

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ASPC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE GEMSİTABİN VE (YA)
EPIBRASSİNOLİDİN UYGULAMASININ APOPTOTİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fadina KURYAYEVA

1800004565

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

HAZİRAN 2020

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ASPC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE GEMSİTABİN VE (YA)
EPIBRASSİNOLİDİN UYGULAMASININ APOPTOTİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fadina KURYAYEVA

1800004565

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Prof. Dr. Elif Damla ARISAN (Gebze Teknik Üniversitesi)

HAZİRAN 2020

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum yüksek lisans tezimin planlanması ve gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleri ile her zaman bana yol gösteren, saygıdeğer tez danışmanım sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen çok değerli öğretmenlerim sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, sayın Prof. Dr. Damla ARISAN, sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER-GÜRKAN başta olmak üzere, laboratuvarında tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süre boyunca yardımlarını banden esirgemeyen Araş. Gör. Özge Berrak'a, Araş. Gör. Pelin Özfiliz'e, Araş. Gör. Burcu Ayhan Şahin'e, Araş. Gör. Tamer Gümüş'e ve sevgili arkadaşlarım Zeynep Elif Apaydın, Börteçine Sevgin, Mervenur Çoban'a sonsuz teşekkür ederim.

Tanıdığım ilk andan bu yana bilgilerini ve yardımlarını her zaman hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı TEKİNER ve Leila Mehdizadehtapeh, Yusif Yusifov ve Leyla Ceferova'ya sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Uzağımda olsalarda hep yanımda hissettiğim çok sevdiğim, her anlamda destek olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan babam Muxtar KURYAYEV, annem Güldeste TUFANOVA ve bu dünyada ki hazinelerim olan kardeşlerime, her zaman desteklerini hiss ettiğim sevgili arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ii
KISALTMALAR	v
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Pankreas Kanseri	3
2.1.1 Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.1.2 Pankreas Kanseri Risk Faktörleri	4
2.1.3 Pankreas Kanseri Moleküler Mekanizması	6
2.1.4 Pankreas Kanseri Evreleri	8
2.1.5 Pankreas Kanseri Tedavi Stratejileri	9
2.2 Gemcitabin	10
2.3 Brassİnosteroidler	12
2.3.1 Epibrassinolid	14
2.3.2 Epibrassinolid Kansere Hücresindeki Etkisi	15
2.4 Endoplazmik Retikulum Stresi	16
2.4.1 PERK	17
2.4.2 ATF6	18
2.4.3 IRE1 α	19
2.5 Apoptotik Hücre Ölümü	20
2.5.1 Kaspazlar	22
2.5.2 BCL-2 ailesi	24
2.5.3 İçsel Apoptoz Yolağı	25
2.5.4 Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1 MATERYALLER	27
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	27
3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları	27
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar	27
3.1.4 Kullanılan Tamponlar	27
3.2 Yöntemler	31
3.2.1 Hücre Kültürü Hazırlama	31
3.2.2 Hücre Canlılığının Belirlenmesi	32
3.2.3 Floresans Boyama	32
3.2.4 Hücre Sağkalım Tayini	33
3.2.5 Yara İyileşme Yöntemi	33

3.2.6 Koloni Oluşum Testi	34
3.2.7 Hücre Akış Sitometresinde Propidyum İyodür (PI) analizi	34
3.2.8 Total Protein İzolasyonu	34
3.2.9 Bradford Protein Miktar Tayini	35
3.2.10 İmmunoblotlama Yöntemi	35
3.2.10.1 Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE’de Yürütülmesi.....	35
3.2.10.2 Membrana Transfer ve Bloklama.....	35
3.2.10.3 Primer ve Seconder Antikor İşaretlemeleleri.....	35
3.2.10.4 Blotların Görüntülenmesi.....	36
3.2.11 İstatiksel Analiz.....	36
4. SONUÇLAR	37
4.1 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Hücre Canlılığına Etkisi.....	37
4.2 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Hücre Sağkalımına Etkisi.....	38
4.3 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Metastaz Üzerindeki Etkisi.....	39
4.4 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Mitokondriden Türevlenen Apoptotik Yolak Üzerindeki Etkisi.....	40
4.5 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi.....	43
4.6 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	43
4.7 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid’in Endoplazmatik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkisinin Zamana Bağlı Gösterilmesi	45
5. TARTIŞMA	49
KAYNAKLAR	56
EKLER 70	
ÖZGEÇMİŞ.....	75

KISALTMALAR

ACS	: American Cancer Society
AIF	: Apoptoz Başlatıcı Faktör
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APC	: Adenomatöz Polipozis Gen
APS	: Amonyum Persülfat
ASK1	: Apoptoz Sinyalini Düzenleyici aktör 1
ATCC	: American Tissue Culture Collection
ATF6	: Aktive Transkripsiyon Faktörü
ATM	: Ataksi Telenjektazi Mutasyona Uğramış Gen
Bad	: Bcl-2 İlişkili Hücre Ölüm Antagonisti
Bak	: Bcl-2 Antagonist Protein
Bax	: Bcl-2 İlişkili X Proteinini
BES1	: BRI Baskılayıcı 1
Bcl-2	: B-Hücresi Lenfoma-2
Bcl-X_L	: Bcl-2 Benzeri Protein 1
Bcl-W	: Bcl-2 Protein Benzeri Protein 2
BH	: Bcl-2 Homoloji
Bid	: BH3-Etkileşim Bölgesi Ölüm Antagonisti
Bik	: Bcl-2 Etkileşimli Ölüm Proteinini
Bim	: Bcl-2 Benzeri Protein-11
Bip	: İmmüoglobulin Protein Bağlayıcı
BIN2	: Brassinosteroid-Insensitive 2
BMI	: Vücut Kitle İndeksi
BR	: Brassinosteroid
BRCA1	: Tümör Baskılayıcı Gen
BRI1	: Brassinosteroid Insensitive 1
BAK1	: BRI1-ilişkili Reseptör Kinaz 1
BSA	: Sığır Serum Albumin
BSK1	: Brassinosteroid Signaling Kinase 1
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BZR1	: Brassinazole Dayanımlı 1 Proteinini
GADD34	: Büyümenin Durdurulması ve DNA Hasarı İndüklenebilir Protein
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat-Dehidrogenaz
Gem	: Gemsitabin
CA	: Coumaric Acid
CALR	: Kalretikulin
CAPS2	: Kalsifosin 2
CARD	: Kaspaz Aktivasyon Çağırıcı Domein
CD95	: Farklılaşma Kümesi 95
CDKN2A	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
cFLIP	: Hücresel FLICE Benzeri İnhibitör Proteinini

CHOP	: CCAAT Arttırıcı-Bağlayıcı Protein Homolog Protein
CLB	: Hücre Özütleme Tampon
CLPTM1L	: Cleft Lip and Palate Transmembrane Protein 1-Like Protein
CRR9	: Sisplatin Direnç Benzeri Proteinin 9
DAPI	:4',6-Diamidino-2-Fenilindol
dCK	:Deoksisitidin Kinaz
dCTP	:Deoksisitidin Trifosfat
DED	:N Terminal Ölüm Etki Domeini
dFdC	:2', 2'-Difluoro 2'Deoxycytidine
dFdCDP	: Difluorodeoxycytidine Diphosphate
dFdCMP	: Difluorodeoxycytidine Monophosphate
dH₂O	: Distille su
DiOC₆	: 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide
DIABLO	: Direkt Apoptoz İnhibitor Bağlayıcı Protein
DISC	: Ölüm Başlatıcı Sinyal Kompleksi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DR5	: CHOP Ölüm Reseptörü 5
EBR	: Epibrassinolide
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPIC	: European Prospective Investigation Into Cancer
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Protein Yıkımı
Ero1-Lα	: Endoplazmik Retikulum Oksidoredüktin 1-L α
ERSE	: ER Stres Yanıt Elemanı
EUS	: Endoskopik Ultrason
FADD	: Fas ile İlişkili Ölüm Domaini
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FoxO	: ForkHead/Winged Helix Box Class O
hCNT	:Konsantre Nükleosit Taşıyıcılar
IARC	: International Agency for Research on Cancer
IRE1α	: Inositol Gerektiren Enzim 1
JNK	: Jun-N Terminal Kinaz
KRAS	: Kirstein Rat Sarcoma
KEAP1	: Kelch Benzeri ECH İlişkili Protein 1
MAPK	: Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
Mcl-1	: Myeloid Lösemi Hücre Farklılaşma Proteini
MLH1	: MutL Homolog 1
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSH2	: MutS Homolog 2
MTT	: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NRF2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
OS	: Genel Sağkalım
PALB2	: BRCA2'nin Ortağı ve Yerelleştiricisi
PanIN1	: Pankreatik Intraepitelyal Neoplazi
PARP	: Poli-ADP Riboz Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PDAC	: Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDI	: Protein Disülfid İzomeraz

PDK1	: Fosfoinositid bağımlı kinaz
PERK	: Protein kinaz RNA-benzeri ER kinaz
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfoinositid 3-Kinaz
PP1	: Proteinfosfotaz1
PMS2	: Postmayotik Segradasyon Artışı 2
PRSS1	:Katyonik Tripsinojen Gen
PVDF	: Polivinilialen Fluorid
RLCK	: Reseptör Benzeri Sitoplazmik Kinaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türevi
RR	: Relative Risk
SEER	: Surveillance, Epidemiology and End Results
Ser	: Serin
SILAC	: Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
S1P	: Site 1 Proteaz
STK11	: Serin / Treonin Kinaz 11
XBP	: X Box Bağlayıcı Protein
TBS	: Tris Tamponlu Tuz
TBS-T	: TBS-Tween
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TP-53	: Tümör Proteini P53
TUİK	: Türkiye Birleşik Veri Tabanı
TXNIP	: Tioredoksin ile Etkileşen Protein
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı
UV	: Ultraviyole
$\Delta\psi_m$: Mitokondri Membran Potansiyeli

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
M	: Molar
mA	: Miliamper
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
cm	: Santimetre
cm ²	: Santimetre kare
pH	: Hidrojen kuvveti
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
kDa	: Kilodalton
g	: Santrifüj kuvveti
gr	: Gram
L	: Litre
sa	: Saat
dk	: Dakika
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta
k	: Kappa

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Table 1: Kullanılan cihazlar listesi.....	70
Table 2: Hücre Kültürü Donanımları.....	71
Table 3: Kullanılan Kimyasalların Listesi.....	72
Table 4: %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği.....	74



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Pankreas Anatomisi.....	3
Şekil 2.2: Erkekler içerisinde En Sık Görülen 10 Kanser Türünün Yaşa Göre Standardize Edilmiş Şekli.....	4
Şekil 2.3: Genetik değişiklikler gösteren PanIN ilerleme modeli	8
Şekil 2.4: Pankreas kanseri evreleri.....	9
Şekil 2.5: Gemsitabinin moleküler formülü ve yapısı	11
Şekil 2.6: Gemsitabinin etki mekanizması	12
Şekil 2.7: Üç yaygın brassinosteroidin yapısı.....	12
Şekil 2.8: BR sinyal yoluna genel bakış. (A) BRI1 sinyal yolunun şeması. (B) BRI1 kök boyunca eksprese edilmiş hali. BRI1 (C) ve BRI3 (D) kök hücrenin niş bölgesinde ekspresyon edilmiş hali. Koyu yeşil proteinin yüksek ekspresyonunu, açık yeşil proteinin düşük ekspresyonunu temsil etmektedir	13
Şekil 2.9: EBR'in uzun ömürlü tuz stres tolerans olası mekanizması. Ekzojen EBR, hücre zarı bütünlüğünü ve stabilizasyonunu geliştirebilmektedir	15
Şekil 2.10: ER stres ve katlanmamış protein yanıtı	17
Şekil 2.11: Katlanmamış protein cevabının PERK kolu	18
Şekil 2.12: Katlanmamış protein cevabının ATF6 kolu	19
Şekil 2.13: Katlanmamış protein cevabının IRE1 α kolu	20
Şekil 2.14: Apoptozun moleküler mekanizması	22
Şekil 2.15: Apoptoz: Kaspaz aktivasyonuna giden 'dış' ve 'iç' yollar	23
Şekil 2.16: Bcl-2 ailesi üyeleri	25
Şekil 2.17: İçsel apoptoz yolağı mekanizması.....	26
Şekil 2.18: Reseptör Aracılı Apoptoz yolağı mekanizması.....	27
Şekil 4.1: AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı dFdc (A) ve EBR (B) uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. AsPC-1 hücreleri 96 oyuklu plakanın kuyucuklarına 1X10 ⁴ hücre olacak şekilde artan konsantrasyonlarda ekilmiş ve hücre canlılığını saptamak amacı ile MTT testi yapılmıştır (**** P <0.0001).	37
Şekil 4.2: AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde dFdc ve (ya) EBR'nin zamana ve doza bağlı uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1x10 ⁴ hücre olacak 2'şer tekrarlı olacak şekilde hücreler ekilmiş ve 48 ve 72 saat uygulanan dFdc ve (ya) EBR'nin zamana bağlı olarak canlılığa olan etkisi araştırılmıştır (**** P <0.0001).	38
Şekil 4.3: DFdc ve (ya) EBR'nin AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında hücre sağ kalım analizi ile zamana bağlı hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi. 5X10 ⁴ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekildi ve dFdc ve (ya) EBR ile 24,48,72 ve 96 saat zamana bağlı şekilde muamele edildi. Hücrelere 1:1 oranında %0,4 (w/v) tripan mavisi ve 1x PBS eklenerek Neubauer hemositometre ile sayıldı. (**** P <0.0001).	39

- Şekil 4.4:** AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında DFdC ve (ya) EBR'in doza bağlı olarak 48 ve 72 saat'de koloni oluşumlarının (A) ve uygulanan dozlarda etkisinin grafik üzerinde etkisinin (B) gösterilmesi. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^3 olacak şekilde hücreler ekildi. Hücreler dFdc ve (ya) EBR ile farklı konsantrasyonlarda 48 ve 72 saat muamele edildikten sonra hücrelerin büyümesi incelendi. 14 gün sonunda hücreler 5 dak metanol asetik asit (3:1) ile fikse edilerek %0,5'lik kristal viyole ile 20 dak muamele edilmiştir. Görüntüler UV ile çekildikten sonra çapları ölçülmüştür (**** P <0.0001). 40
- Şekil 4.5:** AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat'de doza bağlı olarak dFdc ve (ya) EBR uygulanmasının DAPI boyama ile DNA fragmentasyonuna, DiOC₆ boyama ile mitokondri membran potansiyeline ve PI boyama ile hücre ölümü üzerindeki etkilerinin floresan mikroskopla gösterilmesi. 5×10^4 AsPC-1 hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekildi. 48 saat sonunda PI için 30 dak, DAPI için 10 dak ve Dioc₆ için 15 dak bekletildi. 41
- Şekil 4.6:** AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat'de doza bağlı olarak dFdc ve (ya) EBR uygulanmasının DAPI boyama ile DNA fragmentasyonuna, DiOC₆ boyama ile mitokondri membran potansiyeline ve PI boyama ile hücre ölümü üzerindeki etkilerinin floresan mikroskopla gösterilmesi. 5×10^4 AsPC-1 hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekildi. 72 saat sonunda PI için 30 dak, DAPI için 10 dak ve Dioc₆ için 15 dak bekletildi. 42
- Şekil 4.7:** 48 ve 72 saat'de AsPC-1 hücre hattında doza bağlı olarak dFdc ve (ya) EBR uygulamasının PI floresan boyama ile analizinin gösterilmesi. 48 ve 72 saat dFdc ve (ya) EBR uygulandıktan sonra 1 µg/ml PI 30 dak etüvde inkübe edilir. 536-617 nm aralığında yeşil filtre ile ölü hücrelere bakılmıştır (**** P <0.0001). 42
- Şekil 4.8:** AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 ve 72 saat'de dFdc ve EBR uygulanmasının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin hücre akış sitometresinde analiz edilmesi. 1×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekim yapıldı. 48 ve 72 saat dFdc ve (ya) EBR işleminden sonra, hücrelere tripsin yardımıyla kaldırıktan sonra 1xPBS ile yıkandı. %70 etanol ile muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 43
- Şekil 4.9:** AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat dFdc ve (ya) EBR'in apoptotik proteinler üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hücrelerin yapışması bekletilir. Hücrelere 48 saat dFdc ve (ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklayıcı solüsyonu içerisinde çözülen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi. 44
- Şekil 4.10:** AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat dFdc ve (ya) EBR'in apoptotik proteinler üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hücrelerin yapışması bekletilir. Hücrelere 72 saat dFdc ve (ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklayıcı solüsyonu içerisinde çözülen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi.

İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi. 45

Şekil 4.11: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat dFdC ve (ya) EBR 'in endoplazmatik retikulum stresi üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hüclererin yapışması bekletilir. Hüclerlere 48 saat dFdC ve(ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklama solüsyonu içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntüldü. 46

Şekil 4.12: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat dFdC ve (ya) EBR 'in endoplazmatik retikulum stresi üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hüclererin yapışması bekletilir. Hüclerlere 72 saat dFdC ve(ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklama solüsyonu içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntüldü. 47

ÖZET

Pankreas kanseri pankreasta bulunan hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlamasıyla oluşan, kanser ölümleri içerisinde dördüncü sırada olan agresif bir kanser türüdür. Gempitabin (dFdC veya Gem), dioksisitidin analogu, pankreas kanseri standart terapisi olarak kabul edilmiştir. Gempitabin pankreas kanseri tedavisinin her evresinde tercih edilmesine rağmen, kemodirenç meydana gelmesi ile ilgili kullanımı limitli bir ajandır. Antikanser tedavi stratejilerinde gözlemlenen en önemli problemlerden biri kanser hücrelerinde ilaçlara karşı geliştirilen direnç mekanizmasıdır. İlaçlara karşı direnç mekanizmasının geliştirilmesinde pek çok etken bulunmaktadır. Bu etkenlerden biri, ilk olarak bitkilerde büyüme üzerindeki etkisi, son yıllarda ise kanser hücreleri üzerinde etkisi araştırılan Brassinosteroidler üyesi olan Epibrassinolid (EBR)'dir. EBR doğal bir polihidroksi steroiddir. EBR'nin kanser hücrelerinde çoğalmayı önleyici etkisine ve hücre döngüsüne etki ederek apoptoz mekanizmasını başlattığı öne sürülmüştür.

Bu araştırma kapsamında Gem ve (ya) EBR'nin pankreas kanseri hücre hattı olan AsPC-1 üzerindeki antikanser ve antiproliferatif etkileri incelemeye alınmıştır. AsPC-1 hücrelerinde mitokondri ve kaspazlara bağımlı apoptozun tetiklendiği, ayrıca dFdC ve EBR' nin kombine uygulanması hücre canlılığına sadece gempitabin uygulamasına kıyasla daha etkin ket vurduğu belirlenmiştir. Ayrıca, dFdC ve EBR'nin beraber uygulamasının sadece dFdC uygulamasına göre hücre proliferasyonu, koloni oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Daha sonraki aşamalarda dFdC ve (ya) EBR'in tetiklediği apoptozun ER stress ile ilişkisi moleküler düzeyde incelenmiş ve birçok proteinin anlamlı bir şekilde değiştiği gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, dFdC ve (ya) EBR' nin AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattındaki apoptoz ve endoplazmik retikulumla ilişkili proteinler üzerinde sağkalımda tetikleyici etkisi olduğu sonucu elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, Gempitabin, EBR, Apoptoz, ER stres.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is an aggressive form of cancer, which is formed by the uncontrolled proliferation of cells in the pancreas and ranks fourth in cancer deaths. Gemcitabine (dFdC or Gem), the analogue of dioxycitidine, has been recognized as the standard therapy for pancreatic cancer. Although gemcitabine is preferred at every stage of pancreatic cancer treatment, its use in chemo-resistance is a limited agent. One of the most important problems observed in anticancer treatment strategies is the resistance mechanism developed against drugs in cancer cells. There are many factors in the development of the drug resistance mechanism. One of these factors is Epibrassinolide (EBR), which is a member of Brassinosteroids, whose effects on growth in plants, and on cancer cells in recent years, has been investigated. EBR is a natural polyhydroxy steroid. It has been suggested that EBR initiates the mechanism of apoptosis by affecting the anti-proliferative effect and cell cycle in cancer cells.

In this study, the anticancer and antiproliferative effects of Gem and (or) EBR on AsPC-1, the pancreatic cancer cell line, were investigated. It was determined that mitochondria and caspase-dependent apoptosis were triggered in AsPC-1 cells, and the combined administration of dFdC and EBR affected cell viability more effectively than just gemcitabine. Also, co-administration of dFdC and EBR has been shown to inhibit cell proliferation, colony formation only relative to dFdC administration. In the later stages, the relationship of apoptosis induced by dFdC and (or) EBR with ER stress was investigated at the molecular level and it was shown that many proteins changed significantly. In line with the results we obtained within the scope of the thesis study, it was obtained that dFdC and (or) EBR had a trigger effect on survival on apoptosis and endoplasmic reticulum related proteins in AsPC-1 pancreatic cancer cell line.

Keywords: Pancreatic cancer, Gem, EBR, Apoptosis, ER stress.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki hücrelerin herhangi birinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasından kaynaklı olarak gitdikçe artan bir hastalıktır [1]. Kanser patolojisinde en önemli konu iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki ayrımdır. İyi huylu (benign) tümörlerin mikroçevreye yayılma özelliği yoktur. Kötü huylu (malign) tümörler ise hem normal dokuyu çevreleyen hem de lenfatik sistemler (metastaz) yoluyla vücuda yayılma yeteneğine sahiptirler [2].

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde en ölümcül malign neoplazmlardan biridir. Pankreas kanseri adenokarsinom vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturur. Birçok kanserin aksine, pankreas kanseri hem insidansta hem de mortalitede artmaktadır ve 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümün ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir [3]. GLOBOCAN 2012 tahminlerine göre, pankreas kanseri yılda 331000'den fazla ölüme neden olmaktadır ve buda tüm ölümlerin %4'ünü oluşturur. Risk faktörlerine bakıldığında, fiziksel hareketsizlik, genetik faktörler, obezite, alkol kullanımı, sigara kullanımı gibi birçok farklı sebeple ortaya çıkabilir. Dünya çapında pankreas kanseri artan yaşla ilişkilidir ve erkeklerde kadınlardan biraz daha yaygındır [4]. Amerikan Kanser Topluluğu (American Cancer Society) 2020 yılı istatistiklerine 57600 kişiye pankreas kanseri teşhisi koyulmuş ve tahminen 47050 kişinin pankreas kanserine bağlı hayatlarını kaybettiği bildirilmiştir [5]. Türkiye'de ise Türkiye Halk Sağlığı merkezinin 2018 verilerine göre erkeklerde kadınlara kıyas ile daha fazla pankreas kanseri teşhisi mevcuttur. Ülkemizde pankreas kanseri diğer kanser türlerine kıyasla daha az görülmekte, yinede yeni terapötik ajanların ve de kombin tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini geride bırakmıyor [6].

Gemsitabin (dFdC) sititoksik aktivitesi DNA sentezinin çeşitli aktivitelere dayanan, deoksitidin analogu olan antikanser nükleositidir. Gemsitabin (dFdC) hücreye taşındıktan sonra dFdCMP üretmek için deoksisitidin kinaz (dCK) ile aktif bir forma fosforile edilmektedir. Gemsitabin pankreas kanseri tedavisinin

her evresinde tercih edilen bir ilaç olmasına rağmen, hücre içi alınımı ve direnci haftalar içinde gelişen kullanımı limitli bir ajandır [7].

Brassinosteroidler (BR'ler), *Vicia faba* (bakla) tohumu ve polen dahil olmak üzere çeşitli sebzelerde bulunan steroidal bitki büyüme hormonudur [8]. Enzim aktivitesinin ve protein sentezinin düzenlenmesi, hormone dengenin sağlanması gibi birçok farklı etkileri bulunmaktadır [9]. Brassinosteroidler bitki hücrelerin membranlarında heteroligomerize reseptör halinde aktif halde bulunur. Reseptör ilişkisinin kurulması RLCK, BSK ve CDG1 aktivasyonu ile sinyal iletimi sağlanmaktadır ve sonuç olarak birçok transkripsiyon geni aktif hale gelir ve cevap genlerinin çalışması sağlanır [10].

Kanser hücreleri ile yapılan birçok çalışmada BR türevi olan 24-epibrassinolid (EBR)'in endoplazmatik retikulum stresini ve apoptoz sinyal yolağını çalıştırarak, kaspaz ailesini, Bcl-2 aile proteinlerini etkilediği gösterilmiştir [11-14].

Endoplazmik retikulum (ER) proteinlerin katlanmasını bozan, çeşitli koşullar tarafından tetiklenen hücresel bir işlemdir. Ökaryotik hücrelerin hatalı katlanmış (veya katlanmamış) proteinleri uzaklaştırmak ve ER homeostazi ve dengeyi sürdürmek hedefiyle katlanmamış protein yanıtı (UPR) adlı evrimleşmiş uyumsal korunma mekanizmasını geliştirdikleri bilinmektedir. UPR sinyal yolları arasında IRE1 α hücre kaderini düzenleyebilen bir reosta olarak işlev gören önemli bir moleküldür. IRE1 α ayrıca apoptozu destekleyen St-kin terminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK'nın aktivasyonuna neden olan Apoptotik Sinyal Kinaz-1'in (ASK1) aktivasyonunu uyarır. JNK'nin apoptozu indükleyen substratlar arasında, JNK fosforilasyonu ile inhibe edilen ve aktive edilen Bcl-2 ve Bim bulunur [15].

