

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GEMSİTABİNE DİRENÇLİ PANKREAS KANSERİ 3B HÜCRE
MODELLERİNDE WNT SİNYAL YOLUNU HEDEFLEYEN miRNA
ARACILI İLACA DUYARLILIĞIN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİLARA KAZANCI

1800003886

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI

MAYIS, 2024

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GEMSİTABİNE DİRENÇLİ PANKREAS KANSERİ 3B HÜCRE
MODELLERİNDE WNT SİNYAL YOLUNU HEDEFLEYEN miRNA
ARACILI İLACA DUYARLILIĞIN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİLARA KAZANCI

1800003886

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI

Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN

Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK

MAYIS, 2024

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum yüksek lisans hayatım boyunca derslerine girmekten her zaman keyif aldığım, her konuda anlayışı ile öğrencilerine yardım eden ve yapılan çalışmalara verdiği özveri sayesinde en iyisini yapmamızı teşvik eden ve yaparken de aynı özveriyi bizlere kazandırmaya çalışan, çalışma azmine ve olaylara bakış açısına ve metanetine hep hayranlık duyduğum, hep örnek aldığım, engin bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yoluma ışık tutan, her ne olursa olsun yanımda olup destek olan, her zaman naifliği ve güler yüzü ile hatırlayacağım, bana projede görev alma imkânı sunmuş olan saygıdeğer tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI'na sonsuz saygı, minnet, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca bana bilgi ve deneyimleri ile hem laboratuvar hem de eğitim hayatıma olan yardım ve desteklerini hiç esirgemeyen, hep güler yüz ve anlayışla yaklaşan, her konuda sorularımı cevapsız bırakmayan çok kıymetli öğretmenlerim sayın Dr. Burcu AYHAN-ŞAHİN ve Dr. Pelin ÖZFİLİZ-KILBAŞ'a bana kattıkları her şey için teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman öğretilerini dinlemekten keyif aldığım, güler yüzleriyle çalışma motivasyonumuzu arttıran, sorularımı yanıtsız bırakmayıp destek olan çok değerli saygıdeğer hocalarım Dr. Sinan MERİÇ, Dr. Alp AYAN, Ar. Gör. Tamer GÜMÜŞ ve Ar. Gör. Enes BAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim dönem boyunca çalışmaktan hep keyif duyduğum ve yardımını benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Ayşe Simay METİN, Yiğit Efe AYDIN, Kübranur BAYRAKTAROĞLU, Mustafa ATAKAN ve laboratuvarında çalıştığım süreç boyunca desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yıl boyunca yanımda ve arkamda olup desteklerini ve sevgilerini hep hissettiren kıymetli dostlarım Nergis KONAR, Zehra GİRİTLİOĞLU, Ecem TOSUN ve Osman DENİZHAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca güvenini ve sevgisini hep hissettiğim, en zorlandığım ve yorulduğum anlarda hep yanımda kurtarıcı olan sevgili Kaan SANCAK’a teşekkür ederim.

Beni akademik olarak ilerlemeye teşvik eden, maddi ve manevi olarak hep yanımda bulunan canım dayım İsmail Hakkı KULAKSIZOĞLU’na ve tüm hayatım boyunca bana destek olan her konuda arkamda duran, maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, sonsuz sevgi ile bugünlere gelmem için hep emek veren sahip olduğum en kıymetli hazinem sevgili ailem, canım babam Ekrem İsmail KAZANCI’ya, canım annem Hülya KAZANCI’ya ve canım kardeşim Hacer KAZANCI’ya beni hep destekledikleri ve hep yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tez çalışmamı TÜBİTAK tarafından 122Z862 proje numarası ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı, çok kıymetli dedem “Hamit KAZANCI” ya ithaf ediyorum.

Mayıs, 2024

Dilara KAZANCI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	xv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Pankreas Kanseri Nedir?	4
2.3. Pankreas Kanserin Patogenezi ve Moleküler Süreci.....	6
2.3.1. Moleküler süreç.....	6
2.3.2. Patogenez	7
2.4. Pankreas Kanseri Türleri.....	10
2.5. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	12
2.6. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	13
2.6.1. Değiştirilebilen risk faktörleri;	14
2.6.2. Değiştirilemeyen risk faktörleri;	15
2.7. Pankreas Kanseri Hücre Hatları ve Karakteristik Özellikleri	17
2.3. Pankreas Kanseri Mutasyon Profili ve Genetik Değişiklikler.....	18
2.3.1. Onkogenler ve Tümör Supresör Genler	18
2.4. Pankreas Kanseri Mikro çevresi.....	21
2.5. Pankreas Kanseri Mevcut Tedavi Yöntemleri.....	23
2.6. Mevcut tedavi Stratejileri.....	25

2.7.	Pankreas Kanserinde Kullanılan Kemoterapötik İlaçlar	26
2.7.1.	Palbosiklib (PAB)	26
2.7.2.	Erlotinib (ERL)	27
2.7.3.	Paklitaksel (PTS).....	27
2.7.4.	Sispilatin (SP).....	28
2.7.5.	Gemsitabin (GEM).....	28
2.8.	Gemsitabin Farmakolojisi	29
2.8.1.	Kimyasal Yapı ve Özellikleri.....	29
2.8.2.	Taşıma, Metabolizma ve Etki Mekanizması	30
2.9.	Kemorezistansta Gemsitabin Mekanizmaları.....	32
2.10.	Nükleozit Taşıyıcıları.....	33
2.11.	Nükleozit Enzimleri	34
2.12.	Epiyelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT).....	36
2.13.	Pankreas Kanserinde Kemorezistans	38
2.14.	Hücre Döngüsü.....	40
2.15.	Hücre Ölüm ve Sağ Kalım İlişkili Sinyal Yolakları	42
2.15.1.	Apoptoz	42
2.15.2.	PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı.....	46
2.16.	Hippo sinyal yolu	49
2.17.	WNT / β -catenin sinyal yolu.....	50
2.18.	Pankreas Kanserinde Wnt/ β -Katenin Sinyallemesi	52
2.19.	MikroRNA'lar ve Kemorezistans	54
2.19.1.	mikroRNA'lar (miRNA)	54
2.19.2.	Pankreas Kanseri Sinyal mekanizmalarının ve Gemsitabin Metabolizmasının miRNA'larla ilişkisi	55
2.19.3.	miR-150 ve Kanser	58
2.19.4.	Pankreas Kanserinde miR-345, miR-92 ve miR-27'nin Rolü.....	59

2.20.	3B <i>in vitro</i> Modeller.....	60
3.	MATERYAL VE METOT	63
3.3.	3.1. Materyaller	63
3.3.1.	Kullanılan Cihazların Listesi.....	63
3.1.2.	Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi.....	63
3.1.3.	Kullanılan Kimyasallar Listesi.....	63
3.1.4.	Kullanılan Tamponların İçerik Listesi	63
3.4.	Metot	63
3.4.1.	Hücre Kültürü.....	63
3.4.2.	Dirençli Hücre Hatları.....	64
3.4.3.	Hücre Dondurma.....	64
3.4.4.	Hücrelerin Pasajlanması.....	64
3.4.5.	MTT Hücre Proliferasyon Yöntemi.....	65
3.4.6.	Floresan Boyama.....	65
3.4.7.	Koloni Oluşumu Yöntemi.....	66
3.4.8.	Yumuşak Agar Deneyi.....	66
3.4.9.	Asılı Damla Modeli.....	67
3.4.10.	miRNA izolasyonu ve RT PCR	67
3.4.11.	İmmünoablamlama	68
3.4.12.	Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu (RT PCR)	70
3.4.13.	miRNA mimik/Anti-miR transfeksiyonu.....	70
3.4.14.	Hücre sağkalım testi DiOC ₆ boyama.....	71
3.4.15.	miRNA modülasyonu sonrası immünoablamlama.....	71
3.4.16.	Propidyum iyodür ile boyama, hücre akış sitometrisi.....	71
3.4.17.	İstatistiksel analiz.....	72
4.	SONUÇLAR.....	73

4.3. Gensitabin Uygulaması, İlaça Dirençli Hücre Grubuna Göre Hücre Canlılığını Azaltıcı Yönde Etki Etmiştir.	73
4.4. PANC-1, MiaPaCa-2 ve Dirençli (Gem+) Hücre Hatlarında Gensitabin Uygulamasının Mitokondri Membran Potansiyeli ve Morfolojik Değişim Üzerine Etkisinin Floresan Boya ile İncelenmesi.	74
4.5. Gensitabinin'nin Üç Boyutlu (3B) Hücre Formlarına Etkisinin Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Deneyi ile İncelenmesi	76
4.6. Gensitabin Uygulaması PANC-1 ve MiaPaCa-2 Hücre Hatlarında Dirençli Hücrelere Kıyasla Koloni Oluşturma Potansiyeline Ket Vurmuştur.....	77
4.7. Asılı Damla Deneyi ile Pankreas Kanseri Hücrelerinde Gensitabin Uygulamasının Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi.....	79
4.8. Asılı Damla Deneyi ile PANC-1 ve MiaPaCa-2 Hücrelerinde Gensitabin Uygulamasının zamana bağlı Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi.....	82
4.9. Gensitabin Uygulamasının Direnç Mekanizmasında Görev Alan Protein İfadelerine Etkisi.....	84
4.10. 2B Ve 3B Kültürlerdeki Gem+ Ve Normal PANC-1/Miapaca-2 PK Hücrelerinde Seçili miRna Analizi.....	86
4.11. PANC-1 ve MiaPaCa-2 Pankreas Kanseri Hücrelerine miR-150 Transfeksiyonu ve Gensitabin Uygulaması.....	89
4.12. Pankreas Kanseri Hücrelerinin miR-150 ve Gensitabin Uygulamaları ile Zamana Bağlı Sağkalım Analizi.....	90
4.13. miR-150 Mimik Transfeksiyonu ve Gensitabin Uygulamasının Pankreas Kanseri Hücrelerinde Koloni Oluşturma Etkisinin Gösterilmesi	93
4.14. miR-150 Mimik Transfeksiyonu ve Gensitabin Uygulamasının Pankreas Kanseri Hücrelerinin 3B Hücre Formlarına Etkisinin Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Deneyi ile İncelenmesi	94
4.15. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyon ile Gensitabin Uygulamasının Direnç Mekanizmasında Rol Alan Protein İfadelerine Etkisi	96

4.16. Mir-150 Mimik Transfeksiyonu Yapılan PANC-1 Ve Miapaca-2 Hücrelerinde Gemsitabinin Hücre Döngüsü Fazları Üzerindeki Etkisi.	99
5. TARTIŞMA	103
KAYNAKÇA	127
7. EKLER.....	141
7.3. EK A: Cihaz Listesi	141
7.4. EK B: Hücre Kültürü Donanım Listesi	142
7.5. EK C: Kimyasal Listesi.....	143
7.6. Kullanılan Primer Dizileri.....	144
7.7. KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	144
7.7.1. Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml).....	144
7.7.2. Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için).....	144
7.7.3. 5X Laemmli Tamponunun Hazırlanışı (10 ml).....	144
7.7.4. Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı (250 ml).....	144
7.7.5. Amonyum Persülfat (%10)	145
7.7.6. Bloklama sütü (%5).....	145
7.7.7. Bradford Reaktifi	145
7.7.8. Tris-Baz Çözeltisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı (pH 8,8).....	145
7.7.9. Tris-Baz Çözeltisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı (pH 6,8).....	145
7.7.10. %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı.	145
7.7.11. 10X Yürütme Tamponun Hazırlanışı (pH 8,3)	145
7.7.12. 10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3).....	145
7.7.13. %12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	146
7.7.14. 10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6).....	146
7.7.15. %5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml).....	146
7.7.16. Tris-Baz Çözeltisinin (1 M) Hazırlanışı (pH 8,5)	146
7.7.17. Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)	146

7.7.18.	Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)	146
7.7.19.	10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4)	147
7.7.20.	Kemiluminesans çözelti hazırlanışı.....	147



