 5-FU (330.56 µM), Leptin (0.1 µM), SHLA (1000 ng), 5-FU + Leptin (330.56 µM+0.1 µM), 5-FU + SHLA (330.56 µM +1000 ng), Leptin + SHLA (0.1 µM + 1000 ng) ve son olarak 3’lü

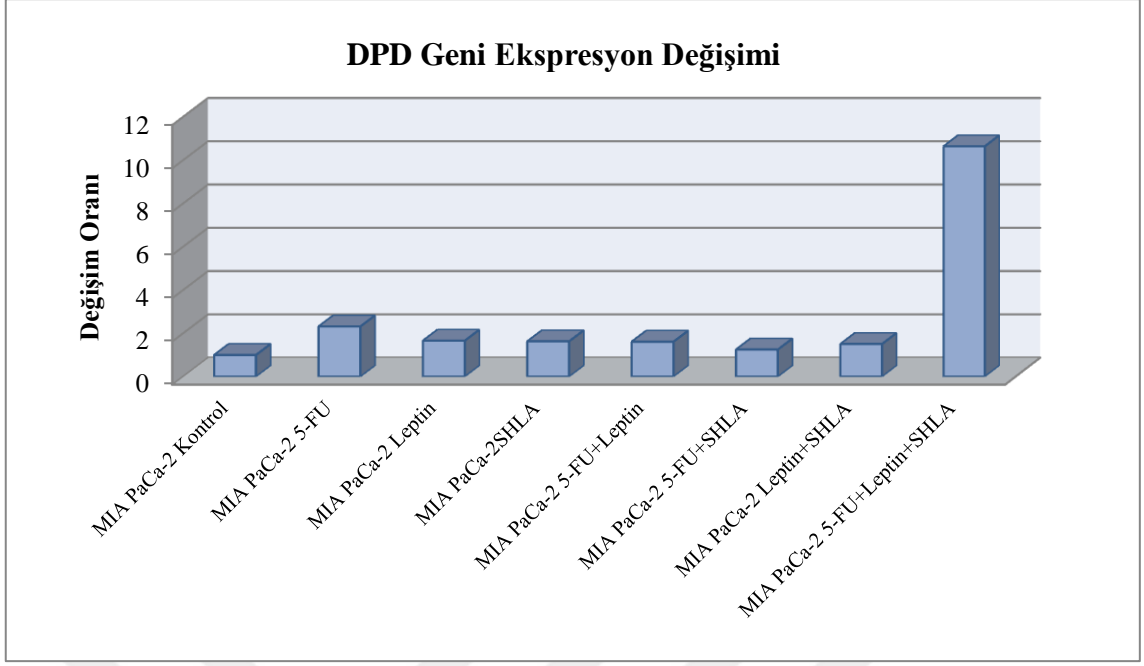
kombinasyon 5-FU + Leptin + SHLA (330.56  $\mu$ M + 0.1  $\mu$ M + 1000 ng) olarak toplam 8 grup belirlenmiştir. MIA PaCa-2 ve Panc-I hücre serileri içinde yalnızca 5-FU değerleri değişkenlik (MIA PaCa  $IC_{50}$  = 450.98  $\mu$ M ve Panc-I  $IC_{50}$ =12.50  $\mu$ M) gösteren benzer gruplar oluşturulmuştur.

#### 4.4.1. DPD Geni Ekspresyon Değişimi

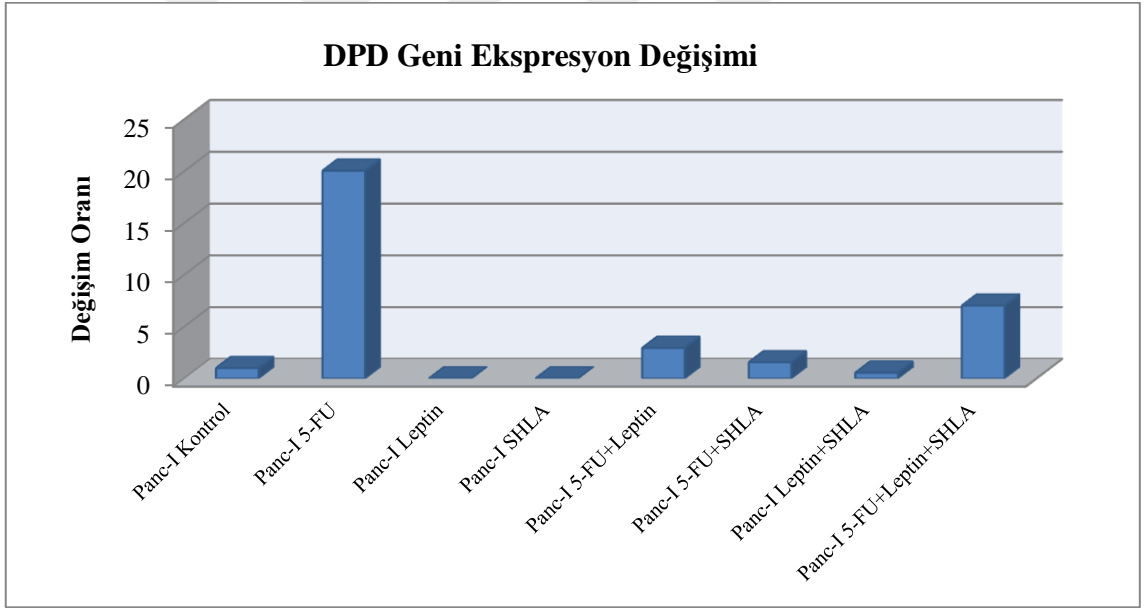
Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra TS geninde meydana gelen ekspresyon değişimi hücre tipine göre farklılık gösterdiği için bu değişiklikler AsPC-1 için Şekil 4.6'de; MIA PaCa-2 için Şekil 4.7 ve Panc-I Şekil 4.8'da verilmiştir.



Şekil 4.6. AsPC-1 hücre serisinde DPD geni ekspresyon değişimi



**Şekil 4.7.** MIA PaCA-2 hücre serisinde DPD geni ekspresyon değişimi

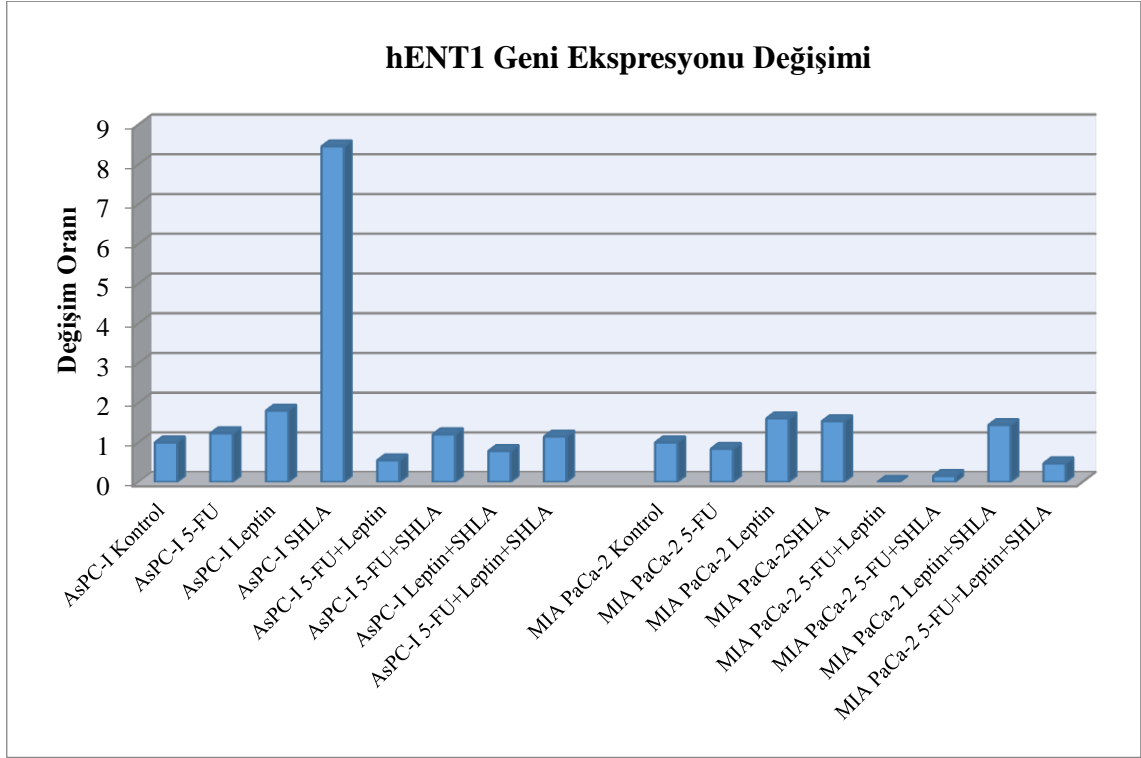


**Şekil 4.8.** Panc-I hücre serisinde DPD geni ekspresyon değişimi

#### 4.4.2. hENT-1 (human equilibrative nucleoside transporter- 1) Geni

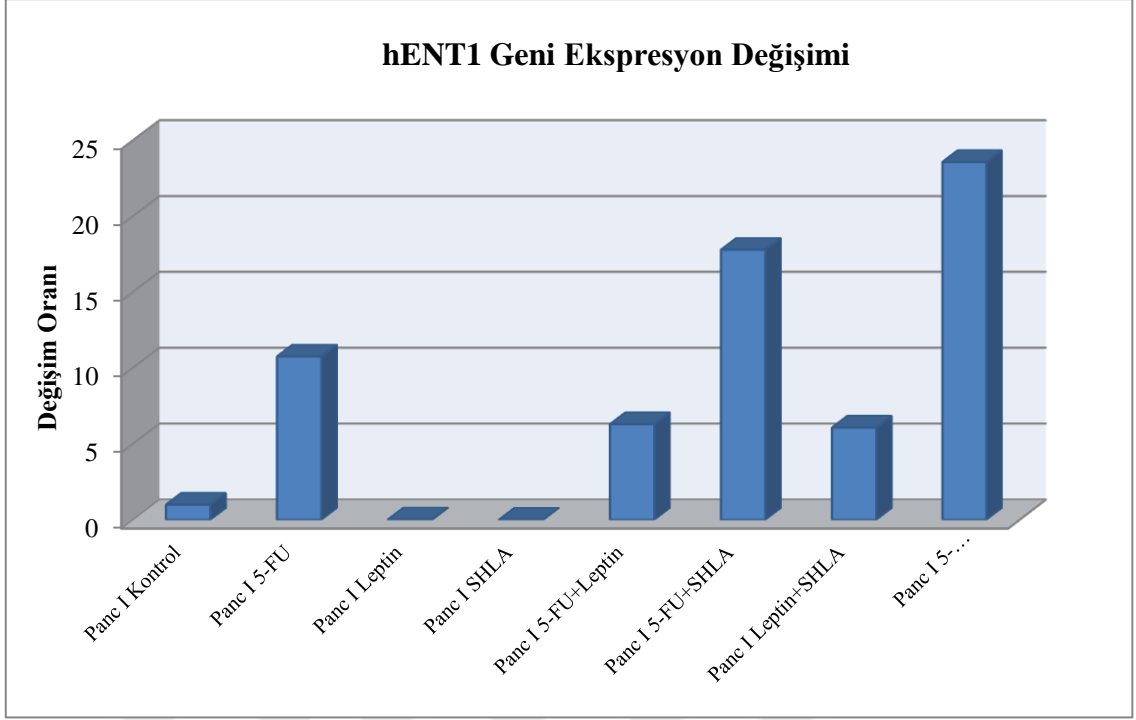
##### Ekspresyon Değişimi

Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra hENT-1 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4.9. AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde hENT-1 geni ekspresyon değişimi

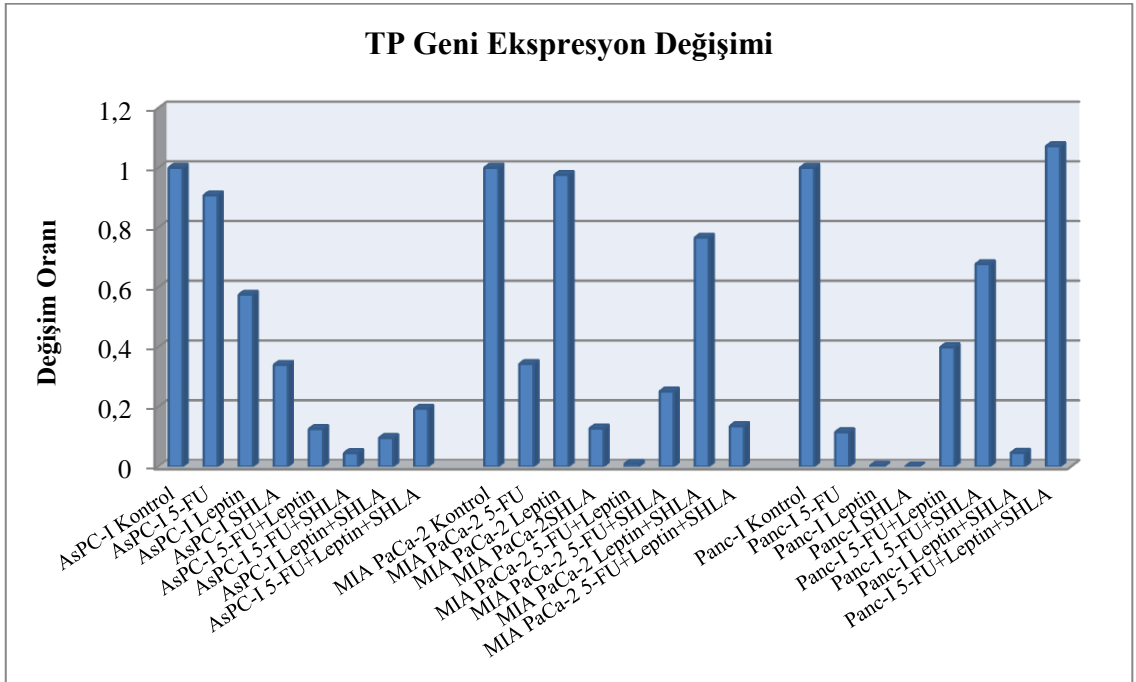




**Şekil 4.10.** Panc-I hücre serilerinde hENT-1 geni ekspresyon değişimi

#### 4.4.3. TP Geni Ekspresyon Değişimi

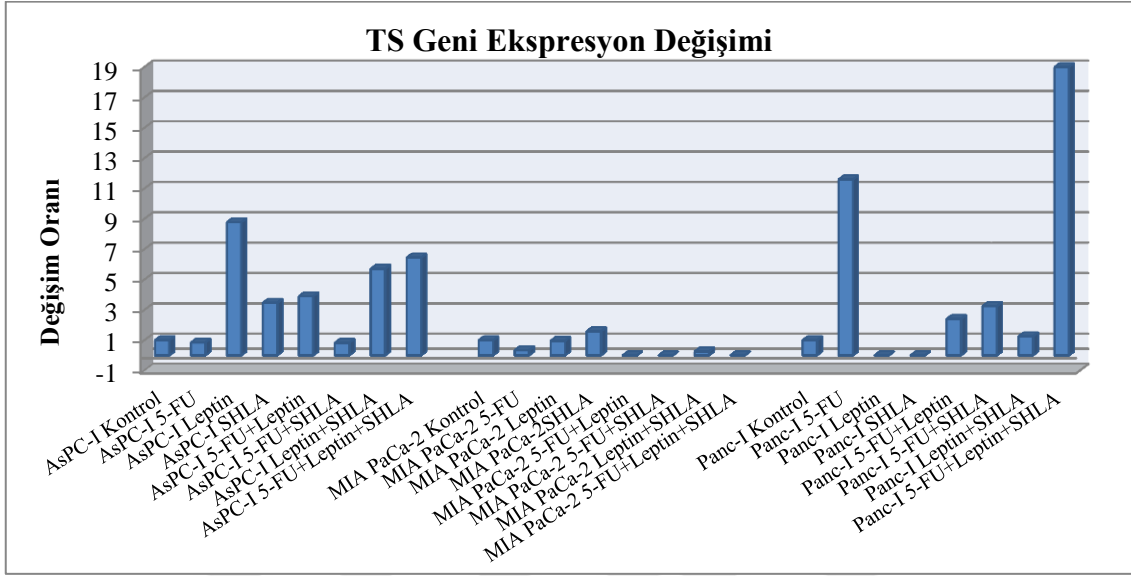
Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra TP geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 4.11’da verilmiştir



**Şekil 4.11.** TP geni ekspresyon değişimi

#### 4.4.4. TS Geni Ekspresyon Değişimi

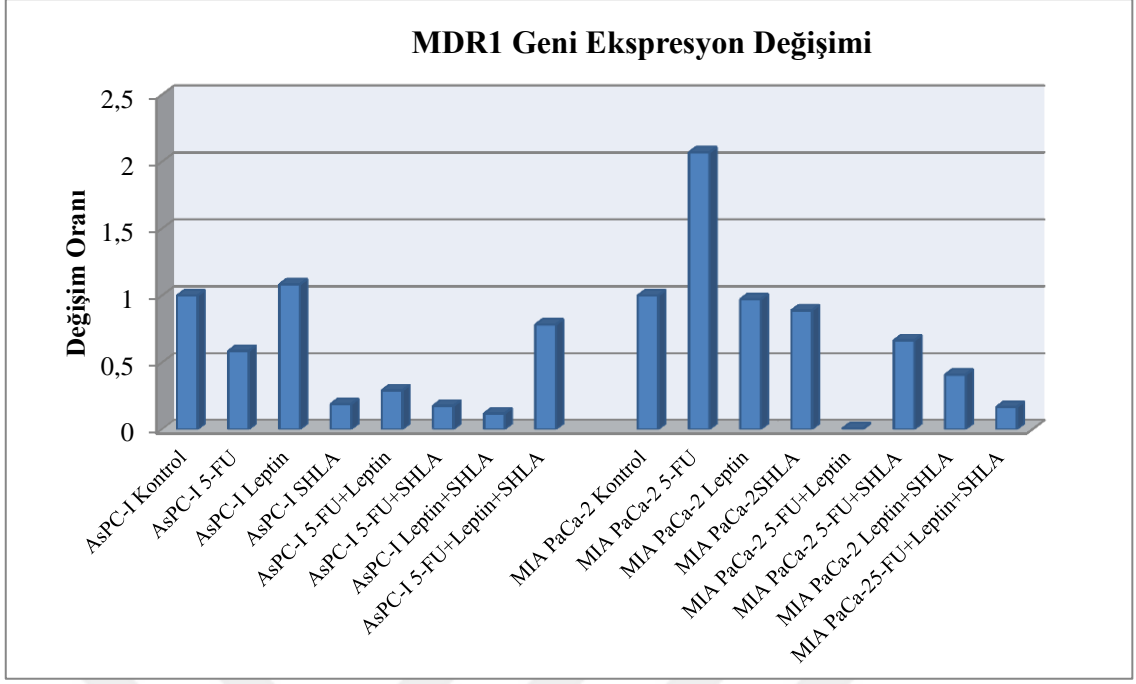
Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra TS geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 4.12’de verilmiştir.