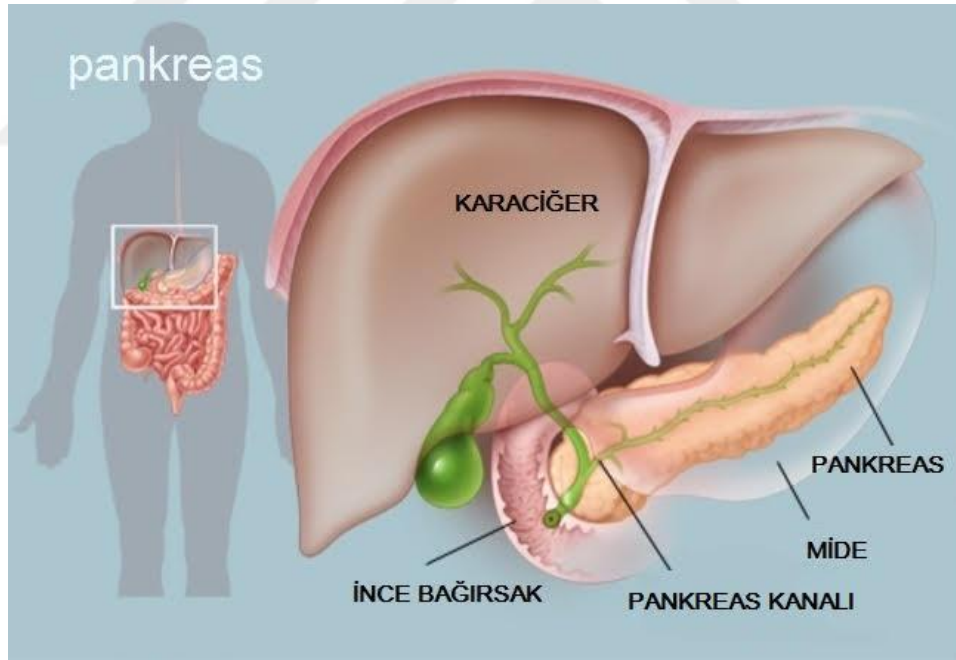
EBR ile ilgili yapılan çalışmalarda steroid reseptörlerinden bağımsız bir şekilde apoptozu tetiklediği ve DNA dizilerine aktılım gösteren deoksisitidin analogu olan dFdC'in etkisi doğrultusunda, bu çalışmada pankreas kanseri hücrelerinde dFdC ve(ya) Epibrassinolid uygulamasının apoptotik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri, karında midenin arka alt kısmında yatay olarak uzanan bir organ olan pankreasın dokularında başlar. Pankreas yetişkinlerde yaklaşık 15cm uzunluğundadır.

- Pankreasın başı karnın sağ tarafında, midenin deodenumla buluştuğu yerde.
- Pankreasın vücudu midenin arkasındadır.
- Pankreasın kuyruğu karnın sol tarafında dalağın yanındadır [5].



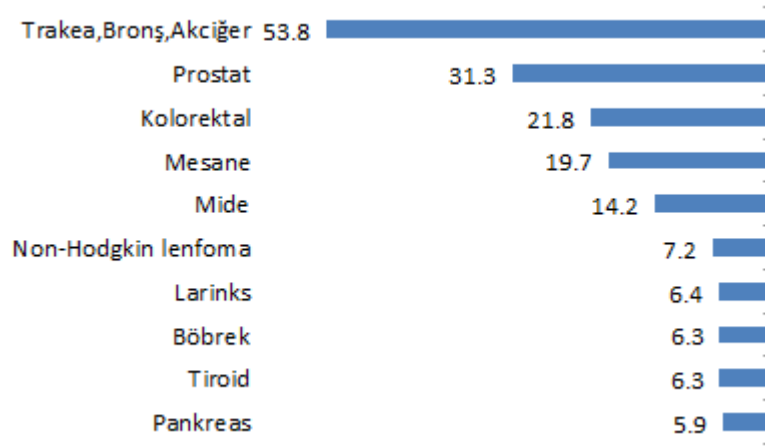
Şekil 2.1: Pankreas Anatomisi [16].

2.1.1 Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümler içerisinde yedinci sırada [17] ABD'de de ise üçüncü sırada yer almaktadır [18]. GLOBOCAN 2018 tahminlerine göre, 2018'de 459 bin yeni pankreas kanseri vakası bildirilmiş (tüm

kanserlerin %2,5) ve 2040'a kadar 355 bin yeni vakanın meydana geleceği tahmin edilmektedir. Pankreas kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı %9'dur. Pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi, dünya çapında artan yaşla ilişkilidir ve erkeklerde kadınlarla kıyasla daha yaygındır. Standart Yaş Oranı (ASR) insidansı ortalama 7,7/100 bin kişi ile Avrupa ve Kuzey Amerika' da en düşük ise 2,2/100 bin kişi oranı ile Afrika'da görülmüştür [17].

Pankreas kanseri erkeklerde 243 bin vaka (5,5/100 bin), kadınlarda ise 216 bin vaka (4/100 bin) görülmüştür. Erkeklerde pankreas kanseri görülme frekansı en fazla Orta ve Doğu Avrupa'da, özellikle Letonya ve Moldovada (15.3) görülmektedir. Kadınlarda ise pankreas kanserinin insidansının en yüksek olduğu bölgeler Batı Avrupadır (7.2). Pankreas kanseri nadiren 55 yaş altında görüldüğü için yaşlı popülyasyonların hastalığı olarak tanımlanır [19-21]. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre pankreas kanserine en sık görülen 10 kanser türünde 100 bin kişi içerisinde erkeklerde 5.9 görülmüştür. Pankreas kanserinin ülkemizde diğer kanserlerle kıyasla az görünmesi, yeni terapötik ajanların ve kombin tedavilerin geliştirilmesine engel değil, tam aksine yeni terapötik ajanlar ve kombin tedaviler geliştirilerek en sık görülen 10 kanser türü içerisinde çıkarabiliriz [6].



Şekil 2.2: Erkekler içerisinde En Sık Görülen 10 Kanser Türünün Yaşa Göre Standardize Edilmiş Şekli [6].

2.1.2 Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Şimdiye kadar pankreas kanseri için çeşitli risk faktörleri tanımlanmış ve iki kategoriye bölünmüştür: değiştirilebilir ve değiştirilmez risk faktörleri [22].

Değiştirilebilir risk faktörlerine sigara, alkol, obezite, diyet faktörleri ve toksik maddelere maruz kalmaktır [21,23-25].

Uluslararası Kanser Araştırmalar Ajansı (IARC) sigara kullanımının pankreas kanserle ilişkili olduğunu doğrulamıştır [26-27]. Risk, günlük içilen sigara sayısı ve süresi ile artar [28-30]. Pankreas kanseri ile sigara içme arasındaki bağlantıyı araştıran 82 çalışmadan elde edilen meta analiz bulgularına göre, sigara içenlerin nispi riski RR=1.74, sigarayı bırakmış kişilerin ise RR=1.2 olduğu ve riskin sigarayı bıraktıktan sonra 10 yıl devam ettiği bildirilmiştir [31-33]. 2011 yılında İngiltere'de yapılan bir çalışmada pankreas kanserinin erkeklerde %26,2'sinin kadınlarda ise %31,0'ın tütün kullanımı ile ilişkili olduğu tahmin edilmiştir [23]. Ayrıca Kanser ve Beslenme (EPIC) Avrupa Prospektif İncelenmesi çalışmasında pasif sigara içiminin bile pankreas kanseri riskinin %50 artırabildiği fark edilmiştir [33,34]. Yapılan bir çalışmada alkol-sigara kullanımının pankreas kanser riskinde bir artış olduğu (yaşa göre oran oranı (OR) = 4.04, %95 CI:1.58-10.37), sigara içenlerde ise (yaşa göre ayarlanmış OR = 2.01, %95 CI:0.50-8.18) gözlemlenmiştir [35]. Amerika Kanser Topluluğu (ACR) çalışmasında, obezite pankreas kanser insidansını ve mortalitesini arttırdığı bulunmuştur. Normal vücut indeksine sahip erkek ve kadınlar (vücut kitle indeksi BMI<25), obez (vücut kitle indeksi BMI ≥ 30) erkek ve kadınlar ile karşılaştırıldığında pankreas kanseri riski RR = 2.08 olduğu bildirilmiştir [36]. Son zamanlarda yapılan meta-analis hem genel hem de abdominal şişmanlığın pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır [37]. Pankreas kanseri üzerinde diyetin etkisi %30-50 arasında değişmektedir. Diyet öğeleri arasında ise kırmızı ve işlenmiş et gibi [4] bazı besinlerin riski arttırdığı, bazı besinlerin ise örneğin meyve ve sebze [4] gibi besinlerin riski azalttığı ileri sürülmüştür [22, 38,39].

Değiştirilemeyen risk faktörlerine cinsiyet, yaş, etnik köken, genetik faktörler, kan grubu aittir.

Pankreas kanseri erkeklerde yüksek alkol alımı, sigara kullanımından dolayı daha fazla görünmektedir. Pankreas kanseri insidansı dünya üzerinde bakıldığında erkekler için 100.000' de 5.5, kadınlar için 100.000'de 4.0'dır [17]. Gözetim, Epidemiyoloji ve Sonuçları (SEER) Kanser İstatistikleri incelemesi zamanı pankreas kanserinin ağırlıklı olarak daha yaşlı bir popülasyonun bir hastalığı olduğu ve hastaların çoğunun 50 yaşın üzerinde olduğu belirtilmiştir

[19]. Pankreas kanseri gelişme riski yaşla birlikte artar. En yüksek 60-80 yaş arası, nadiren 40 yaş altında ortaya çıkar ve ortalama yaş 71'dir [17,40,41]. Pankreas kanserinde ırklar arasındaki farklılıklar birçok çalışmada gösterilmiştir [42,43]. Pankreas kanseri insidans oranları Afro-Amerikalılar için yüksek, Asyalı-Amerikalılar ve Pasifik Adalarında en düşüktür [44]. Genel olarak, pankreas kanseri, siyahi insanlarda diğer ırk gruplarına kıyasla daha fazladır ve bu diyet, alkol, sigara gibi risk faktörlerine bağlanabilir [45]. Pankreas kanseri riskinin artmasında genetik varyasyon veya mutasyon önemli bir rol oynar [46]. Pankreas kanseri olan hastaların %10'da gen varyasyonları vardır [47]. Meme kanseri 1 geni (BRCA1), Meme kanseri 2 geni (BRCA2), BRCA2'nin Ortağı ve Yerelleştiricisi (PALB2), Ataksi Telenjiektazi Mutasyona Uğramış Gen (ATM), Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (CDKN2A), Adenomatöz Polipozis Gen (APC), Postmayotik Segrasyon Artışı 2 (PMS2), Katyonik Tripsinojen Gen (PRSS1) ve Serin / Treonin Kinaz 11 (STK11) gibi kalıtsal pankreas kanseri formlarında rol oynadığı tespit edilmiştir [48,49]. Ayrıca, pankreas kanseri polipoz olmayan kolon kanseri (Lynch sendromu), Peutz-Jeghers sendromu, kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromu gibi bazı ailesel kanser sendromlarıyla ilişkilidir. BRCA2 gen mutasyonu ailesel pankreas kanseri olan ailelerin %5-17'de, PALB2 ailesel pankreas kanseri hastaların %3'de tanımlanmıştır. STK11 Jeghers sendromlu hastalarda görülür [48, 50-55]. Wolpin ve ark. [56] ABD Hemşire Sağlık Çalışması ve Sağlık Uzmanları Takip çalışmasındaki verileri birleştirmiş ve kan grubu O olan hastalarla, kan grubu A olan hastaları karşılaştırdığında pankreas kanserinin gelişme riski daha yüksek olduğu görülmüştür [66].

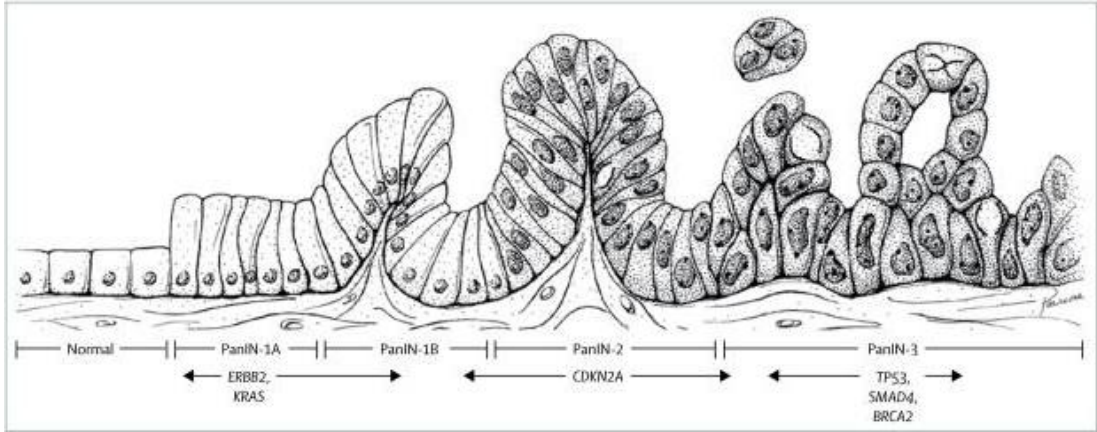
2.1.3 Pankreas Kanseri Moleküler Mekanizması

Genetik analizler, pankreas kanseri olan hastaların mutasyona uğramış genlerinde KRAS (%90), TP53, CDKN2A ve SMAD4 (%50-80) olmak üzere dört ana onkogen olduğunu ortaya koymuştur [57,65]. Patolojik sonuçlar, en sık görülen pankreas kanseri tipinin pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) olduğunu göstermiştir. Pankreatik duktal adenokarsinom pankreatik intraepitelyal yoluyla gelişir ve yol boyunca genetik ve epigenetik değişiklikler elde edilir. PanIN, pankreasın invaziv adenokarsinomunun en yaygın neoplazmatik öncüsü olarak

bilinmektedir. Düşük dereceli PanIN 1 artan yaşla yaygındır, yüksek dereceli PanIN 3 ise genellikle invaziv kanserli pankreatada bulunur [67].

PDAC'de KRAS aşağı yönlü regülasyon yolağında Raf/Mek/Erk, PI3k/Pdk1/Akt ve Ral guanin nükleotid değişim faktörü gibi başlıca 3 önemli yolak tanımlanmaktadır, ancak kodon 12'de gelişen çoğunlukla nokta mutasyonlar sonucu KRAS'da meydana gelen dönüşümle birlikte KRAS proteinin kurucu aktivasyonu ve neticede aşağı yönlü yolağın sürekli uyarılmasına yol açmaktadır [58,59]. Ayrıca, KRAS pankreatik intraepitelyal neoplazmlarda (PanIN'ler) bulunur ve bu, KRAS mutasyonunun pankreatik tümör oluşumundaki ilkin değişikliklerden biri olduğunu göstermektedir [60]. Üç majör tümör baskılayıcı gen olan CDKN2A, TP53 ve SMAD4 PDAC'dasıklıkla mutasyona uğramış olarak tanımlanmış ve bunlar tümörün malign davranışı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. CDKN2A'daki değişiklikler düşük dereceli PanIN'lerin bir alt grubundaki protein fonksiyon kaybının erken olaylarıdır. TP53ve SMAD4 ekspresyonundaki değişikliklerse yüksek dereceli PanIN'lerde meydana gelen geç olaylardır [61].

SMAD4, transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) akıntı yönünde bir sinyal transdüksiyon proteinini kodlar. TGF- β , Smad 2/3'ten aktive edici sinyale yanıt olarak, TGF- β reseptör substratları fosforile edilerek, Smad 4 ile ilişkilendirilir ve çekirdeğe yerleşir ve buda DNA ile etkileşerek gen ekspresyonunu düzenler. PDAC'larda, SMAD4'ün inaktivasyonu veya kaybı nedeniyle, SMAD4'ten bağımsız TGF- β sinyal yolları tetiklenir ve bu da hücre döngüsünün durmasına, apoptozunun azalmasına, epitelyal-mezenkimal geçişin, anjiyogenezin, immün supresyonunun indüklenmesine yol açar ve buda kanser hücrelerinin ilerlemesine ve metastazına neden olur. Ek olarak, TGF- β 'ın aşırı ekspresyonu, PDAC tümör oluşumunda rol oynayan Ras / Erk, P13K / Akt, p38 MAPK ve NF- κ B yollarını aktive eder [62]. Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra, G proteine bağlı reseptör ailesinin üyesi olan GPRC5A, normal dokularla karşılaştırıldığında pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini desteklediği birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, GPRC5A'nın nakledilmesi gemsitabin kemoterapisine duyarlı pankreas kanserlerini hassaslaştırmış ve bu da GPRC5A'nın kemoterapi etkinliğini artırma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir [63-65].



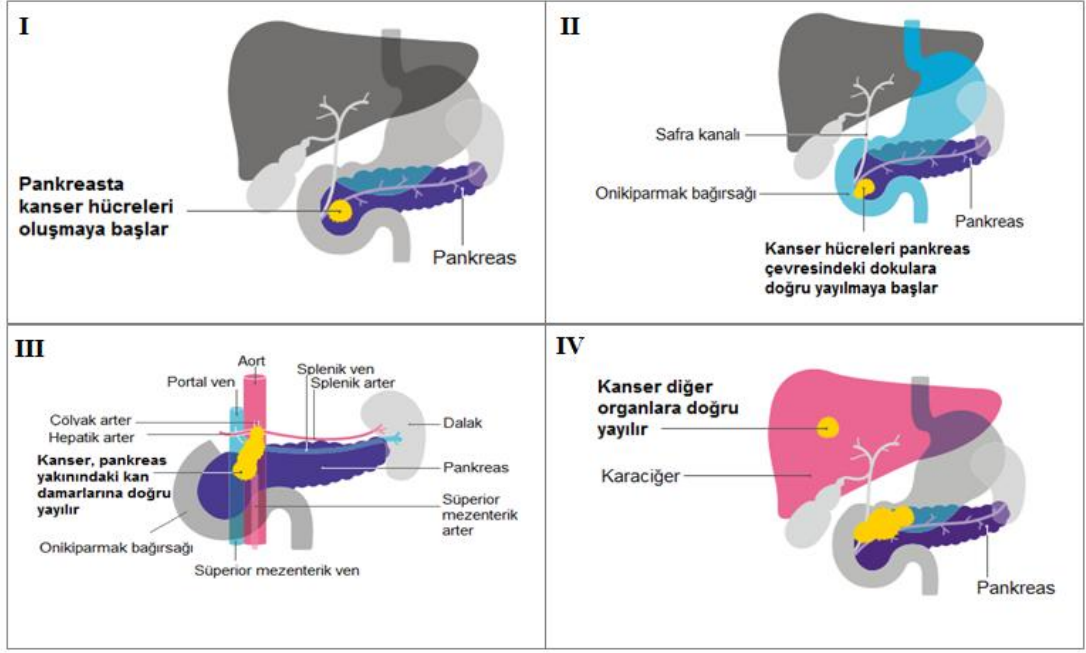
Şekil 2.3: Genetik değişiklikler gösteren PanIN ilerleme modeli [72].

2.1.4 Pankreas Kanseri Evreleri

Pankreas kanserinde şimdiye kadar erken tanı odağı, preinvaziv lezyonları (yaklaşık 1 cm) tespit etmek olmuştur. Tarama testi olarak, karın ultrasonografisi, trifazik pankreas protokolü BT, endoskopik ultrason eşliğinde ince iğne aspirasyonu EUS (duyarlılığın yaklaşık %80 olduğu bildirilmektedir), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), kan testi sık kullanılmaktadır. Ayrıca, pankreas kanserinde erken tanı için önem taşımaktadır. CAPS2 çalışmasında (Pankreas Kanseri Taraması 2) taranan hastaların %10'unda EUS ile intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar saptanmıştır [67,68]. Lakin, pankreas kanseri çoğunlukla ileri bir aşamada teşhis edilir ve hastaların %80-90'ında tanı anında anlaşılmayan tümörler vardır. Bunun sebebi, pankreas kanseri klinik olarak sessizdir, semptomlar olan çoğu insanda ileri bir hastalık (örnek: kolanjit, gastrit) vardır. Semptomlar: karın ağrısı, sarılık, kaşıntı, koyu renkli idrar, akik dışkı, kilo kaybı, hazımsızlık, bulantı ve az yagın olan depresyondur [69].

Pankreas kanseri tanısı koyulduktan sonraki adım, evrelemedir. Pankreas kanseri evrelenmesinde en yaygın sistem Amerika Kanser Ortak Komitesidir (AJCC) [68]. Pankreas kanseri I-IV arasında evrelendirilir ve tedavi evreye uygun olarak belirlenir.

Bu evrelerden I. Kanser pankreasın dışına yayılmamıştır. II. Kanser pankreasın dışına çıkarak dokulara, organlara ve lenf düğümlerine sıçramıştır. III. Kanser pankreasın etrafında yer alan kan damarlarına yayılmıştır. IV. Kanser karaciğere ve diğer uzak organlara yayılmaya başlamıştır [70].



Şekil 2.4: Pankreas kanseri evreleri [70].

2.1.5 Pankreas Kanseri Tedavi Stratejileri

Pankreas kanseri tedavi yöntemleri cerrahi müdahale (rezeksiyon), radyoterapi ve kemoterapi tedavisidir. Cerrahi rezeksiyon adjuvan ortamında kemoterapi ilavesi ile sağkalım oranının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, neoadjuvan ortamında, kemo-radyoterapi uygulamasıyla sağkalımın daha fazla olduğu da gösterilmiştir. Cerrahi rezeksiyon zamanı R1 rezeksiyonlarına kıyasla anlamlı derecede iyileşmiş bir sağkalım ile ilişkili R0 rezeksiyonu elde edilir. Küratif amaçlı pankreatik rezeksiyon uygulanan bireylere adjuvan tedavi önerilmektedir. Genellikle hastalar ameliyattan kurtulduktan sonra verilir (1-2 ay).

Adjuvan tedaviye başlamadan önce taban BT taramaları ve CA19-9 konsantrasyonları elde edilmelidir. Adjuvan kemoterapi, CONKO-001 çalışması ile desteklenmiştir. Bu çalışma, beş yıllık sağkalım %20,7'ye karşı %10,4 ve on yıllık sağkalım %12,2'ye karşı 7.7 ve böylelikle sağkalım 20'den 23'e yükseldi.

Neoadjuvan tedavi ile hastalığı hızla ilerleyen hastalar tespit edebilir ve bu cerrahi rezeksiyondan yararlanamayanları seçmeye yardımcı olabilir. Neoadjuvan tedavisi, mikro-metastazların ve primer tümörün büzülmesinin ortadan kaldırır. Radyoterapi cerrahi müdahaleden önce veya sonra

uygulanmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi birlikte uygulanmaktadır [66,68].

Tedavi yöntemi kanserin evresine bağlıdır. I – II evrede olan hastalara cerrahi tedavi, adjuvan tedavi kullanılabılır ve tümörü küçültmek ve olası metastazları önlemek amacı ile, kombine tedavilerde kullanılabılır. Pankreas kanseri II evrede olan hastaların beş yıllık hayatta kalma oranı %30'dur. III evrede rezektabl kanserli olan hastalara neoadjuvan, kemoterapi ve kemo-radyoterapi tedavi uygulanmaktadır. Bu hastaların büyük çoğunluğu sonradan metastatik hastalık geliştirir. Pankreas kanseri III evrede olan hastaların beş yıllık hayatta kalma oranı %3-12'dir. IV evrede iyi durumda olan hastalara sistemik tedavi uygulanabilir ve genel durumu kötü olan hastalara ise destek tedavisi verilmelidir. Pankreas kanseri IV evrede olan hastaların beş yıllık sağkalım oranı %3'dür [44,66,68,71].

İlaç tedavileri ve kombine tedaviler içinde ilk sıralarda gemsitabin ilacı vardır. Gemsitabin ilacı ile birçok çalışma vardır. Örneğin, 2011 yılında I-II faz için, gemsitabin metastatik pankreas kanseri olan hastalar için birinci basamak olan nab-paklitaksel ile birleştirildiğinde etkili sonuçlar elde edilmiştir. III faz için, tek gemsitabin ve gemsitabin artı erlotinib kullanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme göstermiştir [68].