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Pankreasın üç bölgesi, Patogenezi ve Moleküler Süreci.....	5
Şekil 2. Her aşamada PK'nin ve ilgili genlerin gelişiminin şematik gösterimi	6
Şekil 3. Pankreas kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan faktörler: Enflamasyon, fibroz, anjiyogenez, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu, kanser kök hücreleri ve immün baskılayıcı tümör mikro ortamı dahil olmak üzere pankreas kanserinin başlamasına ve ilerlemesine birçok faktör katkıda bulunur [12]......	10
Şekil 4. Her İki Cinsiyette İnsidans ve Ölüm oranı.....	13
Şekil 5. Pankreas kanseri hastalarının risk faktörleri.	15
Şekil 6. Pankreas Duktal Adenokarsinomunun Patogenezi.	21
Şekil 7. Pankreas kanserinde tümör mikro ortamının şeması	23
Şekil 8. Gempitabin molekülü ve modifikasyon bölgeleri	29
Şekil 9. Gempitabinin DNA tamir mekanizması inhibisyonu.	31
Şekil 10. Gempitabinin etki mekanizması	32
Şekil 11 Gempitabin direnci ve metabolizması	38
Şekil 12. Hücre döngüsünü oluşturan düzenleyici ajanlar	40
Şekil 13 Kanser hücresi ölümünün genel şekli.	43
Şekil 14 Apoptoz.....	46
Şekil 15. PI3K/Akt/mTOR normal ve PK sinyal yolağı.....	48
Şekil 16. Hippo sinyali.....	50
Şekil 17. Pankreas kanserinde Wnt / β -katenin sinyalinin onkogenik rolü.....	54
Şekil 18. PDAK'ın gelişim aşamalarında belirli miRNA'ların ekspresyonu.....	56
Şekil 19. miR-150'nin yer aldığı kromozom.	59
Şekil 20. Pankreas duktal adenokarsinomunda etkili miRNA'lar.....	60
Şekil 21. 2 boyutlu ve 3 boyutlu modellerin karşılaştırılması.....	62
Şekil 22. PANC-1 hücre hattında canlılığın belirlenmesi (24 s).....	73
Şekil 23. MiaPaCa-2 hücre hattında canlılığın belirlenmesi (24 s).....	74
Şekil 24. MIA PaCa-2, PANC-1 ve dirençli hücre hatlarında gempitabinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisinin incelenmesi.....	75
Şekil 25. Yumuşak agar deneyi ile sferoid oluşumunda Gempitabin etkisinin gösterilmesi	77
Şekil 26. hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi.	78

Şekil 27. Asılı damla yöntemi ile PANC-1 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi.....	80
Şekil 28. Asılı damla yöntemi ile MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi.....	81
Şekil 29. Asılı damla yöntemi ile PANC-1 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi.....	82
Şekil 30. Asılı damla yöntemi ile MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi.....	83
Şekil 31. PANC-1, MiaPaCa-2 ve dirençli 2B hücre formlarında Gemsitabin varlığının Direnç mekanizmalarındaki sinyal yollarına etkisi.	85
Şekil 32. Gem+ ve normal Panc-1 hücrelerinin 2B ve 3B formlarında miR-345, miR-150, miR-92a-3p ve miR-27b-3p ekspresyon seviyelerinin incelenmesi	86
Şekil 33. Gem+ ve normal MiaPaCa-2 hücrelerinin 2B ve 3B formlarında miR-345, miR-150, miR-92a-3p ve miR-27b-3p ekspresyon seviyelerinin incelenmesi	88
Şekil 34. PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyon sonrası Gemsitabinin belirtilen miRNA ifadesine etkisi	89
Şekil 35. 2B PANC-1 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Gemsitabinin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi	91
Şekil 36. 2B MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Gemsitabinin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi.	92
Şekil 37. a. miR-150+ ve/veya GEM uygulanan MiaPaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri.....	93
Şekil 38. Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile miR-150 transfeksiyonu sonrası koloni oluşturma etkisinin gösterilmesi.	94
Şekil 39. Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile gemsitabinin miR-150 transfeksiyonunun sonrası koloni oluşturma üzerindeki etkisinin gösterilmesi.....	95
Şekil 40. MiaPaCa-2 2B hücre formlarında miR-150'nin Gemsitabin varlığında direnç mekanizmalarına etkisi.....	97
Şekil 41. PANC-1 2B hücre formlarında miR-150'nin Gemsitabin varlığında direnç mekanizmalarına etkisi.....	98
Şekil 42. miR-150 mimik transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Gem+ Panc-1 hücrelerinde gemsitabinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisi.....	100
Şekil 43. miR-150 mimik transfeksiyonu yapılan MiaPaCa-2 ve Gem+ MiaPaCa-2 hücrelerinde gemsitabinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisi.	101

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Pankreas Kanseri ile İlişkili Ailesel Kanser Sendromları ve Genler	16
Tablo 2. Pankreas Hücre Hatları ve Özellikleri	17
Tablo 3. Pankreas kanseri hastaları için FDA tarafından onaylanan tedaviler	25
Tablo 4. Pankreas kanserinde gemitabin metabolizması ile ilişkili kemorezistans varlıkları.....	33
Tablo 5. Seçili miRNA'ların dizi ve hedefleri ve pankreas kanserindeki rolü.	68
Tablo 6. Kullanılan Cihazların Listelenmesi.....	141
Tablo 7. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi.....	142
Tablo 8. Kullanılan Kimyasalların Listesi	143
Tablo 9. Primer dizileri	144
Tablo 10. Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	146
Tablo 11. Kemiluminesans çözelti hazırlanışı	147

KISALTMALAR

ARK5: AMPK ilişkili protein kinaz 5

ATP: adenozin trifosfat (ATP)

APK: Ailesel pankreas kanseri

ABC: ATP bağlayıcı kaset

BSA: bouvine serum albümin

CXCL12: kemokin ligand 12

CDK: Siklin bağımlı kinaz

CDA: sitidin deaminaz

cN1/3: sitozolik 5'-nükleotidaz I/II

CCK : kolesistokinin

CKI: CDK inhibitörleri

CF: CFPAC-1

Chk1i: Chk1 inhibitörleri

CXC: kemokin ligand

DISK: ölümü indükleyen bir sinyal kompleksi

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-fenilindol

dCTD: deoksisitidilat deaminaz

dck: Deoksisitidin kinaz

dFdCDP: deoksisitidin kinaz difosfat

dFdCMP: deoksisitidin kinaz monofosfat

dFdCTP: deoksisitidin kinaz trifosfat

dFdU: deoksiüridindir

DiOC₆ : 3', 3'- Diheksiloksakarbosiyanin iyodür

ECM: Ekstrasellüler matriks

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EMT: Epitelyal-mezankimal geçiş

GEM: Gempitabin

hENT: İnsan dengelenmiş nükleozit taşıyıcı-1

HuR: RNA bağlayıcı protein insan antijeni R

Hh; Hedgehog

HIF: Hipoksi ile indüklenbilir faktör

HR: homolog rekombinasyon

IRS-1,2: İnsülin reseptör substratları

MDR: çoklu ilaç direnci

MUC1: Hücre yüzey ilişkili müsin 1 (MUC1),

miRNA: mikroRNA

MK2: MAPK ile aktive olan protein kinaz

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

MP: MIA PaCa-2

mPTP: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru

NHEJ: Homolog olmayan uç birleştirme

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PTS: Paklitaksel

PAB: Palbosiklib

PC: PANC-1

PDA : Pankreas duktal adenokarsinom

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz

UMP-CMP kinaz: Pirimidin nükleozit monofosfat kinaz

PK: Pankreas kanseri

RTK: Reseptör tirozin kinazların

RB: retinoblastoma

RR: ribonükleotit redüktaz

SP: Sispilatin

TRAIL: TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand

TS: Timidilat sentaz

TKI: Tirozin kinaz inhibitörü

TSC2: Tuberöz skleroz kompleksi-2

TNF: Tümör nekroz faktörü

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

5FU: 5-fluorourasil

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Derece

nM : Nanomolar

g: gram

kDa: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

ml: Mililitre

µl : Mikrolitre

mm: Milimetre

nM: Nanomolar

nm: Nanometre

V: Volt

pH: Hidrojen derecesi

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

sa : Saat

ÖZET

Pankreas kanseri (PK), agresif ve mortalitesi yüksek malign tümörlerden biridir. Tüm kanser ölümlerinin %7'sini oluşturan ve %8,5'lik düşük bir genel sağkalım oranıyla en ölümcül kanser türlerinden biridir. Çoğu hasta tanısı geç evrede konulduğundan kemoterapi birincil tedavi seçeneğidir ancak kemorezistans önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Gemsitabin tedavide hasta sağkalım oranını 4-5 kat daha fazla arttırmasına rağmen tedaviden sonraki haftalar içinde başlangıçta duyarlı olan tümörlerin gemsitabin kemo-direnci geliştirdiği görülmüştür. PK'de bu kemo-dirençte rol oynayan Wnt/ β -katenin, Hippo, PI3K/Akt/mTOR, EMT süreci gibi birkaç sinyal yolu tanımlanmıştır. Önceki çalışmalarla bazı miRNA'ların bu genetik değişikliklerde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, PK tedavi sürecinde tedaviyi olumsuz etkileyen ve ilaca direnç mekanizmasının 3 Boyutlu hücre profillerinde miRNA'ların rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen miRNA'lar tümörigenez, migrasyon ve invazyonda rol alan Wnt yolağını hedefleyen miRNA'lardır. miR-150'nin ekspresyon analizleri pankreas duktal karsinomunun önemli bir baskılayıcısı olduğu ve miR-150'nin düşük ekspresyonuna sahip hastaların ölüm oranlarının yüksek miR-150 ekspresyonuna sahip olanlara göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir. Buna göre 3B ve 2B kültürlerde Wnt ve/veya kemorezistans ile ilişkili sinyallerinin baskılanması için miRNA fonksiyonunu taklit edebilen sentetik miRNA (mimik) kullanımı amaçlanmıştır. Mimik miR-150 transfeksiyonları sonrası oluşturulan kültürlerin gemsitabine karşı direnç mekanizmalarını ve hedef sinyal yollarının aktivasyonunu baskıladığı görülmüştür. GEM direncinin üstesinden gelebilmek için mimik miR-150 ifadesinin kullanılabileceğine yönelik umut veren potansiyel terapi kombinasyonlarını tahmin etme ve hastalığın teşhisinde biyo-belirteç olarak kullanılabilecek öncül sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas Kanseri, Kemo-direnç, miRNA

ABSTRACT

Pancreatic cancer (PC) is one of the most aggressive and high mortality malignant tumors. It is one of the most lethal cancer types, accounting for 7% of all cancer deaths and with a low overall survival rate of 8.5%. Since most patients are diagnosed at a late stage, chemotherapy is the primary treatment option, but chemoresistance poses a significant challenge. Although gemcitabine increases the patient survival rate 4-5-fold, it has been observed that initially sensitive tumors develop gemcitabine chemoresistance within weeks of treatment. Several signaling pathways such as Wnt/ β -catenin, Hippo, PI3K/Akt/mTOR, EMT process have been identified in PC that play a role in this chemo-resistance. Previous studies have shown that some miRNAs play a role in these genetic changes. In this study, we aimed to investigate the role of miRNAs in 3D cell profiles that negatively affect the treatment and drug resistance mechanism in the PC treatment process. The miRNAs identified are miRNAs targeting the Wnt pathway, which is involved in tumorigenesis, migration and invasion. miR-150 expression analysis showed that miR-150 is an important suppressor of pancreatic ductal carcinoma and the mortality rates of patients with low expression of miR-150 were significantly higher than those with high miR-150 expression. Accordingly, we aimed to use synthetic miRNA (mimics) that can mimic miRNA function to suppress Wnt and/or chemoresistance-related signaling in 3D and 2D cultures. Mimic miR-150 transfections suppressed the mechanisms of resistance to gemcitabine and the activation of target signaling pathways in the cultures. Preliminary results have been obtained to predict promising potential therapy combinations in which mimic miR-150 expression can be used to overcome GEM resistance and can be used as a biomarker in the diagnosis of the disease.