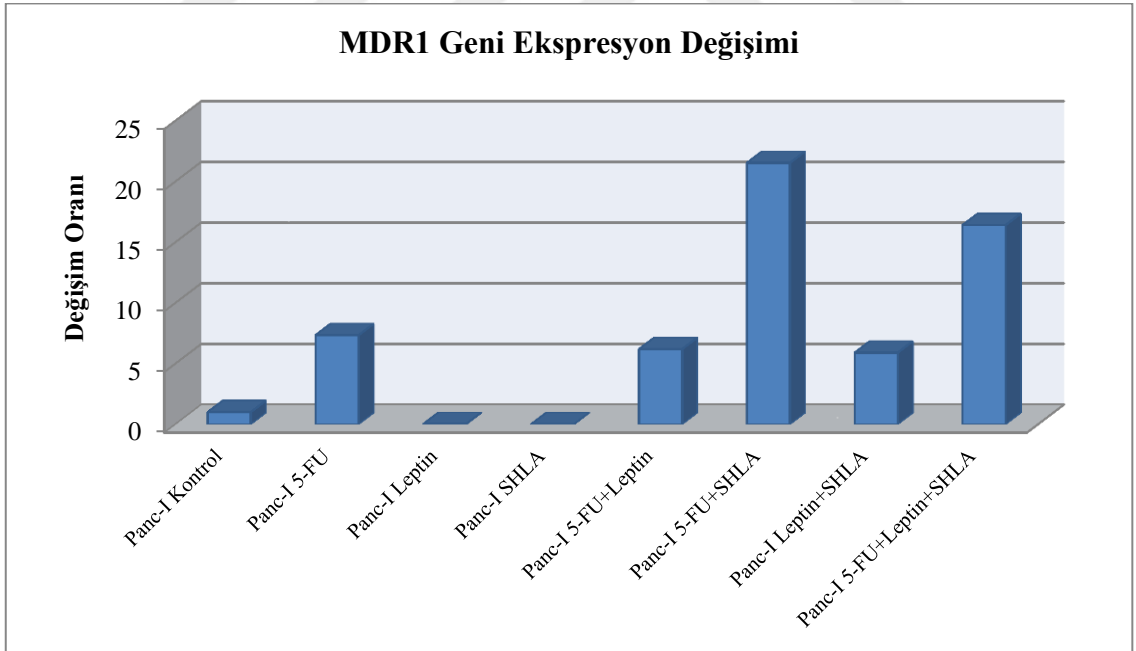
Şekil 4.12. TS geni ekspresyon değişimi

#### 4.4.5. MDR1 Geni Ekspresyon Değişiklikleri

Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra MDR1 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’da verilmiştir.



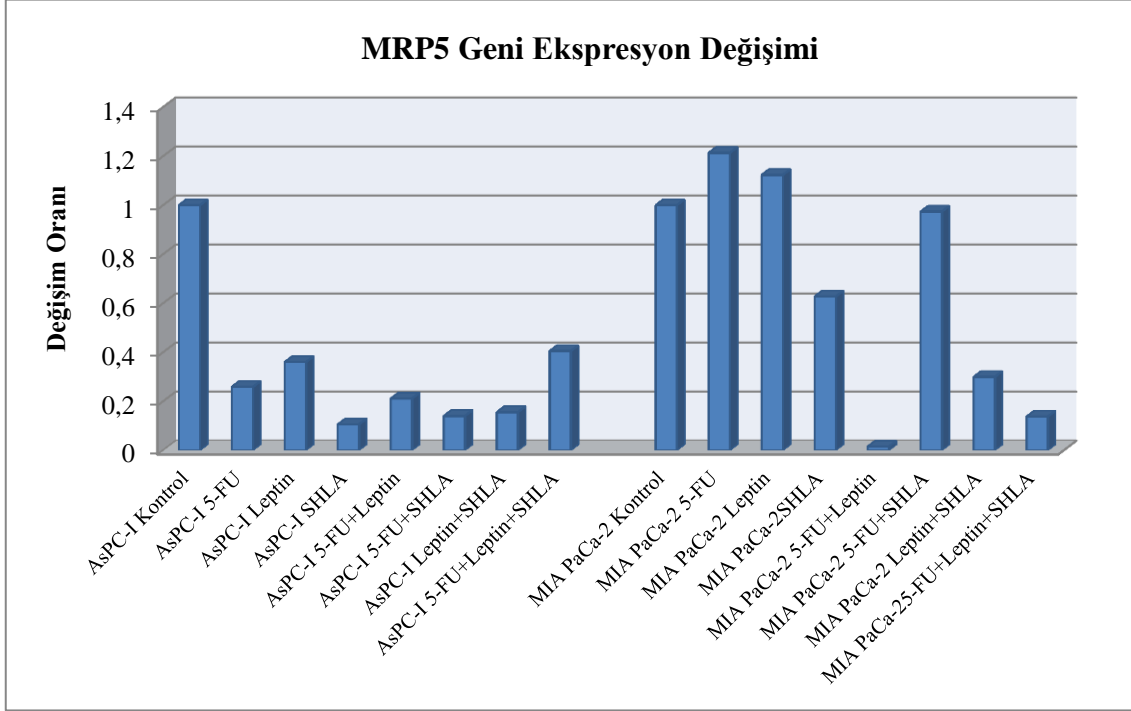
Şekil 4.13. AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde MRP1 geni ekspresyon değişimi



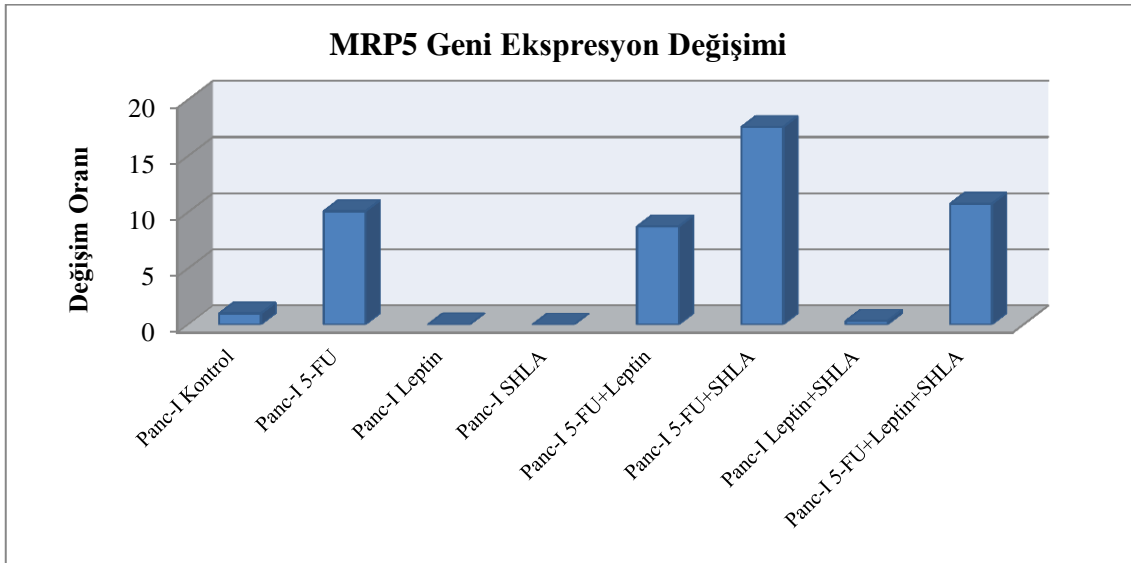
Şekil 4.14. Panc-I hücre serilerinde MDR1 geni ekspresyon değişimi

#### 4.4.6. MRP5 Geni Ekspresyon Değişimi

Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra MRP5 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'de verilmiştir.



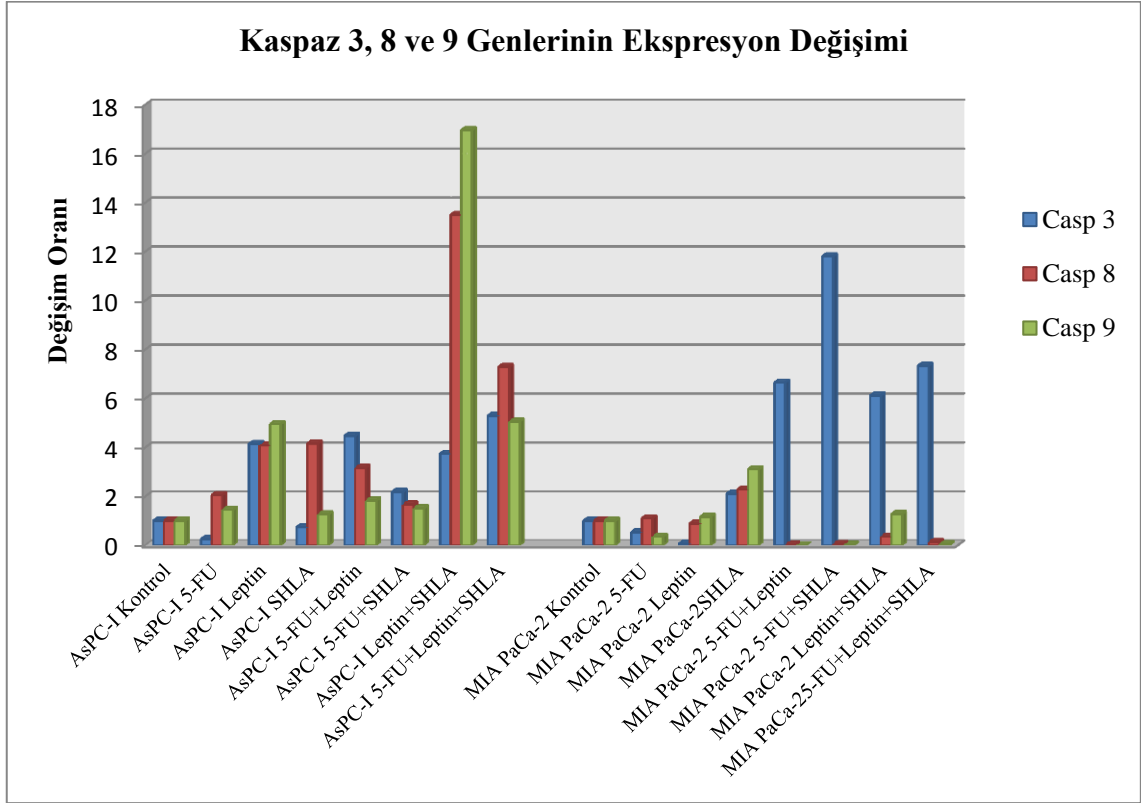
Şekil 4.15. AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde MRP5 geni ekspresyon değişimi



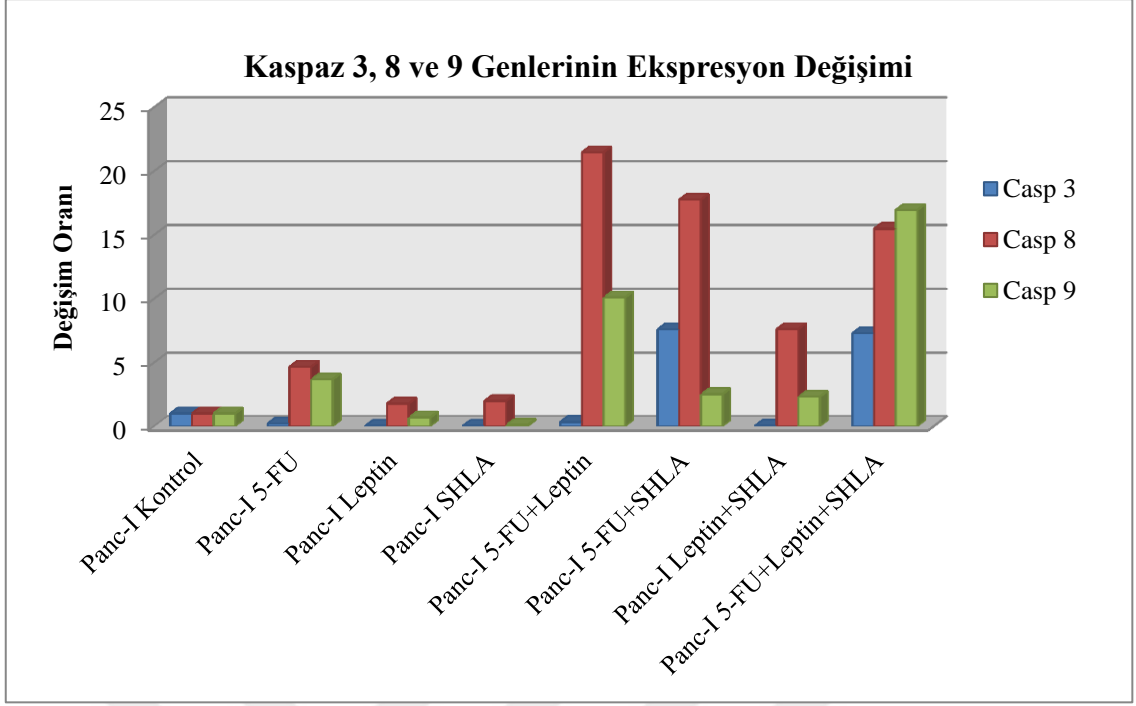
Şekil 4.16. Panc-1 hücre serilerinde MRP5 geni ekspresyon değişimi

#### 4.4.7. Kaspaz Genlerinin Ekspresyonu

Pankreas kanseri hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.



**Şekil 4.17.** AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimi



**Şekil 4.18.** Panc-I hücre serisinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimi

#### 4.5. COMET Analizi

Her bir hücre serisinde, 5-FU ( $IC_{50}$  değeri), Leptin ( $0.1 \mu M$ ) ve SHLA (1000 ng) moleküllerin tek tek ve kendi aralarındaki kombinasyonları hücrelere sunulduktan sonra hücrelerdeki olası genomik DNA hasarı COMET yöntemi ile belirlenmiştir. Her bir grupta saptanan DNA hasarı oranı ve DNA hasarı açısından grupların birbirlerine göre karşılaştırmaları sırasıyla Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te verilmiştir. Her 3 pankreas kanseri hücre serisinde de gruplar arasında DNA hasarı açısından anlamlı bir fark bulunmaktadır ( $p \leq 0.001$ )

**Tablo 4.2.** AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serilerinde saptanan DNA hasarı

Hücre serisi	AsPC-1	MIA PaCA-2	Panc-I	p
Gruplar	Hasar oranı (%)	Hasar oranı (%)	Hasar oranı (%)	
Kontrol	4.5	4.7	8.8	≤0.001
5-FU	5.9	4.9	15.8	≤0.001
Leptin	9.6	4.9	8.8	≤0.001
SHLA	4.6	5.7	8.1	≤0.001
5-FU + Leptin	11	13.7	21.4	≤0.001
5-FU + SHLA	6.9	24.5	20.4	≤0.001
Leptin + SHLA	7.9	13.7	19.6	≤0.001
5-FU + Leptin+ SHLA	13.4	28.7	23.1	≤0.001

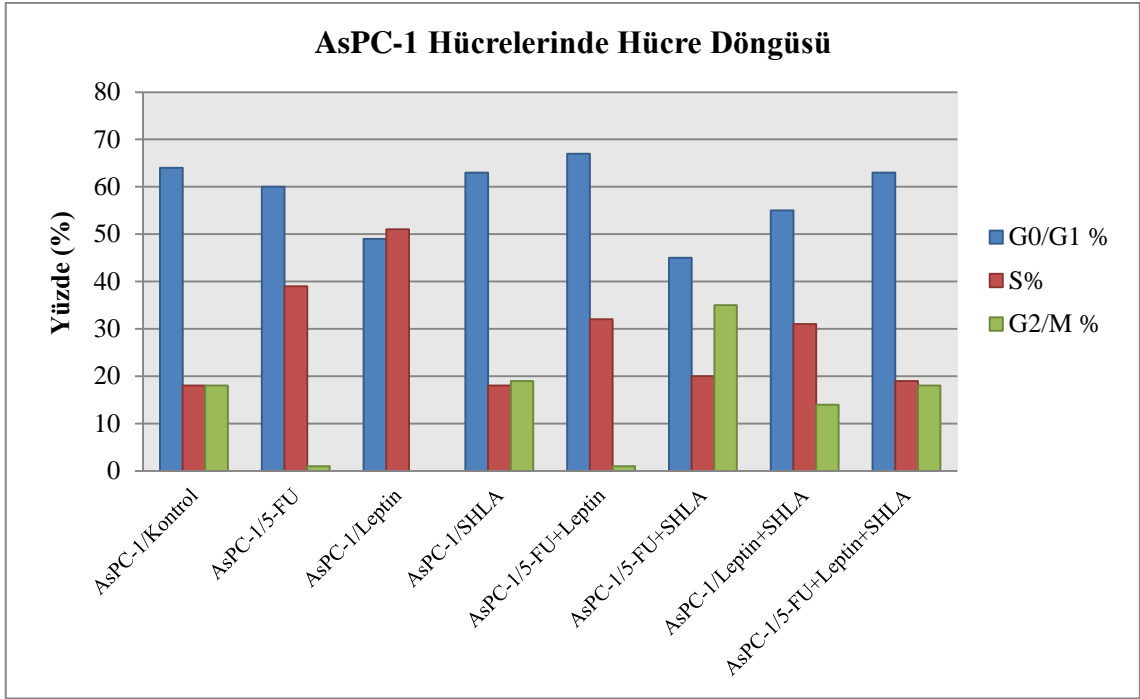
**Tablo 4.3.** AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serilerinde grupların birbirlerine göre DNA hasarı açısından karşılaştırmaları