2.2 Gemsitabin

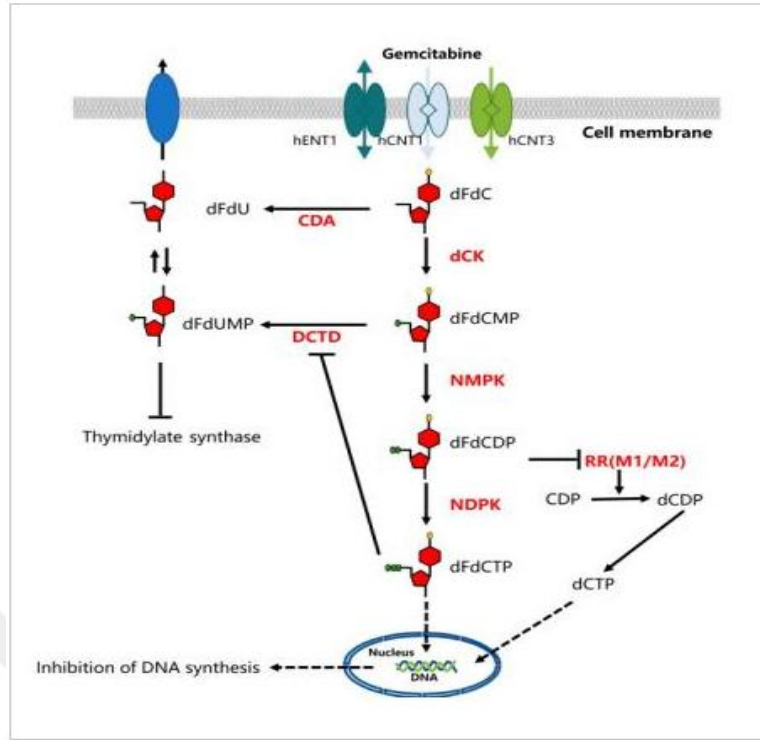
DFdC olarak bilinen Gemsitabin (2',2'-difloro-2'deoksisitidin) pankreas kanseri tedavisinde kullanılan etkili ilaçlardan biridir. Gemsitabin DNA sentezinin inhibasyona bağımlı olan deoksitimidinin nükleosid analogudur [73].

DFdC proliferasyonu inhibe ederek, hücre döngüsünü G1/S fazında bloke eder. DFdC alımından sonra, hücre içi fosforilasyon gerekir ve bu çeşitli enzimler tarafından yönetilir [74]. Bu hidrofilik molekül, sodyum bağımlı (konsantrasyon bağımlı nükleosid taşıyıcı hCNT'ler) ve sodyumdan bağımsız (dengeleyici nükleosid taşıyıcı hENT'ler) taşıyıcılar çeşitli insan nükleosit taşıyıcıları (NT'ler) yoluyla hücrelere taşınabilir. Nükleositlerin hücrelere tek yönlü taşınmasına hCNT'ler, DFdC'nin hücre içi alımına hENT1 aracılık eder [73,75].



Şekil 2.5: Gemcitabinin moleküler formülü ve yapısı [77].

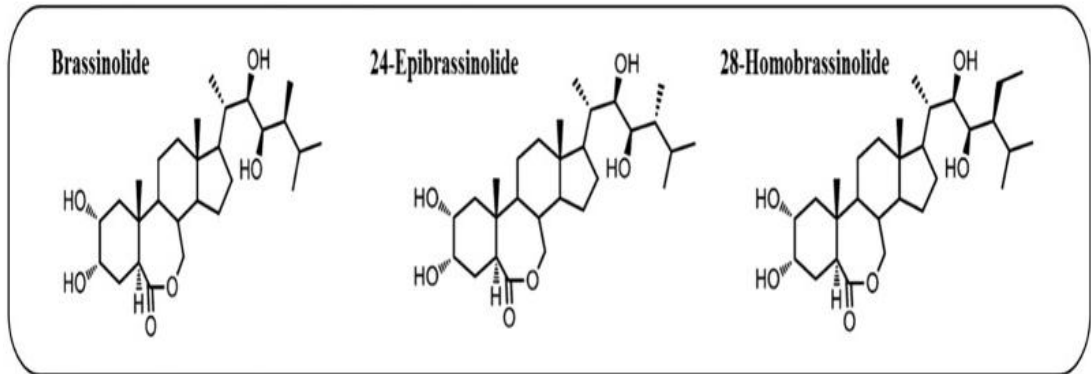
Nükleosit taşıyıcıların hücre zarlarına kompleks hücre transformasyonu (dFdCDP), difosfat (dFdCdo) için trifosfata (dFdCDP) akması sonrasında, deoksisitidin kinaz (dCK) ile gemcitabin monofosfatına (dFdCMP) fosforile edildi. DFdC'in sitotoksik aktivitesi, DNA sentezi üzerindeki çeşitli etkilerin sonucu olabilir. DFdCTP, DNA polimeraz inhibitörü olarak deoksisitidin trifosfat (dCTP) ile rekabet ederek DNA sentezi için gerekli olan deoksiribonükleotit havuzların tükenmesine yol açar. DFdCTP DNA'ya dâhil edilir ve başka nükleotidin daha eklenmesinden sonra, DNA ipliği sonlandırılır. Bu işlem, "maskeli zincir sonlandırma"sı adlandırılır. Bu işlem, dFdCTP'yi DNA onarım enzimlerinden gizler ve gemcitabini DNA'ya kilitleyerek DNA onarım mekanizmasının başarısızlığına yol açar [73]. DFdC, kendi aktivasyonunu geliştirmek için "kendi kendine güçlendirme" adlı mekanizmaya sahiptir ki, bu mekanizma çok az antikanser ilacında vardır [74]. Bu mekanizma, gemcitabin metabolitlerinin bakımını uzatır, rekabetçi doğallığı azaltır ve böylelikle, DNA'ya başarılı bir şekilde dahil olma olasılığını artırır. Gemcitabin metaboliti dFdCDP ribonükleotit redüktazı (RR) inhibe ederek, DNA sentezi için gerekli rakip deoksiribonükleotit havuzlarını azaltır [76-79].



Şekil 2.6: Gemcitabinin etki mekanizması [77].

2.3 Brassinosteroidler

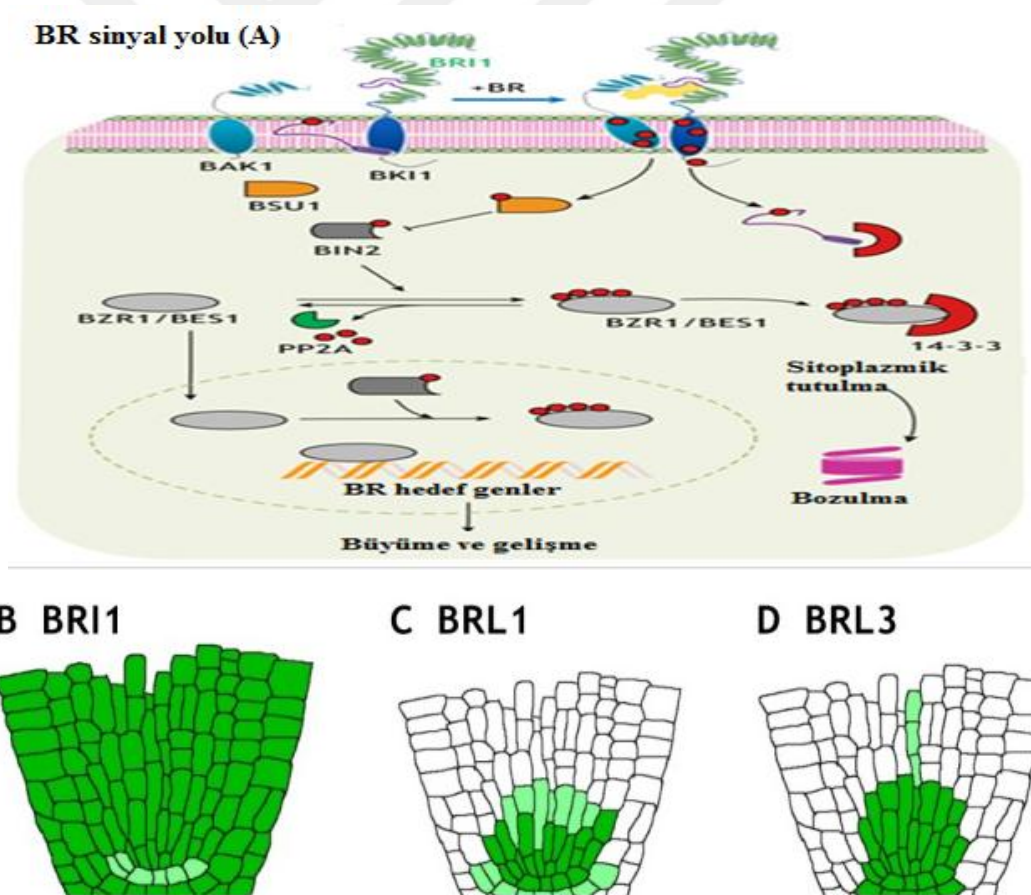
Brassinosteroidler (BR) bitki büyümesini uyarmada, bitkileri biyotik ve abiyotik streslere karşı korumada yüksek aktivite gösteren, bitkiye özgü polihidroksillenmiş steroid hormonlardır. BR'ler ilkin olarak, *Brassica napus* poleninde kök uzaması ve hücre bölünmesi işlevsel olarak nitelendirilmiştir [9]. Yaklaşık 60 farklı çeşit tanımlanmış olup, bunlardan sadece üçü (-brassinolide, 24-epibrassinolide-28 homobrassinolide) yaygındır [80-82].



Şekil 2.7: Üç yaygın brassinosteroidin yapısı [80].

Brassinosteroid metabolizması steroidal iskelette ki yapısal değişimler ve yan zincirde ki yapısal değişimler olmak üzere 2 ana kategoride incelenebilmektedir. *Arabidopsis thaliana*'da yapılan genetik çalışmalar, BR biyosentezinin aydınlatılmasına, sinyal bileşenlerinin tanımlanmasına yol açmıştır. BR'lerin biyosentezinin potansiyel olarak her bitki organında meydana geldiği ve bitki hormonlarının aksine BR'lerin uzun mesafeli nakıl yapmadığı bildirilmiştir [82-85].

Arabidopsis thaliana'da 400'den fazla reseptör kinaz olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında, BR / BRI1 sinyal yolu en iyi karakterize edilmiştir [9]. BR yokluğunda BIN2, BZR1 ve BES1 proteinlerini fosforile eder, 14-3-3 proteinlerine bağlanmasını teşvik ederek etkisiz hale getirir ve sıtoplazmanın tutulmasına ve bozulmasına yol açar. BRI1 BR moleküllerini algıladığında, BAK1 ile heterodimerize olur ve BZR1, BES1 fosforile olur.



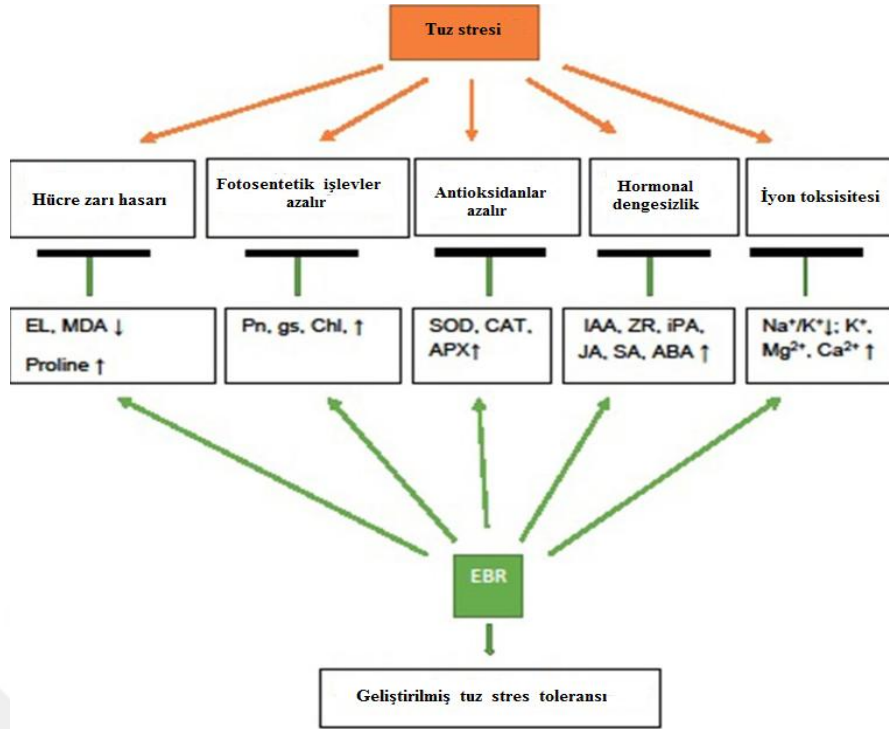
Şekil 2.8: BR sinyal yoluna genel bakış. (A) BRI1 sinyal yolunun şeması. (B) BRI1 kök boyunca eksprese edilmiş hali. BRI1 (C) ve BRI3 (D) kök hücrenin niş bölgesinde ekspresyon edilmiş hali. Koyu yeşil proteinin yüksek ekspresyonunu, açık yeşil proteinin düşük ekspresyonunu temsil etmektedir [81].

2.3.1 Epibrassinolid

Brassinosteroidlerin biyolojik olarak aktif bir bileşeni olan Epibrassinolid (EBR) bitki metabolizması ve büyümesi üzerinde yüksek etkiye sahip oldukları bilinmektedir [86]. Bir başka çalışmada, ekzojen EBR uygulamasının, antioksidan sistemi güçlendirip, membran stabilitesini arttırarak, ozmolit metabolizmasını düzenleyerek, streslerin zararlı etkilerinden kaçına bilirligi gösterilmiştir [87]. 24 EBR tarafından düzenlenen binlerce gen bitki proliferasyonu ve gelişmesine katılmaktadır. Ekzojen EBR uygulamaları çeşitli fizyolojik süreçleri etkileyebilir ve düşük sıcaklıklar, ağır metaller ve kuraklık stresi gibi farklı stres türlerine karşı bitki toleransını arttırabilmektedir.

Bitki stres yanıtlarında EBR'nin fonksiyonel mekanizmaları çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Isı şoku proteini ve soğuğa duyarlı genler de dahil olmak üzere stres işaretleyici genlerin ekspresyonu ile gözlemlenen korelasyonla gösterildiği gibi, stres tolerans enzimlerinin aktivitesini arttırıp, ısı, soğuk, kuraklık ve tuzluluk dahil streslere toleransı yükseltmektedir.

Ekzojen EBR regülasyonlu endojen absisik asit önemli bir bitki hormonudur ve birikimi, bitkilerin farklı türlerde stresleri uyarlaması için gerekli olan aşağı akım yanıtlarının kontrolünde anahtar bir faktördür. Sitokin düzeylerindeki artışlar, hücre bölünmesi, kloroplast gelişimi, tohum çimlenmesi, yaprak yaşlanması, besin mobilizasyonu, gen ekspresyon regülasyonu ve stres koşulları altında etilen biyosentezi dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci arttırmaktadır. Fitohormonların düzenlenmesi bitki büyümesi için çok önemlidir ve her bir hormon stres toleransının uyarılmasında dinamik bir rol oynar. EBR, bitki antioksidan savunma sistemini geliştirip güçlendirerek bitki toleransını arttırır [88-90].



Şekil 2.9: EBR'in uzun ömürlü tuz stres tolerans olası mekanizması. Ekzojen EBR, hücre zarı bütünlüğünü ve stabilizasyonunu geliştirebilmektedir [90].

2.3.2 Epibrassinolid Kanser Hücrelerindeki Etkisi

Uzun süredir bitkilerdeki etkileri araştırılan EBR nin birçok farklı kanser türünde farklı kanser yolları üzerinde ki etkisi de bilinmektedir. İlk defa 2008 yılında Malikova ve arkadaşları [91] tarafından EBR' in farklı kanser hücre hatlarında çoğalmayı önlemesi ve hücre döngüsüne etki ederek apoptotik cevap oluşturduğu belirlenmiştir. 2010 yılında Steigerova ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada, EBR' in steroid kökenli ajan olması nedeni ile, EBR' in apoptotik etkisinin, çoğalmaları hücre içi steroid reseptörleri ile tetiklenen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, ER anlatımı olmayan MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu saptanmış ve EBR' in steroid reseptörlerini bloke ederek, transkripsiyon faktörü gibi davranmalarına ket vura bileceğini ileri sürmüşlerdir [92].

Bir sonraki çalışmada, EBR' nin steroid reseptörü AR anlatımı yapan LNCaP hücreleri ve AR anlatımı bulunmayan DU145 hücre hattında, etkin bir şekilde apoptotik hücre ölümü görülmüştür. Sonuç olarak, PA katabolizmasının EBR için önemli bir moleküler hedef olduğu gösterilmiştir [11]. HCT116 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarında EBR'in sağkalım sinyal molekülleri üzerindeki

potansiyel apoptotik etkisi araştırılmıştır ve EBR'nin PI3K ve MAPK yollarını aktifleştirerek, FoxO3a bağımlı mitokondriyal strese bağlı apoptozu gerçekleştirdiği görülmüştür [13]. Obakan ve arkadaşları tarafından EBR'nin moleküler hedeflerinin anlaşılabilmesi için proteomik analiz SILAC tekniği belirlenmiştir. Toplamda 964 benzersiz protein tanımlanmış ve bunlardan 160'ı 12 saatlik EBR tedavisinden sonra farklı şekilde eksprese edilmiştir. Farklı şekillerde eksprese edilen proteinlerin miktar tayininde katlanmamış protein cevabının (UPR), şaperon proteinin ve kalretikulin (CALR) önemli ölçüde düştüğü ortaya çıkmıştır [93].

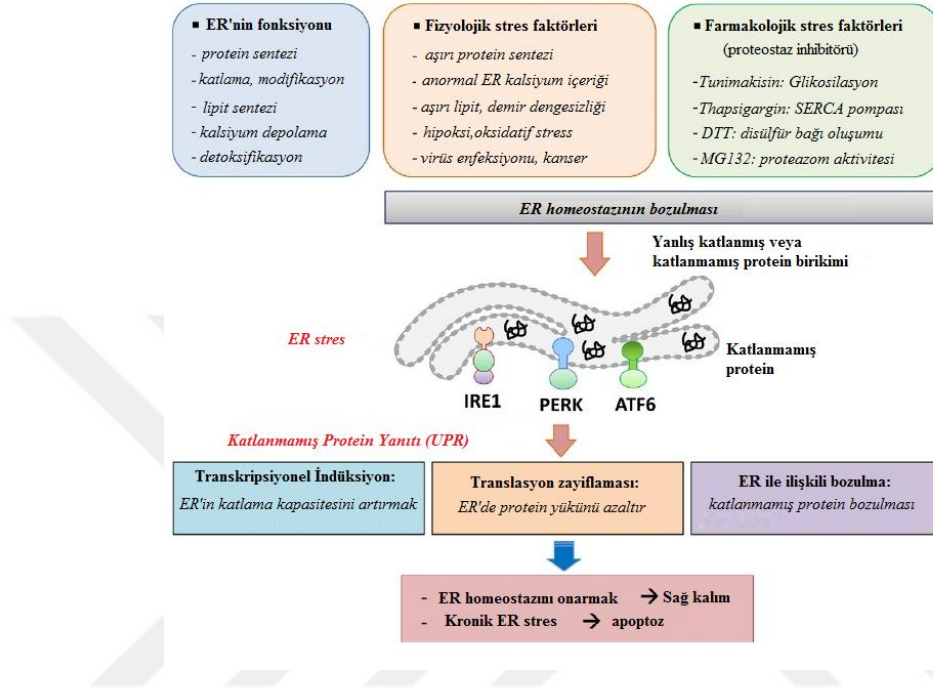
Son Hücre Kültüründe Amino-Asitler Tarafından Kararlı İzotop Etiketleme (SILAC) verileri, EBR tedavisinden sonra önemli ölçüde değiştirilmiş olan proteinin kalretikulin (CALR) olduğunu göstermiştir. Endoplazmatik retikulum (ER) lümeninde yerleşen bir şaperon olan CALR, Ca²⁺ iyonlarının korunmasında ve protein katlanmasında görev almaktadır. CALR'ın değişime uğraması ER stresine ve katlanmamış protein cevabına paralel olarak, apoptozun indüklenmesine sebep ola bilir [12].

2.4 Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER) protein katlanması, olgunlaşması, hücrel homeostazın korunması dahil, birçok hücrel fonksiyonlardan sorumlu organeldir. ER ortamında biokimyasal, fizyolojik ve patolojik uyaranlar nedeniyle oluşan rahatsızlıklar katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimi, kalsiyum tükenmesi, DNA hasarına neden olur. Böylelikle, homeostazı geri yükleyen veya hücre ölümünü aktive eden katlanmamış protein tepkisi (UPR) tetiklenir. UPR hücreleri stresten korur ve hücrel homeostazın yeniden oluşmasında katkıda bulunur. Bununla birlikte, UPR aktivasyonu uzun süreli ER stresi sırasında hücre ölümünü artırır [94].

Bu yolları kontrol eden proteinler normalde, ER membranında Lümen ve sitoplazmaya bakacak şekilde konumlanmış ER lümenine Bakan bölgelerinde Grp78/ bağlayıcı immüoglobulin proteinine (BiP) bağlı şekilde durmaktadırlar [95].

Bip tarafından Lümende katlanamamış veya yanlış katlanmış proteinler işaretlenir ve UPR işlemi aktiveleşir. Bu işlemde, inositol-gereksinimi duyan protein 1 α (IRE1 α), protein kinaz RNA (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktör 6 (ATF6) olmak üzere üç ER stres transmembran proteinleri rol oynamaktadır [96].

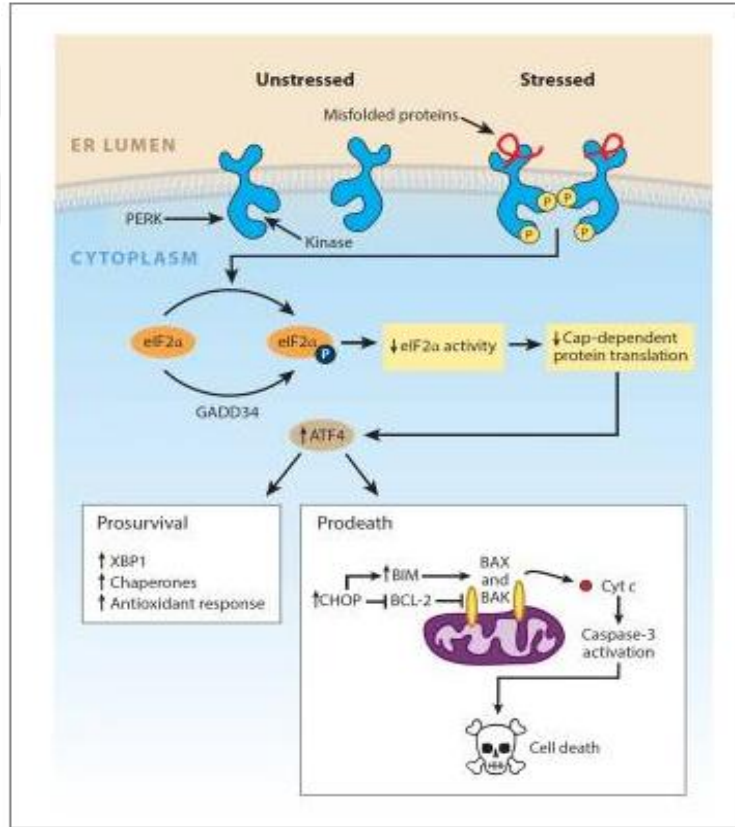


Şekil 2.10: ER stres ve katlanmamış protein yanıtı [97].

2.4.1 PERK

PERK, N-terminali stres algılama alanına ve Ser/ Thr kinaz alanına sahip translasyonu yavaşlatan tip I transmembran proteindir. Başlıca Grp78'in çıkarılması üzerine PERK, Serine 51'de ökaryotik çeviri başlatma faktörü 2'nin (eIF2a) α -alt birimini fosforile ederek, genel translasyon aktivitesinin azalmasına protein çevirisinin genel inhibisyonuna yol açar [97]. ER protein alımının azalması ve eIF2a fosforilasyonu global protein sentezinin azalmasına rağmen, UPR'nin spesifik transkripsiyonel programlarını kontrol eden aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4) çevirisini indükler [98]. ATF4, DNA hasarı ile indüklenebilir transkript 3'ün C / EBP homolog proteinin (CHOP) büyümesinin durması ve DNA hasarıyla indüklenebilir 34 (GADD34) ile etkinleştirmektedir [99]. GADD34, protein fosfataz 1 (PP1) ile birleşerek, protein sentezini geri kazanmak için eIF2a'nın fosforilasyonunu teşvik eder. CHOP ölüm reseptörü 5 (DR5) ER stres aynı kaldığı zaman apoptozu indükler [100].

Ayrıca PERK, NRF2-KEAP1 kompleksini bozarak NRF2'yi fosforile ederek aktifleştirir. NRF2 ve ATF4, UPR ile uyarılan protein katlanması sırasında artan oksidasyon / indirgeme reaksiyonları nedeniyle reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artışı önleyen antioksidan genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. UPR'nin üçüncü dalı olan ATF6 transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna, Golgi organelindeki SP1 ve SP2 proteazları ile iki farklı bölgeden kesilir. Kesilmiş ATF6 şaperonları, ERAD ve XBP1 ile ilişkili olan birçok farklı gen bölgesinin ekspresyonunu regüle eder. ER strese bağlı bu 3 önemli yolak zamanından aslı olmadan stresin boyutuna göre aktifleşmektedir [101]. ER stres kaynaklı oluşan UPR iki farklı faza ayrılabilir: ilki hücre canlılığının korunması ve ER homeostazının geri getirilmesidir, ikinci fazsa geri dönüşümsüz ER stres koşulları ile başlatılarak hücre ölümüyle sonuçlanır [96,102-104].