Key Words: Pancreatic cancer, chemo-resistance, miRNA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Pankreas kanseri, tüm kanser ölümlerinin %7'sini oluşturan ve %8,5'lik genel sağ kalım oranıyla, tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu en ölümcül kanser türlerinden biridir. Pankreas kanseri, pankreasın anatomik olarak konumunun güç yerde olması, erken evrelerinde başlangıç semptomlarının gözle görülür olmaması, belirti veya semptom görüldüğünde ise diğer birçok hastalığın belirti ve semptomları gibi görülmesi PK'nın erken teşhis edilmesini mümkün kılmamaktadır. PK görülme sıklığı ve ölüm oranının birbirine yakın olduğu ve 2030 yılında en sık görülen kanser sıralamasında 2. olarak yer alacağı öngörülmektedir.

Pankreas kanseri, diğer antikanser ajanlara kıyasla gemcitabine karşı daha duyarlı olmasına rağmen, çoğu hasta tedavinin başlamasının ardından haftalar içerisinde direnç geliştirerek sağ kalım oranının düşmesine yol açmaktadır. Ajanların kombine terapilerdeki başarı yüzdesi daha yüksek olmakla birlikte hücre sağ kalım ve metastazını hedef alan farklı etki mekanizmalarına sahip terapi kombinasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Çalışmamızda, PK tedavi sürecinde tedaviyi olumsuz etkileyen en önemli nedenlerden biri olan ilaca direnç mekanizmasında miRNA'ların rolünün incelenmesi amaçlanmaktadır. Belirlenen miRNA'lar tümörigenez, migrasyon ve invazyonda rol alan Wnt yolağını hedefleyen miRNA'lardır. Bu kapsamda öncelikle gemsitabine dirençli hücre hatları eldesi için PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerine kademeli olarak artan konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100, 300, 500 ve 1000 nM) gemsitabin uygulanacaktır. Final gemsitabin konsantrasyonu IC50 oranı hücre sağ kalım testine göre belirlenecektir. Gemcitabine dirençli (Gem+) ve normal Panc-1/MiaPaCa-2 hücreleri ile 3B sferoid kültürler oluşturulacaktır. 3B kültürler, 2B hücre kültürlerine göre tümör dokusunu taklit edebilen formlar oluşturabilmekte ve terapötik ajanların tümör gelişimini baskılamada ne kadar etkili olabileceğini gösterebilmektedir.

Kanser ve çeşitli hastalıklarla ilişkili olarak literatürde geniş bir çalışma alanı olan miRNA'lar, özellikle hücre proliferasyonu, farklılaşması ve metastaz gibi tümörigenez

süreçlerinde görev alarak ifade seviyelerindeki değişiklere bağlı olarak onkogen özellik gösterebildikleri gibi tümör baskılayıcı olarak da rol alabilirler.

Bunu baz alarak araştırmanın devamında, normal ve Gem⁺ hücrelerden oluşturulan 3B sferoid yapıları ile 2B Panc-1/MiaPaCa-2 hücrelerinde Wnt ve Hippo sinyal yolağını hedefleyen belirli miRNA'ların (miR-375, miR-27b-3p, miR-92a-3p, ve miR-150-5p) ifadeleri analiz edilecektir. İlaça dirençliliğe ek olarak 3B kültür ortamının sinyal yolaklarını hedefleyen miRNA ifadelerine etkisi kontrol grupları ile karşılaştırılarak incelenecektir.

Araştırmanın son basamağında Gem⁺ PANC-1/MiaPaCa-2 ile normal Panc-1/MiaPaCa-2 hücrelerinden elde edilen 3B ve 2B kültürlerde Wnt ve/veya Hippo sinyallerinin baskılanması için terapötik ajan olarak miRNA fonksiyonunu taklit edebilen sentetik miRNA (mimik) ve/veya miRNA inhibitörleri (anti-miR) kullanımı amaçlanmıştır. Gem⁺/⁻ hücrelerin 3B sferoid çaplarının miRNA ifadelerinin düzenlenmesine bağlı olarak %25 oranında baskılanması hedeflenmiştir. İlgili sinyal yolaklarına ek olarak hücre siklusunda ve apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmalarında görev alan anahtar protein ifadelerinde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma sağlanması amaçlanmaktadır. miRNA mimik/anti-miR transfeksiyonları sonrası oluşturulan 3B kültürlerin gempitabine karşı oluşturdukları yanıtın terapi hakkında önemli ipuçları sağlayacağı öngörülmektedir. Oluşturulacak 3B modelleri kişiselleştirilmiş bir yaklaşım ile etkili potansiyel terapi kombinasyonlarını tahmin etmek için kullanılabilecektir. Bununla birlikte ilerlemiş PK tedavisinde kombinasyon tedavisinin etkisini göstermekle birlikte direnç mekanizmasının keşfi için önemli çıktılar alınması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.3.2.1. Kanser

Kanser zamanla gelişen vücuttaki herhangi bir hücre türünün, kontrolsüz anormal ve kontrolsüz şekilde bölünmesinden oluşan bir hastalık durumudur. Her kanser türünün kendine özgü özelliklerine olmasına karşın kansere neden olan temel süreçler tüm türlerinde oldukça benzerdir[1].

Normal hücrelerin aşamalı olarak maligniteye dönüştüğü bu süreçte, genomdaki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkan mutasyonların sıralı olarak edinilir. Bu hasar, DNA replikasyonundaki hatalar , belirli DNA bazlarının içsel kimyasal kararsızlığı veya metabolizma sırasında üretilen serbest radikallerin saldırısı gibi endojen süreçlerin sonucu olabilir . DNA hasarı ayrıca iyonlaştırıcı radyasyon, UV radyasyonu ve kimyasal kanserojenler gibi eksojen ajanlarla etkileşimlerden de kaynaklanabilir.

Yetişkin bir insan yaklaşık 10^{15} hücreden oluşur. Bu hücrelerin bir çoğu yenilenmesi gereken organ ve dokular için bölünmesi ve farklılaşması gerekir. Bu hücreler olağan fazda yeni hücreler oluşturmak için hücre siklusu boyunca büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandıklarında veya hasar aldıklarında hücre ölümü gerçekleşir ve yerlerini yeni hücreler alır. Bazı durumlarda ise bu döngü bozulur ve hasarlı hücreler kontrollü şekilde hücre ölümü geçirmesi gerekirken anormal bir çoğalma gerçekleştirirler. Bu çoğalma sonucunda ise kitleler oluşturabilirler. Bu kanserli hücreler tespit edilebilir boyuta ulaştığında $\cong 10\text{mm}$ 'lik boyut veya 1 milyon hücre sayısı- 'kitle' ve 'tümör' gibi terimler ile adlandırılabilirler. Bu kitleler kanserli kötü huylu veya iyi huylu olarak ayrılabilirler[2]. Bu ayrıma kanser patolojisinde benign ve malignant tümör ayrımı denir. Bu iki tümörler arasındaki farklar; (1) farklılaşma, (2) büyüme hızı, (3) büyüme paterni, (4) metastaz bulunur. Benign tümör iyi diferansiyedir, yavaş büyür, büyüme paterni düzgündür ve metastaz yapmaz. Ancak malign tümörler genellikle kötü diferansiyedir, birçok mitozla hızla büyür, invaziv büyüme gösterir ve sıklıkla metastaz yapar [3].

Bu tümörler yakındaki dokulara yayılabilir ve vücuttaki uzak dokulara ulaşarak yeni tümörler oluşturabilirler. Bu sürece ‘metastaz’ adı verilir. Bening tümörlerin metastaz yapma oranı düşüktür. Cerrahi işlem uygulanarak rezekte edildiğinde, bening tümörlerde genellikle nüks görülmezken, malign tümörlerde tekrar büyüme ve nüks etme söz konusu olabilir. Ancak iyi huylu tümörlerde de beyin gibi hayati organlarda görülme durumunda ciddi semptomlar ile karşılaşılabilir[3], [4]. Pek çok kanser türü katı tümörler oluştururken, lösemi gibi kan kanserleri katı tümör oluşturmaz. Davranışları ve tedaviye dönütleri çok farklılık gösterebilen yüzden farklı kanser türü vardır.

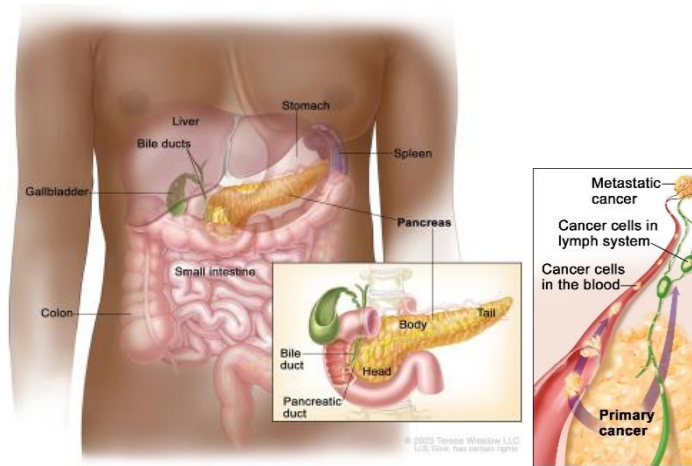
Kanser, hücre siklusunu ve aktivasyonunu bozar, genlerin işlevsiz kalmasına veya yanlış işleyişine sebebiyet verir. Proto-onkogenler normal bir hücre döngüsünde hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen proteinleri kodlar ancak bu proteinler genetik mutasyonlar ve bu artan gen ekspresyonu ile onkogene dönüşebilir [5]. Onkogenler iki mekanizma ile aktif edilebilir. Bunlardan biri proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıdır. Kanser tek bir hücrenin bu onkojenik transformasyon geçirmesi ile ortaya çıkabilir [3]. Onkogen oluşumu ve genetik bozuklukların nedenleri arasında kromozomal translokasyon, nokta mutasyonu, delesyon, amplifikasyon ve insersiyon aktivasyonu vardır. Aynı zamanda tümör supresör gen eksikliği, hücrenin kontrolsüz proliferasyonunu destekler[5].

2.2. Pankreas Kanseri Nedir?

Pankreas arka peritona yerleşmiş, önünde mide bulunan ve 12 parmak bağırsağı ile bağlantısı olan bir organdır. Geniş kafalı, daralan gövdeli ve dar sivri kuyruklu bir şeklidir. Yetişkinlerde yaklaşık 15 cm uzunluğunda yan yatan ince armut şekline benzer bir bezdir. Bu dokuda oluşan kanser türüne pankreas kanseri (PK) denir. Pankreas tümörlerinin büyük çoğunluğu pankreas duktal adenokarsinom (PDAK), asiner hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, kistadenokarsinom, hepatoid karsinom, kolloid karsinom, pankreatoblastom ve pankreas müsinöz kistik neoplazmi dahil olmak üzere ekzokrin tümörlerdir. Ekzokrin pankreas kanserlerinin en yaygın formu tüm pankreas tümörlerinin yaklaşık %95’ini oluşturan adenokarsinomlardır. Bu kanserler genellikle pankreas kanallarında başlar. Pankreatoblastom (PBL) ise genellikle çocukluk döneminde ortaya çıkar. Erişkinlikte görüldüğündeyse kötü

prognoz sergiler. Pankreasın nörendokrin tümörleri, ‘PNET’ olarak adlandırılır. Bu tümörler nadir görülür ve pankreas tümörlerinin sadece %1 ila %2’sini oluşturur [7].