Grup	Karşılaştırma Grubu	AsPC-1	MIA PACA	Panc-I
		p	p	p
<b>Kontrol</b>	5-FU	0.461	0.913	0.090
	Leptin	0.023	0.928	0.941
	SHLA	0.954	0.545	0.842
	5-FU + Leptin	0.005	<0.001	0.005
	5-FU + SHLA	0.245	<0.001	0.007
	Leptin + SHLA	0.108	0.001	0.012
	5-FU + Leptin + SHLA	<0.001	<0.001	0.001
<b>5-FU</b>	Leptin	0.147	0.983	0.043
	SHLA	0.586	0.618	0.026
	5-FU + SHLA	0.664	<0.001	0.266
	Leptin + SHLA	0.406	0.001	0.368
	5-FU + Leptin + SHLA	0.006	<0.001	0.083
<b>Leptin</b>	SHLA	0.079	0.597	0.89
	5-FU + Leptin	0.653	<0.001	0.001
	5-FU + SHLA	0.341	<0.001	0.001
	Leptin + SHLA	0.542	0.001	0.003
	5-FU + Leptin + SHLA	0.243	<0.001	<0.001
<b>SHLA</b>	5FU + Leptin	0.030	0.001	<0.001
	5-FU + SHLA	0.368	<0.001	<0.001
	Leptin + SHLA	0.215	0.005	0.001
	5-FU + Leptin + SHLA	0.005	<0.001	<0.001
<b>5-FU + Leptin</b>	5-FU + SHLA	0.156	0.018	0.814
	Leptin + SHLA	0.279	0.992	0.677
	5FU + Leptin + SHLA	0.457	0.001	0.685
<b>5-FU + SHLA</b>	Leptin + SHLA	0.715	0.042	0.840
	5-FU + Leptin + SHLA	0.034	0.5	0.488
<b>Leptin + SHLA</b>	5-FU + Leptin + SHLA	0.069	0.006	0.385

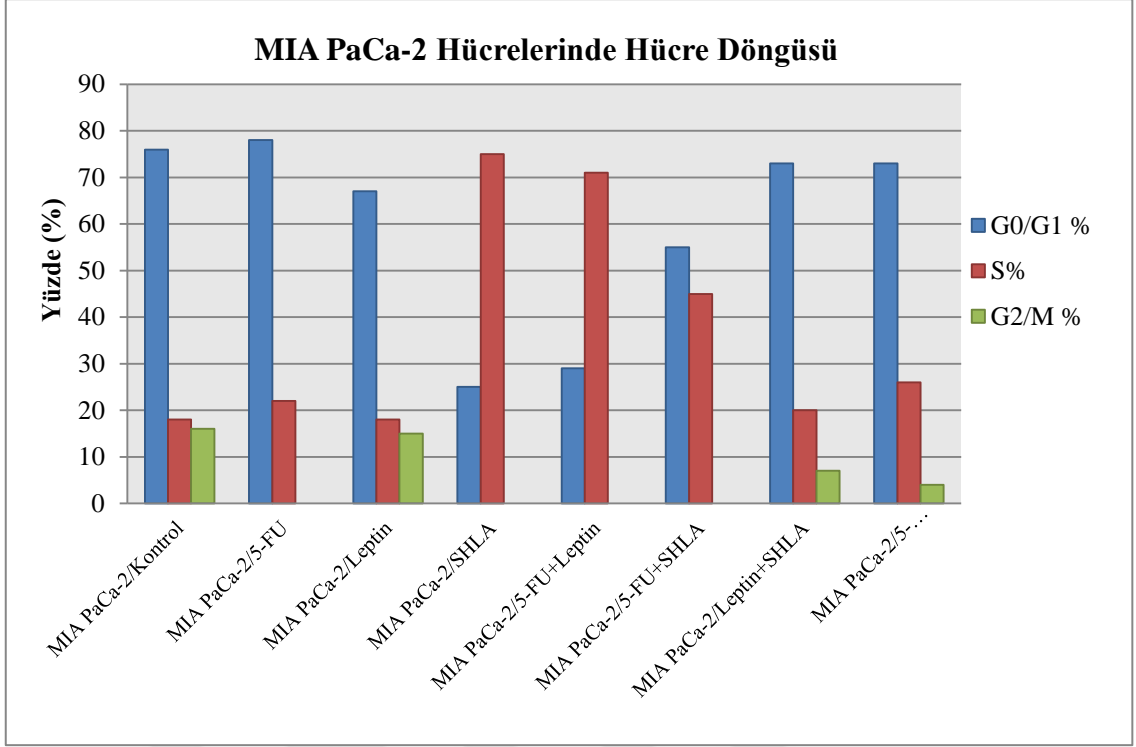


#### 4.6. Akım Sitometri Analizi

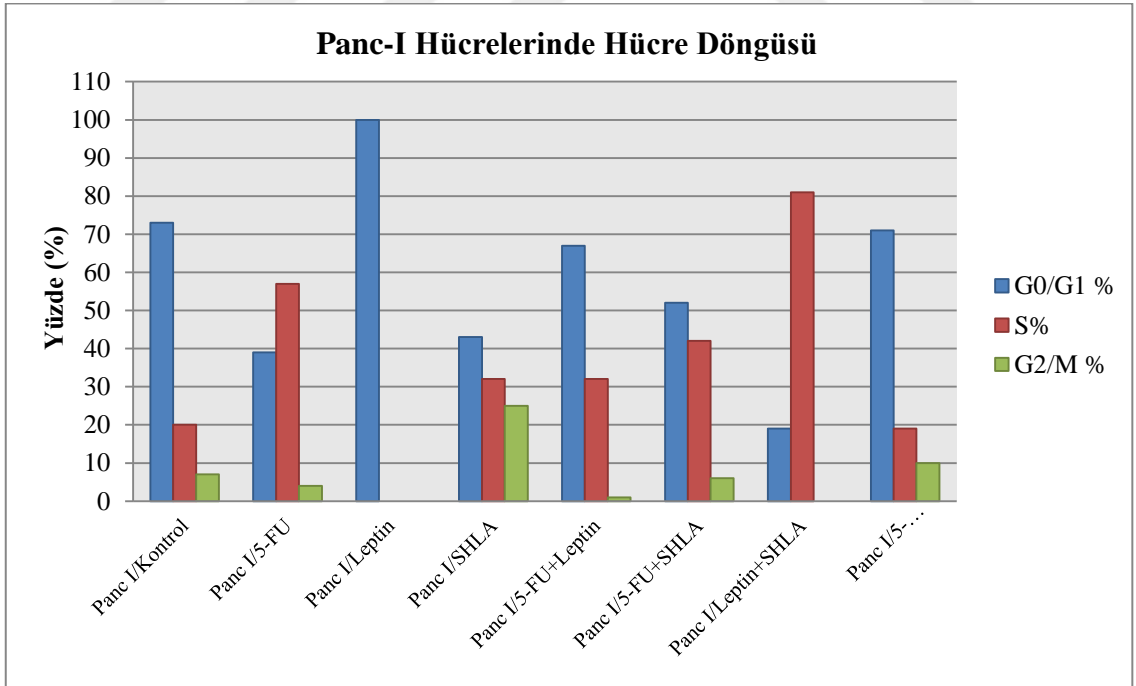
Her bir hücre serisinde, 5-FU (IC<sub>50</sub> değeri), Leptin (0.1 µM) ve SHLA (1000 ng) moleküllerin tek tek ve kendi aralarındaki kombinasyonları hücelere sunulduktan sonra moleküllerin hücre döngüsüne olan etkileri Tablo 4.19 ve Tablo 4.20’te verilmiştir. Moleküllerin hücre döngülerine etkileri açısından hücre serilerinde ki gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmıştır (p≤ 0.001)



Şekil 4.19. AsPC-1 Hücrelerinde akım sitometri sonucu hücre döngüsü



**Şekil 4.20.** MIA PaCa-2 Hücrelerinde akım sitometri sonucu hücre döngüsü



**Şekil 4.21.** Panc-I Hücrelerinde akım sitometri sonucu hücre döngüsü

**Tablo 4.4.** AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serileride moleküllerin hücre döngüsüne olan etkileri

Hücre serisi	AsPC-1			MIA PACA			Panc I			
Döngü Gruplar	G0/G1 (%)	S	G2/M (%)	G0/G1 (%)	S	G2/M (%)	G0/G1 (%)	S	G2/M (%)	p
Kontrol	64	18	18	<b>76</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	73	20	7	≤0.001
<b>5-FU</b>	60	39	1	<b>78</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	39	57	4	≤0.001
Leptin	49	51	0	<b>37</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	100	0	0	≤0.001
<b>SHLA</b>	63	18	19	<b>25</b>	<b>75</b>	<b>0</b>	43	32	25	≤0.001
5-FU + Leptin	67	32	1	<b>29</b>	<b>71</b>	<b>0</b>	67	32	1	≤0.001
<b>5-FU + SHLA</b>	45	20	35	<b>55</b>	<b>45</b>	<b>0</b>	52	42	6	≤0.001
Leptin + SHLA	55	31	14	<b>73</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	19	81	0	≤0.001
<b>5-FU + Leptin + SHLA</b>	63	19	18	<b>73</b>	<b>26</b>	<b>4</b>	71	19	10	≤0.001

**Tablo 4.5.** AsPC-1, MIA PACA-2 ve Panc-I hücre serilerinde grupların hücre döngüsüne etkileri açısından karşılaştırılmaları

<b>Grup</b>	<b>Karşılaştırma Grubu</b>	<b>AsPC-1 p</b>	<b>MIA PACA p</b>	<b>Panc-I p</b>
<b>Kontrol</b>	5-FU	≤0.001	≤0.001	≤0.001
	Leptin	≤0.001	0.940	≤0.001
	SHLA	0.983	≤0.001	≤0.001
	5-FU + Leptin	≤0.001	≤0.001	0.023
	5-FU + SHLA	0.012	≤0.001	0.003
	Leptin + SHLA	0.099	0.200	≤0.001
	5-FU + Leptin + SHLA	0.983	0.014	0.747
<b>5-FU</b>	Leptin	0.156	≤0.001	≤0.001
	SHLA	≤0.001	≤0.001	≤0.001
	Leptin	0.584	≤0.001	≤0.001
	5-FU + SHLA	≤0.001	0.001	0.104
	Leptin + SHLA	0.002	0.027	0.001
	5-FU + Leptin + SHLA	≤0.001	0.108	≤0.001
<b>Leptin</b>	SHLA	≤0.001	≤0.001	≤0.001
	5-FU + Leptin	0.017	≤0.001	≤0.001
	5-FU + SHLA	≤0.001	≤0.001	≤0.001
	Leptin + SHLA	≤0.001	0.195	≤0.001
	5-FU + Leptin + SHLA	≤0.001	0.018	≤0.001
<b>SHLA</b>	5FU + Leptin	≤0.001	0.524	≤0.001
	5-FU + SHLA	0.020	≤0.001	0.001
	Leptin + SHLA	0.093	≤0.001	≤0.001
	5-FU + Leptin + SHLA	0.973	≤0.001	≤0.001
<b>5-FU + Leptin</b>	5-FU + SHLA	≤0.001	≤0.001	0.033
	Leptin + SHLA	0.002	≤0.001	≤0.001
	5FU + Leptin + SHLA	≤0.001	≤0.001	0.005
<b>5-FU + SHLA</b>	Leptin + SHLA	0.002	≤0.001	≤0.001
	5-FU + Leptin + SHLA	0.014	0.003	0.002
<b>Leptin SHLA</b>	+ 5-FU + Leptin + SHLA	0.141	0.459	≤0.001

## 5. TARTIŞMA

PK, küratif bir tedavisi bulunmayan mortalite oranı yüksek kanserlerden biridir. PK tanısı alan hastalar genellikle derece III/IV olduklarından tedavisi çok zordur<sup>2</sup>; PK tedavisinde cerrahi ilk seçenek olmasına rağmen her hastada cerrahi uygulanamamaktadır<sup>62</sup>. Bu nedenle kemoterapi en uygun tedavi seçeneğidir. Kemoterapide 5-FU, gemsitabin ve bunların diğer toksik ilaçlarla kombinasyonları tercih edilmektedir.

5-FU ilk kez 1957 yılında bulunmuş ve yaygın kullanımı kabul görmüş kemoterapötik bir ilaçtır. Anti-kanser etkisini TS enziminin inhibisyonu ve kendi metabolitlerinin genomik DNA ve RNA'ya katılımı yoluyla gerçekleştirmektedir.<sup>72</sup> 1950'li yıllarda kolon kanseri başta olmak üzere PK tedavisinde ilk kemoterapi ilacı olarak kullanılan 5-FU, gemistabinin üretimi ve gemsitabinin yaşam süresi konusundaki üstünlüğü<sup>62</sup> nedeniyle PK tedavisindeki kullanımı gemsitabinden sonraya kalmış olsa da son yıllarda 5-FU temelli kombinasyon tedavilerinin diğer tedavi modalitelerine göre başarısının arttığı saptandığından 5-FU temelli tedaviler tekrardan önem kazanmıştır.<sup>64, 101, 114</sup> Bu tez çalışmasında 5-FU kemoterapötik direncinin seçilmesinin nedenlerinden biri de son yıllarda kemoterapötik önemi tekrar artan<sup>64</sup> ancak direnç mekanizması hakkında az ve çelişkili sonuçları bulunan 5-FU'unun kemoterapötik direncine ait potansiyel mekanizmaların açıklanmasına katkı sunmaktır. Ancak her kemoterapide olduğu gibi 5-FU temelli tedavi protokollerinde de primer ve kazanılmış direnç ile karşılaşmaktadır. Kemoterapötik direnç, ilacın etkinliğini azaltmakta ve tedavi başarısını düşürmektedir. Kemoterapötik direncin önlenmesi ve/veya üstesinden gelinmesi amacıyla 5-FU başka moleküllerle kombine edilerek uygulanmakta ve tedavi başarısı artırılmaya çalışılmaktadır<sup>64,65</sup> Ancak bu kombinasyonlarda 5-FU terapötik yolağında, 5-FU etkinliğini azaltacak hücresel unsurları (genetik, epigenetik,

biyokimyasal) hedef alan molekül ve/veya ilaçların kullanılması hedefe yönelik etkili bir tedavi yaklaşımını barındırabilir. Bu nedenle 5-FU terapötik direnç yolağının tanımlanması önemlidir. 5-FU terapötik direncine katkı sunan unsurları PK dokusal yapısı (sıkı desmoplastik yapı),<sup>63</sup> hücre döngüsü genlerinde, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar,<sup>62</sup> mikroRNA ve DNA ve kromatin asetilasyonu gibi epigenetik faktörler,<sup>2, 67</sup> hücre membranındaki taşıyıcı sistemler,<sup>65</sup> 5-FU metabolizmasında yer alan enzimlerin miktarı ve aktivasyonları<sup>65, 88</sup> şeklinde özetleyebiliriz. Bu tez çalışmasında 5-FU metabolizmasında oluşan metabolitlerin fonksiyonunda yer alan enzimler ile hücre membranında metabolitlerin taşınımında sorumlu ve çoklu ilaç direncine katkı sunan taşıyıcı proteinlerin transkripsiyon düzeyinde ekspresyonlarının terapötik kombinasyonu olası 5-FU temelli yeni bir molekül kombinasyonu ile araştırılması amaçlanmıştır.

Bu yeni kombinasyonda 5-FU ile Leptin ve Leptin reseptör inhibitörü SHLA kullanılmıştır. Leptin, fizyolojik olarak hücre ve organizmada genel metabolizma, nöroendokrin fizyolojisi, infertilite<sup>115</sup> ve immune sistem cevabının gelişimi<sup>9, 115</sup> gibi birçok mekanizmaya doğrudan veya dolaylı katkı sunabilen bir hormondur. Leptin, kanser oluşum ve gelişim basamağında da anjiyogenez, metastaz, tümörigenez ve apoptoza karşı hayatta kalma / direnç gibi işlemleri destekleyen pro-inflamatuar, pro-anjiyojenik ve pro-tümörijenik bir adipokindir.<sup>9, 12</sup> Ancak bu özelliklerinin yanında Leptinin PK hücre serilerinin spesifik olarak ölümüne neden olduğu<sup>6</sup> ve MAPK yolağı üzerinden apoptozu desteklediği ve hücre tipine göre doğal ve kazanılmış bağışıklıkta rolü olduğu bilinmektedir.<sup>9, 116</sup> Kanser olgularında immune sistem hücrelerinin yetersiz kaldığı bilinmektedir. Leptininde periferik mononükleer hücrelerin proliferasyonunu tetiklemesi,<sup>116</sup> apoptozu geciktirmesine ilişkin veriler<sup>9</sup> leptinin PK tedavisinde 5-FU uygulamasında destekleyici rolü olup olmayacağının sorusunu akla getirmiş bu nedenle

de 5-FU ile leptin uygulamasının 5-FU direnç yolağındaki etkileri araştırılmıştır. Leptinin bu olası etkilerinin net olarak ortaya konulması amacıyla da leptin inhibitörü süperaktif insan leptin antogonisti (SHLA) hem 5-FU hem leptin ile ikili kombinasyonda hemde her ikisi ile birlikte üçlü kombinasyon halinde uygulanmıştır.