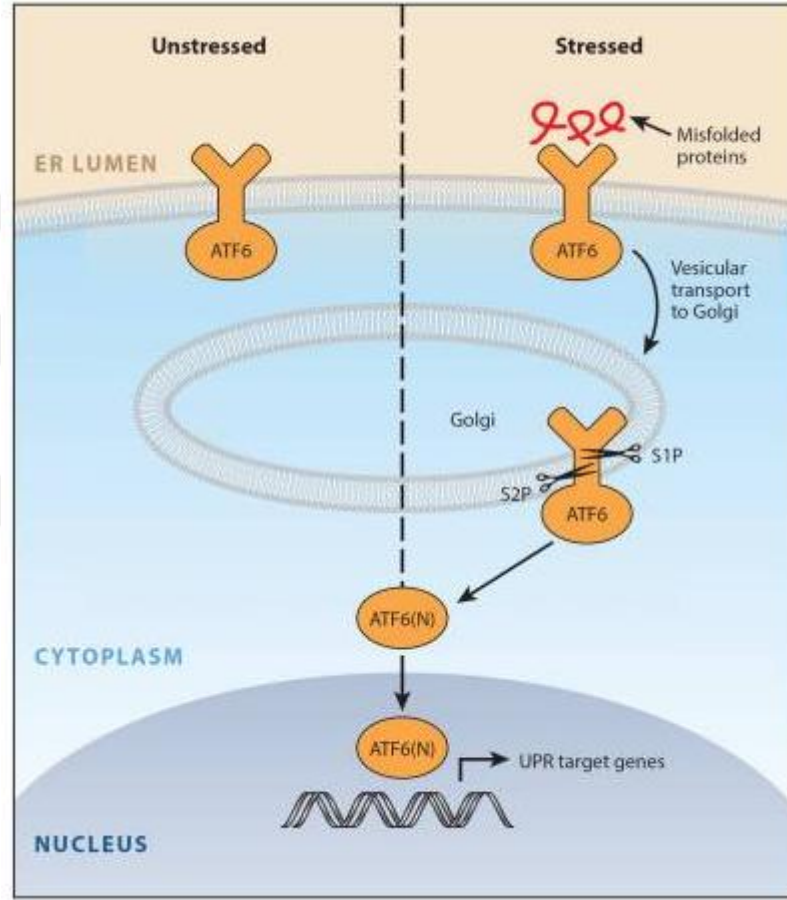


Şekil 2.11: Katlanmamış protein cevabının PERK kolu [105].

2.4.2 ATF6

ATF6 ER lümeninde stres algılama alanı içeren II transmembran proteindir [106]. Hücre içerisinde ER stresin olmadığı durumlarda, ATF6 Grp78 ile birlikte inaktif formda yer almaktadır. Katlanmaya yardımcı olmak amacıyla stres

durumunda Grp78 lümene gönderilirken, ATF6 ER stres koşulları altında Golgi aparatına taşınır. ATF6(N), burada öncelikle site 1 (S1P) proteaza, daha sonra site 2 (S2P) protezla kırılarak nukleusa göç eder [97]. ATF6, ERAD ve XBP1 ile ilgili birçok farklı gen bölgesini aktive etmek için, ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır [107]. Böylelikle, Grp78, Grp94 gibi şaperonların ekspresyonu artar ve sonuç olarak, proteinlerin sentezi çoğalarak strese karşı korunma mekanizması aktifleşir [101].

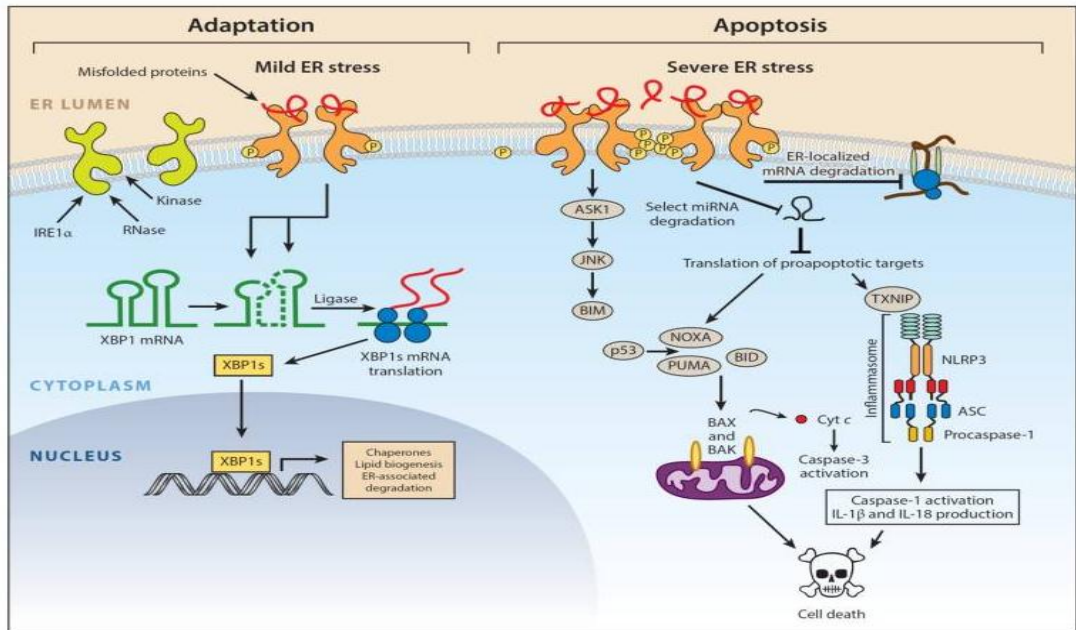


Şekil 2.12: Katlanmamış protein cevabının ATF6 kolu [105].

2.4.3 IRE1 α

IRE1 iki izoformu (IRE1 α , IRE1 β) olan, hem endoribonükleaz (RNAaz) domaine hem de serin / treonin (Ser/ Thr) kinaz domainine sahip çift enzimatik aktiviteli transmembran proteinidir [105]. IRE1 α çoğunluğu hücre ve dokularda, IRE1 β öncelikle gastrointestinal sistemin epitel hücrelerinde eksprese edilmektedir [97]. ER stresin başlaması ile IRE1 α , Grp78den ayrılarak, otoposforillenir. IRE1 α fosforilasyonu RNAaz'ın aktivasyonuna yol açar ve XBP'yi (X-box bağlayıcı

protein) kırarak oluşturan XBP1'i translasyona uğratarak transkripsiyon faktörüne dönüştürür [108]. XBP1 ER protein katlanmasını, ERAD ve lipid sentezini artırır [109]. IRE1 α selektif olarak mRNA degradasyonuna sağlayarak ER'de biriken protein miktarını azaltır. IRE1 α oligomerizasyonu TXNIP (tioredoksin ile etkileşen protein) pro-oksidan proteinleri dahil olmak üzere, bir takım proenflamatuar proteinlerin aktivasyonu gösterilmiştir [105]. IRE1 α 'nın sürekli oligomerizasyonu ASK1 (Apoptotik sinyal kinaz) aktivasyonu ile yolağın devamında bulunan Jun-N terminal kinaz (JNK) ve p38-MAPK aktivasyonuna sebep olarak ile apoptozu başlatmak yönünde etki etmektedir. JNK proapoptotik BIM 'i aktive ettiği ve antiapoptotik BCL-2 'i inhibe ettiği bildirilmiştir [110]. P38-MAPK fosforlanmaya bağlı aktivasyonu ile CHOP proteini aktive olarak, Bim ve DR5 proteinlerinde artışa ve Bcl-2 proteinlerinde ki azalmaya sebep olur [105].



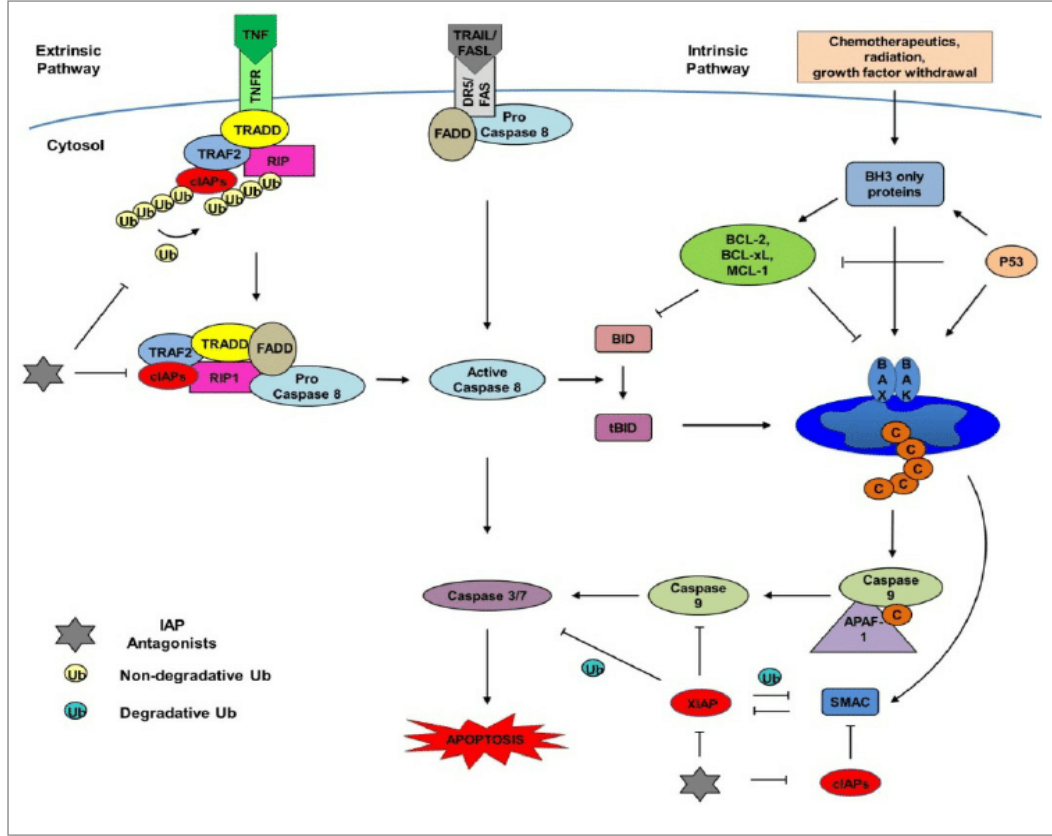
Şekil 2.13: Katlanmamış protein cevabının IRE1 α kolu [105].

2.5 Apoptotik Hücre Ölümü

Apoptoz ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından nekrozdaki farklı olarak gerçekleşen I tip programlanmış hücre ölümü olarak bilinen ve hücre ölümünü kontrol eden bir işlem olduğu tanımlanmıştır [111]. A-poe-to-sis kelimesi Yunancada ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelmektedir. Apoptoz fizyolojik olarak “programlı” hücre ölümü normal doku

gelişiminde görülebildiği gibi, kalsiyum girişi, sitotoksik ajanlar, enfeksiyon gibi hücrel stres ve hasara yol açabilen durumlar tarafından da tetiklenebilmektedir [112-115].

Apoptozun memeli hücrelerde oluşan mekanizmalar hakkında ilk olarak nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi ilgili meydana gelen programlanmış hücre ölümü araştırılmasında gösterilmiştir. Bu organizmalarda 1030 somatik hücreden 131 tanesinde apoptoz geçirdiği görülmüştür [116]. Omurgalılarda doğru gelişim ve kanser oluşumunun önlenmesinde de apoptoz büyük önem arz etmektedir. Bu sistemde önemli role sahip birçok protein mevcuttur. Nekrozla kıyasla apoptoz aktif bir işlem olduğu için enerji gerekmektedir. Apoptozun aktivleşmesi iki farklı yoldan meydana gelir. Bunlardan ilki mitokondri aracılı olan iç yoldur. Bu yolak mitokondri membranında bulunan porlar genişlenerek sitoplazmaya dağılır ve böylelikle, apoptozom kompleksi oluşur. Sistein-aspartik proteaz (kaspaz) aktivasyonu ile hücrelerin degrades olunması, ölüme hazırlanması ve çevredeki dokularda stress ortamının korunması sağlanmaktadır. İkinci yolak, hücre membranı aracılığı olan dış yoldur. İçsel yolak hem proapoptoz hemde antiapoptoz proteinlerine sahiptir. Sinyal regülasyonu Bcl-2 protein ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir [117].

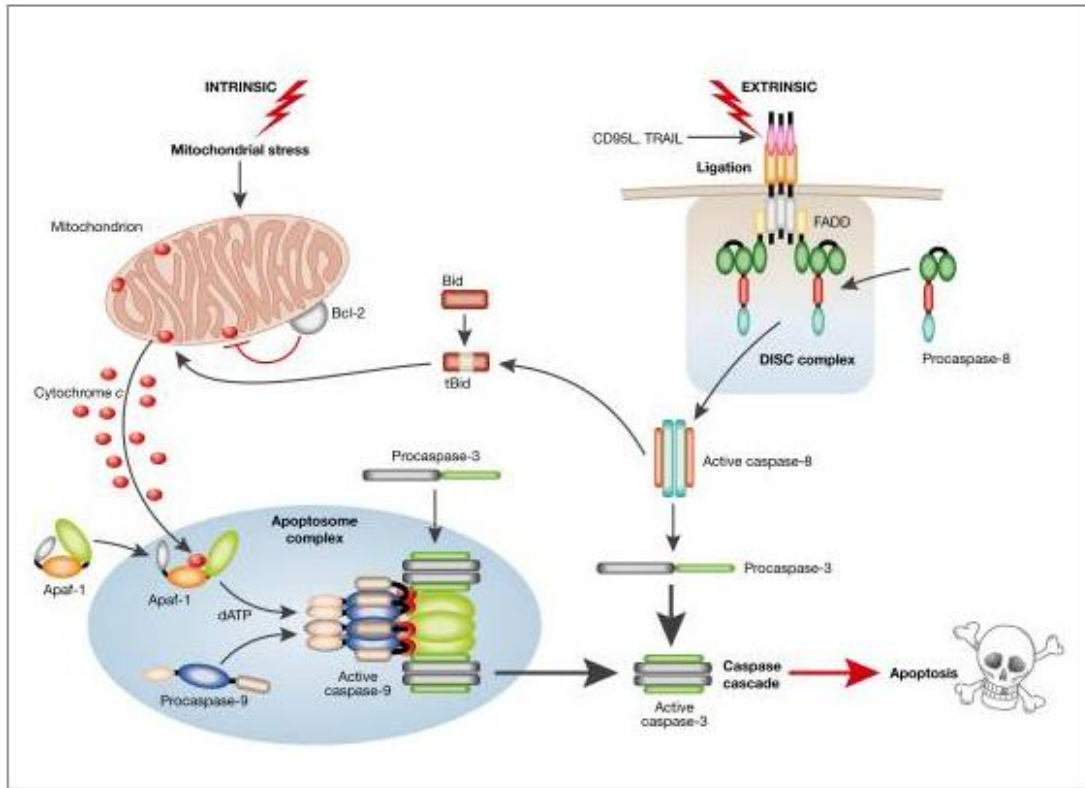


Şekil 2.14: Apoptozun moleküler mekanizması [118].

2.5.1 Kaspazlar

Apoptozun ana efektörleri olan kaspaz ailesi, büyük ölçüde hücre ölümünü ve enflamasyonun kontrol rollerinden bilinen proteolitik enzimler olup, sistein bölgelerini katalitik bölge olarak kullanır ve hedef proteinlerin aspartik asit bölgelerinin yanından spesifik kesim yaparlar [119]. Hücre ölümündeki kaspazların işlevi, ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ın çalışmasındaki *ced-3*'ün keşfi ile tanımlandı [120]. İlk memeli olarak *ced-3* homologu olmak üzere, toplamda 14 kaspaz tanımlanmıştır. Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2,8,9,10), etkili kaspazlar (kaspaz-3,6,9) ve inflamatuvar kaspazlar olmak üzere üç grupta incelenmiştir. Başlatıcı kaspazlar hücreye iç (mitokondri) ya da dış (hücre zarı) yolaktan gelen sinyallerle ölüm sinyallerin başlatılmasından ve etkili kaspazların aktivasyonunu sağlamaktadırlar [121]. İçsel apoptoz yolağındaki 2 ve 9 ile belirlenen başlatıcı kaspazlar, hücre aracılı apoptoz yolağında 8 ve 10'un etkin olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, apoptozom kompleksi kaspaz 9 kesilerek aktive edilmektedir. Apaf-1 (Apoptoz proteaz aktive edici faktör) kaspaz 9'u apoptozom kompleksine N-terminal kaspaz aktivasyon çağırıcısı dolen

(CARD) yardımı ile çağırır [122]. Dimer yapıda olan Kaspaz 9 içsel apoptoz yolağında çok yaygındır. Buna karşılık Kaspaz 2'nin apoptotik cevaba bağlı DNA hasarı için gerekli olduğu da ispatlanmıştır. Kaspaz 2 aktivasyonunun, Apaf-1 proteinlerinden bağımsız şekilde CARD proteinlerden de daha ağır kompleks yapıda olan proteinlerle interaksiyonu sonrasında oluşmuştur. İmmune sistem, hücre aracılı apoptoz yolağındaki Kaspaz 8 ve kaspaz 10'u aktive ederek, istenmeyen hücrelerin programlanmış hücre ölümüne gitmesini sağlamaktadır. Bu yolağın başlangıcı FAS (CD95) ligasyonu ile ilişkilidir ve bu ligasyonun olması durumunda Fas reseptörü hücre yüzeyinde mikroagregatlar oluşturur [123]. Bu durum FADD (Fas ile ilişkili ölüm domeinine sahip protein)'in, N-terminal ölüm efektör domen (DEDs) vasıtasıyla Kaspaz 8'i çağırmasını ve ölüm başlatıcı sinyal kompleks (DISC)'inde aktivleşmesini sağlar. Kaspaz 10 kaspaz 8 ile aynı görevi görür, hatta bazen kaspaz 8'in yerine geçer. Kaspaz 3 ve kaspaz 7 sonlandırıcı kaspazlardan olarak inaktif ve dimer yapıdadırlar. Kısıtlı proteolizis ile aktifleşen bu proteinler domenler arası linkler bölgesinden başlatıcı kaspazlar vasıtasıyla kesilirler [124].

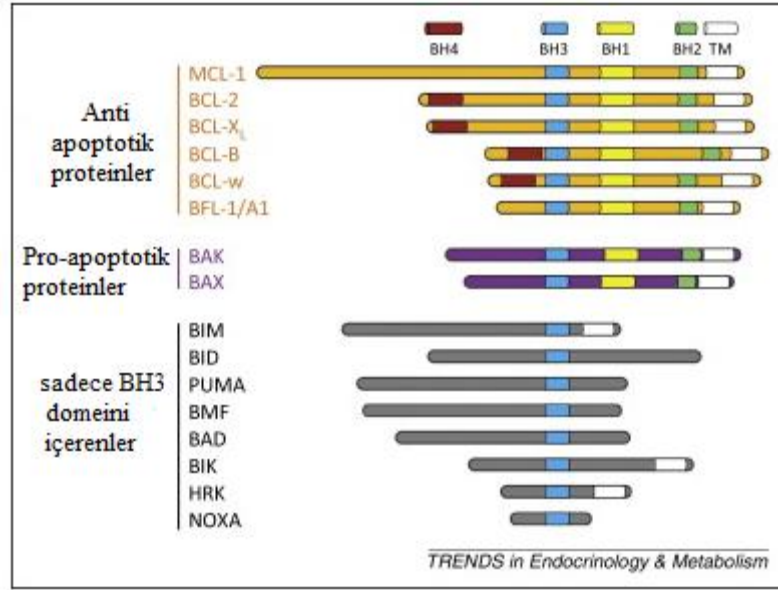


Şekil 2.15: Apoptoz: Kaspaz aktivasyonuna giden 'dış' ve 'iç' yolaklar [125].

2.5.2 BCL-2 ailesi

Bcl-2 (B-hücre lenfoma 2) protein ailesi, apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Bcl-2 protein ailesi vasıtasıyla, hücreye dış ya da iç kaynaklı ölüm sinyallerin var olup olmadığı tespit edilir [117]. Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki birbirine zıt gruba bölünmektedir [126]. Bütün Bcl-2 proteinleri dış mitokondriyal zar üzerinde bulunur. Bu proteinler, gözeneklerin oluşturulması yoluyla membran geçirgenliğinden sorumludurlar. Pro-apoptotik proteinler apoptozu indüklerken, anti-apoptotik proteinler apoptozu baskılar. Bcl-2 homologik bölgeleri (BH) tarafından, bu farklı etkilere sahip proteinlerin işlevleri düzenlenmektedir. Dört tane BH bölgesi (BH1, BH2, BH3, BH4) vardır. Bcl-2 ailesi proteinleri BH1, BH2, BH3 bölgeleri ile diğer Bcl-2 ailesi proteinlerinin BH3 bölgelerine bağlanmasıyla iletişim kurmaktadır. Pro-apoptotik protein ailesi BH1, BH2, BH3 bölgelerini taşıyan (Bak, Bax) ve sadece BH3 bölgesini (Bid, Bad, Bim) taşıyanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi sadece BH4 bölgesini taşıyan (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-w) proteinlere sahiptir [127].

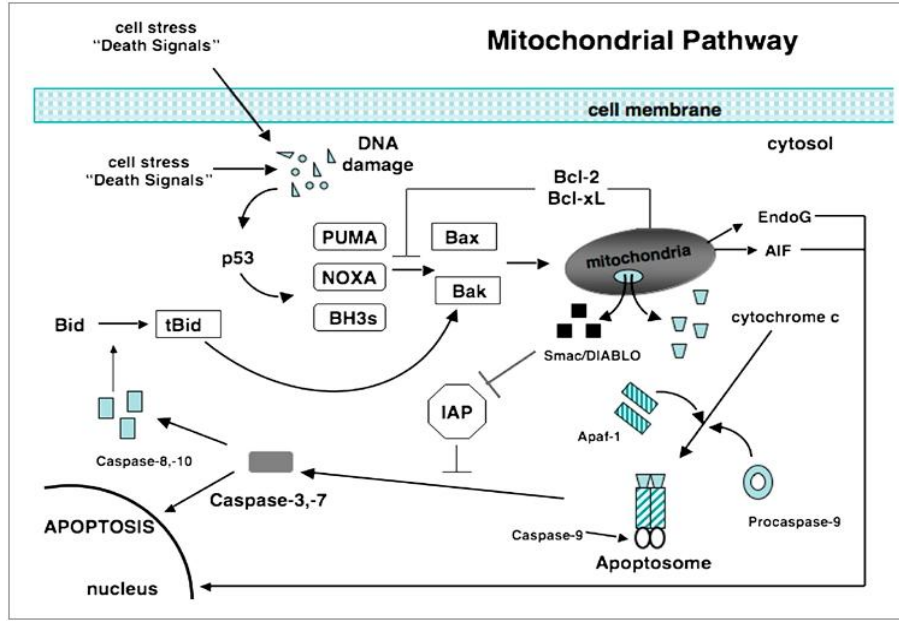
Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler vasıtasıyla hücre sağkalımı ve ölümü arasındaki denge oluşmaktadır. BH3 domeini içeren proteinler vasıtasıyla apoptoz başlatılır. Apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi moleküllerin salınımı ve mitokondri membran potansiyelinin bozulması ile mitokondriyel apoptotik başlatıcı sinyal sitokrom c gerçekleşir [128]. Pro-apoptotik proteinler olan, Bak ve Bax proteinleri por oluşturarak mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına etki ederken, anti-apoptotik proteinler bu porların açılmasına engel olurlar [129].



Şekil 2.16: Bcl-2 ailesi üyeleri [130].