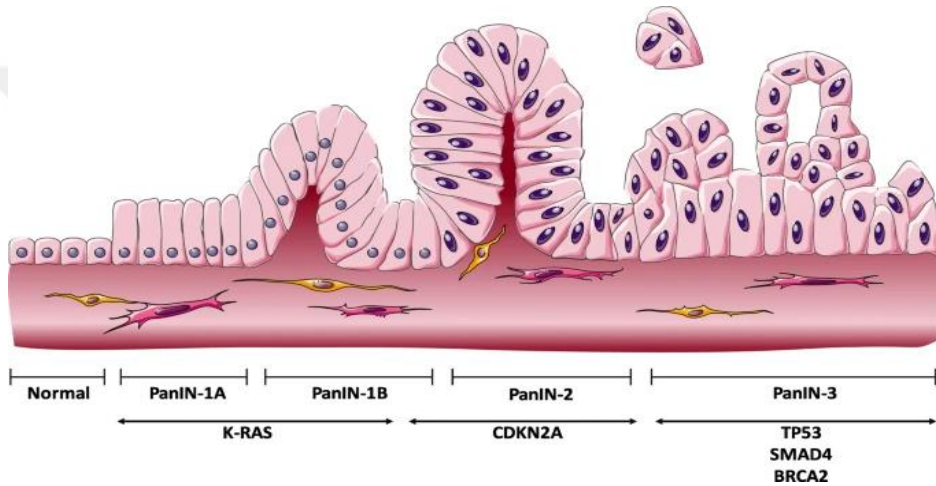
Pankreas kanseri (PK), yüksek ölüm oranına sahip bir kanser türüdür. Anatomik olarak lokalizasyonunun konumunun güç yerde olması, erken evrelerinde başlangıç semptomlarının gözle görülür olmaması ve geç fark edilmesi, belirti veya semptom görüldüğünde ise diğer birçok hastalığın belirti ve semptomları gibi görülmesi PK’nın erken teşhis edilmesini mümkün kılmamaktadır. Ayrıca metastaz sonucu kanser önce bölgesel lenf düğümlerine, ardından karaciğer ve periton boşluğuna yayılır [7]. Dolayısıyla lokal olarak ilerlemiş tümörler veya metastaz sonucu hastalığa sahip popülasyondaki büyük çoğunluk, teşhis sonrasında hemen müdahale edilemez olarak kabul edilir [8]. Hastalık genellikle geç evrelerde teşhis edildiğinden, cerrahi müdahale için fırsat sınırlı kalmaktadır. Ek olarak, sistemik tedavilerin yeterince etkili olmaması hastalığın nüks etme riskini ve kötü prognoz oranını arttırmaktadır. Bu sebeple tümörün sadece pankreas dokusunda lokalizeyken tespit edilip teşhis konması, hem tedavi hem de sağ kalım açısından en iyi seçenekleri sağlar [9]. Son yıllarda, pankreas kanseri için yeni biyobelirteçler, hedef tedaviler ve immünoterapi gibi umut veren yaklaşımlar üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Pankreas kanseri tanı ve tedavisindeki boşlukların doldurulması için daha fazla araştırma ve klinik çalışma yapılması hayati önem taşımaktadır[10] .



Şekil 1. Pankreasın üç bölgesi bulunur: baş, gövde ve kuyruk. Karın bölgesinde mide ve bağırsakların yakınında bulunur. Oluşan tümör herhangi bir boyutta olabilir ve kan ya da lenf sistemi ile akciğer, karaciğer veya periton boşluğu gibi bölgelere metastaz yapabilir [11] Pankreas Kanserinin Patogenezi ve Moleküler Süreci

2.3. Pankreas Kanserinin Patagonezi ve Moleküler Süreci

Pankreas kanserinin başlaması ve ilerlemesi kanserini üç aşamada karakterize edilebilir. Bir mutasyon sonucu ile köken hücrenin mutasyon kazanmasıyla tümörün başlatılması, mutasyon taşıyan hücrenin neoplaziye evrilmesi ve neoplastik hücrelerin hem lokal veya yayılmış olarak ilerlemesi. Bu sürecin başlaması ve ilerlemesine ise kronik inflamasyon veya pankreatit, fibrozis, immünsüpresif tümör mikroçevresi (TM), epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), kanser kök hücresi çoğalması ve farklılaşması, bağırsak mikrobiyotasının değişmesi gibi birçok faktör neden olabilir [12].



Şekil 2. Her aşamada PK'nin ve ilgili genlerin gelişiminin şematik gösterimi. Öncü lezyonlar (PanIN'ler), erken K-RAS onkogenik aktivasyonu ile başlayan ve çoklu tümör baskılayıcıların susturulması ile biten ardışık genetik mutasyonların aracılık ettiği çok aşamalı bu süreç PK'ye yol açar [13].

2.3.1. Moleküler süreç

Başlangıç evresi: Pankreas normal hücresi DNA hasar onarımının gecikmesi veya çevresel faktörlerin maruziyeti sonucu olarak başlatıcı bir sürücü gen mutasyonu kazanır. Genelde bu başlatıcı mutasyon hücrenin apoptoza gitmesi, yaşlanmaya uğraması veya bağışıklık denetimi ile doku dönüşümü sırasında kaybolur. Bu mekanizmalar başarısız olursa mutasyonu taşıyan hücre apoptoz ve immünosupresyondan kaçarak dolayısıyla hayatta kalma veya büyüme avantajı eldeyle fiksasyona devam eder.

İlerleme evresi: İlerleme evresindeki süreçte başlatıcı mutasyonu taşıyan hücre ve onun nesli, sürücü gen mutasyonunun varlığı ile klonal popülasyon oluşturarak

bölünmeye devam eder. Popülasyon, hücre sayısı ve lokalizasyonu büyüdükçe sürücü gen mutasyonları neoplazmanın klonal heterojenliğini arttıran yolcu mutasyonları elde eder. Bunun sonucunda genom çapında hasar meydana gelir. Bu olay yaygın bir yapısal hasara, hücre döngüsü bozulmasına ve birden fazla sürücü gen değişikliğine sebep olur.

Oluşum evresi : Oluşum evresinde artık yabancı mikro ortamlara giriş gözlemlenir. Devam eden klonal genişleme ile birlikte, bazal membranı çevreleyen sayıca fazla bir hücre popülasyonu oluşur ve genetik çeşitliliğini kaybederler. Bu durum ‘*genetik darboğaz*’ adı verilen duruma sebebiyet verir. Bu yayılma tümör gelişimi sırasında da devam eder. Birincil bölgede yüksek uygunluk elde edip yayılmış bu hücreler, PK’de yaygın metastaz bölgeleri olan karaciğer, akciğer veya periton gibi yeni mikro ortamlara giriş yaparak metastaz ile burada kolonize olma ihtimalini elde eder [14]

2.3.2. Patogenez

İnflamasyon : İnflamasyon pankreas kanserinin başlaması ve ilerlemesi için anahtar bir araçtır. PK gelişimi sırasında TM’de tümör büyümesi, doğuştan gelen ve edinsel bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu görülebilir. Örneğin, tümörle ilişkili makrofajlar, TM’deki ana bağışıklık hücrelerinden biridir. PK’nin başlaması, ilerlemesi ve metastazında ayrıca kemoterapötik dirençte önemli bir rol oynamaktadır. Tümör nekroz faktörü alfa1 eksprese eden makrofajlar, kemokin C-C motif ligand 2 (CCL2) tarafından toplanır ve neoplastik hücrelerin , bromodomain içeren protein 4 aracılı sinyal yolu yoluyla agresif bir fenotipe yeniden programlanmasını indükleyebilir.

Ek olarak, monositler, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler, doğal öldürücü hücreler, nötrofiller ve CD4 + ve CD8 + T hücreleri dahil olmak üzere diğer infiltre edici bağışıklık hücreleri, sitokinler salgılayarak kanser hücreleriyle etkileşime girebilir dolayısıyla nükleer faktör- κ B (NF- κ B), reaktif oksijen türleri ve toll benzeri reseptörler (TLR) gibi moleküler sinyal yolları, PK’nin TM’sindeki inflamatuvar süreçte rol oynar. Hem lokal hem de sistemik inflamasyon PK gelişimi ve ilerlemesinde oldukça önemlidir. Obezite sistemik inflamasyonu tetikleyebilir ve PDAC dahil olmak üzere kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilir. Obez hastaların beyaz yağ dokularındaki kronik düşük dereceli inflamasyon, PDAC ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Pankreastaki şişlik ve iltihap ile karakterize kronik pankreatit, aşırı alkol

tüketimi, sigara ve safra taşları gibi faktörler tetikleyebilir. Bu nedenle inflamasyonu hedeflemek PC tedavileri için terapötik bir stratejidir.

Desmoplastik stroma : Kronik pankreatit ve PK'de pankreatik stellat hücrelerinin sebep olduğu desmoplastik doku proliferasyonu da rol oynayabilir . Fibrotik stroma, kanser hücresinin invazyonu ve proliferasyonuna ayrıca bağışıklık sisteminde baskılayıcı ortama neden olabilir. Bu durum, terapötik dirence katkı sağlayan fibroblastlar ve salgıladıkları ekstraselüler matriks proteinleri ile oluşur. Galektin-1, β -katenin ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) gibi bazı moleküller pankreas stellat hücreleri için öncü faktörlerdir ve aktive edilmiş pankreas stellat hücreleri, proliferasyonu, migrasyonu ve kemoterapötik direnci indüklemek için IL-6, TGF- β 1, stromal hücreden türetilen faktör-1 (SDF-1) ve galektin-1 gibi birçok molekülü salgılayabilir. Kanserle ilişkili stromal fibroblastlar (CAF'ler), inflamasyon, ilerleme, metastaz, nüks ve kemorezistansı düzenlemek için birçok faktörü salgılayabilen bir hücre popülasyonudur. Örneğin, CAF'ler ve tümör hücreleri iletişimi ekstraselüler veziküller (EV'ler) aracılığıyla gerçekleştirebilir. CAF'ler tarafından salgılanan Annexin A6 ile zengin EV'ler PK agresifliğini arttırabilir. Ayrıca CAF'ler tarafından salgılanan CD9+ANXA6+EV'ler, protein kinaz sinyal yolunu aktifleştirip PK hücre göçünü ve EMT'yi teşvik edebilir.

İmmünsüpresif Tümör mikroçevresi : Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1), lenfosit aktivasyon geni 3 ve sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen 4 gibi bağışıklık kontrol noktalarının aşırı ifadesi ve bunların ligandları TM'deki immünsüpreşyonu aracılık eder. Bu sebeple, bu moleküler hedefleri araştırmak yeni tedavi seçenekleri sağlayabilir. Ayrıca fibroblast aktivasyon proteini, CD73 ve DNA bağlanma inhibitörü 1 (ID1) gibi proteinler de TM'deki immünoşüpresif ortama neden olabilir. İnsan PDAK hücrelerinde CD73'ün yüksek ekspresyonu, AKT sinyal yolunu aktive ederek PK'nin gemsitabin kemorezistansına neden olabilir.

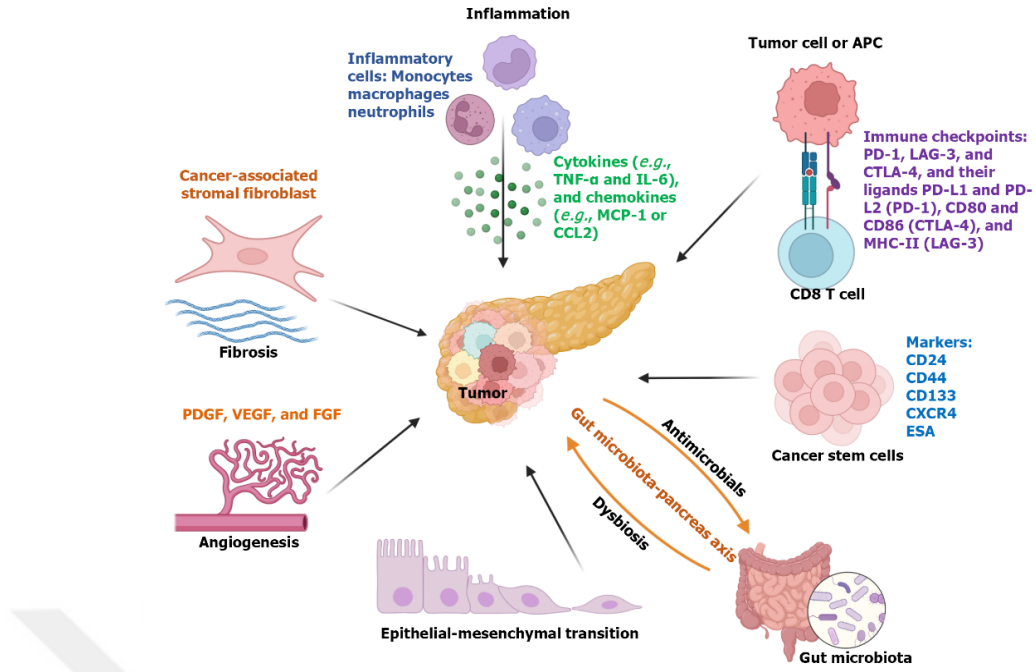
EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerin özelliklerini kaybederek yüksek motilite ve invaziv özellikli mezenkimal hücrelere geçişi ile tanımlanır. PK ilerlemesi ve metastazında önemli bir rol oynar. Dermokin genleri PK'nin onkogenezi düzenler. Dermokin-a'nın aşırı ekspresyonu, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon-3 aktivatörü (STAT3) fosforilasyonunu düzenleyerek hücre çoğalması,

EMT, migrasyon ve invazyonu indükleyebilir. Ayrıca PK kök hücreleri EMT'si PK'nin başlaması ve ilerlemesinde de rol oynar.