### **5.1. 5-FU, Leptin ve SHLA Sitotoksitesi**

Her bir molekülün sitotoksik IC50 değeri MTT testi ile 3 kez ve her bir testte 4 tekrarlı olacak biçimde araştırılmıştır.

### **5.2. 5-FU Sitotoksitesi**

Elde edilen verilere göre 5-FU'ya en duyarlı hücre serisi Panc-I (12.5µM) en dirençli olanı ise MIA PaCa-2 (450.98 µM) hücre serisi olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz IC50 değeri diğer yayınlara<sup>106, 117</sup> göre oldukça yüksek saptanmıştır. Shi ve ark.'ları<sup>117</sup> tarafından Sülforhodamin B testi ile yapılan sitotoksite çalışmasında, 72 saat 5-FU inkübasyonu sonunda IC50 değerleri, AsPC-1 için 3.08 µM, MIA PaCA-2 için 4.63 µM olarak saptandığı belirtilirken, Kurata ve ark.<sup>106</sup> tarafından prodidyum iodide ile yapılan sitotoksite çalışmasında 72 saat inkübasyon sonunda IC50 değerleri, AsPC-1 için 3.25 µM, MIA PaCA-2 için 9 µM, Panc-I için 3.85 µM olarak saptandığı belirtilmiştir.

Yehai Liu ve ark.'ları<sup>118</sup> MTT ile yaptıkları sitotoksite testinde Panc-I hücre serisinin 7 gün inkübasyon süresi sonunda 5-FU IC50 değerini 576 µM (75µg/ml) olarak vermiştir. Her üç çalışmada da farklı testler, farklı besi yeri ve farklı yaklaşımlar kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında özellikle IC50 değeri, çalışmaya özgü elde edilen kantitatif bir değerdir. Bu değeri kullanılan test ve hücre serisinin tipi başta olmak üzere<sup>119</sup> kullanılan hücre serisinin pasaj sayısı, beslenme biçimi, besi yeri tipi, laboratuvar ortamı,<sup>120</sup> kullanılan test,<sup>120</sup> ekim yapılan hücre sayısı ve elde edilen verilen kullanıldığı programlar etkilemektedir. Bu nedenle çalışmalar arasındaki farklılığın

temelinde bu unsurlar yatmaktadır. Meme kanseri hücre serilerinde 5-FU IC50 değerinin 29.9  $\mu\text{M}$ <sup>121</sup> ve hepatosellüler kanser serisinde 5-FU IC50 değerinin 68 $\mu\text{M}$  olarak saptanması bu duruma örnek olarak verilebilir<sup>122</sup>, Web tabanlı veri bankaları üzerinden yapılan araştırmada “[www.cancerrxgene.org/translation/Drug/179?#t\\_IC50](http://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/179?#t_IC50)” adlı veri bankasından AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serileri için IC50 değerlerini sırayla 133 ve 314  $\mu\text{M}$  olarak vermektedir. Bu veriler tez çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle uyumludur. Liu S ve ark.’ları<sup>123</sup> tarafından PK hücre serilerinde yapılan çalışmada Panc-I hücre serisinin 72 saat inkübasyon sonunda IC50 değeri 12  $\mu\text{M}$  olarak verilmiştir. Bu değer bizim Panc-I IC50 değerimiz ile uyumludur.

Bu tez çalışmasında MTT testi 3 kez bağımsız biçimde ve her bir testte her bir doz için 4 tekrarlı olacak biçimde morfolojik izlem yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu MTT görüntüleri ölçüm öncesi fotoğraflanarak kantitatif veri kalitatif olarak ta doğrulanmıştır. Ayrıca MTT ve benzeri testlerde kontrol grubu dahil en az 6 doz yapılması gereklidir. Bu tez çalışmasında ise kontrol dahil 9 doz uygulaması yapılmıştır.

### **5.3. Leptin Sitotoksitesisi**

Leptinin hücre sitotoksitesisi ve proliferasyonu üzerine olası etkilerini farklı kanser hücreleri üzerinde araştıran birçok çalışma bulunmaktadır.<sup>6, 7, 124-127</sup>

Bu çalışmalarda genel olarak leptinin proliferasyonu doza ve zamana bağlı arttırdığı,<sup>124, 126, 128</sup> ancak hücre seçiciliğinin bulunduğu<sup>7</sup> ve hatta PK hücresinde proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmektedir. Hücrenin proliferasyon sonuçlarının farklı çıkmasının nedenlerini ise kullanılan hücre tipi, kullanılan leptin dozunun farklı olması, besi yeri farklılığı ve yöntem farklılığı olarak sıralayabiliriz. Bu farklılıklardan en önemlisi leptinin in vitro şartlar için kullanılması gereken konsantrasyonundaki farklılıktır. Yukarıda belirtilen yayınlarda 0,4 ng/ml’den 100 ng/ml’ye kadar birçok



dozda çalışma yapılmıştır. Bu durum sonuçların farklı çıkmasına neden olduğu anlaşılmaktadır. Normal sağlıklı insandaki leptin düzeyinin in vitro için karşılığının 10 ng/ml obezler için ise 100 ng/ml'ye kadar çıktığı bildirilmektedir.<sup>129</sup>

Alisha M. Mendonsa ve ark.'ları<sup>7</sup> leptinin sitotokik etkisini kemirgen (Panc02) ve insan MIA PaCA-2 ve Panc-I hücre serilerinde araştırmışlar. Leptinin 5, 50 ve 250 ng/ml oranında hücelere uyguladıklarında Panc02 ve MIA PaCA-2 hücrelerinde proliferasyon artarken Panc-I hücrelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirtilmiştir. Somasundar P ve ark.'ları<sup>6</sup> tarafından yapıla çalışmada 0.4 ng/ml ve 4 ng/ml oranında leptin uygulamasının 24 ve 48. Saatte MIA PaCa ve Panc-I hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Yingchao Fan ve ark.'ları<sup>127</sup> 100 ng/ml leptin uygulandığında AsPC-1 ve Panc-I hücrelerinin proliferasyonunun değişmediği anca invazyon ve migrasyon yeteneklerinin arttığı bildirilmiştir. James c. H. Hardwick ve ark.'ları<sup>124</sup> HT-29 kolon kanser hücrelerinde 5, 50, 500 ve 5000 ng/ml konsantrasyonlarda leptin uygulandığında konsantrasyon arttıkça proliferasyonun arttığını belirtmiştir. Neeraj K. Saxena ve ark.'ları<sup>128</sup> tarafından hepatoselüler karsinoma HepG2 ve Huh7 hücrelerine 25,50,100 ve250 ng/ml konsantrasyonda leptin uyguladıktan sonra yapılan bromodeoksiuridin proliferasyon testinde, zamana bağlı olarak proliferasyonun arttığı rapor edilmiştir. Anna Ptak ve ark.'ları<sup>126</sup>, tarafından Alamar Blue testi ile yapılan proliferasyon çalışmasında, ovar 3 hücrelerine 2, 20, 40 ve 100 ng/ml konsantrasyonda leptin uygulamasının hücrelerde proliferasyonu arttırdığı bildirilmiştir. Ines Borone ve ark.'ları<sup>125</sup>, meme kanser hücrelerinde 10, 100 ve 1000 ng konsantrasyonlarda leptin uygulamasının meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı belirtilmiştir.

Harbuzariu A ve ark.<sup>8</sup> ve Harbuzariu A and Gonzalez-Perez RR,<sup>130</sup> çalışmalarında, 1.2nM leptin PK hücre serilerinde proliferasyonun arttığını

bildirmişlerdir. Her iki çalışmada kullanılan leptin konsantrasyonu literature incelemesinde saptanan en küçük leptin konsantrasyonudur. Yazarlar bu çalışmalarda kullanılan 1.2 nM konsantrasyondaki leptinin fizyolojik şartlara uygun olarak belirtse de yukarıda yer alan çalışmalar ile literatürdeki diğer çalışmalar ile çelişmektedir.<sup>6, 7, 127, 129</sup>

Bu tez çalışmasında 0.01, 0.1, 0.2 ve 1µM konsantrasyonda leptin molekülü hücrelere verilerek sitotoksosite analizi yapılmıştır. AsPC-1 hücre serisinde 72.saate 0.01 µM konsantrasyonda kontrole göre %10'luk bir inhibisyon saptansa da doz arttıkça kontrole yakın bir yaşam yüzdesi elde edilmiştir. MIA PaCa-2 hücre serisinde ise 0.1 µM konsantrasyonda hücre kontrole göre %12 oranında artsa da doz arttıkça kontrol düzeyinde bir yaşam saptanmıştır. Panc-I hücre serisinde ise tüm dozlarda kontrole yakın bir yaşam yüzdesi saptanmıştır. MTT sonuçlarından sonra 0.1 µM'lık leptin konsantrasyonunun tezde gerçekleştirilecek diğer testler için sabit leptin konsantrasyonu olarak alınmasına karar verilmiştir. Çünkü 0.1 µM'lık doz literatüre göre ortalama 34ng/ml'lik obez sınırındaki insanlarda saptanan leptin düzeyine eşit olduğu belirtilmiştir<sup>7, 129, 131</sup>

Amacımız leptin varlığının olası kemoterapötik etkisini araştırma olduğundan leptin düzeyinin obez insan sınırında seçilmesinin daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

#### **5.4. SHLA Sitotoksitesi**

SHLA taşıdığı mutasyonlarla (D23L/L39A/D40A/F41A) normal leptin molekülünden 60 kat daha fazla afinite ile OB-R'ye bağlanmakta ve ilk üretilen antagonistlere (L39A/D40A/F41A) göre 14 kat daha fazla antagonist aktivite gösterdiği bildirilmiştir.<sup>12</sup> Bu nedenle tez çalışmasında SHLA seçilmiştir.

Tez çalışması kapsamında SHLA'nın 10, 100, 500 ve 1000 ng'lık konsantrasyonları hazırlanmış ve hücrelere sunulmuştur. AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre

serilerinde 1000 ng SHLA uygulamasında sırayla %12 ve %11 oranında bir proliferasyon artışı saptanmıştır. Diğer dozlarda ise herhangi bir proliferasyon artışı veya azalışı saptanmamıştır. Panc-I hücre serisinde ise 10, 100, 500 ve 1000 ng SHLA uygulamasında genel olarak %10 oranında bir proliferasyon inhibisyonu saptanmıştır. Ancak genel olarak SHLA her 3 PK hücre serisinde de sitotoksik bir doza ulaşamamıştır. SHLA'nın her bir doz için PK hücrelerindeki etkisi hücre tipine göre değişiklik göstermiştir.

E. Fiedor · E. L. Gregoraszcuk<sup>131</sup> tarafından granülosa hücrelerinde yapılan çalışmada leptin (40ng/ml) verilen graülosa hücrelerinde artan proliferasyonu SHLA'nın doza bağlı azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada SHLA'nın tek başına hücrelerin proliferasyonuna olan etkisi araştırılmamıştır. Bu nedenle tez sonuçlarımız ile karşılaştırma yapılamamıştır.

Elz'bieta Fiedor1 · Ewa Łucja Gregoraszcuk<sup>131</sup> tarafından, SHLA'nın epiteliyal ovaryum kanser hücre serilerinde (HOSEpic, CaOV-3 ve OVCAR-3) proliferatif etkisinin araştırıldığı çalışmada, 10, 100 ve 100 ng SHLA'nın sitotoksik etkisinin OVCAR-3 serisinde kontrole göre %20 oranında bir inhibisyonu olduğu diğer hücre serilerinde ise belirgin bir proliferasyon inhibisyonu saptanmadığı, SHLA'nın hücrel etkilerinin hücre tipine göre değişebileceği bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgularla uyumludur.

Yapılan literatür taramasında, SHLA'nın PK dahil diğer kanserler üzerindeki etkisine ilişkin herhangi bir veri ve yayın bulunamamıştır. Bu tez çalışması SHLA'nın PK hücre serileri üzerindeki sitotoksik, genotoksik etkisini araştıran ilk çalışmadır.

## **5.5. 5-FU, Leptin ve SHLA'nın 5-FU Direncinde Rol Alan Genlerin**

### **Ekspresyonuna Etkisi**

#### **5.5.1. DPD Gen Ekspresyonu**

5-FU'nun canlı siteme girdiğinde DPD tarafından DHFU'ya dönüştürülür. 5-FU'nun %80'ine kadar olan kısmı karaciğerde DPD tarafından yıkılır<sup>65, 87</sup>

DPD ekspresyonu ile 5-FU toksisitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı kanser çalışmalarında çelişkili sonuçların var olduğu belirtilmektedir.<sup>94</sup> DPD 5-FU'yu metabolize ettiğinden genel olarak yüksek DPD seviyesi 5-FU'nun metabolize olmasını hızlandıracak ve düşük DPD seviyesinin daha iyi bir yaşam süresinin oluşmasına katkı sağlayabileceği beklenir.

Nakayama ve ark.'nın,<sup>93</sup> 68 adet PK dokusunda immünohistokimya DPD ekspresyonu araştırdığı çalışmada, 5-FU karaciğer perfüzyon kemoterapisi alan hastalarda DPD ekspresyonu düşük olanlarda daha iyi yanıt alındığı ve kemoterapi alınmadan önce DPD ekspresyonunun belirlenmesinin önemli olacağı belirtmiştir. Miyake ve ark.<sup>105</sup> tarafından 28 PK olgusunda RT-PZR ile yapılan DPD ekspresyon çalışmasında, DPD ekspresyonu ile PK olgularının klinikopatolojik sonuçlarıyla ilişkisinin saptanmadığını ve DPD'nin tek başına prediktif bir anlamının bulunmadığını bildirmiştir. Fukui ve ark.,<sup>132</sup> tarafından farklı tiplerdeki 17.613 adet kanser dokusunda (gastrik, kolon, meme, akciğer...) ELISA ve RT-PZR ile yöntemleriyle yaptıkları DPD ekspresyon çalışmasında, DPD ekspresyonunun kanser tipine göre değiştiği yüksek DPD ekspresyonunun zayıf prognozla ilişkili olduğu bildirmiştir.

Shimoda ve ark.<sup>133</sup> tarafından 29 PK tanı hastanın dokusunda immünohistokimya ile yapılan DPD ekspresyon çalışmasında, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşük DPD ekspresyonuna sahip olanlardaki hastalısız yaşam oranının yüksek olanlara göre daha iyi olma eğiliminde olduğu belirtilmektedir. Krug ve ark.'ları<sup>94</sup> tarafından, 5-FU tedavisi alan 26 pankreatik nöroendokrin tümör tanısı almış hastanın tümör dokusunda immünohistokimya ile yaptıkları DPD ekspresyon araştırmasında, DPD ekspresyonunun 5-FU tedavisi alan hastalarda prediktif biyobelirteç olabileceğini bildirmiştir. Ancak bu

çalışmada DPD ekspresyon seviyesi yaşam süresi ile ilişkisi saptanmamıştır bu nedenle büyük sayıdaki olgular üzerinde çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Elander ve ark.'ları<sup>89</sup> tarafından 238 PK olgusunda, 5-FU tedavisinde DPD ekspresyonunun biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelinin immünohistokimya ile araştırıldığı çalışmada, tümör içi düşük DPD ekspresyonunun 5-FU direnci ve artan yaşam süresiyle ilişki olduğu, DPD ekspresyonu arttığında yaşam süresinin azaldığı bu nedenle DPD ekspresyonunun negatif biyobelirteç olabileceği belirtilmektedir. Yine bu çalışmada 5-FU ve gemsitabin tedavilerinde prediktif belirteç olarak DPD ve hENT1 ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesinin daha anlamlı olacağı vurgulanmaktadır.

Yukarıda özetlenen çalışmalar genelde DPD ekspresyon düşüklüğünün 5-FU yanıtını iyileştireceği yönündedir. DPD fonksiyonu nedeniyle de bu beklenti bilimsel olarak doğrudur. Özetlenen çalışmalarda DPD ekspresyonu dokularda araştırılmış ve 5-FU klinik direnci ilişkisi bakılmıştır. Bu tez çalışmasında ise PK hücre serilerinde 5-FU'nun DPD ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldığından sonuçların doğrudan karşılaştırılmamıştır.

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi ışığında, DPD ekspresyon düşüklüğü 5-FU uygulanan PK tedavisinde duyarlılığın atmasına neden olabilir. Bu tez çalışması sonucunda AsPC-1 hücre serilerinde 5-FU uygulaması kontrole göre ekspresyonda değişikliğe neden olmazken hem leptin hem de SHLA uygulamasında ekspresyon kontrole göre ortalama 6 kat düşmüştür. Bu durum 5-FU + leptin ve 5-FU + SHLA, leptin + SHLA ve 5-FU + leptin + SHLA kombinasyonunda daha belirgin biçimde saptanmıştır.

MIA PaCa hücre serisinde ise 5-FU uygulaması 2.3 kat DPD ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Bu artış leptin ve SHLA kombinasyonlarında azaltılmıştır. Ancak 5-FU + leptin + SHLA kombinasyonunda ise ekspresyon kontrol göre 10 kat artış

göstermiştir. Bu durum SHLA'nın leptin inhibisyonunda yalnızca reseptörü bloke etmediği farklı reseptör veya yolaklar üzerinde DPD'nin ekspresyonunda artışa neden olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Kurata ve ark.'ları<sup>106</sup> tarafından 15 adet PK hücre serileri üzerinde RT-PZR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, DPD gen ekspresyonu yüksek olan kanser hücre serilerinin 5-FU'ya daha dirençli olduğu belirtilmektedir. Tez çalışması kapsamında kullanılan ve en agresif PK hücre serilerinden biri olan,<sup>5</sup> tez çalışması kapsamında değerlendirilen hücre serilerinde IC50 değeri diğer iki hücre tipine göre (330.56 µM ve 12.50 µM) yüksek (450.98 µM) saptanan MIA PaCA-2 hücre serisinde de DPD gen ekspresyon değişikliği belirtildiği üzere diğer hücrelere göre farklılık göstermiştir. Bunun nedeni hücre tipinin sahip olduğu genetik ve epigenetik karakterlerden kaynaklanabilir.