2.5.3 İçsel Apoptoz Yolağı

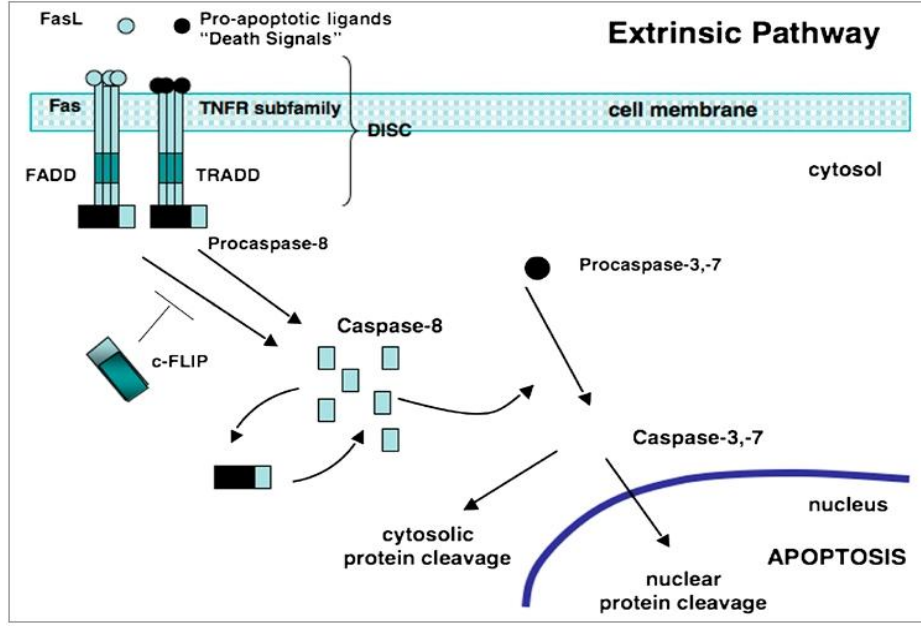
İçsel apoptoz yolağı, mitokondrinin çift katlı membran yapısının bozulması ile başlatılır. Mitokondri dış zar potansiyelinin bozulması pro-apoptotik ve anti-apoptotik B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi arasındaki denge ile sağlanmaktadır [128]. Anti-apoptotik proteinler hücre içine gelen ölüm sinyali ile inaktif hale gelerek Bax, Bad, Bim proteinlerinin dış zarda meydana getirdikleri por yapısı ile mitokondri membran bütünlüğünü bozar [131]. Böylelikle, sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), ikincil mitokondriyel türevli kaspaz/direkt apoptoz inhibitör bağlayıcı protein (Smac/DIABLO) gibi faktörlerin sitoplazmaya salınmasını sağlar [132]. AIF, sitoplazmadan direk nükleusa girerek endonükleaz G'nin aktif hale getirir ve DNA parçalanmasına ve periferik nükleotik kromatin yoğunlaşmasına sebep olur [133]. Apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G kaspazdan bağımsız bir şekilde çalışmaktadırlar. Mitokondriden salınan sitokrom c önce inaktif monomer halinde olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) 'e bağlanır ve daha sonra kaspaz 9'a bağlanarak "apoptozom" kompleksini oluşturur. Apoptozom içerisinde prokaspazlarla oligomerik şekilde duran kaspaz 9'un katalitik aktivitesi iki bin kat artar [134]. Kaspaz 9 aynı zamanda diğer etkili kaspazların (kaspaz 3,7) proteolitik yıkımını sağlayarak onları da aktive eder. Sonuç olarak, kromatin kondensasyonu bozulur ve DNA fragmentleri meydana gelerek hücre apoptoza gider [135,136].



Şekil 2.17: İçsel apoptoz yolağı mekanizması [128].

2.5.4 Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı

Apoptotik hücre ölümü, hücre dış yüzeyinde yer alan ölüm reseptörlerine bir ölüm ligandının bağlanmasıyla başlatılır [117]. Bu hücreler tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine dahildir. Bu ailenin en iyi karakterize edilmiş reseptörlerinden olan Fas reseptörü, tip 1 membran protein olarak 3 sistein zengin domen içermektedir. Trimerik yapıda olan ve sitotoksik T lenfositlerinin membranlarında lokalize olan Fas yaklaşık 80 ölüm domeni barındırır. Reseptör aracılı apoptoz yolağı, Fas ve ligandı birleştiği andan itibaren aktif hale gelir [137]. Aktif hale gelen Fas, adaptor protein olan FADD'a bağlanarak DISC (ölüm tetikleyici sinyal kompleksi)'ni oluşturur [128]. DISC pro-kaspaz 8'e ölüm efektör domeninden bağlanarak, monomerik yapıdan dimerize hale getirir ve komşu dimer yapılarını keserek serbestleşmesini sağlar. Böylelikle, kaspaz 8 aktif hale gelir ve diğer efektör kaspazlarında aktivleştirir [138]. Kaspaz 8 aktif hale geldiğinde, apoptozun yürütme aşaması tetiklenir. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz, FADD ve kaspaz 8'e bağlanarak, cFLIP adlı bir proteinle onları etkisiz hale getirir. cFLIP katalitik aktivitesi olmayan, pro-kaspaz 8 benzeri bir proteindir [139,140].



Şekil 2.18: Reseptör Aracılı Apoptoz yolağı mekanizması [128].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERYALLER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ek-1'de yer almaktadır.

3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ek-2'de yer almaktadır.

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullandığımız kimyasallar Ek-3'de yer almaktadır.

3.1.4 Kullanılan Tamponlar

10 X TBS hazırlanması

88 gr - NaCl

12,11gr - Tris-Baz çözülerek, pH:8'e ayarlanır ve dH₂O ile 1000 ml'e tamamlanır.

1 X TBS hazırlanması

500 µl - 10 X TBS

500 ml - dH₂O

1 X TBS-Tween hazırlanması

100 ml - 10 X TBS

500 µl - Tween20

dH₂O

10 X PBS hazırlanması

80gr - NaCl

2 gr - KCl

14.4 gr - Na₂HPO₄

2.4 gr - KH₂PO₄

800 ml - dH₂O çözülerek pH:7,4'e ayarlanır ve 1000 ml'e tamamlanır.

1 X PBS hazırlanması

100 µl - 10X PBS

900 ml - dH₂O

Besiyeri hazırlanması

450 ml- negatif besiyer

50 ml- FBS

5 ml- Penisilin Streptomisin (10.000 U/ml)

0.22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek falkonlara süzülür.

Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması

9 ml- filtre edilmiş Fetal sığır serumu (FBS)

1 ml- dimetilsülfoksit (DMSO)

0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilir

-20°C'de saklanır.

Hücre Lizis Tamponu (CLB)

10ml- M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent

1 tablet - Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli

1 tablet - Roche® proteaz inhibitör kokteyli

+4°C'de saklanır.

5 X Laemmler Tamponu

2,0 ml - 1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8)

0,5 ml - Bromofenol mavisi (%1(ağırlık/hacim))

5,0 ml - Gliserol

2,5 ml - β-merkaptoetanol

2,0 gr - Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄)

-20°C'de saklanır.

Bradford Reagent

100 mg- Coomassie Brilliant Blue (C₄₇H₅₀N₃O₇S₂)

50 ml- %95 etanol'le (C₂H₅OH)

100 ml- %85 Fosforik asit; 1 L tamamlanarak filtrekağıdı ile süzülür.

Coumaric Acid (C.A)

0,15 gr- P-coumaric Acid

10 ml- DMSO

-20°C' de saklanır.

Protein Standardı (Bovine Serum Albumin = BSA)

0,015 gr- Albumin Bovine Serum

10 ml - dH₂O ile çözülerek, 0,22 µM por çapındaki filtrelerden süzülür.

%10 Amonyum persulfat tamponu (APS)

100 mg - Ammoniumpersulfate

1 ml - dH₂O

Luminol

0,44 gr - Luminol (C₈H₇N₃O₂)

10 ml - Dimetilsülfoksit (DMSO, (CH₃)₂SO)

SDS (100 ml)

10,0 gr - Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄)

100 ml - Distile su (dH₂O)

1.5 Molar Tris-Baz Çözeltisinin hazırlanması

90,8 gr - Tris-baz (C₄H₁₁NO₃)

500 ml - Distile su (dH₂O)

pH 8,8'e ayarlanır ve çözelti 1 L'ye tamamlanır.

0.5 Molar Tris-Baz Çözeltisinin hazırlanması

30,25 gr - Tris-baz (C₄H₁₁NO₃)

500 ml - Distile su (dH₂O)

pH 6,8'e ayarlanır ve çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır.

Harsh Strip Buffer

200 ml %10'luk SDS

125 ml Tris-HCl (pH=6,8)

8 ml β-merkapt etanol

675 ml dH₂O

Mild Strip Buffer

15 gr glisin

1 gr SDS

10 ml Tween-20

800 ml dH₂O çözülür, pH:2,2'ye ayarlanarak ve 1 L'e tamamlanır.

Yürütme tamponu

30,3 gr Tris-Baz

114 gr Glisin

10 gr SDS

1000 ml dH₂O

Hazırlanan 10X Yürütme Tamponu, jel yürütme esnasında kullanılmak üzere 1X'e dönüştürülür.

Transfer tamponu

200 ml 10X yürütme tampon

100 ml metanol

1000 ml' e dH₂O ile tamamlanır.

Yürütme jelinin hazırlanması

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için %12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütülür. Jel içeriği Ekler Bölümünde Tablo 4' te sunulmuştur.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü Hazırlama

AsPC-1 hücresi Amerikan Doku ve Hücre Kültürü Koleksiyonu (ATCC)'den temin edilmiştir. AsPC-1 pankreas kanseri hücreleri RPMI besiyerinde %10 sığır fetüs serumu (FCS) ve 10U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri 0,22 µM por çapına sahip hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır. Uygulanacak deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun %90' na ulaşması sonucunda hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Pasajlama işlemi için ilk önce ortamdan besiyeri uzaklaştırılır. 25 mm²'lik hücre kültürü petrisi 1 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. Petri kabı içerisine 1 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) eklenerek 37°C CO₂ içeren etüvde 5 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 1 ml RPMI besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuştur.

Hücreler santrifüj tüpüne alınarak 2000 rpm'de 5 dakikada santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1ml taze RPMI besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu homojen bir hale getirilmiştir. Böylelikle, hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometre de 25 karede sayılan hücre sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10^4 ile çarpılmıştır. 1×10^6 hücre, 25 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Hücre canlılığının belirlenmesi

AsPC-1 pankreas kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca hücrelerin petriye yapışması için beklenmiştir. EBR (0-50 µM) ve (ya) dFdC uygulaması doza bağlı olarak 24,48,72 saat boyunca uygulanmıştır. 10 µl MTT her kuyucuğa eklenmiş ve 4 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerimizde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin yüzeyinde birikir. Bu süre sonunda MTT ayırıcı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekilmiş ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiştir ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Mikroplaka okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm' de absorbans ölçümü ile okutulmuştur.

EBR (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD), firmasından temin edilmiş ve 5mM stok konsantrasyon olacak şekilde DMSO ile hazırlanmıştır. Gemsitabin (Sigma-Aldrich, Seri/Katalog no: G6423).

3.2.3 Floresans Boyama

3,3'-diheksilkarboksisiyanin iyodür (DiOC₆)

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere GEM (veya) EBR 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır 1 nM DiOC₆ (ana stok: 4 mM) 15 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda 525'de nm mavi filtre ile mikroskopla çekilerek canlı hücreler belirlenmiştir.

Propidyum iyodür (PI) Boyama

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere GEM (veya) EBR 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa $1 \mu\text{g/ml}$ PI (anastok: 50 mg/ml) uygulanarak 30 dakika etüvde inkübe edildikten sonra 536-617nm aralığında yeşil filtre ile ölü hücelere bakılmıştır.

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

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücelere GEM (veya) EBR 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa $1 \mu\text{l/ml}$ DAPI uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten 570nm'de mavi filtrede DNA kırıklarına bakılmıştır

3.2.4 Hücre Sağkalım Tayini

DFdC ve(ya) EBR'nin hücreler üzerindeki sitostatik etkisi değerlendirilmiştir. 12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edildikten sonra hücelere $100 \mu\text{M}$ Gem, $30 \mu\text{M}$ EBR ve $100 \mu\text{M}$ Gem+ $30 \mu\text{M}$ EBR dozları 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulanmıştır. Hücreler $500 \mu\text{M}$ 1xPBS yıkanır ve $250 \mu\text{M}$ tripsin ile toplanarak 2000 rpm ' de 5 dakika boyunca santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Hücre pelleti $100 \mu\text{l}$ 1xPBS ve $1 \mu\text{l}$ 0.4% (w/v) Tripan Mavisini boyası ile karıştırıldıktan sonra bu karışımdan $10 \mu\text{l}$ çekilerek Neubauer hemositometre ile sayım yapılmıştır.

3.2.5 Yara İyileşme Yöntemi

AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde yara iyileşme potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücreler ilaçlanır $200 \mu\text{l}$ ' lik steril pipet ucu ile petri kabında bir yara oluşturulur. 0, 24, 48, 72 saat boyunca yara uzunluğunun değişimi ölçülmüştür.

3.2.6 Koloni Oluşum Testi

Gem ve(ya) EBR'nin hücrelerdeki metastatik etkisini ve hücreler tek başına bırakıldığında nasıl davrandıklarını belirlemek için koloni oluşum testi yapılmıştır. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edildikten sonra hücrelere 48 ve 72 saatde ilaç uygulanmıştır, sonra ilaçlı medya çekilip atılarak ilaçsız medya ile değiştirildikten sonra hücrelerin büyümesi incelenmiştir. 14 günün sonunda hücreler metanol asetik asit (3:1) ile 5 dk muamele edilerek fikse edilmiştir. Hücreler 0,5 ml %0,5' lik kristal viyole ile 20 dk muamele edildikten sonra yıkanmıştır ve morfolojik görüntüler trans UV ile çekilmiştir.

3.2.7 Hücre Akış Sitometresinde Propidyum İyodür (PI) analizi

Gem ve(ya) EBR'nin hücre döngüsü üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometresi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra, uygun ilaç dozlarında ilaçlama yapılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra %70 soğuk etanol ile muamele edilip fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fikse edilen hücreler 1-2 hafta boyunca -20°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etanol uzaklaştırılarak 1ml 1X PBS içerisinde $1 \mu\text{l}$ PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama yapılmıştır. Hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildikten sonra akış sitometresi aletinde okutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 Total Protein İzolasyonu

100 mm' lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 37°C ' de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücrelere hücrelere GEM ve(ya) EBR 48 ve 72 saat hücrelere uygulanmıştır. İlk olarak, kontrol hücresi hariç, ilaçlı hücrelerin medyası toplanarak 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Daha sonra, hücreler 1XPBS ile toplanarak 2 dakika 13200 rpm' de çöktürülmüştür. Aynı şekilde, bu işlemde petrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu (CLB) eklenmiştir. Örnekler 20 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 20 dk 13200

rpm de +4 °C' de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni Ependorf tüpüne alınarak -20°C veya -80°C'ye saklamak üzere kaldırılmıştır.

3.2.9 Bradford Protein Miktar Tayini

Protein miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 µg/ µl olan Bovine Serum Albumin (BSA), artan miktarda kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. 96 kuyucuklu petrilere her örnekten 1 µl konulmuş, üzerine 200 µl Bradford solüsyonu ilave edilmiş ve 10 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 1,5 µg/ µl, 3 µg/ µl, 4,5 µg/ µl, 6 µg/ µl BSA'nın 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş ve elde edilen proteinlerden aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans / konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.10 İmmunoblotlama Yöntemi

3.2.10.1 Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için laemmlı tamponu (5x) ve 30 µg protein örnekleri 1:5 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika tutulur. Tablo 4'te verilen miktarlara göre %4 yükleme ve %12' lik ayırma SDS PAGE hazırlanır ve proteinler bu jel sistemine yüklenir. Jel sisteminde ilk kuyucuk daima protein belirteç ile birlikte 70-80V/ 3-4 saat aralığında yürütme tamponunda yürütülür.

3.2.10.2 Membrana Transfer ve Bloklama

SDS-PAGE sonrası, ilk olarak yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılır. Ayırma jeli boyutunda kesilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar jellerin altına koyulur. Daha sonra, membran ve jellerin her iki tarafına transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıtları yerleştirilir. Jel, membran ve filtre kağıtları kasetlere yerleştirilerek 90 dak. 350 miliamperde transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 1 saat oda sıcaklığına, %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1 X TBS) içerisinde bekletilerek bloklama işlemi yapılır.

3.2.10.3 Primer ve Seconder Antikor İşaretlemeleri

Süt tozu içerisinde alınan membranlar, primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilir. Birincil antikorlar %5' lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween20

içeren 1xTBS) içinde aşağıda belirtilen dilüsyonlarda uygulanır: PARP, kesilmiş PARP, kaspaz 9, Bak, Bim, Bid, Beta Actin. Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:1000 aralığında çalışılmıştır. Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 10-15'er dakika boyunca 3 kez TBS-Tween ile yıkanır. Yıkamanın ardından, membranlar anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyunca +4°C sıcaklıkta bekletilir. İkincil antikor uygulamasının ardından 10-15 dakika olmak üzere 3 kez TBS-Tween ve 10 dakika TBS yıkaması sonrasında örnekler kemiluminisans tamponu (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 2 dakika muamele edilir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenir.

3.2.10.4 Blotların Görüntülenmesi

Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, röntgen kasetleri içerisine streç filmle sarılarak yerleştirilir. Membranların üzerine röntgen filmleri yerleştirilerek elde edilen kemiluminisansın filmi yakması sağlanır. Geliştirici ve sabitleyici çözeltileri ile istenilen görüntü elde edilinceye kadar yıkanarak, en son filmler suda yıkanarak kurumaya bırakılır.

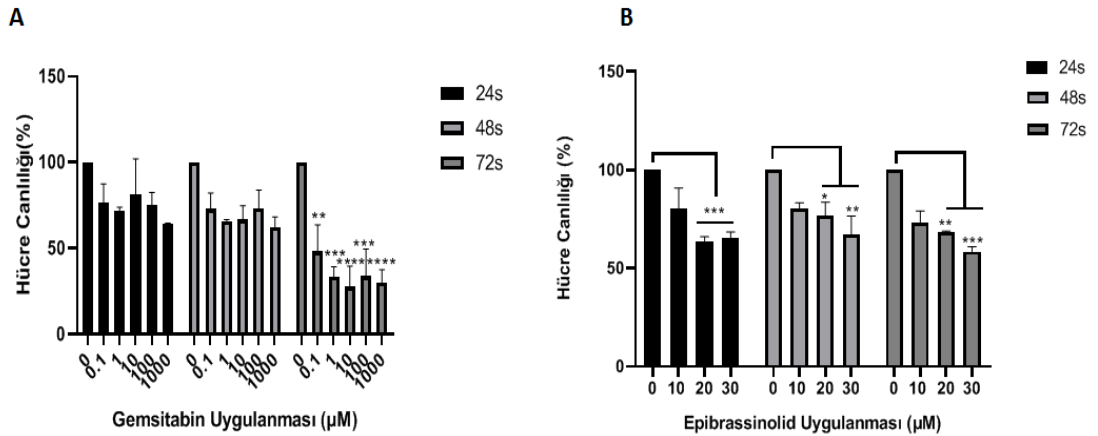
3.2.11 İstatiksel analiz

Elde edilen tüm verilerin grafik sunumları “GraphPad-Prism 6” programı ile hazırlanarak sunulmuştur. Grupların karşılaştırılmasında istatistiksel analizler için 2 way ANOVA testi ve Bonferroni doğrulama yöntemi seçilmiştir. Anlamli değişimler için p değeri <0,05 olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid'in Hücre Canlılığına Etkisi

Pankreas kanseri AsPC-1 hücresinde artan konsantrasyonlarda 24,48 ve 72 saat olmak üzere Gemsitabin (dFdC) ve Epibrassinolid (EBR) uygulanmıştır. DFdC ve EBR'in artan dozlarında AsPC-1 hücre hattında canlılığın azaldığı görülmüştür. DFdC için 48 ve 72 saat de 10,100 μ M uygulaması zamanı hücre ölümünün en fazla olduğu saptanmıştır. EBR 'da ise 48 ve 72 saat de 30 μ M EBR uygulamasının en fazla hücre canlılığını azalttığı görülmüştür.

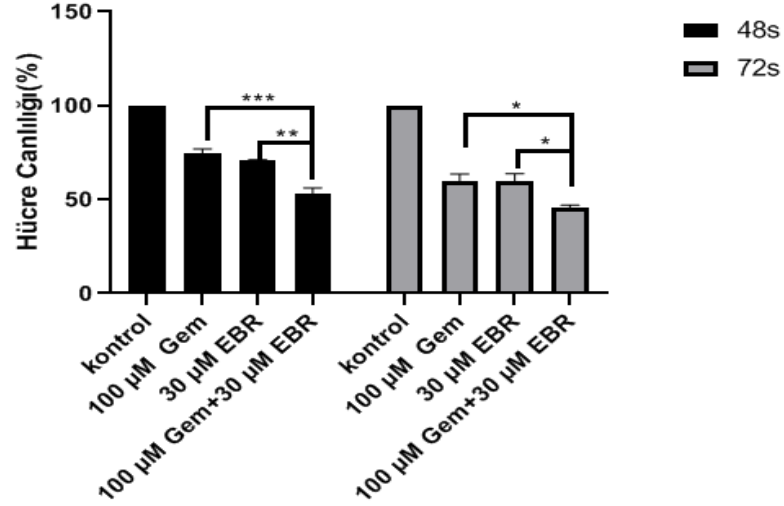


Şekil 4.1: AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı dFdC (A) ve EBR (B) uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. AsPC-1 hücreleri 96 oyuklu plakanın kuyucuklarına 1×10^4 hücre olacak şekilde artan konsantrasyonlarda ekilmiş ve hücre canlılığını saptamak amacı ile MTT testi yapılmıştır (**** P <0.0001).

MTT testi sonucunda seçilen 10 μ M dFdC dozunun 48 saatde %25, 72 saatde %60 etki ettiği, 100 μ M dFdC dozunun 48 saatde %30, 72 saatde %65 etki ettiği araştırılmıştır. Aynı şekilde, MTT testi sonucunda seçilen 30 μ M EBR dozunun 48 saatde %35, 72 saatde ise %40 etkisi olduğu araştırılmıştır.

100 μ M dFdC ve 30 μ M EBR 48 ve 72 saat olmak üzere birlikte ve ayrı hücre canlılığı üzerindeki etkileri de MTT deneyi ile gösterilmiştir. 48 saatde 100 μ M

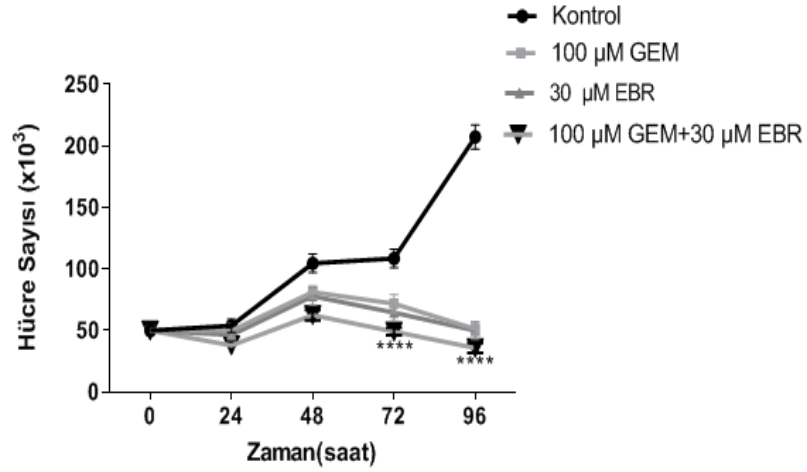
dFdC %25, 30 μ M EBR %30 ket vurmuşken, 100 μ M dFdC ile 30 μ M EBR hücre canlılığına %50 ket vurmuştur. 72 saatde ise 100 μ M dFdC %40, 30 μ M EBR %38, 100 μ M dFdC ile 30 μ M EBR hücre canlılığına %60 ket vurduğu araştırılmıştır.



Şekil 4.2: AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde dFdC ve (ya) EBR'nin zamana ve doza bağlı uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak 2'şer tekrarlı olacak şekilde hücreler ekilmiş ve 48 ve 72 saat uygulanan dFdC ve (ya) EBR'nin zamana bağlı olarak canlılığa olan etkisi araştırılmıştır (**** P <0.0001).

4.2 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid'in Hücre Sağkalımına Etkisi

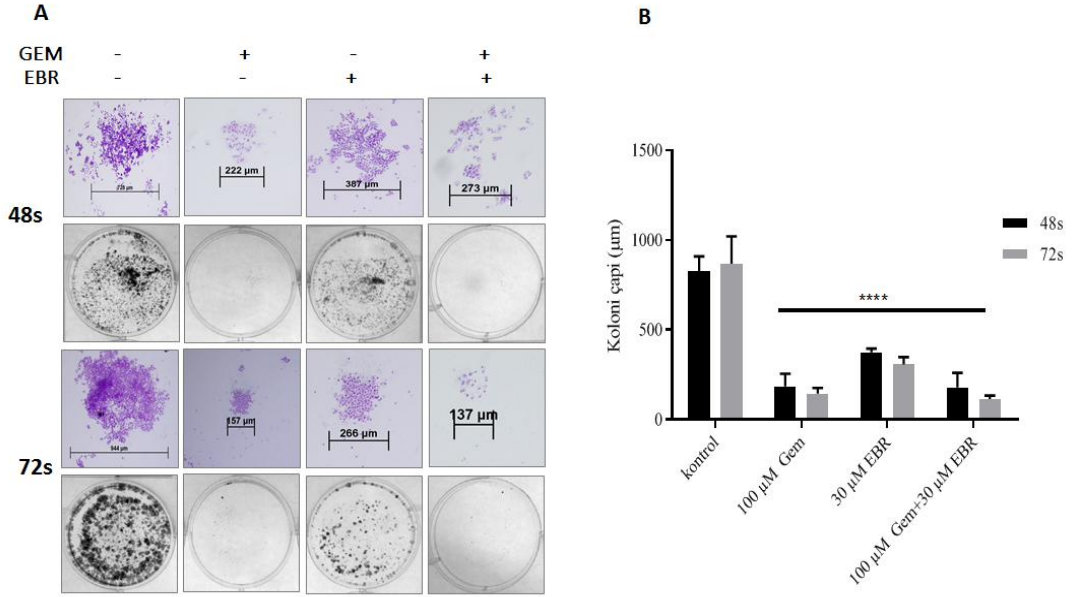
Yapılan MTT deneyleri sonucu seçilen 100 μ M dFdC ve 30 μ M EBR'in zamana bağlı olarak hücre büyümesi üzerindeki etkilerini belirleyebilmek amacıyla hücre sağkalım analizi uygulanmıştır. Hücreler tripan mavisi boya ile boyanarak ışık mikroskobu yardımıyla sayılmış ve hücre sayıları karşılaştırılmıştır. 100 μ M dFdC ve 30 μ M EBR uygulamasında AsPC-1 hücrelerinde ilk 24 saatte hücre büyümesinin durduğu 48 saatle beraber hücre ölümünün başladığı belirlenmiştir.