Anjiyogenez : Anjiyogenez, PK gelişimi, ilerlemesi ve metastazında önemli bir rol oynar. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün aşırı ekspresyonu sonrası PK hücrelerinde anjiyogenez aracılı metastaz görülebilir. Yoğun makrodamarlar, zayıf perfüze damarlar, yapı bütünlüğü bozulmuş mikrodamarlar, ve TM'sinde vaskülarizasyon anjiyogenez ile karakterizedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü ve VEGF reseptörleri (VEGFR1-3) de dahil olmak üzere PK'nin anjiyogenezinde birçok protein rol oynar.

Kanser kök hücreleri : Kanser kök hücreleri (CSC'ler), kemorezistansta TM'nin önemli bir parçasıdır. Pankreas CSC'leri, CD24, CD44, CD133, C-X-C kemokin reseptörü tip 4, tirozin-protein kinaz Met gibi çeşitli yüzey markerları harici aldehit dehidrojenaz 1 ve RNA polimeraz II gibi hücre içi markerları da eksprese eder. Bir çalışma, miR-497'nin, nükleer faktör- κ B ifadesini inhibe ederek pankreas CSC'lerini gempitabin tedavisine tekrar duyarlı hale getirebildiğini göstermiştir. Örneğin gempitabinle indüklenen kök hücre özelliklerinin kemoterapik direnç neden olması AKT/Notch1 sinyal yolunu daha da etkinleştirebilir ve kemoresistans neden olabilir. Dolayısıyla CSC'ler ilaç direncinde rol oynar.

Bağırsak mikrobiyotasının değiştirilmesi : Bağırsak mikrobiyomları, enerji sindirimi, ikincil safra asitleri, vitaminler ve proteinlerin sentezi ile bağışıklık düzenlemesinde önemli roller oynar. Bunlar bakteriler, virüsler, arkeler ve mantar türlerini içerir. Mikropların çoğu bağırsakta bulunur ve bağırsak homeostazisini korur. Bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyoz, kanserin ilerlemesini TM'deki inflamasyon ve bağışıklık tepkisi yoluyla sağlayabilir. Klinik öncesi yapılan çalışmalarla, bağırsak mikrobiyotasının, TM'deki doğal öldürücü hücrelerin infiltrasyonunu ve anti-kanser aktivitesini etkileyerek PDAK ilerlemesinde rol oynadığını gösterdi. Üç farklı ülkede kohort çalışmalarında ise PDAK hastalarının bağırsak mikrobiyal profillerinde *Streptococcus* ve *Veillonella* türlerinin belirgin bir şekilde arttığını, *Faecalibacterium prausnitzii*'nin ise azaldığını göstermiştir. PK dahil olmak üzere birçok tümörde gerçekleştirilen mikrobiyota analizinde, çoğu intratümör bakterinin hem kanser hücrelerinde hem de immün hücrelerde intrasellüler olarak mevcut olduğunu göstermiştir [12].



Şekil 3. Pankreas kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan faktörler: Enflamasyon, fibroz, anjiyogenez, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu, kanser kök hücreleri ve immün baskılayıcı tümör mikro ortamı dahil olmak üzere pankreas kanserinin başlamasına ve ilerlemesine birçok faktör katkıda bulunur [12].

2.4.Pankreas Kanseri Türleri

Pankreas kanseri türlerini iki kategoride ayırabiliriz. Adenokarsinomu içeren ekzokrin pankreas kanserleri ve nörendokrin pankreas kanseri. Her iki tip de semptomları ve prognozu açısından değişiklik gösterebilecek kanser türlerine sahiptir.

Ekzokrin (Nonendokrin) pankreas kanseri: Pankreas kanserinin en yaygın türüdür. Pankreasın ekzokrin bezini ve kanalları oluşturan ekzokrin hücrelerde görülür. En yaygın ekzokrin tümör tipine adenokarsinom denir. Adenokarsinom belirli iç organları kaplayan glandüler dokuda gelişir. Ekzokrin pankreas kanserinin farklı türleri, tüm pankreas kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur.

Adenokarsinom: Duktal karsinom olarak da bilinir. pankreas kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturduğundan, "pankreas kanseri" terimi genellikle PDAK'yi belirtmek için birbirinin yerine kullanılır. Adenokarsinom, pankreas kanseri tanılarının %95'ini oluşturan en yaygın pankreas kanseri türüdür. Bu kanser pankreas kanallarında oluşur. Adenokarsinomun pankreas enzimi üreten hücrelerde de

gelişmesi mümkün olabilir bu durumda ve asiner hücreli karsinom olarak adlandırılır. 5 yıllık genel sağ kalım oranı %5-10 arasındadır.

Skumöz hücre karsinom: Asiner hücreli karsinomlar nispeten nadir görülen kanser türüdür. Pankreas kanallarında oluşur ve tipik olarak pankreasta bulunmayan skumöz hücrelerden meydana gelir. Pankreas kanserleri spektrumunda “orta dereceli” kanserler olarak kabul edilirler.

Adenoskumöz karsinom: Nadir bir pankreas kanseri türüdür. Ekzokrin pankreas kanserlerinin %1-4’ünü oluşturur. Bu tümörler hem duktal adenokarsinom hem de skumöz karsinomun özelliklerini gösterir kötü prognozu sebebiyle agresitir.

Kolloid (musinöz) karsinom: Diğer bir nadir tür olan kolloid karsinomlar, ekzokrin pankreas kanserlerinin %1-3’ünü oluştururlar. İntraduktal papiller musinöz neoplazm adı verişne iyi huylu kistten gelişme gösterir. Musin adlı bir salgı içinde yüzen kötü huylu hücrelerden oluştuğundan dolayı metastaz riski daha düşüktür. Bu musin salgılar içinde noldüler musin gölcükleri oluştururlar ve bununla karakterizelerdir. Tümörler büyük çaplarda olabilir (<12cm).

Nörendokrin pankreas kanseri: Pankreasın nöroendokrin tümörleri (PNET) ise farklı klinik sonuçlarla ortaya çıkan ve tüm pankreas neoplazilerinin yaklaşık %1 ila 2’sini oluşturan nadir tümör türleridir. Hormon üreten ve üretmeyen tümörler olarak ikiye ayrılırlar. Pankreas nörendokrin tümörleri kan şekerini düzenleme amacıyla üretilen insülin ve glukagon hormonlarını kan dolaşımına salgılayan pankreas endokrin bezindeki hücrelerden gelişir. Bu hormon-aktif tümörler PNET’nin yaklaşık %10’unu oluştururken kalan %90’lık kısımda tanı anında herhangi bir hormon salınımı görülmemektedir. PNET Tüm pankreas kanserinin yaklaşık %7’ini oluşturur. Katısal olmasından dolayı birçok nesil etkilenebilir. Aktif bir nöroendokrin tümör, hücrelerin ürettiği hormona göre adlandırılırlar; İnsülinoma, Glukagonoma, Gastrinoma, Somatostatinoma, VIPomalar, PPomlar [15].

2.5.Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri, agresivitesi, geç evre tanısı ve kötü prognozu ile karakterize edilen, onkoloji alanında zorlu bir kanser türüdür. Halk sağlığı ve sağlık sistemi üzerindeki etkisi oldukça derindir. PK, ileri düzeydeki tedaviler nedeniyle yalnızca anlamlı bir maliyete neden olmakla kalmaz, aynı zamanda iş gücü kaybı nedeniyle daha da yüksek bir toplumsal ekonomik maliyete de neden olur. Bu nedenle, yüksek riskli popülasyonlara yönelik erken tarama stratejilerinin yanı sıra tedbirleri uygulanmadan önce PK'nin epidemiyolojik özelliklerini kapsamlı araştırılması oldukça önemlidir.

Pankreas kanseri dünya çapında kansere bağlı ölüm nedenleri arasında 7. sırada yer almaktadır. İnsidans oranları ülkelere göre önemli ölçüde farklılık gösterse de, küresel eğilimler PK teşhislerinin yükselişte olduğunu ve yakın zamanda Batı ülkelerinde kanserden ölümlerin 2. önde gelen nedeni haline gelmesinin beklendiğini gösteriyor. İnsani Gelişme Endeksi yüksek olan ülkelerde, PDAK görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelerle karşılaştırıldığında yaklaşık 5 kat daha yüksek görülmektedir [16].

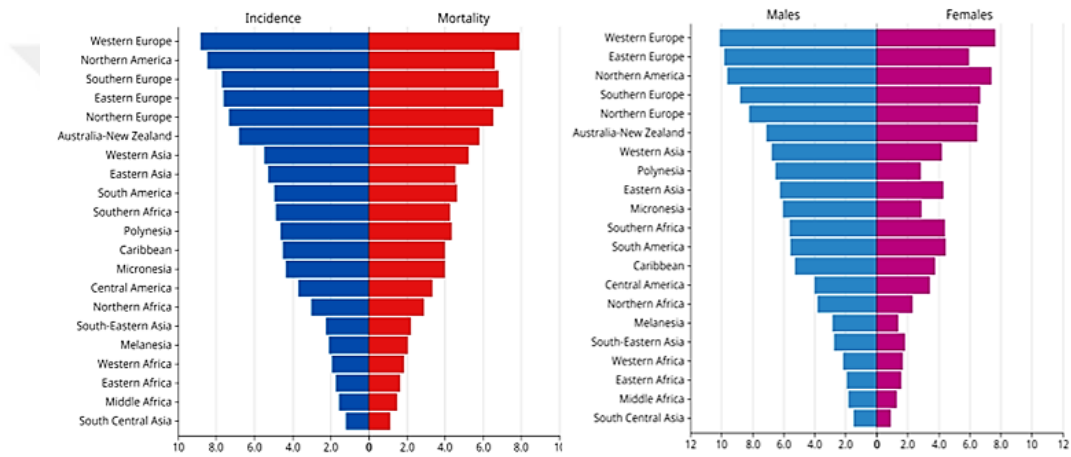
Batı Avrupa ve Kuzey Amerika, sırasıyla 100.000 kişi başına 8,5 ve 8,0 vaka bildirirken, Güneydoğu Asya'daki 100.000 kişi başına yalnızca 1,3 vaka rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise PK insidans oranları 2010'dan bu yana yılda %0,5 artış görülmüştür ve PK şu anda Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kansere bağlı ölümlerin 3. önde gelen nedenidir. ABD'de her yıl tahminen 62.200 yeni tanı ve 48.800 ölüme neden olmaktadır. Bu oranlar 75 yaşına gelindiğinde genel yaşam boyu pankreas kanseri riskinin %1,7 olduğunu gösteriyor demektir [16], [17].