Panc-I hücre serisinde ise 5-FU uygulaması sonrası artan DPD ekspresyonu leptin ve SHLA kombinasyonu ile azaltılabileceği gösterilmiştir.

Eldeki sonuçlara göre AsPC-1 ve Panc-I hücre serisinde 5-FU leptin ve SHLA kombinasyonu DPD ekspresyonunu azaltırken MIA PaCa hücre serisinde yalnızca 5 - FU + leptin + SHLA kombinasyonunda ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu farklılığın nedeni birbirinden farklı yapıdaki PK hücre serilerinin birbirinden farklı genetik ve epigenetik özelliklerinden kaynaklanabilir. Genel olarak PK'da leptin ve SHLA kullanımı ile dirence neden olduğu bildirilen DPD ekspresyonun azaltılması 5-FU duyarlılığını arttırabilir.

Ayrıca literatür taraması sonucunda leptin ve SHLA molekülünün DPD ekspresyonuna olası etkisi üzerine herhangi bir veri bulunamamıştır. Bu açıdan da leptin ve leptin antagonisti SHLA'nın ve bunların 5-FU ile ikili ve üçlü kombinasyonunun DPD ekspresyonu üzerindeki etkisi ilk kez araştırılmıştır.

### **5.5.2. hENT1 Gen Ekspresyonu**

hENT1 proteinin fonksiyonu gereği, hENT1'in 5-FU kemoterapötik dirence katkı sunma potansiyeline sahiptir bu nedenle de genin ekspresyonu ve fonksiyonel yapıya ulaşması önem arz etmektedir. Çünkü, 5-FU, TS inhibisyonu yoluyla hücre içerisinde nükleotit miktarını azaltır ve DNA sentezini bloke eder. Bu durumda hücre nükleozitleri ekstraselüler sıvıdan hENT1 yoluyla almak ister. hENT1 ekspresyonu yüksek olunca hücre içerisine nükleozitlerin girmesi sonucu 5-FU'ya olan duyarlılık azalır ve direnç gelişmiş olur. Ancak yapılan çalışmaların sonuçları arasında çelişkiler saptanmıştır.<sup>89,98,100-102</sup>

Bunun temel nedeni örneklerin doku veya hücre serisi olması, araştırma yöntemi (RT-PZR veya immünohistokimya gibi) ve kullanılan 5-FU dozundan kaynaklanabilir. Ayrıca çalışmalar hENT1 ekspresyonuna etki eden birden fazla faktörün var olabileceğini göstermektedir. Bunlar kanser hücrelerinin mikroçevresi, hipoksi, stromal yapı, farklılaşma faktörleri hENT1 ekspresyonunun değişmesine ve çalışmalar arasındaki çelişkili sonuçların saptanmasına neden olabilir. Ayrıca, çalışmalarda belirtilmese de epigenetik değişikliklerde hENT1 ekspresyonunun değişmesine neden olabilecek önemli aktörlerden biridir.

PK olgularına ait tümör dokularında hENT1 ekspresyonun araştırıldığı birçok çalışma vardır. Michalski ve ark.'ları<sup>99</sup> PK dokularında hENT1 ekspresyonun normal dokulara göre azaldığını belirtmektedir. Mohelnikova-Duchonova, B ve ark.'ları<sup>102</sup> tarafından 32 pankreatik duktal adenokarsinom hastasında RT-PZR ile yapılan hENT1 ekspresyon araştırmasında, pankreatik duktal adenokarsinoma dokularında hENT1 ekspresyonunun normal dokularda göre azaldığı bu durumda diğer çalışmalara göre beklentinin dışında bir durum olduğu vurgulanmaktadır.

Farrell ve ark.'larının<sup>100</sup> 107 PK hastada, immünohistokimya metodu ile hENT1 ekspresyonunu araştırdığı çalışmada, 5-FU direnci ile hENT1 ekspresyonu arasından

tüm yaşam süresi ve hastaliksız yaşam süresi arasında her hangi bir ilişki saptanmadığı belirtilmektedir. Ayrıca Neoptolemos ve ark.'ları<sup>101</sup> da 5-FU alan PK hastalarında hENT1 ekspresyon seviyesinin yaşam süresi ile anlamlı bir ilişkinin saptanmadığını bildirmektedir. Elander ve ark.'ları<sup>89</sup> tarafından 238 PK olgusunda, 5-FU tedavisinde hENT1 ekspresyonunun immünohistokimya ile araştırıldığı çalışmada, hENT1 ekspresyonunun 5-FU yerine gemsitabin tedavisi ile ilişki olduğu ve gemsitabin tedavisi alanlarda artmış hENT1 ekspresyonunun artmış yaşam süresi ile ilişki olduğu ancak hENT1 ekspresyonunun tek başına yaşam süresine katkısının bulunmadığını belirtilmiştir.

Yukarıda özetlenen çalışmalarda hENT1 ekspresyonu PK dokularında immünohistokimya ile incelendiği rapor edilmiştir. PK dokusunun heterojenitesi nedeniyle sonuçların farklı çıkması bilimsel açıdan beklenen bir durumdur.

Tsujie ve ark.'ları<sup>98</sup> tarafından yapılan çalışmada, PK hücre serilerinde yüksek hENT1 ekspresyonunun 5-FU direncine neden olduğu ve 5-FU direncinin belirlenmesinde hENT1 ekspresyonunun kullanılabileceği belirtilmektedir. Ayrıca Tsujie ve ark.'ları<sup>98</sup> hENT1 inhibitörü kullanıldığında PK hücrelerinde 5-FU duyarlılığın (IC50 değerinin) %50 oranında düştüğünü belirtmektedir. Benzer bir sonuç Gao ve ark.'ları<sup>103</sup> tarafından yapılan çalışmada da saptanmıştır. Gao ve ark.'ları<sup>103</sup> tarafından yapılan çalışmada, PK hücre serilerinde hENT1 inhibisyonunun 5-FU toksisitesini arttırdığı bildirilmektedir.

MIAPaCa-2 pankreatik kanser hücrelerinin subkutan olarak enjekte edildiği ksenograft modelinde araştırmacılar bir 5-FU türeviden olan S-1 ajanını 5 gün boyunca 10 mg/kg/gün ve 50 mg/kg/gün olarak farelere verdiklerinde hENT1 mRNA ekspresyonunu, S-1 uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artmış olarak bulmuşlardır.<sup>134</sup>



PK kanseri dışındaki kanser olgularında da az sayıda 5-FU hENT1 ilişkisini inceleyen çalışma bulunmaktadır. Phua ve ark.'ları<sup>95</sup> tarafından, kolon kanseri dokularında ve kolon kanseri hücre serisinde (Caco-2) yapılan çalışmada, hENT1 ekspresyonunun kolon kanseri dokularında farklı düzeyde saptandığı ve yüksek hENT1 ekspresyonunun zayıf prognozla ilişki olduğu ve Caco-2 hücrelerin hENT1 inhibisyonunun 5-FU duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir.

Kubota<sup>135</sup> tarafından yapılan çalışmada, kolorektal kanserli hastalarda RT-PZR ile saptanan hENT1 ekspresyon artışının 5-FU direnciyle ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Yukarıda özetlenen çalışmalarda genellikle PK dokusu kullanılması ve immnositokimya ile ekspresyon analizi yapıldığından tez sonuçlarımızla uyumluluk karşılaştırılması yapılamamıştır.

Hücre serisi kullanılan çalışmalarda,<sup>98, 103</sup> hENT1 ekspresyonu ile 5-FU duyarlılığı ilişkisi araştırılmış. Bu tez çalışmasında ise 5-FU uygulanmasının hENT1 ekspresyonunu nasıl değiştirdiği araştırılmış ve kullanılan leptin ve SHLA ile bu direncinin ekspresyonunun nasıl değiştiği incelenmiştir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında uygulanan yaklaşım belirtilen çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Bu tez çalışması sonuçlarına göre, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-1 pankreatik kanser hücre hatlarında 5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli ve kombinasyonlarının hENT1 ekspresyonu üzerine etkileri incelendiğinde; AsPC-1, MIA PaCa-2 hücre hatlarında 5-FU'nun tekli uygulaması sonucu hENT1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte her üç ajanın kombine uygulaması sonucu AsPC-1 hücrelerinde hENT1 ekspresyonu kontrol grubuna göre kısmi artış gösterirken, MIA PaCa-2 hücre hattında kontrol grubuna göre ekspresyon azalışı saptanmıştır. Panc-1 hücre hattında ise kontrol grubuna göre 5-FU tekli uygulaması sonucu hENT1 ekspresyonu ciddi şekilde artmış, kombine uygulama sonucu ise de tekli etkiden daha

fazla bir (yaklaşık 2.3 kat) ekspresyon artışı gözlenmiştir. Saptanan bu ekspresyon farklılığı PK hücreleri arasında bile genetik ve epigenetik heteroenitenin olduğunu ve bu durumun ilaç ve benzeri moleküllere olan yanıtı değiştirebileceğini göstermektedir. Michalksi CW ve ark.'ları<sup>99</sup> tarafından yapılan çalışmada hENT1 ekspresyonun PK hücre serilerinde farklı düzeyde olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında da hENT1 ekspresyonu tüm hücre serilerinde birbirlerinden farklı düzeyde saptanmıştır. Bu tez çalışmasının sonuçları Michalksi CW ve ark.'nın<sup>99</sup> yaptığı çalışmayla uyumludur. Çünkü kullanılan hücre serilerinin genetik yapısı ve orjinleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle ekspresyon farklılığı beklenen bir durumdur.

Bu tez çalışması 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonunun hENT1 ekspresyonu üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

### **5.5.3. TP Gen Ekspresyonu**

TP ekspresyonunun, kanser hücrelerinin anjiyogenez ve metastazının tetiklenmesinde ve anti-apoptotik süreçlerini tetiklediği belirtilmektedir. Çeşitli kanserlerde taksan, kapesitabin ve siklofosfamid gibi kemoterapi ajanlarının kullanımında TP ekspresyonu arttığı ve TP artışının zayıf prognozla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle TP ekspresyonunun azaltılması veya TP inhibitörlerinin kullanımı ile TP protein inhibisyonu yaparak kanser tedavisinin etkinliğinin artırılabilmesine yönelik terapötik yaklaşımlar önerilmesine rağmen bu konuda oldukça çelişkili sonuçların var olduğu da vurgulanmaktadır.<sup>104</sup> Çünkü TP inhibisyonunun tersine TP aktivitesinin artması 5-FU ve benzeri ajanların kullanımında daha fazla FDUR'e oluşmasını ve FdUMP oluşmasını sağlayacak ve böylece 5-FU ve benzeri ajanların etkinliğinin artması sağlanabilecektir. Bu nedenle TP aktivitesinin önemi kullanılacak kemoterapötik yaklaşımın içeriğine bağlı olarak değişecektir. TP

ekspresyonu ve 5-FU duyarlılığını araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.<sup>105, 106</sup>

107

Minari ve ark.'ları<sup>107</sup> tarafından benign, primer ve metastatik dokulardan oluşan 148 adet pankreas invaziv duktal karsinoma hastasından elde edilen dokularda immünositokimya yöntemi yapılan TP ekspresyon çalışmasında, TP ekspresyonunun primer ve metastatik dokular arasında farklılık gösterdiği bu durumun PK olgularında farklı kemoterapötik yanıtın oluşmasına katkı sunabileceği belirtilmiştir.

Miyake ve ark.'ları<sup>105</sup> tarafından 28 PK olgusunda RT-PZR ve immünositokimya ile yapılan TP ekspresyon çalışmasında, TP ekspresyonunun tek başına prognostik bir değerinin olmadığı ve yine ekspresyonun PK olgularının klinikopatolojik sonuçlarıyla ilişkisinin saptanmadığını bildirilmiştir. Ancak yine aynı çalışmada TP/DPD oranının klinik açıdan anlamlı olduğu ve TP/DPD oranı arttıa prognozun kötü olduğu ve ölümün arttığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışma sonucu yalnızca 28 PK olgusunda yapıldığından sonuçların genel PK patolojisini ve tedavi yanıtını yansıtmaya potansiyeli düşüktür.

Kurata ve ark.'ları<sup>106</sup> tarafından 15 PK hücre serileri üzerinde yapılan çalışmada, TP gen ekspresyonu yüksek olan kanser hücre serilerinin 5-FU'ya karşı gelişen dirençte rol alabileceği ancak verinin doğrulanması gerektiği belirtilmektedir.

Bu tez çalışması sonuçlarına göre, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-1 pankreatik kanser hücre hatlarında 5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli ve kombinasyonlarının TP ekspresyonu üzerine etkileri incelendiğinde, AsPC-1, hücre MIA PaC-2 ve Panc-I hücre serilerinin tüm gruplarında ekspresyon miktarının kontrole göre düşük saptanmıştır. Sitotoksitesitesi farklı olan bu hücre serilerinde TP ekspresyonun kendi kontrol gruplarına göre düşük bulunması değerlendirilen hücre serilerinde TP ekspresyonun 5-FU yanıtında etkisinin zayıf olabileceğini düşündürmektedir. Ancak tez çalışmasının

amacı ilgili moleküllerin bu genlerin ekspresyonuna olan etkisi olduğundan bu kapsamda değerlendirildiğinde, tüm hücregruplarında leptin ve SHLA uygulamalarında TP ekspresyonunda bir artış saptanmamıştıTP artışının 5-FU yanıtını güçlendirdiği düşünüldüğünde leptin ve SHLA uygulamasının TP ekspresyonu üzerinden herhangi bir katkısının olmayacağı saptanmıştır. Literatür araştırmasına göre, bu tez çalışması 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonunun TP ekspresyonu üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

#### **5.5.4. TS Gen Ekspresyonu**

TS, 5-FU'nun etki mekanizmasında en önemli rolü oynayan proteindir. Çünkü 5-FU etki mekanizması, DNA ve RNA hasarı etkisi TS üzerinden düzenlenmektedir.<sup>87, 88.</sup><sup>108</sup> TS yolağı incelendiğinde, TS geni ve proteini aşırı eksprese olduğunda 5-FU metabolitleri TS inhibisyonunu gerçekleştirmede yeterli olamayabilir. Bunun sonucu hücre 5-FU'ya yeterli düzeyde yanıt veremeyecektir. Bu nedenle TS inhibisyonu 5-F yanıtının geliştirilmesinde önemli bir terapötik yaklaşımdır.

Formentini ve ark.'ları<sup>136</sup> tarafından 131 PK dokusunda immünohistokimya ile yapılan TS ekspresyon çalışmasında, dokuların %56'sında düşük TS ekspresyonu saptandığını ve düşük TS ekspresyonuna sahip kişilerin kemoterapiye daha duyarlı olduğunu ancak sonuçların daha fazla sayıdaki PK olgularında ve daha homojen gruplarda yapılarak doğrulanması gerektiğini bildirilmiştir. Ancak, Ceppi ve ark.'ları<sup>137</sup> ise 58 nöroendokrin tümördeki TS ekspresyon çalışmasında genel olarak nöroendokrin tümörlerde TS ekspresyonunun düşüklüğünün zayıf farklılaşma paterni ile ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Fukui ve ark.'ları<sup>132</sup> tarafından farklı tiplerdeki 17.613 adet kanser dokusunda (gastrik, kolon, meme, akciğer...) ELISA ve RT-PZR ile yöntemleriyle yaptıkların TS

ekspresyon çalışmasında, TS ekspresyonunun kanser tipine göre değiştiğini ve protein ekspresyonu bakılan 62 PK dokusunda düşük düzeyde TS ekspresyonu saptandığını bildirmiştir. Bu çalışmada PK'da TS ile 5-FU arasında herhangi bir ilişki araştırılmamıştır.

Shimoda ve ark.'ları<sup>91</sup> tarafından 29 PK tanı hastanın dokusunda immünohistokimya ile yapılan TS ekspresyon çalışmasında, düşük TS ekspresyonunun daha uzun hastalısız yaşam süresi ile ilişkili olduğunu ve kanser dokularında TS ekspresyonunun yüksek olduğunu belirtilmektedir.

Van der Zee ve ark.'ları<sup>138</sup> tarafından, 212 PK dokusunda immünohistokimya yöntemi ile yapılan TS gen ekspresyonu çalışmasında, düşük TS ekspresyonu saptanan hastalardaki yaşam süresinin yüksek TS ekspresyonu saptananlara göre daha fazla olduğu ve TS'nin zayıf prognoz için bağımsız bir prediktif faktör olabileceği bildirilmektedir.

Yukarıda özetlenen çalışmalarda genel olarak TS ekspresyonunun azalmasının 5-FU yanıtını attıracağı<sup>136, 137</sup> ve yaşam süresini arttıracığı<sup>133</sup> yönündedir. Bu sonuçlar bilimsel açıdan TS'nin 5-FU fonksiyonuyla uyumludur. Ancak Krug ve ark.'ları<sup>94</sup> tarafından yapılan çalışma yukarıda verilen sonuçlarla uyumsuzdur. Krug ve ark.'ları<sup>94</sup> 5-FU tedavisi alan 26 pankreatik nöroendokrin tümör tanısı almış hastanın tümör dokusunda immünohistokimya ile yapılan TS ekspresyon araştırmasında, TS ekspresyonunun tümörün grade ve proliferasyonu ile ilişkili olmadığı, TS ekspresyonunun varlığında hastaların 5-FU'ya daha iyi yanıt verdiği bu durumun pankreatik nöroendokrin tümörlerdeki yüksek DNA sentezinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, TS'nin pankreatik nöroendokrin tümörde prediktif biyobelirteç olabileceğini ancak büyük sayıdaki olgular üzerinde çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır. Krug ve ark.'ları<sup>94</sup> çalışması yüksek doz 5-FU uygulanan

ve hızlı bölünen PK tümör hücreleri için uyumlu bir sonuç olabilir. Hızlı bölünen ve daha fazla TS eksprese eden hücrelerde yüksek doz 5-FU uygulanması tümörü daha hızlı bir biçimde küçültebilir. Çünkü, hücre sentez fazında ne kadar çok girerse 5-FU o kadar daha etkili olacaktır.