Şekil 4.3: DFdC ve (ya) EBR'nin AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında hücre sağ kalım analizi ile zamana bağlı hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi. 5×10^4 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekildi ve dFdc ve (ya) EBR ile 24,48,72 ve 96 saat zamana bağlı şekilde muamele edildi. Hücrelere 1:1 oranında %0,4 (w/v) tripan mavisini ve 1x PBS eklenerek Neubauer hemositometre ile sayıldı. (**** P <0.0001).

4.3 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gempitabin ve Epibrassinolid'in Metastaz Üzerindeki Etkisi

DFdC ve(ya) EBR'nin AsPC-1 hücre hattında metastatik etkisini, hücreler tek başına bırakıldığında davranışlarını belirlemek amacıyla koloni oluşum tekniği yapılmıştır. DFdC ve (ya) EBR uygulanması zamanı pankreas kanseri hücre hattı olan AsPC-1 'de kontrol gruplarına oranla, zamana bağlı olarak hücre çoğalmasında azalma gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, sadece dFdc ve sadece EBR'nin ve kombine kullanımını da, koloni oluşumu üzerine ciddi bir baskılayıcı etki gösterilerek hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir.



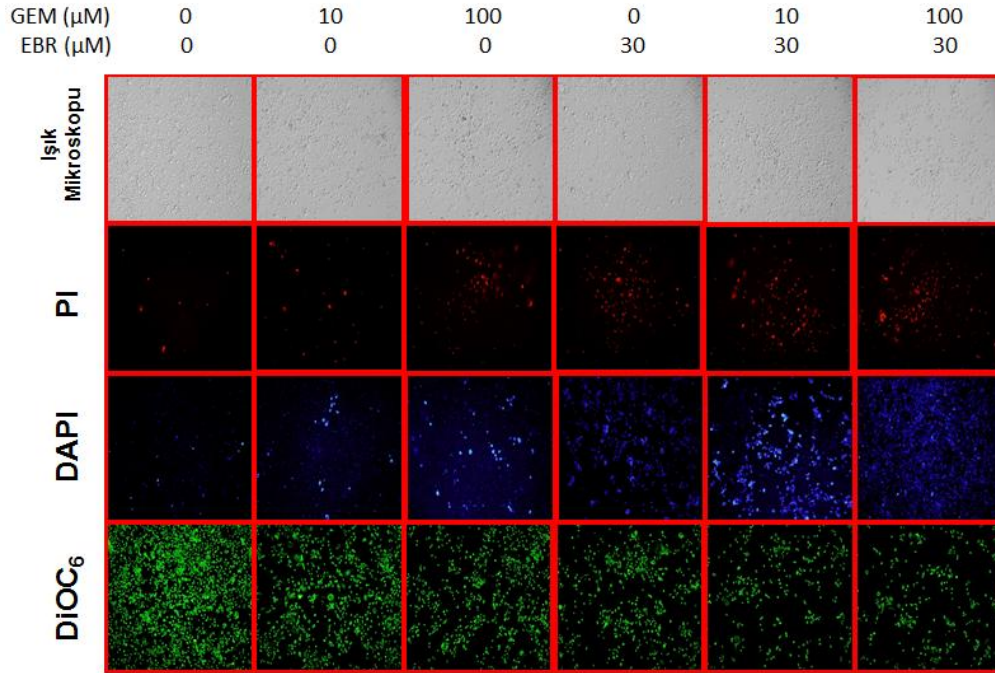
Şekil 4.4: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında DFdC ve (ya) EBR'ın doza bağlı olarak 48 ve 72 saat'de koloni oluşumlarının (A) ve uygulanan dozlarda etkisinin grafik üzerinde etkisinin (B) gösterilmesi. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^3 olacak şekilde hücreler ekildi. Hücreler dFdC ve (ya) EBR ile farklı konsantrasyonlarda 48 ve 72 saat muamele edildikten sonra hücrelerin büyümesi incelendi. 14 gün sonunda hücreler 5 dak metanol asetik asit (3:1) ile fikse edilerek %0,5'lik kristal viyole ile 20 dak muamele edilmiştir. Görüntüler UV ile çekildikten sonra çapları ölçülmüştür (**** P < 0.0001).

4.4 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid'in Mitokondriden Türevlenen Apoptotik Yolak Üzerindeki Etkisi

DFdC ve (ya) EBR'nin AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinin ölümü, hücre canlılığı ve DNA kırıklarının belirlenmesi amacıyla doza bağlı olarak floresan boyamaları analizi gerçekleştirilmiştir. DNA kırıklarının gözlemlenmesi için hücreler çift zincirli DNA'ya bağlanarak mavi renk ışımaya sebep olan, DAPI floresan boya ile boyanarak floresan mikroskopunda incelenmiştir. Apoptotik ölüm ile karakterize edilen DNA kırıklarını gösteren DAPI boyamasında 48 ve 72 saatde dFdC ve (ya) EBR uygulanmasının doza bağlı olarak arttığı gösterilmiştir.

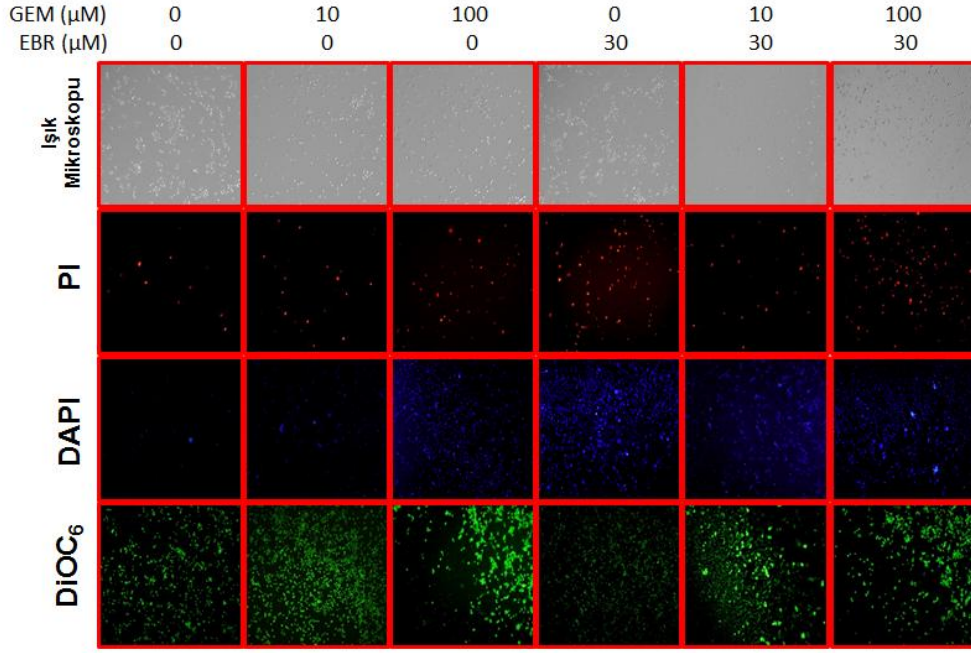
DFdC ve (ya) EBR uygulaması sonrası, hücre ölümü üzerindeki etkiyi göre bilmek için ölü hücre membranlarından girerek DNA baz çiftleri arasına girerek sadece ölü hücreleri boyayan PI boyaması yapılmıştır. AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubuna kıyasla sadece dFdC ve sadece EBR uygulandığın

da ölü hücre sayısının arttığı görülmüştür. En fazla ölü hücrenin ise, dFdC ve EBR'nin kombine halde uygulandığı hücrelerde görülmüştür.

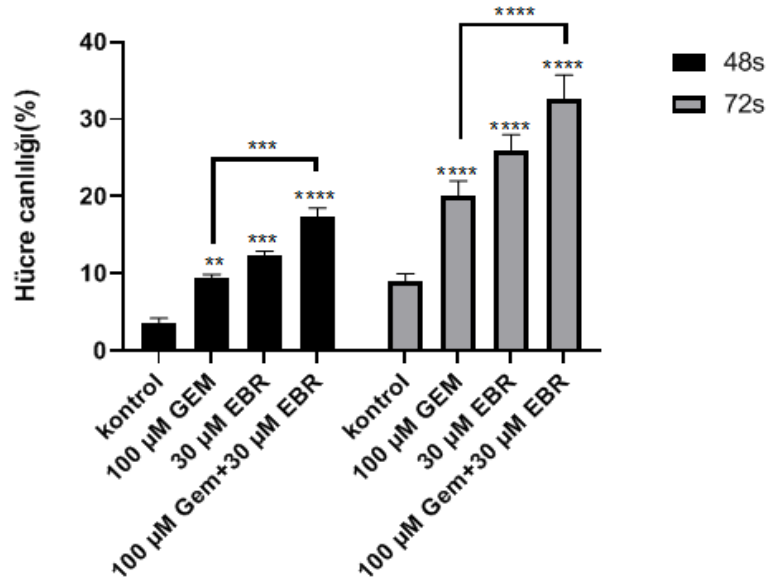


Şekil 4.5: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat'de doza bağlı olarak dFdC ve (ya) EBR uygulanmasının DAPI boyama ile DNA fragmentasyonuna, DiOC₆ boyama ile mitokondri membran potansiyeline ve PI boyama ile hücre ölümü üzerindeki etkilerinin floresan mikroskopla gösterilmesi. 5×10^4 AsPC-1 hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekildi. 48 saat sonunda PI için 30 dak, DAPI için 10 dak ve Dioc₆ için 15 dak bekletildi.

AsPC-1 hücrelerine uygulanan dFdC ve (ya) EBR'nin apoptoza bağlı olarak mitokondri transmembran potansiyeline etkisi, mitokondriye özgü bir boya olan DiOC₆ ile belirlenmiştir. DiOC₆ boyasının pozitif yüklü olması, negatif yüklü mitokondriler tarafından tutunmasını sağlar, fakat mitokondri membran potansiyeli bozulmuş olan apoptotik hücrelere bağlanamaz. DFdC ve (ya) EBR uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısının kontrole kıyasla azaldığı görülmüştür.



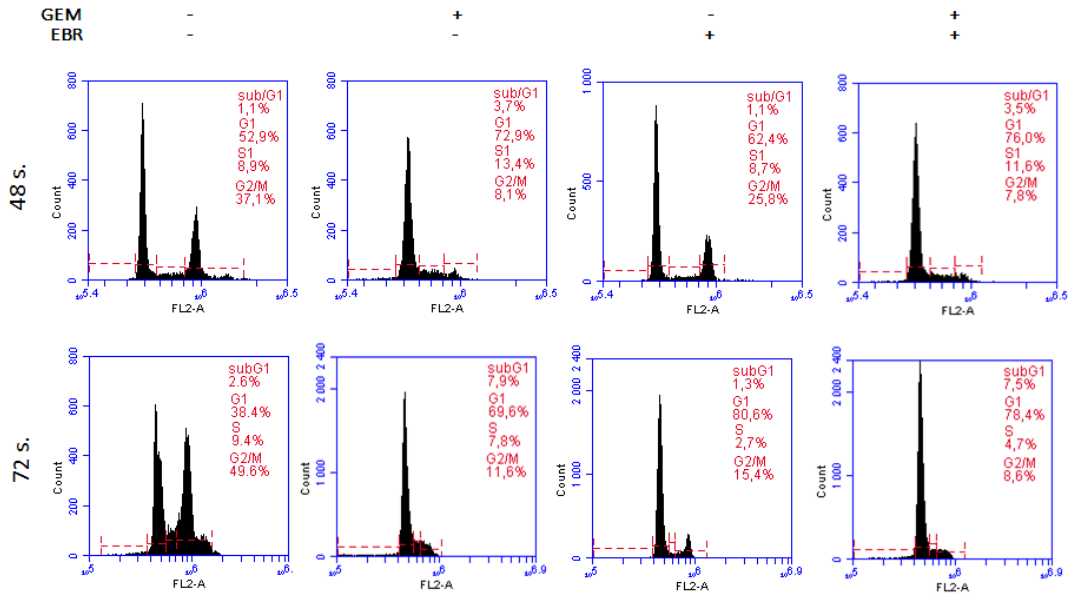
Şekil 4.6: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat'de doza bağlı olarak dFdC ve (ya) EBR uygulanmasının DAPI boyama ile DNA fragmentasyonuna, DiOC₆ boyama ile mitokondri membran potansiyeline ve PI boyama ile hücre ölümü üzerindeki etkilerinin floresan mikroskopla gösterilmesi. 5×10^4 AsPC-1 hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekildi. 72 saat sonunda PI için 30 dak, DAPI için 10 dak ve Dioc₆ için 15 dak bekletildi.



Şekil 4.7: 48 ve 72 saat'de AsPC-1 hücre hattında doza bağlı olarak dFdC ve (ya) EBR uygulamasının PI floresan boyama ile analizinin gösterilmesi. 48 ve 72 saat dFdC ve(ya) EBR uygulandıktan sonra $1 \mu\text{g/ml}$ PI 30 dak etüvde inkübe edilir. 536-617 nm aralığında yeşil filtre ile ölü hücrelere bakılmıştır (**** P < 0.0001).

4.5 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında dFdC ve (ya) EBR uygulanarak hücre döngüsü üzerindeki etkisi gösterilmiştir. AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında sadece dFdC uygulanması zamanı SubG1 popülasyonunda kontrole göre 48 ve 72 saat' de anlamlı bir artış görülmüştür. Aynı zamanda, 48 ve 72 saatlerde dFdC ve EBR uygulanması, G2/M popülasyonunda düşüş, G1 popülasyonun kontrole göre anlamlı bir artış görülmüştür. DFdC ve EBR' in kombine halde uygulanması zamanı ise AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat' de %3,5 SubG1 popülasyonu, %76,0 G1, %11,6 S, %7,8 G2/M popülasyonu görülürken, 72 saat' de %7,5 SubG1, %78,4 G1, %4,7 S, %9,6 G2/M popülasyon varlığı belirlenmiştir.

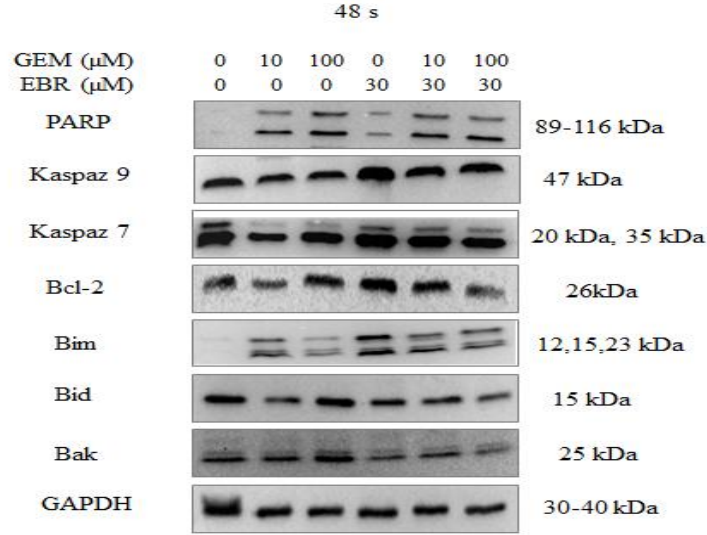


Şekil 4.8: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 ve 72 saat'de dFdC ve EBR uygulanmasının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin hücre akış sitometresinde analiz edilmesi. 1×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekim yapıldı. 48 ve 72 saat dFdC ve(ya) EBR işleminden sonra, hücelere tripsin yardımıyla kaldırıktan sonra 1xPBS ile yıkandı. %70 etanol ile muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.6 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid'in Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Görsel olarak belirlenmiş apoptotik ölüm, immunoblotlama yöntemi ile apoptotik hücre yolağı ilişkili proteinler üzerindeki etkisi incelenmiştir. DFdC ve (ya) EBR

uygulaması zamanı AsPC-1 hücrelerinde kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde bir belirteç olan PARP kesimi araştırılmıştır. İki farklı zamanlarda dFdC ve (ya) EBR uygulaması yapılan AsPC-1 hücrelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında 72 saat'de PARP kesiminin 48 saate göre arttığı görülmektedir.

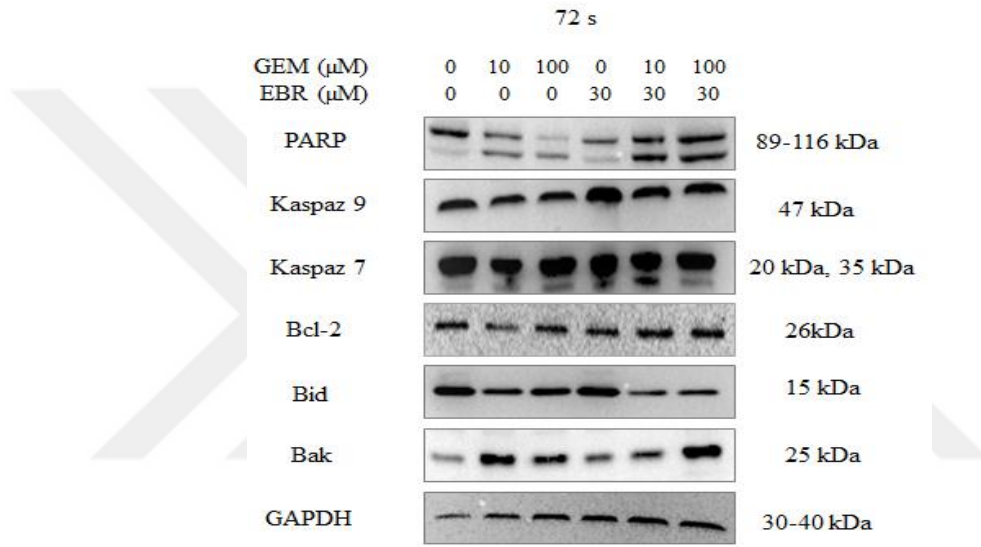


Şekil 4.9: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat dFdC ve (ya) EBR'in apoptotik proteinler üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hücrelerin yapışması bekletilir. Hücelere 48 saat dFdC ve(ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklayıcı solüsyonu içerisinde çözülür (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Bu verilere ilaven dFdC ve (ya) EBR uygulanmış AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında apoptotik yolaktaki kaspaz ailesi anlatımları araştırılmıştır. Kaspaz ailesi üyesi olan mitokondriyal apoptotik yolağın aktive olması için başlatıcı kaspaz 9 ve etkili olan kaspaz 7, hücre içindeki kalsiyum seviyesinin artmasıyla aktifleşerek hücre iskeletinin yıkılmasını sağlamaktadır. AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında Kaspaz ailesinin üyesi olan kaspaz 9 ifadesinin dFdC ve (ya) EBR uygulanması zamanı kesilime yol açtığı saptanmıştır.

AsPC-1 hücrelerinde sonlandırıcı kaspaz olarak bilinen kaspaz 7, zamana bağlı olarak dFdC ve (ya) EBR uygulaması zamanı artmıştır.

DFdC ve (ya) EBR uygulanması sonucundaki değişimler, apoptotik hücre ölüm yolağının tetiklenmesinde önemli bir rolü olan pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde de incelenmiştir. Bcl-2 ailesine ait olan Bak proteini, AsPC-1 hücre hattında dFdc ve (ya) EBR uygulamasından sonra 72 saat'de anlatımının arttığı görülmektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid protein ifadesinin AsPC-1 hücre hattına dFdc ve (ya) EBR uygulanması zamanı 48 ve 72 saat' de azaldığı görülmüştür. Pro-apoptotik protein ailesinin bir diğer üyesi olan Bim'in üç ana formunun (BimEL, BimL, BimS) AsPC-1 hücre hattında 48 saat dFdc ve (ya) EBR uygulanması zamanı arttığı gözlenmiştir.

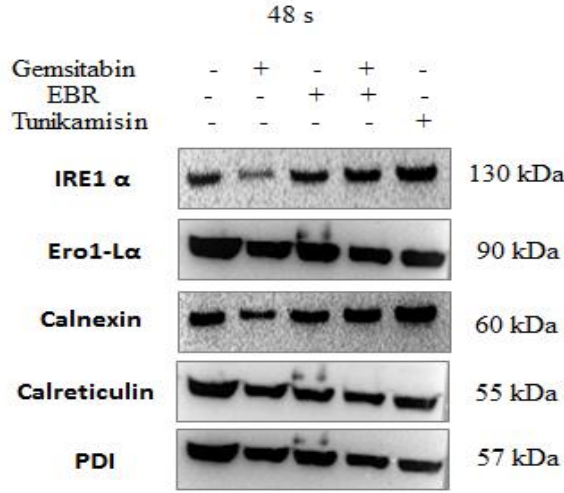


Şekil 4.10: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat dFdc ve (ya) EBR'in apoptotik proteinler üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hüclererin yapışması bekletilir. Hüclerlere 72 saat dFdc ve(ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklayıcı solüsyonu içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntöleme cihazı ile görüntülendi.

4.7 AsPC-1 Pankreas Hücre Hattında Gemsitabin ve Epibrassinolid'in Endoplazmatik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkisinin Zamana Bağlı Gösterilmesi

Pankreas kanseri AsPC-1 hücre hattında dFdc ve (ya) EBR'in ER stres üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla immünoblotma tekniği kullanılmıştır. DFdc AsPC-1 hüclerine 48 saat' de uygulandığında Calnexin anlatımının kontrole göre

azaldığı görülürken, 72 saat'de arttığı görülmektedir. EBR AsPC-1 hücrelerine 48 ve 72 saat'de uygulandığında Calnexin anlatımının kontrole göre arttığı görülmektedir. DFdC ve EBR AsPC-1 hücrelerine kombine halde uygulandığında ise hem 48, hem de 72 saat'de Calnexin anlatımının kontrole göre arttığı görülmüştür.

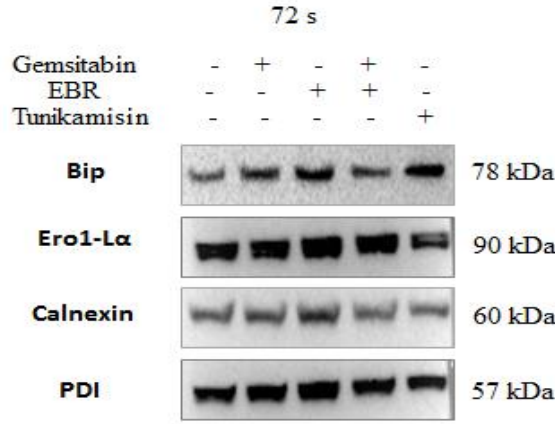


Şekil 4.11: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 48 saat dFdc ve (ya) EBR 'in endoplazmatik retikulum stresi üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hüclererin yapışması bekletilir. Hüclerlere 48 saat dFdc ve(ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler bloklama solüsyonu içerisinde çözölen (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntöleme cihazı ile görüntölendi.

Katlanmamış veya yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) sırasında PERK' in temel bir redoks duyarlı aktivatörü olarak görev alan PDI pankreas kanseri hücre hattı olan AsPC-1 hüclerine dFdc ve (ya) EBR uygulanması zamanı anlatımı incelenmiştir. AsPC-1 hüclerine dFdc ve(ya) EBR uygulaması zamanı PDI' ın anlatımının 48 saate göre 72 saat' de daha fazla arttığı görölmüştür.

AsPC-1 hüclerinde dFdc ve (ya) EBR uygulaması zamanı anlatımın araştırıldığı bir diğer ER stres ilişkili protein Ero1-L α 'dır. Ero1-L α AsPC-1 hüclerine dFdc uygulanması zamanı 48 ve 72 saat 'de bir değişiklik göstermemiş, EBR uygulanması zamanı ise 48 ve 72 saat' de kontrole göre arttığı görölmüştür. DFdc ve EBR' in kombine uygulanması zamanı AsPC-1 hücre

hattında Ero1-L α anlatımının 72 saat' de kontrole göre daha fazla arttığı görülmüştür.