Temel olarak PK'nin beş yıllık hayatta kalma oranı yaklaşık %12'dir ve tüm kanser türleri arasında en kötü prognoza sahip olan kanser türünden biridir. Nispeten düşük insidans oranına rağmen PK, %94'lük bir mortalite/insidans oranıyla, orantısız derecede fazla sayıda kansere bağlı ölümden sorumludur. PK epidemiyolojisi, en temelleri insidans, risk faktörleri ve prognoz dahil olmak üzere, demografik ve coğrafi eşitsizliklerden önemli ölçüde etkilenen geniş bir faktör yelpazesini kapsamaktadır. İlginç bir şekilde, Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'nın bazı bölgelerinde daha yüksek PK görülme oranlarının gözlemlendiği GLOBOCAN 2020'ye göre PK görülme oranı ile İnsani Gelişme Endeksi arasında pozitif bir korelasyon vardı . Bu bölgelerdeki insidans oranları, yaş, cinsiyet ve etnik köken gibi değiştirilemeyen faktörlerin yanı

sıra sigara içme, diyet ve egzersiz gibi değiştirilebilir faktörleri de içeren daha bireysel bir spektrumdan da etkilendiği gözlemlenmiştir [17].

PK'nin mortalitesi 4,5/100.000 olup, 2020'de diğer kanserler arasında en yüksek ölüm oranıyla 9. ve en yüksek ölüm sayısı ile da 7. sırada yer almıştır. Son verilere göre, son 8 yılda PK'nin tahmini görülme sıklığı ve ölüm vakalarında istikrarlı bir artış yaşandığı gözlemlenmiştir [16].

PK'ye sebebiyet veren potansiyel risk faktörleri hakkındaki verilerdeki gelişmelere ve erken tanı için mevcut imkanların genişletilmesine karşın, insidansın artacağı ve 2040 yılına kadar 355.317 yeni vaka olacağı tahmin edilmektedir [18].



Şekil 4. 100.000 Kişi Başına Yaşa Standartlaştırılmış oran (Dünya). Her İki Cinsiyette İnsidans ve Ölüm oranı, (2) 100.000 Başına Yaşa Standartlaştırılmış oran (Dünya), Erkekler ve Kadınların insidansı.

2.6.Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Risk faktörlerinin karmaşık etkileri PK etiyolojisine katkıda bulunur ve bu faktörlerin anlaşılması tedbirlerinin, erken teşhisin ve risk değerlendirme algoritmalarının uygulanması yüksek risk grubundaki insanların analiz edilmesi önemlidir için oldukça önemlidir [17].

PK için kesin ve spesifik bir nedensel faktörün olmamasıyla birlikte, bir dizi risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri olarak ikiye sınıflandırılabilir. Ayrıca risk faktörlerini kendi içerisinde değiştirilebilir faktörlere yaşam tarzı, değiştirilemez faktörlere, aile öyküsü/genetik mutasyonlar ve hastalıklar olarak örneklendirebiliriz [16], [19].

2.6.1. Değiştirilebilen risk faktörleri;

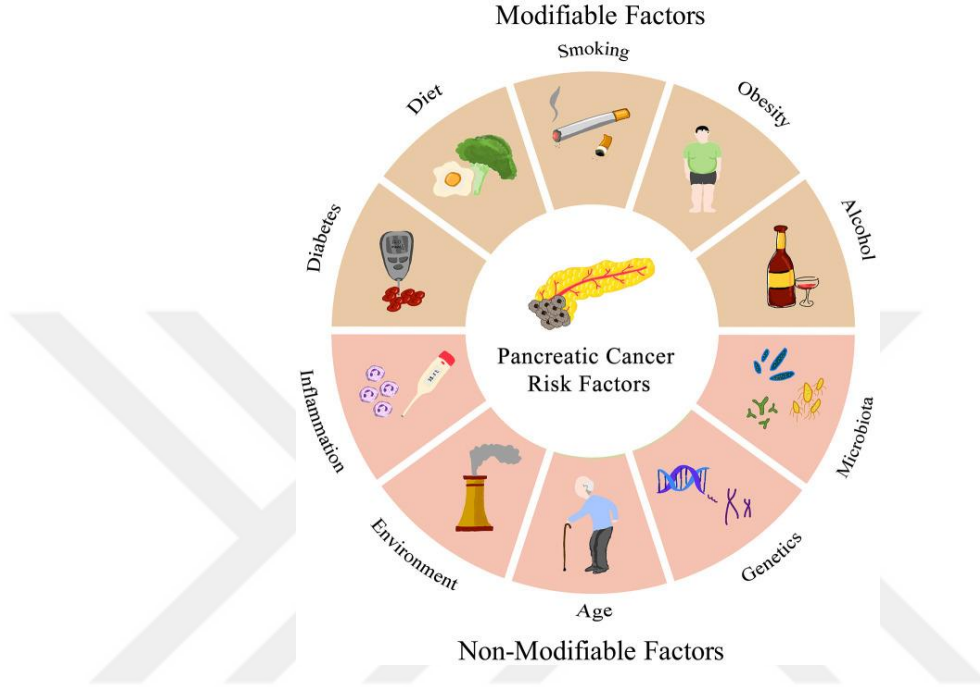
Sigara kullanımı: PK'nin %22'sinden sorumlu olduğu düşünölmektedir. Araştırmalara göre erkeklerde PK ölümlerinin %25,9'u ve kadınlarda %16,1'i sigaradan kaynaklanmaktadır. Sigara dumanının içinde kanserojen olarak tanımlanan 60'tan fazla kimyasal bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenler solunum-sindirim sisteminde hızla emilebilen kimyasallardır. Sigara dumanı, bulunduğunda ve akciğer kılcal damarları tarafından emildiğinde, kan yoluyla dolaşabilen ve pankreasta birikerek maligniteyi tetikleyebilen bir kanserojen kimyasalları içerir. Son ęalıřmalar sadece bu ilişkiyi doğrulamakla kalmadı, aynı zamanda tütüne maruz kalmanın ve pankreas karsinogenezinin altında yatan mekanizmaları da ortaya ęıkarmıřtır [17]. Nikotin, pankreas hücrelerinde genetik mutasyonlara neden olabilen önemli bir bileşendir. Genetik mutasyon faktörü iğerinde KRAS ve p53 indüklenmesi yaşanabilirken ayrıca kronik bir inflamasyon da yaşanabilir. Bu iki faktör sitokinleri ve büyüme faktörlerini indükleyerek hücrenel bir transformasyon için doğru yolu sağlar.

Diyet alışkanlıkları: Özellikle işlenmiş gıdalar, D vitamini eksikliği kızarmış yiyecekler, yağlı yemekler ve sağlıksız diyetlerde kolesistokinin (CCK) değerinde önemli bir artış tespit edilmiştir. CCK'nın yüksek oranda salınımı, vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) ile ilişkili tümör embolisi gelişimi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Obezite: Obezite PK'nin %12'sinden sorumlu olduğu düşünölmektedir. Bazı ęalıřmalar, vücut kitle indeksindeki her 5 kg/m²'lik artış için 1,12'lik göreceli risk artışı olduğunu göstermiştir. Obez kişilerde patogeneze, makrofajların proinflamatuvar sitokinler ürettiği ve hormonal seviyede bir düzensizliğin olduğu kronik bir yağ hastalığı adipozopati ile karakterize edilmektedir. Özellikle yüksek düzeyde leptin ve düşük düzeyde adiponektin bulunabilmektedir. Diyetetik düzeyde, yüksek miktarda kırmızı et tüketimi ve yağlı beslenme patogeneze rol oynayabilir.

Kronik pankreatit: pankreasın uzun süreli iltihabı olan pankreatit, PK riskini 5-15 kat arttırdığı düşünölmektedir. Kronik inflamasyon, TNF α , IL-6, IL-8, PDGF, TGF β ve hücrenel proliferasyonu indükleyen sitokinlerin üretimine sebebiyet verebilir ve sonuçta DNA üzerindeki ana hasar, ROS üretiminden kaynaklanabilir.. PK için risk bilinen kronik pankreatit hastalığı, aşırı alkol tüketim ile ilişkilidir. Epidemiyolojik kanıtlar, alkol kullanan kesimin alkol kullanmayan kesime göre daha yüksek bir PK

insidansına sahip olduğunu göstermektedir. Alkol ve metabolitleri, kronik inflamasyon ve hücresel gen instabilitesi yolu ile pro-karsinogenetik bir yolak oluşturduğu görülmüş ayrıca ortaya çıkan bulgular, artan PK riski ile alkol tüketimi arasında doza bağlı bir ilişkiyi desteklemiştir. Günde dokuz veya daha fazla alkollü içeceğin önemli ölçüde risk artışına yol açtığı görülmüştür [17].



Şekil 5. Pankreas kanseri hastalarının risk faktörleri.

2.6.2. Değiştirilemeyen risk faktörleri;

Yaş, cinsiyet, 0 olmayan kan grubu; Değişen AB0 glikoziltransferaz aktiviteleri, PK riskini etkileyebilir. 0 kan grubu koruyucu bir etki gösterirken tüm PK'lerin yaklaşık %15–%20'si 0 olmayan kan grubuyla ilişkilendirilmiştir, Aile öyküsü ve Genetik yatkınlık; Aile öyküsü ve genetik PK ilerlemesinde önemli faktörlerden biridir. ATM, APC, BRCA1/2, CDKN2A, MSH2/6, MLH1, PALB2, PMS2, PRSS1 ve STK11, kalıtsal PK hastalarında en yaygın germline mutasyonlarından biridir [20]. Ailesel pankreas kanserinde (APK), birinci derece akrabası olanlarda %62-75 daha yüksek risk artışı olduğu görülmüştür. PK ilişkili ailesel kanser sendromlarına baktığımızda; FAMMM sendromu, kalıtsal pankreatit, Peutz-Jeghers sendromu, kistik fibröz, ailesel atipik çoklu mol melanomu, fankoni anemisi, lynch sendromu ve adenomatöz polipozis dahil birçok sendrom, BRCA2, p16, ATM, STK11, PRSS1, SPINK1 ve PALB2 gibi belirli genlerdeki germ hattı mutasyonlarıyla ilişkili olup PK'da değişken

bir artışa neden olabilir. Kalıtsal risk faktörlerinin yanı sıra spesifik genlerdeki somatik mutasyonlar gelişimine sebep olabilir [20], [21].

Kalıtsal pankreas kanseri çoğunlukla otozomal dominant bir şekilde katılır ve heterojen bir fenotip gösterir. Yapılan çalışmalarda ailedeki PK'li akraba sayısına sağlıklı, PK hastalarının etkilenmemiş olan 1. derece akrabalarında, PK geliştirme riskinin arttığı belirlenmiştir. PK'de genetik yatkınlığın kabul edilmesiyle, genetik danışmanlık ve testler, önleme ve tedbir stratejilerinin önemli bileşeni haline gelmiştir. Ailesinde hastalık öyküsü olan veya PK ile ilişkisi bilinen genetik mutasyonları taşıyan kişilerin, genetik danışmanlık almaları ve test yaptırmaları teşvik edilmelidir. Yüksek riskli bireylerin belirlenmesi, önleyici tedbirlerin alınmasına olanak tanımaktadır [17].

Tablo 1. Pankreas Kanseri ile İlişkili Ailesel Kansere Sendromları ve Genler [20]

GEN	SENDROM	PREVELANS
BRCA1-2	Kalıtsal meme ve yumurtalık sendromu, fankoni anemisi	%4-7
PALB2	Kalıtsal meme ve yumurtalık sendromu, fankoni anemisi	<%1
ATM	Ataksi telenjektazi	%1.1-4.2
STK11	Peutz-jeghers sendromu	<%1
P16/CDKN2A	FAMMM	<%1-1.25
PRSS1	Kalıtsal pankreatit	<%1
TP53	Li fraumeni sendromu	%0,005-0,01

2.7. Pankreas Kanseri Hücre Hatları ve Karakteristik Özellikleri

Pankreas kanserinde çoklu mutasyon kombinasyonları kanser gelişmesine rol oynanabilmektedir. Dolayısıyla PK alt sınıfları, birden fazla hedefe yönelik müdahale gerektiren farklı tedavi stratejileri sunabilir. Erken teşhis stratejilerini, önleyici tedbirleri ve etkili tedavileri belirlemek için PK gelişimi ve ilerlemesinin spesifik hücresel ve moleküler mekanizmalarının kapsamlı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Ayrıca yapılan araştırmalarda hücre hatlarının sahip olduğu karakteristik özelliklerinin dikkate alınarak seçilmesi süreç için önemli bir adımdır. Tablo 2.'de bazı PK hücre hatlarının donör bilgisi ve çoğalma süresi gibi bazı karakteristik özellikler listelenmiştir [22].