Yukarıda özetlenen çalışmalar dokulardaki TS ekspresyonunun klinik önemi ile ilgilidir. Bu tez çalışmasında ise PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA'nın TS ekspresyonu değişimi incelenmiştir. Bu nedenle doku verileri ile ilgili karşılaştırma yapılamamaktadır.

Kurata ve ark.'ları<sup>106</sup> tarafından 15 PK hücre serileri üzerinde yapılan çalışmada, TS gen ekspresyonu yüksek olan kanser hücre serilerinin 5-FU'ya daha dirençli olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bu çalışmada, PK hücre serilerinin 5-FU için IC50 değerlerinin farklı olduğu bildirilmektedir.<sup>106</sup> Bu farklılık bizim tez çalışmamızda da saptanmıştır. PK kanser hücre serilerinin IC50 değerlerindeki bu farklılık PK'nin genetik heterojenitesinin ne kadar yüksek olduğunu ve her PK olgusunun aynı tedavi biçimiyle tedavi edilmeye çalışılmasının bilimsel olarak mümkün olmadığını bir kanıt niteliğindedir.

Bu tez çalışması sonuçlarına göre, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-1 pankreatik kanser hücre hatlarında 5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli ve kombinasyonlarının TS ekspresyonu üzerine etkileri incelendiğinde, AsPC-1 hücresinde kontrole göre leptin ve SHLA TS ekspresyonunu sırayla 9 ve 3.5 kat artırırken 5-FU azaltmıştır. İkili kombinasyonlarda ise leptin ve SHLA'daki artışları 5-FU azaltmıştır. 5-FU, leptin ve SHLA kombinasyonunda ise ortalama 6.5 kat daha fazla TS ekspresyonu saptanmıştır. AsPC hücresinde leptin ve SHLA TS ekspresyonunu kontrol ve 5-FU grubuna göre arttırmıştır. Mia PaCA-2 hücresinde ise 5-FU ve leptin tek başına TS ekspresyonunu kontrol grubuna göre azaltırken SHLA 1.5 kat arttırmıştır. 5-FU ve leptinin olduğu ikili

kombinasyonlarda ve üçlü kombinasyonda TS ekspresyonu azalmıştır. Bu durum MIA PaCa-2 gibi agresif<sup>5</sup> tümör hücreleri için bir avantaj olabilir. Panc-I hücre serisinde ise 5-FU TS ekspresyonunu kontrol grubuna göre yaklaşık 12 kat artırırken leptin ve SHLA'nın tek başına uygulanmasında TS ekspresyonun azaldığı, leptin ve SHLA'nın 5-FU ile olan ikili kombinasyonlarında 5-FU'nun TS ekspresyonunu arttırıcı etkisinin azaltıldığı saptanmıştır. Ancak üçlü kombinasyonlarda ise 5-FU'nun TS ekspresyonunu 19 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum SHLA'nın leptin inhibisyonu yaparken 5-FU'nun TS ekspresyonunu tetikleyebileceği yolları aktif hale getirebileceğine işaret etmektedir. Dolayısıyla SHLA'nın yalnızca leptin reseptörüyle değil başka molekül ve yapılarla da etkileşime geçerek hücrenin transkripsiyon paternini değiştirebilme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır.

PK hücre serilerinin TS gen ekspresyonu bir bütün olarak incelendiğinde, PK hücre serilerinin genetik ve epigenetik yapılarının farklı olduğu bu nedenle farklı yanıtlar alınabileceği ve PK'da tek bir yolak üzerinden geniş etkili tedavi yaklaşımları geliştirmenin zor olduğu anlaşılmaktadır.

Bu tez çalışması 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonunun TS ekspresyonu üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

#### **5.5.5. MDR1 ve MRP5 Gen Ekspresyonu**

MDR1 ve MRP5 transport proteinleri, organizmada moleküllerin vücutta dağılımının düzenlenmesinde<sup>109</sup> ve ilaçların ve onların metabolitlerinin hücre içerisinde alınımında hücre membranında bulunan pompa proteinlerindedir. MDR1 ve MRP5 transport proteinleri, fonksiyonlarını, sitotoksik ilacın veya metabolitlerin hücre içine alınmasını engelleme veya dışarı doğru atılmasını sağlama şeklinde gerçekleştirdiğinden kemoterapötik dirençte bu genlerin hücre içi ekspresyon artışının etkili olabileceği beklenir.

Lu ve ark.'ları<sup>139</sup> tarafından yapılan çalışmada 67 PK dokusu 15 adet sağlıklı insana ait pankreatik doku üzerinde northern blot analizi ile yapılan çalışmada, sonucu MDR1 ekspresyonunun hasta grubunda 1.4 kat daha yüksek olduğu ancak bunun sağ kalımı etkilemediği bildirilmiştir.

Guo ve ark.'larının<sup>110</sup> SW1990, PCT-2, PCT-3, PCT-4, ASPC, Cap-1, MIAPaCa-2 ve Panc-1 olmak üzere 8 PK hücre serileri üzerinde RT-PZR ile yaptıkları çalışmada, SW1990 hücre serisinde, MDR1 ekspresyonunu yüksek oranda saptandığı PCT-2 hücre serisinde ise herhangi bir MDR1 ekspresyonu saptanmadığı ve geriye kalan 6 adet PK hücre serilerinde de MDR1 gen ekspresyonunu düşük seviyede saptandığı belirtilmektedir. MDR1 aşırı eksprese SW1990 hücre hattında bu ekspresyonun 5-FU direnciyle ilişkili olmadığı bildirilmiştir.

Hagmann ve ark.'larının<sup>111</sup> izole ettikleri normal insan pankreatik kanal epitel hücreleri ve PK hücre serileri üzerinde RT-PZR ile yaptıkları çalışmada, normal pankreatik kanal hücrelerinde MRP3, MRP4 ve MRP5 mRNA ekspresyonlarının arttığı, MRP1 geninin ise düşük oranda eksprese olduğu MRP2, MRP6-9 ekspresyonlarını ise bu hücrede saptayamadıklarını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, 5-FU'ya dirençli hale getirilmiş Capan-1 PK hücre serisinde MRP1-5'in 2 kat daha fazla eksprese olduğu ve protein düzeyinde yine bu dirençli hücre serisinde MRP3, MRP4 ve MRP5 protein düzeylerinin arttığı belirtilmiştir. Ayrıca, Capan-1 hücrelerinde MRP-5'i RNA interferans aracılı susturduklarında, Capan-1 hücrelerinin 5-florourasile daha duyarlı hale geldiğini ve PK'da 5-FU kemoterapötik direncinin MRP5 ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir<sup>111</sup> MRP, 5 siklik nükleotitlerin hücre dışarısına çıkarılmasından sorumlu olduğundan ekspresyon artışının 5-FU direnciyle ilişkisi olması beklenmektedir.

Nambaru ve ark.'ları<sup>112</sup> tarafından PK hücrelerinde yapılan çalışmada, MRP5 mRNA ekspresyonu ve 5-FU'ya duyarlılık arasında anlamlı bir korelasyonun olduğu,



MRP5'in gen ekspresyonunun susturulması ile birlikte pankreatik kanser hücrelerinin 5-FU'ya belirgin biçimde tekrar duyarlı hale geldikleri ve bu nedenle MRP5 eksprese eden PK hücrelerinde bu genin ekspresyonunun düzenlenmesi 5-FU'ya dirençte değişiklik yaptığı rapor edilmiştir.

Li ve ark.'larının<sup>113</sup> Panc-1 ve MIA PaCa-2 PK hücre serilerinde, MRP5 inhibitörü olarak kullandıkları kurkuminin doza-bağılı olarak bu hücrelerin 5-FU'ya olan duyarlılığını arttırdığını belirlemişlerdir.

Bu tez çalışması sonuçlarına göre, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-1 pankreatik kanser hücre hatlarında 5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli ve kombinasyonlarının MDR1 ekspresyonu üzerine etkileri incelendiğinde, AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde leptin ve SHLA'nın tekli ve kombine uygulamalarda MDR1 ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Panc-I hücre serisinde ise leptin ve SHLA'nın tekli kullanımlarında MDR1 ekspresyonunu azalttığı ancak ikili ve üçlü kombinasyonlarda ise MDR1 gen ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. MRP5 ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde, MRP5 için, PK hücrelerinde MDR1 ile benzer bir ekspresyon profili saptanmıştır. Leptin ve SHLA AsPC-1 ve MIA PaCa-2 hücre serilerinde tekli ve kombinasyon uygulamasında MRP5 ekspresyonu düşürdüğü tespit edilmiştir. Panc-I hücre serisinde de leptin ve SHLA tekli kullanımda MRP5 ekspresyonunu düşürürken, 5-FU ile kombine kullanımlarda MRP5 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Bu sonuç, MDR1 ve MRP5 transport genlerinin yine hücre spesifik ekspresyon profiline sahip olduğu, leptin ve SHLA'nın hücre tipine göre MDR1 ve MRP5 ekspresyonu açısından inhibitör etkisinin olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak ekspresyon değişim oranları diikkate alındığında MDR1 ve MRP5'in 5-FU yanıtını etkileyebilecek potansiyelinin eksik olduğu sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışması 5-

FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonunun MDR1 ve MRP5 genlerinin ekspresyonu üzerindeki değişimini inceleyen ilk çalışmadır.

Bu tez çalışmasında, 5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli ve kombine uygulamalarının 5-FU direnç yolağında yer alan aday genlerin ekspresyonları üzerine olan değişimlerinin araştırıldığı ekspresyon aşaması sonuçları, genel olarak değerlendirildiğinde, a) leptin ve SHLA'nın direnç genlerinin ekspresyonlarını değiştirebileceği b) verilerin yeni çalışmalar ile doğrulandıktan sonra leptin ve SHLA'nın tekli ve kombinasyonlarının 5-FU yanıtında kullanılabileceği b) fenotipik ve genotipik heterojenite nedeniyle çalışılacak örneklerin yalnız doku veya yalnız hücre serilerinden oluşmaması gerekliliği, c) verilerin anlamlılığı ve bütünlüğü için yeni örneklem tiplerinden organoid modellerin geliştirilmesi ve bunun kişiye özgü yapılması gerekliliği d) kemoterapi ajanına özgü kemoterapötik direncin tayininde daha fazla sayıda ve farklı genetik ve epigenetik yapıdaki örnekler üzerinde genom ebadında çalışmalar ile genomiks, epigenomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks çalışmalarının bir bütün halinde yapılması ve bunlardan alınan verilerle kemoterapötik direnci tayin edebilen yapay zeka tabanlı algoritma geliştirilmesi gerekliliği sonucuna ulaşılmıştır.

#### **5.5.6. 5-FU, Leptin ve SHLA'nın Kaspaz 3, 8 ve 9 Genlerinin**

##### **Ekspresyonlarına Etkisi**

Çalışmamızda, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-1 hücre serilerinde, 5-FU, leptin ve SHLA ajanlarının tekli, ikili ve üçlü kombine uygulamalarının, apoptotik kaspaz 3, 8 ve 9 genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisi RT-PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

AsPC-1 hücre serisinde 5-FU uygulamasında kontrol grubuna göre 2.2 kat artış gösteren kaspaz 3 gen ekspresyonu 5-FU + leptin kombinasyonunda 4.5 kat, SHLA kombinasyonunda ise 5.2 kat artmıştır. AsPC-1 hücresinde leptin + SHLA

kombinasyonu da kontrole göre 3.7, SHLA tekli uygulamasına göre de 5.1 kat arttırmıştır. AsPC-1 hücre serisinde, apoptozun intrinsik yolağı yolağın belirleyicisi kaspaz 9 ve reseptör aracılı yolağın belirleyicisi kaspaz 8 gen ekspresyonlarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

MIA PaCa-2 ve Panc-I hücre serilerinde de leptinin ve SHLA'nın 5-FU ile kombine uygulamalarında, 5-FU tekli uygulamasına göre apoptozu tetiklediğı saptanmıştır. Her iki hücre serisinde de üçlü kombinasyon uygulamasının diğ er gruplara göre apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir.

RT-PZR sonuçlarına göre, leptin ve SHLA'nın PK hücrelerinde 5-FU ile birlikte kullanıldığında apoptozu hem intrinsik hem de reseptör aracılı yola üzerinden tetikleyebildiğı, leptinin ve SHLA'nın adjuvan molekül olarak 5-FU ile birlikte PK tedavisinde kullanılabileğı gösterilmiştir. Bu tez çalışması, SHLA'nın tekli uygulamasıyla 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonlarının, PK hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini gösteren ilk çalışmadır.

#### **5.5.7. 5-FU, Leptin ve SHLA'nın DNA Hasarına Etkisi**

Çalışmamızda, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-1 hücre serilerinde, 5-FU, leptin ve SHLA ajanlarının tekli, ikili ve üçlü kombine uygulamalarının DNA hasarına olan etkisi COMET yöntemi ile araştırılmıştır. Literatürdeki bilgiler göz önüne alındığında, 5-FU'nun PK üzerinde DNA hasarına olan etkisi ile COMET yöntemine dayalı ilgili çalışma tespit edilmemiştir. Bununla birlikte diğ er kanser türleri üzerine birtakım çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genel olarak zamana ve doza bağı olarak DNA hasarının arttığı bildirilmektedir.

Kolorektal kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda 5-FU'nun DNA hasarını arttırdığı<sup>140-144</sup> doza ve zamana bağı olarak 5-FU'nun DNA hasarını arttırdığı belirtilmektedir. Hepatoselüler kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda da,<sup>145, 146</sup>

5-FU'nun DNA hasarını farklı düzeylerde olsa da arttırdığı bildirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında da 5-FU uygulanan gruplarda DNA hasarı kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu veri yukarıda özetlenen kolorektal ve hepatoselüler kanser de saptanan DNA hasarı artışı ile uyumludur. Çünkü, sitotoksik bir ajan olan 5-FU'nun DNA hasarını arttırması beklenir. Ancak tez çalışmasında, AsPC-1, MIA PaCA ve Panc-I hücre serilerinin 5-FU gruplarında elde edilen DNA hasarı artışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (p değerleri sırayla 0.461, p=0.913 ve p=0.090). Bu durumun nedeni 5-FU ile inkübasyon süresi ve 5-FU dozu etkili olabileceği gibi PK hücre serilerinin 5-FU karşı daha genotoksisite açısından dirençli olduğunu gösterebilir.

Tez çalışmasında kullanılan üç hücre serisinde de en yüksek DNA hasar yüzdeleri, 5-FU, leptin ve SHLA üçlü kombinasyon uygulanan gruplarda gözlenmiştir. Çalışma grupları içerisinde anlamlı gruplar tek tek incelendiğinde leptin ve SHLA varlığının DNA hasarını arttırdığı saptanmıştır. 5-FU varlığı tek ve ikili ve üçlü kombinasyonlarda DNA hasarını arttırdığı, bu kombinasyonlarda özellikle AsPC-1 hücresinde leptin varlığının, MIA PaCa-2 hücresinde ise hem leptin hem de SHLA varlığının, Panc-I hücresinde ise hem 5-FU, hem leptin hem de SHLA varlığının DNA hasarını arttırdığı saptanmıştır. Bu nedenle özellikle Panc-I hücresinde üçlü kombinasyon varlığında DNA hasarı daha artmış ancak diğer ikili kombinasyonlarda da artmış DNA hasarı olduğu için sonuç anlamlı çıkmamıştır. Çünkü her bir molekülün DNA hasarı arttırıcı etkisi vardır.

Elde edilen sonuçlar, 5-FU, leptin ve SHLA'nın her birinin birbirlerinden bağımsız biçimde kombinasyon durumunda DNA hasarını arttırıcı etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, leptinin beklenen leptin reseptörleri dışında başka reseptör ve/veya moleküllere bağlanarak bilinen yolların dışındaki yolları kullanabileceği ve DNA hasarını arttırabileceğini fikrini doğrulamıştır. SHLA da leptinin bağlanacağı

reseptör dışındaki resetörlere veya moleküllere bağlanarak DNA hasarını arttırıcı etkiye sahip olabileceği ancak bunu 5-FU ve leptin varlığında yaptığı anlaşılmaktadır. Bu tez çalışması leptin ve SHLA'nın bu etkileri üzerinde daha detaylı araştırmalar yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışması, PK hücrelerinin 5-FU'nun genotoksik etkisine daha dirençli olabileceğini göstermesi yanında bu direncin leptin ve/veya SHLA uygulanarak artırılabilceğini gösteren ilk ve tek çalışmadır.

#### **5.5.8. 5-FU, Leptin ve SHLA'nın Hücre Döngüsüne Etkisi**

5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli, ikili ve üçlü olarak kombine uygulamalarının hücre döngüsü üzerine olan etkileri akım sitometri yöntemi ile PI boyamasına bağlı olarak incelenmiştir.

PK'da, 5-FU'nun hücre döngüsü üzerine olan etkisi ile ilgili sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Mirjolet ve ark.'ları<sup>147</sup> tarafından yapılan çalışmada, PANC3, PK hücre serisinde PI boyamasına bağlı olarak akım sitometri yöntemi ile yapılan hücre döngüsü analizinde, 5-FU uygulanma öncesi ve sonrasında G0/G1, G1/S ve G2/M fraksiyonlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, bromodeoksiuridin [bromodeoxyuridine (BrdU)] boyaması yoluyla da akım sitometri deneyi yaptıklarında, 5-FU uygulanan grupta kontrol gruba göre G1/S fazında 3.5 katlık bir artış saptandığı bildirilmiştir.<sup>147</sup>

Urick ve ark.'ları<sup>148</sup> tarafından yapılan çalışmada, MIA PaCa-2 PK hücre serisinde, 5-FU uygulanan grup ile kontrol grubu arasında G2 ve M fazında bulunan hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir.<sup>148</sup> BxPC-3 PK hücre serisinde ise, 5-FU'nun 24 saatlik uygulanması sonucu artan dozla birlikte S-fazında bulunan hücrelerde artış meydana geldiği belirtilmektedir.<sup>149</sup> 5-FU sitotoksik ajanı bir antimetabolittir ve en iyi etkiyi S fazında göstermektedir.