Şekil 4.12: AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat dFdc ve (ya) EBR 'in endoplazmatik retikulum stresi üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile zamana bağlı gösterilmesi. 60 ve 100 mm petrilere AsPC-1 hücreleri ekildikten sonra inkübatörde 24 saat hücrelerin yapışması bekletilir. Hücelere 72 saat dFdc ve(ya) EBR uygulaması yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu sonucu elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforez sisteminde yürütüldü. PVDF membrana aktarılan proteinler blokaj solüsyonu içerisinde çözülür (1:1000) birincil antikor içerisinde bir gece bekletildi. İkincil antikora alınan membran ikincil antikor içerisinde de bir gece daha bekletildikten sonra chemidoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Bir diğer ER stres ilişkili protein, yanlış katlanmış proteinlere bağlanan ve endoplazmatik retikulumdan Golgi aparatına verilmesini önleyen Calreticulin proteindir. AsPC-1 hücrelerine dFdc ve (ya) EBR uygulanması zamanı Calreticulin anlatımının 48 saat' de bir artış görülmemiştir.

IRE1 α , ER'in yeni sentezlenmiş ve UPR proteinlerinin parçalama kapasiteni yükselterek, proksimal sensör görevi görmektedir. AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde 48 saat dFdc uygulandığında IRE1 α anlatımının kontrole göre azaldığı, 48 saat EBR uygulandığında ise kontrole göre arttığı görülmektedir. AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerine dFdc ve EBR kombine halde uygulanması zamanı 48 saat'de kontrole göre bir artış görülmüştür.

Pankreas kanseri hücre olan AsPC-1 hücrelerine dFdc ve(ya) EBR uygulanması zamanı ER stres anahtarı olan Bip 'in anlatımı da incelenmiştir. AsPC-1 hücrelerine 72 saat dFdc uygulandığında kontrole göre bir arttığı, EBR uygulanması zamanı ise daha fazla artış görülmüştür. DFdc ve EBR AsPC-1

hücrelerine 72 saat birlikte uygulanması zamanı kontrole göre bir artış görülmüştür.



5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı pankreas kanseri agresif AsPC-1 hücre hattında pankreas kanseri tedavisinde kullanılan, fakat bir zamandan sonra hücrelerde direnç oluşturan dFdC ile farklı kanserlerde etkisi araştırılan steroid yapıya sahip, BR ailesi üyelerinden EBR'ın yalnız ve dFdC ile kombine halde apoptotik etkilerinin incelenmesidir. DFdC ve (ya) EBR AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında MTT tekniği, koloni oluşumu, hücre sağ analizi ve birçok analizlerle apoptotik mekanizmasıyla ilişkili bir şekilde hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur. Pankreas kanseri en ölümcül gastrointestinal malignitelerden biridir [142]. Pankreas kanseri dünya genelinde yedinci sırada yer almaktadır [17]. Pankreas kanseri histolojisinden en yaygın olanı pankreas duktal adenokarsinomudur [142]. İlk sırada sigara ve alkol kullanımı olmak üzere, genetik faktörler, yaş, cinsiyet, obezite ve s. gibi faktörler pankreas kanseri risk faktörlerine aittir [22].

Pankreas kanseri tedavisinde en çok kullanılan tedavi yöntemlerinden biri cerrahi müdahiledir [142]. Bunun yanı sıra, pankreas kanseri tedavisinde kullanılan birçok ilaç vardır. Bu ilaçlardan biride, pankreas kanseri tedavisinde kullanılan ilkin ilaçlardan olan ve pankreas duktal adenokarsinom (PDA) tedavisinin temel taşı olarak bilinen dFdC ilacıdır. Gemcitabin dFdC olarak bilinmekte olan, DNA sentezinin inhibasyona bağımlı deoksisitininin nükleosid analogudur.1997'den beri, Burris ve ark. Gemcitabin'in genel sağkalım (OS), performans durumu ve ağrı kontrolü açısından fluorourasil (5-FU) 'dan daha üstün olduğu, metastatik pankreas kanseri için standart tedavi seçeneği haline geldiği gösterilmiştir [143,144]. Bunlara rağmen, Gemcitabin ilacının hücre içi alınımı ve direnci haftalar içinde gelişen, kullanımı limitli bir ajandır [73]. Mekanik açıdan bakıldığında dFdC direnci, ilaç metabolizmasındaki değişikliklerden, sitidin analogu DNA'ya dahil edilene kadar veya dFdC'e bağılı apoptozun hafifletilmesinden kaynaklına bilirliliği birkaç araştırmada gösterilmiştir [7]. Bu tez çalışmasında, pankreas kanseri için standart tedavi yöntemlerinden biri olan

dFdC'in agresif AsPC-1 hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiş ve yapılan birçok çalışmada olduğu gibi apoptoz ilişkili hücre ölümü görülmüştür.

Günümüzde birçok çalışma ile ışık tutulmaya çalışılan pankreas kanserinde gerçekleştirilmekte olan tedavi stratejilerinde karşılaşılan en büyük güçlüklerden biri kanser hücreleri tarafından geliştirilen ilaçlara direnç mekanizması ve ilaçların bireylerde meydana getirdiği istenmeyen yan etkilerdir. Bu kapsamda, pankreas kanserinde alternatif tedavilere, kemoterapötik ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. BR' ler düşük moleküler ağırlığa sahip steroid içerikler olarak, bitkilerde büyümeyi ve gelişimi düzenlerler. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda BR'lerin hayvan steroidal laktonlarla yapısal benzerlik gösterdiği göz önüne alınarak antikanser ve antiproliferatif özellikleri çeşitli hayvan sistemlerinde incelenmiştir [152]. EBR, bitkilerde büyüme hormonu görevi alan BR ailesi üyesidir. EBR'nin, bitki hücrelerinde moleküler mekanizması uzun yıllar araştırılmış ve aydınlatılmıştır. 2008 yılında Malikova ve arkadaşları tarafından ilk defa olarak, memelilerdeki etkisi araştırılmış ve kanser hücrelerindeki hücre canlılığına olan etkisi gösterilmiştir [91]. Bu çalışmayı takiben, Steigerova ve arkadaşları tarafından 2010 yılında EBR'nin meme kanseri üzerindeki etkileri araştırılmıştır [92]. Bunların yanı sıra, yapılan birçok çalışma ile EBR'nin hücre döngüsünü, poliamin metabolizmasını ve ER stres yolağına etki ederek, apoptoz mekanizmasını aktif hale getirdiği öne sürülmüştür [11,12,93].

2013 yılında Obakan ve ark. EBR' nin steroid reseptörü AR anlatımı yapan LNCaP ve steroid reseptörü AR anlatımı yapmayan DU145 prostat kanseri hücre hatlarında apoptotik etkisini göstermişlerdir [11]. Obakan ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışma, EBR'nin moleküler hedeflerinin anlaşılabilmesi için proteomik analiz stable-isotope labelled aminoacid in cell culture (SILAC) tekniğinin belirlenmesidir. Bu teknik vasıtasıyla, calreticulin proteinin anlatımının azalarak, ER stress kaynaklı apoptoz gerçekleştirildiği gösterilmiştir [12,93]. Bu veriler doğrultusunda, BR üyesi olan EBR etkisi bu tez çalışmasında pankreas kanseri üzerinde ki etkisi araştırılmış ve diğer kanser türlerinde olduğu gibi pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik ölüm görülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, dFdC ve(ya) EBR' nin AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında doza ve zamana bağlı olarak MTT tekniği ile hücre

canlılığına etki ederek azalttığı görülmüştür. AsPC-1 hücrelerinde 48 saat süre ile 10 μ M dFdC uygulamasının ardından %25 oranında canlılık görülürken 72 saat' de %60 etki etkili olduğu saptanmıştır. AsPC-1 hücrelerine 100 μ M dFdC uygulamasının 48 saat' de %30 etki ederken, 72 saat' de hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü görülmüştür (Şekil 4.1). Daha önceler AsPC-1 pankreas kanser hücre hattının diğer pankreas kanseri hücre hatlarına göre dFdC'e daha dirençli olduğu düşünülmüştür [145,146]. EBR' nin pankreas kanseri hücre hattı olan AsPC-1 hücrelerindeki hücre canlılığına olan etkisine bakıldığında 48 saat' de 30 μ M EBR uygulaması zamanı hücre canlılığını %35, 72 saat' de ise %40 azalttığı görülmüştür (Şekil 4.1). DFdC ve EBR' nin AsPC-1 hücre hattında kombinasyon halinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi 48 saat uygulaması zamanı %50, 72 saat' de ise %60 ket vurduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Yapılan bir çalışmada A549 akciğer kanseri hücre hattında gemsitabin ve sisplatin in vivo ve in vitro ' da uygulanmış ve gemsitabin' in kontrole göre hücre canlılığının azaldığı görülmüştür [153]. Bir diğer çalışmada gemsitabin AsPC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2, Panc-1 pankreas kanseri hücre hatlarına uygulanmış ve diğer çalışmalarda olduğu gibi kontrole göre hücre canlılığının azaldığı görülmüştür [146]. Şekil 4.3'de gösterildiği gibi, AsPC-1 hücrelerinde dFdC ve (ya) EBR hücre sağ kalım analizinde kontrole oranla zamana ve doza bağlı şekilde hücre çoğalmasını azalttığı bulunmuştur. 2010 yılında Steigerova ve ark. tarafından yapılan çalışmada EBR' nin etkisine meme kanseri hücre hatlarında bakılmış ve hücre canlılığının azaldığı görülmüştür [92]. Elde edilen veriler literatürle uyumlu olduğu, dFdC ve EBR'nin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve literatürde olmayan dFdC ve EBR'nin kombine halde uygulanması zamanı da hücre canlılığının azaldığı görülmüştür.

100 μ M dFdC, 30 μ M EBR ve 100 μ M dFdC artı 30 μ M EBR'ın kombine şekilde 48 ve 72 saat' de AsPC-1 hücre hattına uygulanarak koloni oluşumu deneyi gerçekleştirilmiştir. Hücreler koloni oluşumu gözlemlenene kadar hücre besiyeri normal medium ile değiştirilmiştir. 48 ve 72 saatlik dFdC (ya) EBR uygulanması zamanı koloni oluşumunun azaldığı, en fazla azalmanın ise dFdC ve EBR' nin kombine halde uygulanan hücrelerde görülmüştür (Şekil 4.4). Yapılan bir çalışmada gemsitabin'e bağlı uPA, mutant p53-R273H etkileşime bağlı pankreas kanseri hücre hattı olan Panc-1 CSC'lerde koloni oluşumunun azaldığı

görülmüştür [150]. Bir başka çalışmada EBR'nin meme kanseri hücre hatları olan RT-R MDA-MB-231 ve MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu, kontrollere kıyasla doza bağımlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir [151]. MTT testi, hücre sağ kalım testi, floresan boyama ve koloni oluşum testindeki elde edilen verilere bakıldığında dFdC ve EBR'in AsPC-1 hücre hattında doza ve zamana bağlı hücre sağ kalımını engellediği ortaya çıkmaktadır.

AsPC-1 hücre hattına dFdC ve (ya) EBR uygulanması sonucu doza ve zamana bağlı hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik mekanizmanın aktivasyonu ile ilgili olup olmadığı da araştırmamızda ele alınmıştır. Hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümünden dolayı kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla 48 ve 72 saat'de mitokondri membran potansiyelindeki ($\Delta\Psi_m$) bozulma floresan mikroskopu ile belirlenmiştir. Nükleusu işaretleyen DAPI boyası apoptoza bağlı DNA kırıklarını açık mavi görüntüler ile görüntüleyerek, AsPC-1 hücre hattında dFdC ve (ya) EBR'nin 48 (Şekil 4.5.) ve 72 saat' deki (Şekil 4.6.) apoptotik etkisini göstermiştir. DNA kırıkları hücrelerin apoptoz sebebi ile onarılamadığını göstermektedir [147]. PI canlı hücrelerin membranlarından geçemeyen fakat canlılığını kaybetmiş hücrelerin membranlarından geçerek DNA baz çiftleri arasına gire bilmektedir. Bu sebeple, PI apoptotik hücre ölümünün doğrulanması için kullanılan, ölü hücreleri kırmızı renge boyayan boya olduğu bilinmektedir [154]. AsPC-1 hücrelerine 48 ve 72 saat sadece dFdC ve sadece EBR uygulandığında hücre ölümünün, dFdC ve EBR'nin kombine uygulanmasına oranla daha az olduğu görülmektedir (Şekil 4.5-4.6). PI boyama ile elde edilen floresan sonuçlarına bakıldığında AsPC-1 hücre hattında en fazla 72 saat 100 μ M dFdC ve 30 μ M EBR hücre ölümünü uyardığı saptanmıştır (Şekil 4.6., 4.7). DFdC ve (ya) EBR'nin hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlendikten sonra, hücre canlılığındaki azalma ve apoptotik mekanizmanın aktivasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. DiOC₆ mitokondri membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) bozulmamış olan hücreleri yeşil renkle boyayarak hücre canlılığını göstermektedir (Şekil 4.6). Elektron transport zinciri üyesi olan sitokrom c'nin mitokondrinin dış zarı geçirgen hale geldik de sitoplazmaya salınır [148]. Bu salınımın sağlanması, kaspaz aktivasyonun tetiklenmesine neden olmaktadır [149]. DFdC ve (ya) EBR uygulanmış AsPC-1 hücre hattında kaspazların aktivasyonu sonrası PARP kesimi gözlemlenmiştir. Şekil 4.9 ve Şekil

10'da 48 ve 72 saat dFdc ve (ya) EBR' nin AsPC-1 hücrelerine uygulandığında başlatıcı kaspaz 9 ifadesinin arttığı görülmüştür. DFdc ve (ya) EBR'nin apoptozu uyarmasında diğer efektör kaspazların da etkili olabileceği düşünülerek, efektör kaspaz olan kaspaz 7'nin ifadesi incelendiğinde, AsPC-1 hücrelerinde kaspaz 7 ifadesinin zamana bağlı olarak anlamının arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan bir araştırmada, BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattına dFdc uygulanması zamanı Parp ve kaspaz 9 anlatımlarının arttığı gösterilmiştir [155]. Bu duruma floresan işaretlerle bakıldığında AsPC-1 hücrelerine dFdc ve (ya) EBR uygulaması sonucu apoptoz sebepli ölümün gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9., Şekil 4.10). Awasthi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, gemitabin, dosetaksel ve nab-paklitaksel tedavisinin intratümöral proliferatif ve apoptotik etkisine bakıldığında, AsPC-1 tümör taşıyan farelere floresan mikroskopu altında bakıldığında, en etkili gemitabin' in olduğu görülmüştür [146]. Steigerova ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, EBR'nin meme kanseri hücre hatlarında kaspaz bağımlı apoptozu tetikleyici etkisi gösterilmiştir [92]. Benzer şekilde Obakan ve ark. LNCaP ve DU145 prostat kanseri hücre hatlarında EBR' nin apoptozu tetiklediği saptanmıştır [11]. 2012 yılında Bhardwaj ve ark. yaptığı bir çalışmada BR'den olan EBR'nin kültüre edilmiş hibridoma fare hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve EBR'nin mitokondriyal membran potansiyelini arttırdığı bulunmuştur [152]. Ayrıca, dFdc ve (ya) EBR uygulamasının AsPC-1 hücre hattında intrensek ve eksrinsik apoptotik yolağı aktive ederek, daha fazla apoptotik etki ettiği görülmektedir (Şekil 4.9., Şekil 4.10).

DFdc ve (ya) EBR'nin apoptotik etkilerin bilinmesi için pro- ve anti-apoptotik protein düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Bcl-2 ailesi üyesi olan Bak protein anlatımının 48 ve 72 saatlik dFdc ve (ya) EBR uygulanması sonucu AsPC-1 hücre hattında anlatımının arttığı gözlemlenmiştir. Pro-apoptotik protein olan Bim anlatımı 48 saat dFdc ve (ya) EBR uygulanması sonucu AsPC-1 hücre hattında bir artış görülmüştür. Bir diğer pro-apoptotik protein olan Bid anlatımı 48 ve 72 saat dFdc ve (ya) EBR uygulaması sonucu AsPC-1 hücrelerinde etkisinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.9., Şekil 4.10). Aynı şekilde, bu sonuçlar gibi gemitabin'in pankreas kanseri hücrelerinde ve EBR'nin farklı kanser türlerinde Bcl-2 ailesi üyelerinin anlatımları üzerine sonuçlar saptanmıştır.

Obakan ve ark. [11] ve Steigerova ve ark. [92] tarafındanda yapılan çalışmalarda EBR'nin farklı kanser hücrelerinde farklı Bcl-2 ailesi üyelerinin rol oynadıkları görülmüştür.

AsPC-1 hücrelerine 100 μ M dFdC, 30 μ M EBR ve 100 μ M dFdC artı 30 μ M EBR' in kombine halde zamana bağlı uygulanarak PI hücre akış sitometrisi analizindeki etkileri incelenmiştir. 48 ve 72 saat'de AsPC-1 hücrelerine dFdC uygulandığında SubG1 oranı en yüksek, G2/M oranı en düşük popülasyonu, EBR uygulandığında ise en yüksek G1, en düşük SubG1 popülasyonu görülmüştür. DFdC ve EBR'nin kombine halde 48 ve 72 saat'de AsPC-1 hücrelerine uygulanması zamanı kontrole göre G1 fazında en fazla artışın olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Obakan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, EBR' nin en fazla SubG1 popülasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir [12].

Araştırmanın bir sonraki aşamasında, AsPC-1 hücrelerine uygulanan dFdC ve (ya) EBR' nin ER stres yolunun gösterilmesi hedeflenmiştir. AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde BiP, IRE1 α gibi ER stress de önemli rol oynayan moleküllerin anlatımları immünoblotlama yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.11., Şekil 4.12). BiP'in anlatımı 72 saat dFdC ve (ya) EBR uygulanmasıyla kontrole göre artış göstermiştir (Şekil 4.12). Yapılan bir çalışmada, gemitabin'in pankreas adenokarsinom hücrelerinde ER stresinde hayatta kalması ve kemorezistans için hücre yüzeyi sinyallerinde GRP78 ile CLPTM1L/ CRR9 ektodomain etkileşimi incelenmiş ve gemitabin BiP anlamında artış görülmüştür [156]. Obakan ve ark. tarafından kolon kanseri hücrelerine EBR uygulanması zamanı ER stres proteini olan BiP anlatımında artış gözlemlenmiştir [12]. IRE1 α , katlanmamış protein cevabında önemli bir algılayıcı olarak görülmektedir [157]. 48 saat dFdC uygulanan AsPC-1 hücrelerinde IRE1 α anlatımının azaldığı, EBR uygulandığında ise arttığı görülmektedir. DFdC ve EBR'nin 48 saat AsPC-1 hücrelerine kombine halde uygulanması zamanı IRE1 α anlatımının anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.11). Obakan ve ark. tarafından laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada SILAC yöntemi ile prostat kanserinde EBR etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre EBR'nin IRE1 α proteininde anlatımının arttığı görülmüştür [93]. AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerine 48 saat dFdC uygulanması zamanı calnexin anlatımının kontrole oranla azaldığı görülürken (Şekil 4.11), 72 saat ve kombine uygulanmasıyla

arttığı görülmüştür (Şekil 4.12). AsPC-1 hücrelerine 48, 72 saat ve kombine halde EBR uygulanması zamanı Calnexin anlatımının arttığı görülmüştür (Şekil 4.11., şekil 4.12). Pankreas kanseri hücre hatlarında gemsitabin'in etkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, Calnexin anlatımının kontrole göre arttığı gösterilmiştir [158]. Calreticulin yanlış katlanmış proteinlere bağlanır ve böylelikle, yanlış katlanmış proteinlerin endoplazmatik retikulumdan Golgi aparatına verilmesini engeller. AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde dFdc ve (ya) EBR uygulanması zamanı Calreticulin anlatımında bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.11). AsPC-1 hücre hattına dFdc ve (ya) EBR uygulandığında PDI protein anlatımının 48 saat'e oranla 72 saat'de daha fazla artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11., Şekil 4.12). AsPC-1 hücrelerinde dFdc ve (ya) EBR uygulaması zamanı anlatımın incelendiği bir diğer ER stres ilişkili protein Ero1- α 'dır. Ero1- α AsPC-1 hücrelerine dFdc uygulanması zamanı 48 ve 72 saat'de bir değişiklik göstermemişken, EBR uygulanması zamanı ise 48 ve 72 saat'de kontrole göre arttığı görülmüştür (Şekil 4.11., Şekil 4.12). DFdc ve EBR' in kombine uygulandığında AsPC-1 hücre hattında Ero1- α anlatımının 72 saat'de kontrole göre daha fazla arttığı görülmüştür (Şekil 4.12). Yapılan birçok çalışmada farklı kanser türlerindeki EBR' nin etkisi incelenmiş olup, EBR' nin ER stres üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir [11,12,93].

Bu çalışmada, AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde dFdc ve(ya) EBR uygulamasının apoptotik etkilerinin incelenmiş ve sonuç olarak, dFdc ve EBR'nin kombine halde uygulanması apoptoz ilişkili hücre ölümünü arttırdığı görülmüştür.

Bu çalışmada ulaşılan sonuca göre, araştırmanın deney hayvanları seviyesinde incelenerek ilerletilmesi ve pankreas kanseri tedavisi amaçlı daha geniş kapsamlı çalışmalar önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] A. Sudhakar, “*History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods,*” *J. Cancer Sci. Ther.*, 2009.
- [2] G. M. Cooper and R. E. Hausman, “*The Development and Causes of Cancer,*” *Cell A Mol. Approach*, 2007.
- [3] Rahib L, et al. *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States.* *Cancer Res.* 2014.
- [4] Milena Ilic and Irena Ilic, “*Epidemiology of pancreatic cancer,*” *World J Gastroenterol* 2016.
- [5] 2020 *American Cancer Society.*
- [6] Tabanı, T.B.V., *Türkiye Kanser Rastlanma Sıklığı.* 2018.
- [7] Binenbaum, Y., et al. “*Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma*”. *Drug Resist Updat*, 2015. 23: p. 55-68.
- [8] Julie Carange et al.” *24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP+-Induced Oxidative Stress and apoptosis* ” *Journal of Toxicology*, 2011.
- [9] Zhu, J.Y., J. Sae-Seaw, and Z.Y. Wang, “*Brassinosteroid signalling*”. *Development*, 2013. 140(8): p. 1615-20.
- [10] Xu, P., et al., *A brassinosteroid-signaling kinase interacts with multiple receptor-like kinases in Arabidopsis.* *Mol Plant*, 2014. 7(2): p. 441-4.
- [11] Obakan, P., et al., *Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines.* *Amino Acids*, 2014. 46(3): p. 553-64.
- [12] Obakan-Yerlikaya, P., et al., *Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic*

- reticulum stress in colon cancer cells*. Mol Carcinog, 2017. 56(6): p. 1603-1619.
- [13] Coskun, D., et al., *Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells*. Exp Cell Res, 2015. 338(1): p. 10-21.
- [14] Fariduddin, Q., et al., *24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of Cucumis sativus under salt and/or copper stress*. Environ Monit Assess, 2013. 185(9): p. 7845-56.
- [15] Renata Sano, John C. Reed “*ER stress-induced cell death mechanisms*” 2013 December; 1833(12)
- [16] Matthew Hoffman “*Human Anatomy*” 2014 WebMD.
- [17] Bray F., et al., “*Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*” CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.
- [18] Ferlay J EM., et al “*Global cancer observatory: cancer today*”. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [19] “*SEER Cancer Statistics Review*”, 1975-2013. National Cancer Institute, Bethesda, MD. 2016.
- [20] Malvezzi M, Carioli G., et al. “*European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias*”.
- [21] Bosetti C, Bertuccio P., et al. “*Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology*”. Mol Carcinog. 2012;51(1):3–13.
- [22] Midha S., et al. “*Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: a review*” Cancer Letters 2016; 381 (1): 269-277.
- [23] Parkin DM, Boyd L, Walker LC. “*16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010*”. Br J Cancer. 2011; 105 Özel Sayı 2: S77 – S81.
- [24] Willett WC. “*Diet and Cancer*”. The Oncologist. 2000; 5: 393-404
- [25] Anand P., “*Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*”. Pharm Res. 2008; 25: 2097-21616.

- [26] Ezzati M., et al., "*Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs*". Int J Cancer. 2005; 963-971.
- [27] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. "*Tobacco Smoke and Involuntary smoking*". 2004;83:1-1438.
- [28] Kuzmickiene I., et al., "*Smoking and other risk factors for pancreatic cancer: a cohort study in men in Lithuania*". Cancer Epidemiol. 2013; 37(2): 133-139.
- [29] Mizuno S., et al., "*Smoking, family history of cancer, and diabetes mellitus are associated with the age of onset of pancreatic cancer in Japanese patients*". Pancreas. 2014; 43 (7): 1014-1017.
- [30] Pelucchi C., et al., "*Smoking and body mass index and survival in pancreatic cancer patients*". Pancreas. 2014; 43 (1):47-52.
- [31] Rastogi T., et al., "*Cancer incidence rates among south Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US*". Int J Epidemiol. 2008; 37 (1): 147-160.
- [32] Iodice S., "*Tobacco and the risk of pancreatic cancer: A Review and Meta-Analysis*". Langenbecks Arch Surg. 2008; 393 (4): 535-545.
- [33] Vrieling A., et al., "*Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition*". Int J Cancer. 2010; 1 (10): 2394-2403.
- [34] Lynch S.M., et al., "*Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium*". J Epidemiol. 2009; 170(4): 403-413.
- [35] Rahman F., et al., "*Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study*". PLoS One. 2015; 10 (4): e0124489.
- [36] Calle EE., et al., "*Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*". N Engl J Med. 2003; 347 (17): 1625-1638.