Tablo 2. Pankreas Hücre Hatları ve Özellikleri [22].

Hücre hattı	Kişisel Bilgi	Köken	Metastaz	Çoğalma Süresi
MIAPaCa-2	65/Erkek	Primer tümör	Metastatik	40 sa
PANC-1	56/Kadın	Primer tümör	Metastatik	52 sa
AsPC-1	62/Kadın	Karın boşluğu sıvısı	Metastatik	38-40 sa
Capan-2	56/Erkek	Primer tümör	Metastatik değil	96 sa
BxPC-3	61/Kadın	Primer tümör	Metastatik değil	48-60 sa
CFPAC-1	26/Erkek	Karaciğer metastazı	Metastatik	31 sa
Capan-1	40/Erkek	Karaciğer metastazı	Metastatik	60-70 sa
SW1990	56/Erkek	Dalak metastazı	Metastatik	64 sa
Colo357	77/Kadın	Lenfatik metastazı	Metastatik	21 sa
HS 766T	46/Erkek	Lenf metastazı	Metastatik	6-7 sa

2.3.Pankreas Kanserinde Mutasyon Profili ve Genetik Değişiklikler

Pankreas kanseri alanında yapılan ekzom dizileme çalışmaları ile DNA, RNA, protein ve epigenetik seviyelerdeki moleküler anormalliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. PK'nin moleküler olarak heterojen bir hastalık olduğunu ve dört ortak genetik değişik olan onkogenik KRAS mutasyonu ve CDKN2A, TP53 ve SMAD4 tümör supresör genlerinin inaktivasyonu ile karakterize edildiği gösterilmiştir. Bu genetik değişiklikler ise genel olarak, bireysel genlerdeki mutasyonlar belirli ana yolları içermektedir. DNA hasar onarımı (TP53 veya BRCA2), hücre döngüsü regülasyonu (Cyclin-Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A, (CDKN2A)), Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β)/SMAD4 yolağı, Hippo/WNT yolağı, kromatin regülasyonu, Ekstrasellüler Sinyal Düzenlenmiş Kinazlar (ERK)-Mitojene Aktive Olmuş Protein Kinazlar (MAPK) yolağı. Bununla birlikte, tümörlerin alt gruplarında çok sayıda ek gen tipik olarak çok düşük sıklıkta ($\leq 10\%$) mutasyona uğrar ve bu mutasyonların birçoğu yineleyici bir şekilde ortaya çıkmadığı gösterilmiştir [23], [24].

Pk ilerlemesinde bu çeşitli genetik olarak değişen yollar arasındaki bağlama/ortama bağımlı etkileşimlerin nasıl katkıda bulunduğunu anlamak, tedavi süreci için daha seçici ve etkili terapötik yöntemler geliştirme konusundaki temel bir hedef olmaktadır.

2.3.1. Onkogenler ve Tümör Supresör Genler

Onkogenler, hücre döngüsü ilerlemesi gibi süreçleri düzenleyen normal genlerdeki (proto-onkogenler) mutasyonların sonucu olarak ortaya çıkar. Bu mutasyonların bir sonucu olarak, normalde bu genler tarafından kodlanan proteinler hücre içinde artış gösterebilir. Buna karşılık tümör supresör genler, hücre çoğalması gibi süreçleri inhibe eden proteinleri kodlar. Tümör supresör genlerin mutasyonu ve/veya silinmesi, bu inhibitör fonksiyonları ortadan kaldırır. Bu gen mutasyonlarının sonuçları, bir hücrenin malign fenotip olan çoğalma artışı, apoptozdan kaçma, invazyon ve metastaz kapasitesi gibi özellikleri kazanmasını sağlar [25].

KRAS: K-RAS, H-RAS ve N-RAS Ras proteininin mutasyonla aktive edilen üç formundan biridir. RAS mutasyonları taşıyan tüm kanserler arasında en çok ifade edilen ve PK'de mutasyona uğrayan gendir. K-RAS'ın PK vakalarının $>90\%$ 'inde mutasyona uğraması sebebiyle ana sürücü (driver) mutasyon olduğu bilinmektedir. Bu durum PK'yi tüm kanser türleri arasında en RAS bağımlısı durumuna getirir ancak K-

RAS aktivasyonu tek başına PK gelişimi için yeterli değildir . K-RAS geni, hücre içi sinyalizasyon ve transkripsiyon faktörlerine bağlayarak çeşitli hücre işlevlerinde rol oynayan GTPaz olan K-RAS'ı kodlar. K-RAS, GDP'ye bağlı olduğunda inaktifken, GTP'ye bağlı olduğunda aktifleşir. Bu şekilde ERK'ler, Jun amino-terminal kinazlar (JNK'ler), Stresle Aktifleşen Protein Kinazlar (p38/SAPK'ler) ve PI3K/PDK1/AKT aşağı regüle efektör özellikleri gösterir. PK ve onkogenik K-RAS mutasyonları taşıyan diğer kanserlerde bu protein, GTP'ye bağlı durumda yapısal olarak aktiftir [24].

CDKN2A (P16) : PK'nin evrimsel süreci boyunca, K-RAS mutasyonunu , PK hastalarının %95'inde tümör supresör gen CDKN2A'da (P16) genetik değişikliklerin ortaya çıkması takip eder. Gen, kromozom 9 üzerinde yer alır ve burada retinoblastoma (RB) proteininin sikline bağımlı kinaz (CDK) 4/6'ya bağımlı fosforilasyonunu inhibe eder. Çoğu CDKN2A mutasyonu, bu lokus tarafından kodlanan p16INK4a ve p14ARF olan iki tümör baskılayıcıda ortak olan ekson 1 ve 2'nin kodlama dizilerindeki yanlış anlamlı mutasyonlardır. Spesifik olarak, P16INK4a ve P14RF proteinlerini kodlayan bu gen ikili bir mekanizma gösterir: P16INK4a, Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK) 2 ve 4'ü inhibe eder, böylece hücre döngüsünün S fazına ilerlemesini engeller, P14RF ise inhibitörünü inhibe ederek P53'ü tetikler. CDKN2A fonksiyonunun kaybı, pankreas kanserlerinin yaklaşık %90'unda görülür.

Tümör baskılayıcı genler, onkojenik sinyalleme bağlamında anormal hücre proliferasyonunun önüne geçmek için önemlidir ve bu amaçla bu genler, hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz veya yaşlanmanın uyarılması gibi farklı stratejilere dayanır [23], [24], [25].

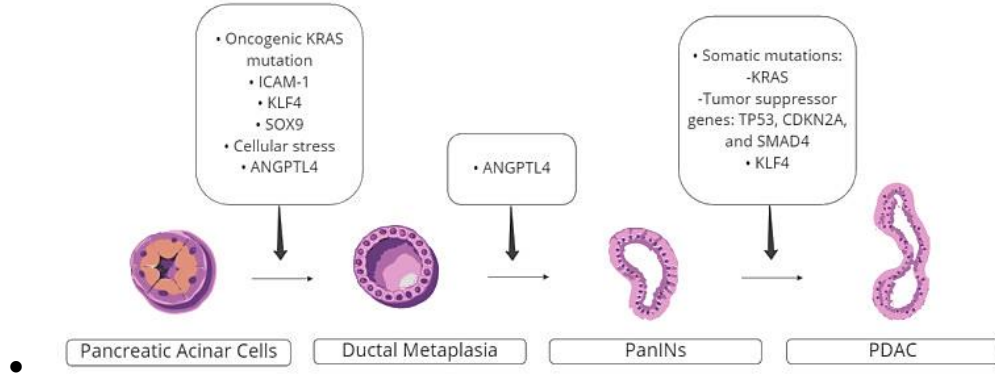
TP53 : TP53 geninin kodladığı protein olan P53'ün , kromatin hasarındaki rolü nedeniyle "genom koruyucusu" olarak bilinmektedir. Gen, kromozom 17 üzerinde yer alır. Ana işlevleri arasında hücre döngüsü blokajı ve DNA onarım enzimlerinin aktivasyonu bulunmaktadır. P53, DNA hasarı onarılamaz hale geldiğinde hücreyi yaşlanmaya ve/veya apoptoza gitmesi için indükler. Ayrıca sikline bağımlı kinaz inhibitörü CDKN1A ekspresyonunu artırır ve hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur. TP53, tüm kanserlerde en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. TP53'ün bu genetik inaktivasyonu, yaklaşık PK vakalarının %75'inde mevcuttur. P53'ün kaybı kontrolsüz bir proliferasyona yol açar yani bu durum hücre döngüsü "kontrol noktası" fonksiyonunun kaybı bile sonuçlanır. P53 inaktivasyonunun

mekanizması intragenik mutasyondur ve DNA'ya bağlanamayan hasarlı bir gen ürünü ile sonuçlanır. Bazı klinik bulgulara göre TP53'ün prognoz ve tedavi tahmini için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir [23], [24], [25].

Epidermal büyüme faktörü : Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), hücrel proliferasyona ve hayatta kalma sinyallerine aracılık eden membran reseptörü tirozin kinazlardır. EGFR, PK'de aşırı eksprese edilir ve EGFR ile bir veya daha fazla ligandın bu aşırı ekspresyonu, PKli hastalarda kötü prognozun bir belirteci olarak görünür. EGFR'ye karşı yönlendirilen antikorlar ve onun tirozin kinaz aktivitesinin inhibitörleri (ör: erlotinib) şu anda PK tedavisinde kullanılmaya devam etmektedir.

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) : TGF- β protein ailesi, başta hücrel proliferasyonun inhibisyonu olmak üzere birçok işlevle ilişkilidir. Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) sinyal yolundaki değişiklikler, PK patogenezinde hem apoptozu indükleyebilir hem de invazyon ve metastazı teşvik edebilir. TGF- β sinyallemesinin antiproliferatif etkisi, transkripsiyonel ortak aktivatör SMAD4/DCP4'ün aktivitesine bağlıdır. PK vakalarının yaklaşık %90'ı SMAD4 lokusu için heterozigotluk kaybı (LOH) gösterir. Ayrıca, homozigot delesyon veya intragenik mutasyonların bir sonucu olarak tümörlerin kabaca %50'sinde SMAD4 inaktivasyonu gözlemlenmiştir. Bu genetik değişiklikler tipik olarak CDKN2A kaybını takiben gelişmiş pankreas intraepitelyal neoplazilerinde (PanIN) meydana gelir ve SMAD4 kaybını tümör başlangıcındaki son adımlardan biri haline getirir. PK hücrelerinde DPC4/SMAD4'ün etkisizleştirilmesi, onların TGF- β 'nın büyümeyi inhibe edici etkilerinden kaçmasına olanak sağlayabilir. TGF- β sinyalinin promalign etkileri arasında invazyon ve anjiyogenez desteklenmesi yer almaktadır.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) : Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını teşvik eder ve dolayısıyla anjiyogenezi indükler. VEGF, pankreas kanseri hücreleri tarafından ve pankreas kanseri dokularında aşırı eksprese edilir. VEGF reseptörüne karşı kullanılan bir monoklonal antikor (Bevasizumab) PK hastalarında yapılan klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir.



Şekil 6. Pankreas Duktal Adenokarsinomunun Patogenezi.