Genel olarak 5-FU'nun hücreleri S fazına sürüklemeye çalışıldığı bilinmektedir. Bu nedenle Huang ve ark.'nın<sup>149</sup> sonucu 5-FU etki mekanizmasıyla uyumludur. Mirjolet ve ark.'larının<sup>147</sup> çalışması ile Urick ve ark.'larının<sup>148</sup> çalışması arasındaki etki farkının temel nedeni 5-FU'unun uygulama dozu ve inkübasyon zamanı olabilir.

Leptinin hücre döngüsü üzerine yapılan çalışmalarda genel olarak leptinin S fazında birikime neden olduğu belirtilmektedir.<sup>8, 128, 150, 151</sup>

Harbuzariu ve ark.'ları<sup>8</sup> tarafından yapılan çalışmada AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Panc-I PK hücre serilerinde leptinin S fazında hücre birikimine neden olduğu bildirilmektedir.

Chen ve ark.'ları<sup>151</sup> tarafından yapılan çalışmada da ZR-75-1 insan meme kanseri hücre serisinde, 100 ng/ml'lik leptinin 48 saatlik uygulanması sonucu, G0/G1 fazındaki hücre sayısının azaldığı, bununla birlikte S ve G2/M fazındaki hücre sayısının arttığı belirtilmiştir. Saxena ve ark.'ları<sup>152</sup> tarafından yapılan çalışmada 100 ve 200 ng/ml'lik leptinin meme kanseri hücrelerinde G0/G1 fazındaki hücre sayısını azalttığı ve S-fazındaki hücre sayısını arttırdığı ve aynı bulgunun HepG2 ve Huh7 hepatoselüler karsinomda da benzer şekilde 24 saatlik leptin uygulaması sonucu S-fazındaki hücre sayısının arttığı saptanmıştır.<sup>128</sup>

Catalano ve ark.'ları<sup>150</sup> tarafından yapılan çalışmada Ishikawa insan endometriyal kanser hücrelerinde, leptinin 24 saat boyunca uygulanan 100 ng/ml ve 1000 ng/ml'lik dozlarının G0/G1 fazındaki hücre sayısını azalttığı, S-fazındaki hücre sayısını anlamlı şekilde arttırdığı rapor edilmektedir. İnsan gastrik kanseri MGC-803 hücre hattında, rekombinant Leptinin (rhLep) 24 saatlik saatlik uygulanmasının, doza-bağımlı olarak G0/G1 hücre popülasyonu arttırdığı belirlenmiştir.<sup>153</sup>

OVKAR-3 insan ovaryum epitelyal karsinoma hücrelerinde, 40 ng/ml leptin dozunun 48 saatlik uygulamasının da S ve G2 fazındaki hücre sayısını anlamlı şekilde arttırdığı akım sitometri deneyi ile analiz edilmiştir. <sup>126</sup>

SHLA'nın tekli ve kombine uygulaması ile ilgili olarak literatür taraması yapıldığında gerek pankreatik gerekse de diğer kanser türleri üzerine hücre döngüsü analizi yönünden herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonlarının hücre döngüsü etkilerinde, hücre döngülerindeki birikmenin hücre tipine göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Ancak her bir molekülün hücre döngüsü etkilerinin her hücrede değiştiği ve moleküle özgü belirgin bir döngüde yığılma olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızda, 5-FU ve leptinin hücreleri S fazına sürüklediği tespit edilmemiştir. Bunun temel nedeni moleküllerin uygulama dozu ve inkübasyon süreleri olabilir. Çünkü, yukarıda özetlenen çalışmalarda leptin 100ng/ml olarak uygulanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda ise leptin 35ng/ml (obez sınır leptin değeri) olarak kullanılmıştır.

Akım sitometride hücre yığılmaları hücre tipine göre değiştiği için moleküllerin 72.saatten daha fazla inkübe edilmeleri gerekebilir. Çünkü akım sitometride inkübasyon süresi hücrelerin ikiye katlanma sürelerini mutlaka aşmaları gerekmektedir ki bu sayede döngüdeki bekleme ve yığılma daha rahat tespit edilebilsin. Ayrıca bu sayede apoptotik yüzdeler de daha rahat tespit edilebilir. Ayrıca, akım sitometri analizinden ayrı olarak, tez kapsamında çalışılan PK hücre serilerinde COMET analizi ile 5-FU, leptin ve SHLA kombine uygulamalarında saptanan DNA hasarı artışı 5-FU ve leptinin S faz indüklemeye özelliğinden olabilir. COMET yöntemi ile DNA hasarının saptanmasında, moleküllerin IC50 değerlerinin tespit edildiği inkübasyon süresi yeterli olabilir.

Çünkü COMET’te yalnızca genomik DNA’daki büyük kırılmalar tespit edilmektedir. 5-FU antimetabolitleri en iyi S fazında etki göstereceğinden leptin tarafından S fazına indüklenen hücrelerde DNA hasarı daha fazla saptanacaktır.

Bu tez çalışmasında leptinin tercih edilmesinin nedenlerinden biri de leptinin literatür taramasına göre S faz indüklediğinin tespit edilmesidir. Bu nedenle 5-FU leptin kombinasyonunun direnç yolağındaki etkileri araştırılmak istenmiştir. Bu tez çalışmasında, PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA’nın ikili ve üçlü kombinasyonlarının hücre döngüsü etkileri ilk kez araştırılmıştır.





## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, PK hücre serilerinde, 5-FU, leptin ve SHLA'nın 5-FU kemoterapötik direncinde rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkileri ile apoptoz süreci ve hücre döngüsü üzerine olan etkileri araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

SHLA'nın kanser hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisi ilk kez araştırılmış ve SHLA'nın 10,100 ve 1000 ng konsantrasyonda sitotoksik etkisi belirlenmiştir.

PK hücre serilerinde, 5-FU, leptin ve SHLA'nın tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının 5-FU direnç yolağında yer alan DPD, hENT1, TP, TS, MDR1, MRP5 genlerin ekspresyonlarını değiştirdiği ilk kez gösterilmiştir.

PK hücre serilerinde 5-FU'nun leptin ve SHLA ile birlikte ikili ve üçlü kombinasyonlarında kaspaz genlerinin ekspresyonu değiştirdiği ve hem intrinsik hem de reseptör aracılı yolak üzerinden apoptozu tetikleyebildiği ilk kez saptanmıştır.

PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonlarında DNA hasarını arttırabileceği ve bu DNA hasarının hücre tipine göre değiştiği ilk kez gösterilmiştir.

SHLA'nın hücre döngüsü üzerine olan etkisi ilk kez gösterilmiştir.

PK hücre serilerinde 5-FU, leptin ve SHLA'nın ikili ve üçlü kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerine olan etkisi ilk kez gösterilmiştir. Kombinasyonlarda hücre döngüsü yoğunluğunun hücre tipine göre değiştiği ve belirgin bir döngüde yığılma olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, 5-FU direncinde rol alan genlerin ekspresyonlarının leptin ve SHLA kullanımını ile değiştiği, leptin ve/veya SHLA'nın 5-FU direncinde adjuvan terapide kullanılabileceği ancak verilerin anlamlılığı, bütünlüğü ve tekrarlanabilir olması için organoid modellerde genomiks, epigenomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks yaklaşımlar kullanılarak doğrulanmasının gerektiği önerilir.

PK tedavisinde 5-FU kemoterapötik direncinin prediktif olarak saptanabilmesi için 5-FU yolağında yer alan tüm metabolik enzimlerin genlerinin genetik ve epigenetik yapıları dikkate alınarak genom ebadında array sistemleri ile araştırılması ve elde edilen sonuçların klinik verilerle birleştirilerek algoritma oluşturulması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Rajabpour A, Rajaei F, Teimoori-Toolabi L. Molecular alterations contributing to pancreatic cancer chemoresistance. *Pancreatology*, 2017, 17: 310-320.
2. Mantho CIT, Harbuzariu A, Gonzalez-Perez RR. Histone deacetylases, microRNA and leptin crosstalk in pancreatic cancer. *World journal of clinical oncology*, 2017, 8: 178.
3. Wang W-B, Yang Y, Zhao Y-P, Zhang T-P, Liao Q, Shu H. Recent studies of 5-fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, 20: 15682.
4. Ghadban T, Dibbern JL, Reeh M, Miro JT, Tsui TY, Wellner U, Izbicki JR, Güngör C, Vashist YK. HSP90 is a promising target in gemcitabine and 5-fluorouracil resistant pancreatic cancer. *Apoptosis*, 2017, 22: 369-380.
5. Lipsey CC, Harbuzariu A, Daley-Brown D, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role of leptin and Notch interleukin-1 leptin crosstalk outcome in cancer. *World journal of methodology*, 2016, 6: 43.
6. Somasundar P, Alice KY, Vona-Davis L, McFadden DW. Differential effects of leptin on cancer in vitro. *Journal of Surgical Research*, 2003, 113: 50-55.
7. Mendonsa AM, Chalfant MC, Gorden LD, VanSaun MN. Modulation of the leptin receptor mediates tumor growth and migration of pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 2015, 10: e0126686.
8. Harbuzariu A, Rampoldi A, Daley-Brown DS, Candelaria P, Harmon TL, Lipsey CC, Beech DJ, Quarshie A, Ilies GO, Gonzalez-Perez RR. Leptin-Notch signaling axis is involved in pancreatic cancer progression. *Oncotarget*, 2017, 8: 7740.
9. Procaccini C, Lourenco EV, Matarese G, Cava AL. Leptin signaling: A key pathway in immune responses. *Current signal transduction therapy*, 2009, 4: 22-30.

10. Maurya R, Bhattacharya P, Dey R, Nakhasi HL. Leptin Functions in Infectious Diseases. *Front Immunol*, 2018, 9: 2741.
11. Meleń-Mucha G, Ławnicka H. Leptin promotes the growth of Colon 38 cancer cells and interferes with the cytotoxic effect of fluorouracil in vitro. *Endokrynologia Polska*, 2007, 58: 2-6.
12. Candelaria PV, Rampoldi A, Harbuzariu A, Gonzalez-Perez RR. Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World journal of clinical oncology*, 2017, 8: 106.
13. Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2015, 12: 649.
14. Longnecker DS. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, 2014.
15. Dahl-Jensen SB, Yennek S, Flasse L, Larsen HL, Sever D, Karremore G, Novak I, Sneppen K, Grapin-Botton A. Deconstructing the principles of ductal network formation in the pancreas. *PLoS biology*, 2018, 16: e2002842.
16. Moore K, Persaud T. Klinik yönleriyle insan embriyolojisi, 2008. Çev.: Dalçık, H., Yıldırım, M.), *Nobel tıp kitabevleri, İstanbul*, 524s.
17. Babic T, Travagli RA. Neural Control of the Pancreas. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, 2016.
18. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. *Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. Malatya*, 2009.
19. Beer RL, Parsons MJ, Rovira M. Centroacinar cells: at the center of pancreas regeneration. *Developmental biology*, 2016, 413: 8-15.
20. Low JT, Shukla A, Thorn P. Pancreatic acinar cell: new insights into the control of secretion. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010, 42: 1586-1589.

21. Costanzo LS. *Physiology E-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2017.
22. Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD. Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23: 711-719.
23. Kopinke D, Brailsford M, Pan FC, Magnuson MA, Wright CV, Murtaugh LC. Ongoing Notch signaling maintains phenotypic fidelity in the adult exocrine pancreas. *Dev Biol*, 2012, 362: 57-64.
24. Ellis C, Ramzy A, Kieffer TJ. Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14: 612-628.
25. Beer RL, Parsons MJ, Rovira M. Centroacinar cells: At the center of pancreas regeneration. *Dev Biol*, 2016, 413: 8-15.
26. Ferdek PE, Jakubowska MA. Biology of pancreatic stellate cells-more than just pancreatic cancer. *Pflugers Arch*, 2017, 469: 1039-1050.
27. Xue R, Jia K, Wang J, Yang L, Wang Y, Gao L, Hao J. A Rising Star in Pancreatic Diseases: Pancreatic Stellate Cells. *Front Physiol*, 2018, 9: 754.
28. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol*, 2012, 3: 344.
29. McCarroll JA, Naim S, Sharbeen G, Russia N, Lee J, Kavallaris M, Goldstein D, Phillips PA. Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer. *Front Physiol*, 2014, 5: 141.
30. Marzoq AJ, Mustafa SA, Heidrich L, Hoheisel JD, Alhamdani MSS. Impact of the secretome of activated pancreatic stellate cells on growth and differentiation of pancreatic tumour cells. *Scientific Reports*, 2019, 9: 5303.
31. Raica M, Cimpean AM. Paul Langerhans: a pilgrim" traveling" from functional histology to marine biology. *Acta medico-historica Adriatica*, 2017, 15: 139-146.

32. Islam MS. One hundred forty years after the discovery of islets by Paul Langerhans, Islets, a new journal dedicated to these mini-organs, is born. 2009.
33. Langerhans P, Jolles S. *J Clin Pathol*, 2002, 55: 243.
34. Reverón R. Herophilos, the great anatomist of antiquity. *Anatomy*, 2015, 9.
35. Tando Y, Yanagimachi M, Matsushashi Y, Nakamura T, Kamisawa T. A brief outline of the history of the pancreatic anatomy. *Digestive surgery*, 2010, 27: 84-86.
36. Busnardo AC, DiDio LJ, Tidrick RT, Thomford NR. History of the pancreas. *Am J Surg*, 1983, 146: 539-550.
37. Çağlar V, Gönül Y, Songur A. Pankreas Anatomisi ve Varyasyonları. *Uluslararası Klinik Araştırmalar Dergisi*, 2014, 2: 77-82.
38. Drake RL, Vogl W, Mitchell AW, Gray H, Tibbitts RM, Richardson P, Horn A, Yıldırım M. *Tıp fakültesi öğrencileri için Gray's anatomi*. Baskı. Güneş Tıp Kitabevleri, 2007.
39. Moore K, AMR A. Temel klinik anatomi (Çev. Ed. Alaittin Elhan) 2. baskı. *Ankara: Güneş kitabevi*, 2006: 165-168.
40. Türkvatan A, Erden A, Türkoğlu MA, Yener Ö. Congenital variants and anomalies of the pancreas and pancreatic duct: imaging by magnetic resonance cholangiopancreatography and multidetector computed tomography. *Korean journal of radiology*, 2013, 14: 905-913.
41. Gosling JA, Harris PF, Humpherson JR, Whitmore I, Willan PLT. *Human Anatomy, Color Atlas and Textbook E-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2016.
42. Sembulingam K, Sembulingam P. *Essentials of Medical Physiology*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. *New Delhi, India*, 2006: 82-84.

43. Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi (Çev. Gökbel H, Okudan N, Gergerlioğlu HS, Belviranlı M.). *İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi*, 2011: 223-227.
44. Grapin-Botton A. Ductal cells of the pancreas. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 504-510.
45. Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Mochimaru Y. Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. *Nagoya J Med Sci*, 2012, 74: 1-18.
46. Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD In *Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells*, Semin Cell Dev Biol, (editör).^(editörler). Elsevier: 2012; 711-719.
47. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology E-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2016.
48. Pandol SJ. Normal pancreatic function. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, 2015.
49. McPhee SJ, Hammer GD. *Hastalıkların patofizyolojisi: klinik tıpla bir tanışma*. Baskı. Palme Yayıncılık, 2012.
50. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2018, 68: 394-424.
51. MacDonald MJ, Marshall LK. Survey of normal appearing mouse strain which lacks malic enzyme and Nad<sup>+</sup>-linked glycerol phosphate dehydrogenase: normal pancreatic beta cell function, but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*, 2001, 220: 117-125.
52. Genel TSBHS. Müdürlüğü Türkiye Kanser İstatistikleri. 2018.

53. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 9694-9705.
54. Göral V. Pankreas kanseri: patogenezi ve tanı. *Güncel Gastroenteroloji*, 2014, 18: 407-414.
55. Collisson EA, Bailey P, Chang DK, Biankin AV. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 16: 207-220.
56. Rindi G, Wiedenmann B. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: new insights. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011, 8: 54.
57. Ro C, Chai W, Yu VE, Yu R. Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin J Cancer*, 2013, 32: 312-324.
58. Kanthan R, Senger J-L, Ahmed S, Kanthan SC. Pancreatic Neuroendocrine Tumors in the 21st Century—An Update. *Journal of Cancer Therapy*, 2017, 8: 1194.
59. Beger HG, Nakao A, Neoptolemos JP, Peng SY, Sarr MG. *Pancreatic Cancer, Cystic Neoplasms and Endocrine Tumors: Diagnosis and Management*. Baskı. Wiley, 2015.
60. Klöppel G, Klimstra DS, Hruban RH, Adsay V, Capella C, Couvelard A, Komminoth P, La Rosa S, Ohike N, Osamura RY, Perren A, Scoazec J-Y, Rindi G. Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Update on the New World Health Organization Classification. *AJSP: Reviews & Reports*, 2017, 22: 233-239.
61. ŞAHİN F, TAŞPINAR M, SUNGUROĞLU A. Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2007, 27: 560-566.
62. Long J, Zhang Y, Yu X, Yang J, LeBrun DG, Chen C, Yao Q, Li M. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2011, 15: 817-828.