- [37] Aune D., et al., "*Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies*". Ann Oncol. 2012; 23 (4): 843-852.
- [38] Michaud D.S., et al., "*Dietary Patterns and pancreatic cancer risk men and women*". J Natl Cancer Inst. 2005; 97 (7): 518-524.
- [39] Maisonneuve P., Lowenfels A.B., "*Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies*". Int J Epidemiology. 2015; 44 (1): 186-198.
- [40] Siegel RL., Miller KD., Jemal A., "*Cancer Statistics,2018*". CA Cancer J Clin 2018; 68 (1): 7-30.
- [41] Bosetti C., et al., "*Pancreatic Cancer: Overview of descriptive epidemiology*". Mol. Carcinog. 2012; 51 (1): 3-13.
- [42] Brotherton L., Welton M., Robb SW. "*Racial disparities of pancreatic cancer in Georgia: a country-wide comparison of incidence and mortality across the state, 2000-2011*". Cancer Med. 2016; 5 (1): 100-110.
- [43] Ma J., Siegel R., Jemal A., "*Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970-2009*". J Natl Cancer Inst. 2013; 105 (22): 1694-1700.
- [44] American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2014.
- [45] Yadav D., Lowenfels AB., "*The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer*". Gastroenterology. 2013; 144(6): 1252-1261.
- [46] Ghiorzo P., "*Genetic predisposition to pancreatic cancer*". World J Gasroenterol. 2014; 20 (31): 10778-10789.
- [47] Shi C., Daniels JA., Hruban RH. "*Molecular characterization of pancreatic neoplasms*". Adv Anat Pathol. 2008; 15 (4): 185–195.
- [48] Vincent A., et al., "*Pancreatic cancer*". 2011; 378(9791): 607-620.
- [49] Solomon S., Das S., Marka R., Whitcomb DC. "*Inherited pancreatic cancer syndromes*". Cancer J. 2012; 18 (6): 485-491.

- [50] Murphy KM., et al., "Evaluation of candidate genes *MAP2K4*, *MADH4*, *ACVR1B*, and *BRCA2* in familial pancreatic cancer: deleterious *BRCA2* mutations in 17%". *Cancer Res.* 2002; 62 (13): 3789-3793.
- [51] Hahn SA., et al., "*BRCA2* germline mutations in familial pancreatic carcinoma". *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95 (3): 214-221.
- [52] Couch FJ., et al., "The prevalence of *BRCA2* mutations in familial pancreatic cancer". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16 (2): 342-346.
- [53] Jones S., et al., "Exomic sequencing identifies *PALB2* as a pancreatic cancer susceptibility gene". *Science.* 2009; 324 (5924): 217.
- [54] Slater EP., et al., "*PALB2* mutations in European familial pancreatic cancer families". *Clin Genet.* 2010; 78 (5): 490-494.
- [55] Tischkowitz MD., et al., "Analysis of the Gene Coding for the *BRCA2*-interacting Protein *PALB2* in Familial and Sporadic Pancreatic Cancer". *Gastroenterology.* 2009; 137 (3): 1183–1186.
- [56] Wolpin BM., et al., "*ABO* blood group and the risk of pancreatic cancer". *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 424-431.
- [57] Jones S., et al., "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses". *Science.* 2008; 321: 1801-1806.
- [58] Ying H., et al., "Oncogenic *Kras* Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism". *Cell.* 2012. 149(3): 656–670.
- [59] Collins MA., et al., "Oncogenic *Kras* Is Required for Both the Initiation and Maintenance of Pancreatic Cancer in Mice". *J. Clin. Invest.* 2012; 122: 639-653
- [60] Kanda M., et al., "Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia". *Gastroenterology.* 2012; 142: 730-733.
- [61] Morris JP., Wang SC., Hebrok M., " *KRAS*, *Hedgehog*, *Wnt* and the Twisted Developmental Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma". *Nat. Rev. Cancer.* 2010; 10:683-695.

- [62] Ahmed S., et al., "*The TGF- β /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance*". J Clin Med. 2017; 6(1):5.
- [63] Liu B., Yang H., Pilarsky C., Weber GF., "*The Effect of GPRC5a on the Proliferation, Migration Ability, Chemotherapy Resistance, and Phosphorylation of GSK-3 β in Pancreatic Cancer*". Int. J. Mol. Sci. 2018; 19(7): 1870.
- [64] Maximilian Brunner., et al., "Current Clinical Strategies of Pancreatic Cancer. Treatment and open Molecular Questions". 2019;13.
- [65] Bo Ren., et al., "*Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer*". Ren et al. Molecular Cancer (2018) 17:108
- [66] Andrew McGuigan., et al., "*Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes*". World J Gastroenterol. 2018; 24(43): 4846-4861.
- [67] Audrey Vincent., et al., "*Pancreas cancer*". Lancet. 2011; 378(9791): 607-620.
- [68] Christopher L., et al., "*Recent progress in pancreatic cancer*". CA Cancer J Clin. 2013; 63(5): 318-348.
- [69] Prashanth Rawla., et al., "*Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors*". World J Oncol. 2019; 10(1): 10-27.
- [70] Diagnosis, overview and treatment of pancreatic cancer.UK January 2018 (book).
- [71] Stefan Heinrich and Hauke Lang." *Neoadjuvant Therapy of Pancreatic Cancer: Definitions and Benefits*". Int J Mol Sci. 2017; 18(8): 1622.
- [72] Hruban RH., Goggins M., Parsons J., Kern SE. "*Progression Model for Pancreatic Cancer*". Clin Cancer Res. 2000; 6: 2969-72.
- [73] Mini E., Nobili S., Caciagli B., Landini I., Mazzei T. "*Cellular Pharmacology of Gemcitabine*". Ann. Oncol. 2006; 17: Suppl 5: v7 – v12.
- [74] Plunkett W., Huang P., Xu YZ, Heinemann V., Grunewald R., Gandhi V. "*Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential*" Seminars in oncology. 1995; 22: 3-10.

- [75] Rauchwerger DR., Firby PS., Hedley DW., Moore MJ. "*Equilibrative-sensitive Nucleoside Transporter and Its Role in Gemcitabine Sensitivity*". Cancer Res. 2000; 60: 6075-6079.
- [76] Heinemann V., Xu YZ, Chubb S., Sen A., Hertel LW., Grindey GB., Plunkett W. "*Cellular Elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: A mechanism of Self-Potential*". Cancer Res. 1992; 52: 533-539.
- [77] Siyuan Zeng, Marina Pöttler, Bin Lan, Robert Grützmann, Christian Pilarsky, Hai Yang. "*Chemoresistance in Pancreatic Cancer*". Int J Mol Sci. 2019; 20 (18):4504.
- [78] Chen Liang., et al., "*Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: Where we are and where we are going*". Exp. Mol. Med. 2017; 49(12): e406.
- [79] Min Liang., Tiangang Zhao., Linferg Ma., Yingjie Guo. "*CHK1 Inhibition Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine via Promoting CDK-dependent DNA Damage and Ribonucleotide Reductase Downregulation*". Oncol Rep. 2018; 39(3): 1322-1330.
- [80] Ali Anwar., Rongrong Dong., Longgiang Bai., Xianchang Yu., Yansu. "*The Physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review*". Biol. Res. 2018; 51:46.
- [81] Ainoa Planas-Riverola., Aditi Gupta., Isabel Betegon-Putze., Nadja Bosch., Marta Ibanes., Ana I. Cano-Delgado. "*Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress*". Development. 2019; 146(5): dev151894.
- [82] Damian Gruszka. "*The Brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance*". Int J Mol Sci. 2013; 14(5):8740-8774.
- [83] Trevor Nolan., Jiani Chen., Yanhai Yin. "*Cross-Talk of brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses*". Biochem J. 2017; 474(16):2641-2661.
- [84] Mei-Hui Yu., Zhe-Ze Zhao., Jun-Xian He. "*Brassinosteroid signaling in plant-microbe interactions*". Int J Mol Sci. 2018; 19(12):4091.

- [85] Yanhong Zhou., et al., "*Brassinosteroids play a critical role in the regulation of pesticide metabolism in crop plants*". *Sci Rep.* 2015; 5:9018.
- [86] Pravej Alam., et al., "*24-Epibrassinolide (EBR) Confers Tolerance against NaCl Stress in Soybean Plants by Up-Regulating Antioxidant System, Ascorbate-Glutathione Cycle, and Glyoxalase System*". *Biomolecules.* 2019; 9 (11):640.
- [87] Parvaiz Ahmad., "*Mitigation of sodium chloride toxicity in Solanum lycopersicum L. by supplementation of jasmonic acid and nitric oxide*". *Journal of Plant Interactions,* 2018; 13:1, 64-72.
- [88] Ali Anwar., et al., "*24-Epibrassinolide Ameliorates Endogenous Hormone Levels to Enhance Low-Temperature Stress Tolerance in Cucumber Seedlings*". *Int J Mol Sci.*2018; 19(9): 2497.
- [89] Shivani Saini., Isha Sharma and Pratap Kumar Pati. "*Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homoeostasis, signaling and crosstalks*". *Front Plant Sci.* 2015; 6:950.
- [90] Wenli Wu., et al., "*Physiological Mechanism of Enhancing Salt Stress Tolerance of Perennial Ryegrass by 24-Epibrassinolide*". *Front Plant Sci.* 2017; 8:1017.
- [91] Malíková, J., et al., "*Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids*". *Phytochemistry,* 2008. 69(2): p. 418-26.
- [92] Steigerova, J., Oklestkova, J., Levkova, M., Rarova, L., Kolar, Z. and Strnad, M. "*Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells*". *Chemico-biological interactions.* 2010; 188, 487-496.
- [93] Obakan, P., et al., "*SILAC-Based Mass Spectrometry Analysis Reveals That Epibrassinolide Induces Apoptosis via Activating Endoplasmic Reticulum Stress in Prostate Cancer Cells*". *PLoS One,* 2015. 10(9): p. e0135788.
- [94] Raj Kumar Yadav., et al., "*Endoplasmic reticulum stress and cancer*". *J Cancer Prev.* 2014; 19(2): 75-88.
- [95] Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, "*Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*". *J Clin Invest,* 2005. 115(10): p. 2656-64.

- [96] Meyerovich, K., et al., *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation*. J Mol Endocrinol, 2016. 57(1): p. R1-R17.
- [97] Jae-Seon So. “*Roles of endoplasmic reticulum stress in immune responses*”. Mol Cells. 2018; 41(8):705-716.
- [98] Walter P., Ron D. “*The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*”. Science. 2011; 334:1081–1086.
- [99] Fawcett T.W., Martindale J.L., Guyton K.Z., Hai T., Holbrook N.J. “*Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response*”. Biochem J. 1999; 339:135–141.
- [100] Puthalakath H., et al. “*ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim*”. Cell. 2007; 129:1337–1349.
- [101] Ye J., Rawson R.B., et al. “*ER Stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*”. Mol Cell. 2000; 6:1355–1364.
- [102] Ira Tabas., David Ron. “*Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*”. Nature Cell Biology. 2011; 13(3):184-90.
- [103] Gorman AM., et al. “*Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis*”. Pharmacology & Therapeutics. 2012. 134(3):306-13.
- [104] Cao SS., Kaufman RJ “*Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease*”. Antioxidants & Redox Signaling. 2014; 21:396-413.
- [105] Scott A. Oakes. Feroz R. Papa. “*The Role of Endoplasmic Reticulum Stress In Human Pathology*”. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2015. 10:173–94.

- [106] Adachi Y., Yamamoto K., Okada T., Yoshida H., Harada A., Mori K. "ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum". *Cell Struct Funct.* 2008; 33:75–89.
- [107] Yamamoto K., Yoshida H., Kokame K., Kaufman R.J., Mori K. "Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II". *J Biochem.* 2004; 136:343–350.
- [108] Cynthia Lebeau-pin., Deborah Vallee., Younis Hazari., et al, " Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease". *Journal of Hepatology* 2018 vol. 69 j 927–947.
- [109] Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., Glimcher, L.H. "The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α ". *Physiol Rev.* 2011; 91:1219–1243.
- [110] Sano, R. and J.C. Reed. "ER stress-induced cell death mechanisms". *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833(12): p. 3460-3470.
- [111] Kerr JF., Wyllie AH., Currie AR. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br J Cancer.* 1972; 26:239-57.
- [112] Watson, C. J. "Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ". *Breast Cancer Res.* 2006; 8(2): 203.
- [113] Elmore, S. "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
- [114] Duiker, E. W., A. G. van der Zee, P. de Graeff, W. Boersma-van Ek, H. Hollema, G. H. de Bock, S. de Jong ve E. G. de Vries "The extrinsic apoptosis pathway and its prognostic impact in ovarian cancer." *Gynecol Oncol.*2010; 116(3):549-555.
- [115] Hongmei, Z. "Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review." 2012.

- [116] Horvitz HR. "*Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans**". *Cancer Res.* 1999; 59:1701s–1706s.
- [117] Wong, R.S.Y., "*Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*". *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30(1):87.
- [118] Rebecca T. Marquez., Bryan W. Tsao., Nicholas F. Faust and Liang Xu. "*Drug Resistance and Molecular Cancer Therapy: Apoptosis Versus Autophagy*".
- [119] S. Shalini., L. Dorstyn., S. Dawar., S. Kumar. "*Old, new and emerging functions of caspases*". *Cell Death Differ.* 2015; 22(4):526-39.
- [120] Ellis HM., Horvitz HR. "*Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans**". *Cell.* 1986; 44:817–829.
- [121] Olson, M. and Kornbluth, S. "*Mitochondria in apoptosis and human disease*". *Current molecular medicine.* 2001; 1, 91-122.
- [122] McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, "*Caspase functions in cell death and disease*". *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. 7(4).
- [123] Boatright., K.M. and G.S. Salvesen. "*Mechanisms of caspase activation*". *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(6): p. 725-31.
- [124] Tummers, B. and D.R. Green, "*Caspase-8: regulating life and death*". *Immunol Rev*, 2017. 277(1): p. 76-89.
- [125] Marion Mac Faclane., Ann C. Williams. "*Apoptosis and disease: a life or death decision*". *EMBO Rep.* 2004; 5:674-678.
- [126] Gross A., McDonnell JM., Korsmeyer SJ. "*BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*". *Genes Dev.* 1999; 13: 1899-1911.
- [127] Grant Dewson., Ruth M Kluck. "*Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease*". *Cell Health and Cytoskeleton* 2010;2 9–22.
- [128] Mauria A. O'Brien, DVM and Rebecca Kirby, DVM, DACVIM, DACVECC. "*Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease*". 18 (6) 2008, pp 572-585.
- [129] Chinnaiyan, A.M. "*The apoptosome: heart and soul of the cell death machine*". *Neoplasia N.Y.* 1999; 1, 5-15.

- [130] Alfredo Gimenez-Cassina., Nika N. Danial. "*Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by Bcl-2 family proteins*". Trends Endocrinol Metab/ 2015; 26(4):165-75.
- [131] Kuwana, T. and Newmeyer, D.D. "*Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis*". *Current opinion in cell biology*. 2003; 15, 691-699.
- [132] Hill MM., Adrain C., Duriez PJ., Creagh EM., Martin SJ. "*Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes*". *Embo J*. 2004; 23:2134–45.
- [133] Li LY., Luo X., Wang X. "*Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*". *Nature*. 2001; 412:95–9.
- [134] Herr, I. and K.M. Debatin, "*Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy*". *Blood*, 2001. 98(9): p. 2603-14.
- [135] Schuler, M. and Green, D.R. "*Mechanisms of p53-dependent apoptosis*". *Biochemical Society transactions*. 2001; 29, 684-688.
- [136] Adrain, C., Creagh, E.M. and Martin, S.J. "*Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2*". *The EMBO journal*, 2001; 20, 6627-6636.
- [137] Caulfield, A.J. and W.W. Lathem. "*Disruption of fas-fas ligand signaling, apoptosis, and innate immunity by bacterial pathogens*". *PLoS Pathog*, 2014. 10(8): p. e1004252.
- [138] Wajant H. "*The Fas signaling pathway: more than a paradigm*". *Science*. 2002; 296:1635–6.
- [139] Lavrik, I.N., "*Systems biology of death receptor networks: live and let die*". *Cell Death Dis*, 2014. 5: p. e1259.
- [140] Sayers, T.J., "*Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy*". *Cancer Immunol Immunother*, 2011. 60(8): p. 1173-80.
- [141] Karp G. "*Cell and molecular biology: Concepts and experiments*". 2008, John New Jersey: Wiley and Sons, 653-657. 5/

- [142] Sameer H., Patel Michael J., Edwards Syed A. Ahmad "Intracellular Ion Channels in Pancreas Cancer". *Cell Physiol Biochem* 2019;53(S1):44-51.
- [143] Burris H.A., Moore M.J., Andersen J., et al. "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial". *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:2403–2413.
- [144] Manoj Amrutkar ID and Ivar P. Gladhaug. "Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine" *Cancers* 2017, 9, 157.
- [145] Deer EL., et al. "Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines". *Pancreas* 2010. 39:425-435.
- [146] Awasthi N., et al. "Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer". *Carcinogenesis* 2013. 34:2361-2369.
- [147] Mirza, M.B., et al., *Induction of apoptosis and cell cycle arrest by ethyl acetate fraction of Phoenix dactylifera L. (Ajwa dates) in prostate cancer cells.* *J Ethnopharmacol* 2018. 218: p. 35-44.
- [148] Olson, M. and Kornbluth, S. "Mitochondria in apoptosis and human disease". *Current molecular medicine* 2001. 1, 91-122.
- [149] Nigel J. Waterhouse., Joshua C. Goldstein., et al. "Cytochrome c Maintains Mitochondrial Transmembrane Potential and ATP Generation after Outer Mitochondrial Membrane Permeabilization during the Apoptotic Process". *The Journal of Cell Biology*, Volume 153, 2001. 319–328.
- [150] Li Wang., Yi Zhang., et al. " Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs)". *PLoS One* 2017; 12 (8): e0184110.
- [151] Hye Jung Kim., et al. "13-Ethylberberine Induces Apoptosis through the Mitochondria-Related Apoptotic Pathway in Radiotherapy-Resistant Breast Cancer Cells". *Molecules* 2019. 24, 2448.

- [152] Bhardwaj R., et al. "Prevalence of rheumatic fever and rheumatic heart disease in rural population of Himachal--a population Based study". The Journal of the Association of Physicians of India 2012. 60:13-14.
- [153] J.P. Teng., et al. "Gemcitabine and cisplatin for treatment of lung cancer *in vitro* and *vivo*". European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2018; 22: 3819-3825.
- [154] Riccardi C., Nicoletti I. "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry". Nature protocols 2006. 1(3):1458-1461.
- [155] Linghui Chen., et al. "HINT2 triggers mitochondrial Ca²⁺influx by regulating the mitochondrial Ca²⁺uniporter (MCU) complex and enhances gemcitabine apoptotic effect in pancreatic cancer". Cancer Letters 411, 2017. 106e116107.
- [156] William R. Clarke., Laufey Amundadottir., Michael A James. "CLPTM1L/CRR9 Ectodomain Interaction with GRP78 at the Cell Surface Signals for Survival and Chemoresistance Upon ER Stress in Pancreatic Adenocarcinoma Cells". Int. J. Cancer, 2019: 144, 1367–1378.
- [157] Y. Chen and F. Brandizzi, "IRE1: ER stress sensor and cell fate executor," Trends in Cell Biology. 2013.
- [158] Francesca Vena., et al. " The MEK1/2 Inhibitor Pimasertib Enhances Gemcitabine Efficacy in Pancreatic Cancer Models by Altering Ribonucleotide Reductase Subunit-1 (RRM1)". Published Online First 2015.

EKLER

Table 1: Kullanılan cihazlar listesi.

CİHAZ TANIMI	ÜRÜN KODU	ÜRETİCİ FİRMA ve ÜLKESİ
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5 µl-10 µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20 µl-200 µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200 µl-1000 µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/Prolab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	N315	SEM/MettlerToledo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/Prolab
Dry Heat Sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo

Floresan Mikroskopu	Model:1X71	Olympus
-80 °C Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer U725 innova	New Brunswick Scientific
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6

Table 2: Hücre Kültürü Donanımları.

MALZEME TANIMI	ÜRÜN KODU	ÜRETİCİ FİRMA ve ÜLKESİ
12 kuyucuklu petri	92012	TPLP
6 kuyucuklu petri	92006	TPLP
96 kuyucuklu petri	92096	TPLP
75 cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPLP
25 cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPLP
100 mm hücre büyütme kapları	93100	TPLP
60 mm hücre büyütme kapları	93060	TPLP
Steril pipetler (5 ml)	94005	TPLP
Steril pipetler (10 ml)	94010	TPLP
Şırınga Filtreleri (0,22µm)	99722	TPLP
Enjektör Seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
RPMI 1640	PO4-18947	PAN BIOTECH
AsPC-1	CRL-1682	ATCC

Table 3: Kullanılan Kimyasalların Listesi.

KİMYASAL ADI	ÜRÜN KODU	ÜRETİCİ FİRMA ve ÜLKESİ
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	Sigma-Aldrich
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
İzopropanol	K44518295 321	Merck
2-MerkaptoEtanol	S4805940 517	Merck
Akrilamid/Bis-Akrilamid %30 çözelti	A9099	Sigma-Aldrich
Amonyum Persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	Merck
EDTA	A2937	Applichem
Dioc ₆ Boyası	2129966	Fluka
DCFH-DA Boyası	C6827	Invitrogen
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	D1306	Thermo Scientific
PI Boyası	P4170-100MG	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Acid	C9008-1G	Sigma-Aldrich
MTT Solüsyonu	M2128-5G	Sigma-Aldrich
Luminol	A2185	Applichem
Phosphate Buffered Saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA

Sığır Serum Albumin (PSA)	A2153-10G	Sigma-Aldrich
SDS (Sodyum Dedosil Sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	Sigma-Aldrich
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Acid	27225	Sigma-Aldrich
Ethidium Bromide	E1510	Sigma-Aldrich
Tris-HCL	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6 x Yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Ammonyum Asetat	1,110115,1000	Merck
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Gemsitabin		
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween 20	S6740684348	Merck
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H ₂ O ₂ Hidrojen Peroksi	K39218400838	Merck
Super Blocj T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega

Ponceau Read	A1405	Applichem
Hidroklirik Asit	K43804717239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK

Table 4: %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği

Alt Jel	Üst Jel	
Distille Su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCL	2,5 ml (1,5M, pH:8.8)	1,125 ml (0,5M, pH:6,8)
% 10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05 ml

ÖZGEÇMİŞ

1.Adı Soyadı: Fadina KURYAYEVA

İletişim Bilgileri:

Adres: Çobançeşme Mahallesi, Çardak Sokak No:6 D:1.
Bahçelievler / İSTANBUL

Telefon: 0 552 261 99 21

E-posta: fedinekuryayeva@gmail.com

2.Doğum Tarihi: 17.11.1997

3.Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrencisi

4.Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Azerbaycan Devlet Pedagoji Üniversitesi – Azerbaycan	2014- 2018
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi- Türkiye	2018- 2020

5.Yayımlar

5.1. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

- **Fadina Kuryayeva**, Elif Damla Arisan, Ajda Coker Gurkan and Pınar Obakan Yerlikaya “Epibrassinolide promotes the apoptotic potential of



gemcitabine in pancreatic cancer cells” 3rd NPCPT Congress, Kayseri-TURKEY, 18-20 December 2019.

6.Ödüller ve Sertifikalar

- 3rd NPCPT Congress, Turkey 2019 – En iyi poster sunum sertifikası

7. Katıldığı Bilimsel Kongre / Seminer / Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

- İstanbul Medeniyet Üniversitesi – ONKOLOJİ SEMPOZYUMU, Katılımcı 2020
- BİRÜNİ Üniversitesi – Nadir Hastalıklar Günü, Katılımcı 2020
- Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – III.GENÇÖMÜ Öğrenci Kongresi 2020
- Anadolu Sağlık Merkezi – 2 Moleküler Tümör Konseyi
- TSC Yönetim Sistemi Akademisi – ISO / IEC 17025: 2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği 2019
- TSC Yönetim Sistemi Akademisi – ISO 22716: 2007 Kozmetik İyi Üretim Uygulamaları GMP 2019
- TSC Yönetim Sistemi Akademisi – GMP İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası, 2019
- TSC Yönetim Sistemi Akademisi – GLP İyi Laboratuvar Uygulamaları, 2019

8. Referanslar

- Azerbaycan Pedagoji Üniversitesi Kimya ve Biyoloji fak. Dekanı Doç. Dr. Elnare Mehbaliyeva
- Tel: +994 12 498 72 91
- E-Posta: elnare.mehbaliyeva@adpu.edu.az
- Azerbaycan Pedagoji Üniversitesi Kimya ve Biyoloji fak. BTM Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Anaxanım Yusifova

- Tel: +994 12 493 29 70
- E-Posta: anaxanim.yusifova@adpu.edu.az
- Azərbaycan Pedagoji Üniversitesi Kimya ve Biyoloji fak. Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Raul Sultanov
E-Posta: rsultanov@bk.ru