63. Adamska A, Elaskalani O, Emmanouilidi A, Kim M, Razak NBA, Metharom P, Falasca M. Molecular and cellular mechanisms of chemoresistance in pancreatic cancer. *Advances in biological regulation*, 2018, 68: 77-87.
64. Springfield C, Jäger D, Büchler MW, Strobel O, Hackert T, Palmer DH, Neoptolemos JP. Chemotherapy for pancreatic cancer. *La Presse Médicale*, 2019.
65. Sheikh R, Walsh N, Clynes M, O'Connor R, McDermott R. Challenges of drug resistance in the management of pancreatic cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 2010, 10: 1647-1661.
66. Bellone G, Carbone A, Busso V, Scirelli T, Buffolino A, Smirne C, Novarino A, Bertetto O, Tosetti L, Emanuelli G. Antagonistic interactions between gemcitabine and 5-fluorouracil in the human pancreatic carcinoma cell line Capan-2. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 1294-1303.
67. Hung SW, Mody HR, Govindarajan R. Overcoming nucleoside analog chemoresistance of pancreatic cancer: a therapeutic challenge. *Cancer letters*, 2012, 320: 138-149.
68. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372: 425.
69. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 1995, 269: 543-546.
70. KILINÇ F, GÖZEL N. Obezite ve Genetik. *Firat Tıp Dergisi/Firat Med J*, 2018, 23: 9-13.
71. Forny-Germano L, De Felice FG, Vieira M. The Role of Leptin and Adiponectin in Obesity-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 2018, 12: 1027.

72. Wang B, Charukeshi Chandrasekera P, J Pippin J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Current diabetes reviews*, 2014, 10: 131-145.
73. Brunner L, Nick HP, Cumin F, Chiesi M, Baum HP, Whitebread S, Stricker-Krongrad A, Levens N. Leptin is a physiologically important regulator of food intake. *International Journal of Obesity*, 1997, 21: 1152-1160.
74. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004, 30: 113-118.
75. Pan WW, Myers Jr MG. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nature Reviews Neuroscience*, 2018, 19: 95.
76. Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: effects and signaling pathways. *Journal of molecular endocrinology*, 2012, 49: R9-R17.
77. Upadhyay J, Farr OM, Mantzoros CS. The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism*, 2015, 64: 105-113.
78. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Annals of internal medicine*, 2010, 152: 93-100.
79. Park H-K, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*, 2015, 64: 24-34.
80. Mora-Muñoz L, Guerrero-Naranjo A, Rodríguez-Jimenez EA, Mastronardi CA, Velez-van-Meerbeke A. Leptin: role over central nervous system in epilepsy. *BMC neuroscience*, 2018, 19: 51.
81. Guyton AC, Hall JE. *Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji*. Baskı. Güneş Tıp Kitabevleri, 2017.

82. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, 1996, 334: 292-295.
83. Mantzoros CS, Liolios AD, Tritos NA, Kaklamani VG, Doulgerakis DE, Griveas I, Moses AC, Flier JS. Circulating insulin concentrations, smoking, and alcohol intake are important independent predictors of leptin in young healthy men. *Obes Res*, 1998, 6: 179-186.
84. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*, 1996, 97: 1344-1347.
85. Pothuraju R, Rachagani S, Junker WM, Chaudhary S, Saraswathi V, Kaur S, Batra SK. Pancreatic cancer associated with obesity and diabetes: an alternative approach for its targeting. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37: 319.
86. Stolzenberg-Solomon RZ, Newton CC, Silverman DT, Pollak M, Nogueira LM, Weinstein SJ, Albanes D, Mannisto S, Jacobs EJ. Circulating Leptin and Risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis From 3 Cohorts. *Am J Epidemiol*, 2015, 182: 187-197.
87. Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Chen W-S. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*, 2008, 13: 1551-1569.
88. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*, 2003, 3: 330.
89. Elander N, Aughton K, Ghaneh P, Neoptolemos J, Palmer D, Cox T, Campbell F, Costello E, Halloran C, Mackey J. Expression of dihydropyrimidine dehydrogenase

(DPD) and hENT1 predicts survival in pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 2018, 118: 947.

90. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz H-J, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 2014, 11: 282.

91. Shimoda M, Sawada T, Kubota K. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase are upregulated in pancreatic and biliary tract cancers. *Pathobiology*, 2009, 76: 193-198.

92. Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K, Nakajima G, Hatori T, Danenberg KD, Danenberg PV, Yamamoto M. High intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in pancreatic cancer associated with a high rate of response to S-1. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2008, 63: 85-89.

93. Nakayama S, Takeda S, Kawase Y, Inoue S, Kaneko T, Nakao A. Clinical significance of dihydropyrimidine dehydrogenase in adjuvant 5-fluorouracil liver perfusion chemotherapy for pancreatic cancer. *Annals of surgery*, 2004, 240: 840.

94. Krug S, Boch M, Nimphius W, Gress T, Michl P, Rinke A. Relevance of dihydropyrimidine-dehydrogenase and thymidylate-synthase in patients with pancreatic neuroendocrine neoplasms treated with 5-FU-based chemotherapy. *Pancreatology*, 2017, 17: 139-145.

95. Phua LC, Mal M, Koh PK, Cheah PY, Chan ECY, Ho HK. Investigating the role of nucleoside transporters in the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2013, 71: 817-823.

96. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): do we really have a new predictive biomarker of chemotherapy outcome in pancreatic cancer patients? *Pancreatology*, 2013, 13: 558-563.

97. Mackey JR, Jennings LL, Clarke ML, Santos CL, Dabbagh L, Vsianska M, Koski SL, Coupland RW, Baldwin SA, Young JD. Immunohistochemical variation of human equilibrative nucleoside transporter 1 protein in primary breast cancers. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8: 110-116.
98. Tsujie M, Nakamori S, Nakahira S, Takahashi Y, Hayashi N, Okami J, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M. Human equilibrative nucleoside transporter 1, as a predictor of 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer. *Anticancer research*, 2007, 27: 2241-2249.
99. Michalski C, Erkan M, Sauliunaite D, Giese T, Stratmann R, Sartori C, Giese N, Friess H, Kleeff J. Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 2008, 99: 760.
100. Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, Abrams R, Benson AB, Macdonald J, Cass CE. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2009, 136: 187-195.
101. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wentz MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Buchler MW. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *Jama*, 2010, 304: 1073-1081.
102. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Kocik M, Oliverius M, Hlavsa J, Honsova E, Mazanec J, Kala Z, Melichar B, Soucek P. The association

between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72: 669-682.

103. GAO Y-m, LIU S-l. The effect of human equilibrative nucleoside transport (hENTs) in pancreatic cancer cell membrane on the cytotoxicity of 5-fluorouracil [J]. *Modern Medical Journal*, 2006, 3.

104. Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, Liekens S. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Medicinal research reviews*, 2009, 29: 903-953.

105. Miyake K, Imura S, Yoshizumi T, Ikemoto T, Morine Y, Shimada M. Role of thymidine phosphorylase and orotate phosphoribosyltransferase mRNA expression and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase in the prognosis and clinicopathological features of patients with pancreatic cancer. *International journal of clinical oncology*, 2007, 12: 111-119.

106. Kurata N, Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Mahawithitwong P, Sakai H, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil. *International journal of oncology*, 2011, 39: 473-482.

107. Minari Y, Nio Y, Hirahara N, Dong M. Heterogeneous distribution of thymidine phosphorylase between primary tumors and metastatic lesions of human pancreatic ductal carcinoma: implications for the efficacy of chemotherapy with 5-FU or its derivatives. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47: 415-422.

108. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11: 282-298.

109. Niero EL, Rocha-Sales B, Lauand C, Cortez BA, de Souza MM, Rezende-Teixeira P, Urabayashi MS, Martens AA, Neves JH, Machado-Santelli GM. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2014, 33: 37.
110. Guo J, Zhao Y, Liao Q, Zhu Y. Significance and reversal of MDR1/P-gp in pancreatic cancer chemotherapy. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*, 2007, 45: 1488-1490.
111. Hagmann W, Jesenofsky R, Faissner R, Guo C, Löhr JM. ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreatology*, 2009, 9: 136-144.
112. Nambaru PK, Hübner T, Köck K, Mews S, Grube M, Payen L, Guitton J, Sandler M, Jedlitschky G, Rimbach C. 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*, 2011, 39: 132-139.
113. Li Y, Revalde JL, Reid G, Paxton JW. Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2011, 68: 603-610.
114. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, 2011, 364: 1817-1825.
115. Perez-Perez A, Vilarino-Garcia T, Fernandez-Riejos P, Martin-Gonzalez J, Segura-Egea JJ, Sanchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2017, 35: 71-84.

116. Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gomez-Reino JJ, Mera A, Lago F, Gómez R, Gualillo O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nature Reviews Rheumatology*, 2017, 13: 100.
117. Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology*, 2002, 62: 354-362.
118. Liu Y, Liu Z, Xia Z. Up-regulation of microrna-125b induced by 5-fluorouracil (5-FU) treatment inhibits cell growth and proliferation in pancreatic cancer cells. *MOJ Cell Sci Rep*, 2016, 3: 30-37.
119. Damiani E, Solorio JA, Doyle AP, Wallace HM. How reliable are in vitro IC50 values? Values vary with cytotoxicity assays in human glioblastoma cells. *Toxicology letters*, 2019, 302: 28-34.
120. He Y, Zhu Q, Chen M, Huang Q, Wang W, Li Q, Huang Y, Di W. The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 70803.
121. Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, Iwao H. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *International journal of oncology*, 2013, 43: 1985-1991.
122. Gao L, Shen L, Yu M, Ni J, Dong X, Zhou Y, Wu S. Colon cancer cells treated with 5- fluorouracil exhibit changes in polylysamine- type N- glycans. *Molecular medicine reports*, 2014, 9: 1697-1702.
123. Liu S-L, Friess H, Kleeff J, Buchler M. Intrinsic resistance of pancreatic cancer cell lines towards 5-fluorouracil. *JOURNAL-CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY*, 2002, 33: 492-495.



124. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus G, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 2001, 121: 79-90.
125. Barone I, Catalano S, Gelsomino L, Marsico S, Giordano C, Panza S, Bonofiglio D, Bossi G, Covington KR, Fuqua SA. Leptin mediates tumor–stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. *Cancer Res*, 2012, 72: 1416-1427.
126. Ptak A, Kolaczowska E, Gregoraszcuk EL. Leptin stimulation of cell cycle and inhibition of apoptosis gene and protein expression in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Endocrine*, 2013, 43: 394-403.
127. Fan Y, Gan Y, Shen Y, Cai X, Song Y, Zhao F, Yao M, Gu J, Tu H. Leptin signaling enhances cell invasion and promotes the metastasis of human pancreatic cancer via increasing MMP-13 production. *Oncotarget*, 2015, 6: 16120.
128. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 2007, 67: 2497-2507.
129. Dubois V, Delort L, Billard H, Vasson M-P, Caldefie-Chezet F. Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies? *PLoS One*, 2013, 8: e58541.
130. Harbuzariu A, Gonzalez-Perez RR. Leptin-notch axis impairs 5-fluorouracil effects on pancreatic cancer. *Oncotarget*, 2018, 9: 18239.
131. Fiedor E, Gregoraszcuk EL. The molecular mechanism of action of superactive human leptin antagonist (SHLA) and quadruple leptin mutein Lan-2 on human ovarian epithelial cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2016, 78: 611-622.

132. Fukui Y, Oka T, Nagayama S, Danenberg PV, Danenberg KD, Fukushima M. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, orotate phosphoribosyltransferase mRNA and protein expression levels in solid tumors in large scale population analysis. *International journal of molecular medicine*, 2008, 22: 709-716.
133. Shimoda M, Sawada T, Kubota K. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase are upregulated in pancreatic and biliary tract cancers. *Pathobiology*, 2009, 76: 193-198.
134. Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takeda S, Sugimoto K, Takahashi Y, Okami J, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Pretreatment with S-1, an oral derivative of 5-fluorouracil, enhances gemcitabine effects in pancreatic cancer xenografts. *Anticancer Res*, 2008, 28: 179-186.
135. Kubota T. Real-Time RT-PCR (Taqman®) of Tumor mRNA to Predict Sensitivity of Specimens to 5-Fluorouracil. İçinde: *Chemosensitivity: Volume II*, Springer, 2005: 257-265.
136. Formentini A, Sander S, Denzer S, Straeter J, Henne-Bruns D, Kornmann M. Thymidylate synthase expression in resectable and unresectable pancreatic cancer: role as predictive or prognostic marker? *International journal of colorectal disease*, 2007, 22: 49-55.
137. Ceppi P, Volante M, Ferrero A, Righi L, Rapa I, Rosas R, Berruti A, Dogliotti L, Scagliotti GV, Papotti M. Thymidylate synthase expression in gastroenteropancreatic and pulmonary neuroendocrine tumors. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14: 1059-1064.
138. Van der Zee J, Van Eijck C, Hop W, van Dekken H, Dicheva B, Seynhaeve A, Koning G, Eggermont A, Ten Hagen T. Expression and prognostic significance of

thymidylate synthase (TS) in pancreatic head and periampullary cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2012, 38: 1058-1064.

139. Lu Z, Kleeff J, Shrikhande S, Zimmermann A, Korc M, Friess H, Büchler MW. Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 2000, 21: 240-247.

140. Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Grivicich I, Garcia- Santos D, Chies JAB, Saffi J, Larsen AK, Henriques JAP. 5- Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *Journal of Applied Toxicology*, 2009, 29: 308-316.

141. Kong L, Wang X, Zhang K, Yuan W, Yang Q, Fan J, Wang P, Liu Q. Gypenosides synergistically enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil on colorectal cancer in vitro and in vivo: a role for oxidative stress-mediated DNA damage and p53 activation. *PLoS One*, 2015, 10: e0137888.

142. Sun ZZ, Zhang T, Ning K, Zhu R, Liu F, Tang SC, Jiang B, Hua D. B7-H3 upregulates BRCC3 expression, antagonizing DNA damage caused by 5-Fu. *Oncol Rep*, 2016, 36: 231-238.

143. Lopes-Costa E, Abreu M, Gargiulo D, Rocha E, Ramos AA. Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. *J Toxicol Environ Health A*, 2017, 80: 776-787.

144. Khoei S, Poorabdollahi R, Mostaar A, Faeghi F. Methoxyamine Enhances 5-Fluorouracil-Induced Radiosensitization in Colon Cancer Cell Line HT29. *Cell J*, 2017, 19: 283-291.

145. Kang SJ, Lee YJ, Kim BM, Kim YJ, Woo HD, Jeon HK, Chung HW. Effect of bupleuri radix extracts on the toxicity of 5- fluorouracil in HepG2 hepatoma cells and

normal human lymphocytes. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2008, 103: 305-313.

146. Hu Z, Lv G, Li Y, Li E, Li H, Zhou Q, Yang B, Cao W. Enhancement of anti-tumor effects of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma by low-intensity ultrasound. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 71.

147. Mirjoleit JF, Didelot C, Barberi- Heyob M, Merlin JL. G1/S but not G0/G1 cell fraction is related to 5- fluorouracil cytotoxicity. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2002, 48: 6-13.

148. Urick ME, Chung EJ, Shield WP, Gerber N, White A, Sowers A, Thetford A, Camphausen K, Mitchell J, Citrin DE. Enhancement of 5-fluorouracil-induced in vitro and in vivo radiosensitization with MEK inhibition. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17: 5038-5047.

149. Huang Z, Guo K-J, Guo R-X, He S-G. Effects of 5-fluorouracil combined with sulfasalazine on human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 proliferation and apoptosis in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6: 312-320.

150. Catalano S, Giordano C, Rizza P, Gu G, Barone I, Bonofiglio D, Giordano F, Malivindi R, Gaccione D, Lanzino M. Evidence that leptin through STAT and CREB signaling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation. *Journal of cellular physiology*, 2009, 218: 490-500.

151. Chen C, Chang Y-C, Liu C-L, Chang K-J, Guo C. Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21 WAF1/CIP1. *Breast cancer research and treatment*, 2006, 98: 121-132.

152. Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and

mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 13316-13325.

153. Wu N, Wang Y, Wang S, Chen Y, Yan J. Recombinant human leptin induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer MGC-803 cells. *Clinical and experimental medicine*, 2013, 13: 305-314.



## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
<b>Adı Soyadı:</b>	Filiz Taşpınar
<b>Doğum tarihi:</b>	03.01.1981
<b>Doğum Yeri:</b>	Çine/Aydın
<b>Medeni Hali:</b>	Evli, iki çocuk
<b>Uyruğu:</b>	T.C.
<b>Adres:</b>	Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bardakçı Mahallesi, 65090
<b>Tel:</b>	0507 118 31 88
<b>Faks:</b>	-
<b>E-mail:</b>	ftaspinartr@gmail.com
Eğitim	
<b>Lise:</b>	Çanakkale Lisesi, Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
<b>Lisans:</b>	Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümü
<b>Yüksek lisans:</b>	Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri. Ens, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı (2010)
<b>Doktora:</b>	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
<b>İngilizce:</b>	İyi
<b>Almanca:</b>	-
<b>Rusça:</b>	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Doğa ve kültürel geziler, Yüzme, Bisiklet, Masa Tenisi	

## EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU


T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

### ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Dursunali ÇINAR danışmanlığında sunulan "Pankreas Kanseri Kemoterapötik Direncinde 5-Fluorourasil, Leptin Ve Leptin İnhibitörü Kombinasyonunun Rolü" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	15
Genel Bilgiler	9	30
Materyal ve Metod	14	35
Bulgular	4	10
Tartışma	0	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 14/06/2019

  
Öğrenci Adı-Soyadı  
İmza

Filiz TAŞPINAR

Danışman Adı-Soyadı  
İmza

Prof. Dr. Dursunali ÇINAR



\* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



### ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



#### KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Dursun Ali ÇINAR	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	Pankreas Kanseri Kemoterapötik Direncinde 5-Fluorourasil, Leptin ve Leptin İnhibitörü Kombinasyonunun Rolü	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 5 Karar No: 25	Tarih: 28.09.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Mustafa GÜL  
Üye

Prof.Dr.Hamidullah UYANIK  
Üye

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR  
Etik Kurul Başkanı

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR  
Üye

Yrd.Doç.Dr.İlker İNCE  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Zahide KOŞAN  
Üye

Emrah MELETLİOĞLU  
Üye