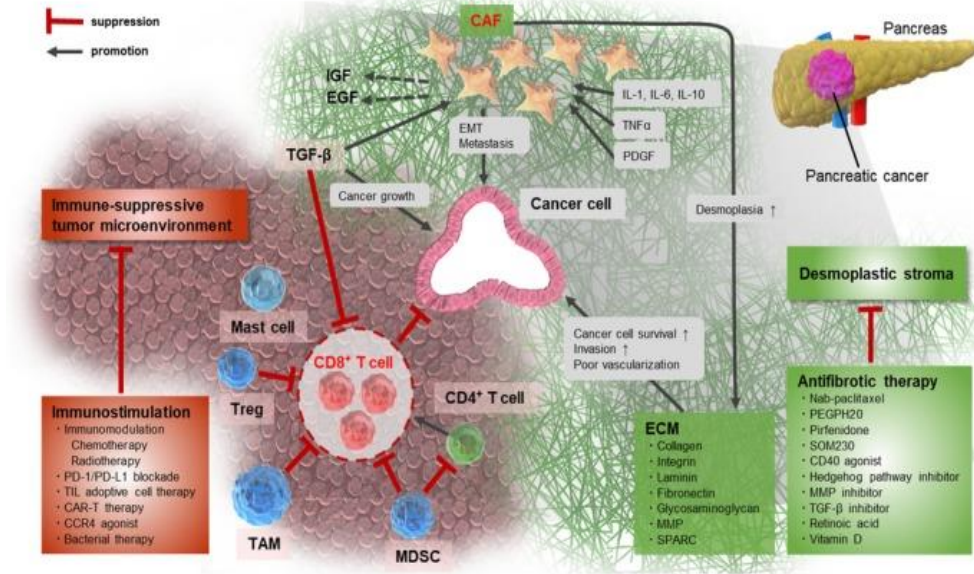
2.4. Pankreas Kanseri Mikro çevresi

Tümör mikro çevresi (TM) pankreas kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Mikro çevre, tümör hücrelerin, tümör dışı hücreler, hücre dışı matrsten, sitokinlerden, büyüme faktörlerinden ve otokrin, parakrin ve endokrin iletişimini düzenleyen ve tümörün ilerlemesini etkileyen eksozomlardan oluşur [26].

PK morfolojik, hücresel ve moleküler düzeyde oldukça heterojendir. Tümör içi heterojenite, kanserli hücrelerin klonal evrimini, hücre kimliğinin farklılaşmasını ve farklılaşmasını ve mikro çevresindeki hücresel ve hücresel olmayan bölümler arasında karmaşık bir karşılıklı etkileşimi içerir. Geleneksel olarak, tümör içi hücresel heterojenite çoğunlukla genomik instabilite, bireysel mutasyonlar, kopya sayısı değişiklikleri ve onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyesi ile ilgili moleküler farklılıklara atıfta bulunur. Pankreas kanserindeki tümör mikro ortamı, tümörün ilerlemesine çok yönlü olarak katkıda bulunur. Kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler) ve hücre dışı matris (ECM), desmoplastik stromayı oluşturur ve doğrudan/dolaylı yollardan kanser büyümesini, invazyonunu ve metastazı artırır. Tümör mikro çevresi, PK'nin gelişimi ve metastazında önemli bir rol oynar. Kanser erken evrelerinde semptomların veya biyo-belirteçlerin eksikliği, kanser hücrelerinin küçük tümörlerden bile uzak lezyonlara metastaz yapması gibi agresif bir biyolojik özellik ve yoğun fibröz stromanın bir sonucu olarak ilaç direncinin tümü, pankreas kanserinin kötü tedavi sonuçlarına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, pankreas kanserinin, bağışıklık sistemini baskılayan bir mikro ortam yarattığı, bunun da bağışıklık sistemindeki konakçının antitümör bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olduğu ve bunun da hızlı kanser ilerlemesine yol açtığı bilinmektedir. Son yapılan

alışmalar, pankreas kanserinin tümör mikro çevresinin, yıldız hücreler gibi CAF'leri, ekstrasellüler matriksi, çeşitli türlerdeki immün hücreleri ve bu hücreler tarafından salınan sitokinleri içerdiğini dolayısıyla kanser hücreleriyle yakın etkileşimleryoluyla tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı kontrol etmede rol oynadığı gösterilmiştir. düzenleyici T hücreleri (Treg) ise miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC) ve tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM) gibi immün baskılayıcı hücreler, tümöre karşı immün yanıtta anahtar rol oynayan CD8+ T hücrelerini, immün baskılayıcı tümör mikro çevresini oluşturarak inhibe ederler. CAF'ler, immün hücreler veya diğer bileşenler tarafından salgılanan sitokinler bu sürece aracılık eder.

Pankreas kanserindeki stromal hücreler CAF'leri, endotel hücrelerini ve bağışıklık hücrelerini içerir. Pankreas yıldız hücreleri CAF'lerin bir alt kümesidir. CAF'ler, fibroblastlar, pankreas yıldız hücreleri ve epitelyal, endotelyal ve mezenkimal kök hücreler gibi farklı türden progenitör hücrelerden türetilen PK stromasının önemli bir bileşenidir. CAF'ler, CAF'nin iyi bir belirteci olan, α -düz kas aktinini (α -SMA), stromal hücreden türetilen faktör-1 α (CXCL12), fibroblast aktivasyon proteini ve fibroblast spesifik protein-1'i eksprese eder. CAF'ler, TGF- β , sonic hedgehog, TNF- α , trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve interleokin (IL)-1,-6'nın dönüştürülmesiyle aktive edilir, ve TGF- β , tümör büyümesini, farklılaşmasını ve bağışıklık hücresi fonksiyonunu düzenler. TGF- β başlangıçta tümör supresör bir rol oynar, ancak kanser ilerledikçe tümör büyümesini artırır. Aynı zamanda PK hücreleri veya hücre dışı matris tarafından salgılanan TGF- β , bağışıklık hücresi fonksiyonunu da kısıtlayabilmektedir. Antifibrotik tedavi, immünoterapi, immün modülasyonun indüklenmesi ve bakteriyel tedavi, PK'ye eşlik eden olumsuz tümör mikro çevresini iyileştirebilir [27], [28].



Şekil 7. Pankreas kanserinde tümör mikro ortamının şeması. CAR-T (kimerik antijen reseptörlü T hücresi), CCR4 (kemokin reseptörü tip 4) EGF, EMT (epitel mezenkimal geçiş), IGF (insülin benzeri büyüme faktörü), IL (interlökin), MMP (matriks metalloproteinaz), PD-1 (programlanmış hücre ölümü proteini 1), PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü) PD-L1 (programlanmış hücre ölümü ligandı 1), PEGPH20 (pegvorhialuronidaz alfa), SPARC, salgılanan asidik ve sistein açısından zengin protein; TGF- β , (dönüştürücü büyüme faktörü β) TIL (tümör infiltre eden lenfosit), TNF- α (tümör nekroz faktörü α) [28].

2.5. Pankreas Kanserinde Mevcut Tedavi Yöntemleri

Kanser, genel olarak karmaşık mekanizması, farklı ilerleme aşamaları, tarama ve tanımlama için yeterli prosedürlerin olmaması nedeniyle etkili tedavi açısından zor bir hastalıktır. Pankreas kanseri semptomları genellikle belirsiz ve gözden kaçırılması kolaydır bir kanser türüdür. Bu nedenle hastalar, çok geç evrelere kadar bu hastalığa sahip olduklarını bilmemektedir. Başlıca semptomlar sarılık, iştahsızlık/kilo kaybı ve sağ karın ağrısıdır. Pankreasa ulaşmak ve teşhis etmek de oldukça zordur, bu sebeple geleneksel görüntüleme yöntemleri genellikle kanseri yeterince erken tespit edememektedir. Ancak erken tanı ve tedavi sağkalımı iyileştirmek için kritik öneme sahiptir. Günümüzün erken tespit yöntemleri her zamankinden daha iyi fakat mevcut teşhis araçlarında hala kısıtlamalar mevcuttur.

İlaç kullanımı kanserli hücreleri yok ederken çevredeki sağlıklı hücreleri de korur ve bunların diğer kanser tedavileriyle birleştirilerek etkinliğini en üst düzeye çıkarmasına olanak tanır. İleri pankreas kanseri olan hastalar için mevcut tedavi olanakları arasında

kemoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve cerrahi rezeksiyon yer almaktadır. Kemoterapi, kanser hücrelerini DNA'larına saldırarak ve büyümelerini ve bölünmelerini bozarak öldüren güçlü ilaçların kullanılmasını içerir [29], [30].

Cerrahi rezeksiyon, erken evrelerdeki PK hastaları ve iyi sağlık koşullarına sahip olanlar için hayatta kalma ve iyileşme ile sonuçlanabilecek tek potansiyel tedavidir. Bu nedenle rezekte edilebilir pankreas karsinomlu hastalarda ön cerrahi tedavi şu anda standart olarak görülmektedir ancak hastaların %80'ninden fazlasında lezyon, primer olmadığına teşhis edildiğinden bu tedavi lokalize hastalarda uygulanır.

Rezeke edilemeyen PK için Gempitabin (GEM) pankreas kanserini tedavi etmek için onaylanan ilk ilaçtır. Yeni kanser hücrelerinin gelişimini durdurur ve bağışıklık sisteminin onları öldürmesini hızlandırır. Gempitabin'in mevcut standart tedavisi, birkaç gün boyunca günde iki kez intravenöz Enjeksiyondur. PK tedavisi için FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı ilaçlar mevcuttur. (Tablo 2), bunlar arasında belzutifan, erlotinib hidroklorür, everolimus, 5-fluorourasil olarak da bilinen fluorourasi, irinotekan hidroklorür lipozomu, mitomisin, olaparib, paclitaksel ve sunitinib malat bulunmaktadır. Ayrıca, leucovorin kalsiyum (folik asit) + fluorourasil + irinotekan hidroklorür + oksaliplatin, gempitabin hidroklorürü + sisplatin, gempitabin hidroklorürü + oksaliplatin ve oksaliplatin + fluorourasil + leucovorin kalsiyum kombinasyonlu tedaviler PK tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. Bununla birlikte PK, kemoterapide ilaçlara karşı direnç oluşturan yoğun bir dezmozplastik reaksiyon ile karakterizedir[30] .

Sistemik kemoterapi hastalığa bağlı semptomları en aza indirip, hasta sağ kalımını uzatmak için kullanılmaktadır. PK kemoterapisi GEM, 1996 yılında onaylanmasının ardından referans bir tedavi kabul edilmiştir. Onayın ardından GEM kombinasyonları geliştirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Hücresel alımdan sonra aktif metabolitlere fosforilasyon gerektiren, DNA zincir uzamasını inhibe eden ve DNA kırılması ile hücre ölümüne yol açan bir ön ilaçtır. 5-fluorourasil (5FU), sisplatin, epirubisin, oksaliplatin ve irinotekan gibi birçok ajan ile çoklu kemoterapi tedavi rejimleri oluşturulmuştur.

Tablo 3. Pankreas kanseri hastaları için FDA tarafından onaylanan tedaviler [30].

İLAÇ	KOŞULLAR	HEDEF
Gemsitabin Hidroklorür	Metastazlı, lokal ilerlemeli/fluorourasil tedavisi olan PK.	DNA sentez inhibitörü
Belzutifan	Pankreas nöroendokrin tümörleri.	HIF-2 α inhibitörü
Erlonotin Hidroklorür	GEM hidroklorür ile tedavi edilen PK, cerrahiye çıkarılamayan, metastazlı veya lokal ilerlemeli.	EGFR inhibitörü
Olaparib	Platin kemoterapisi ile birinci basamak tedavi sonrası veya BRCA2 geninde belirli germline mutasyonları olan metastatik PK.	Bir poli ADP-riboz polimeraz inhibitörü
Flourasil	Pankreas kanseri	DNA replikasyonu-RNA sentezi-hücrel timidilat sentaz inhibisyonu.
Mitomisin	Diğer tedavi türleriyle onayı olmayan, lokal ilerlemeli veya bölgelerle metastazlı PDAK	DNA sentezi ve tioredoksin redüktaz inhibitörü
Paklitaksel	Metastazlı PK	Hücre mitozunu ve kanser hücrelerinin büyümesini engeller.

2.6.Mevcut tedavi Stratejileri

Günümüzde pankreas kanserinin pek çok tedavisi mevcut olmasına rağmen, tümörün iyileştirilmesi sürecinde gelişen zorluklar kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle hastalığa yönelik yenilikçi ve etkili tedavilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. PK tedavisinde yeni yaklaşımlar sağlama umuduyla kemoterapi, radyoterapi gibi geleneksel tedaviler dışında nano ilaç sistemleri, moleküler hedefli tedavi, CRISPR, T Hücre Terapisi, kodlanmayan RNA'lar, onkolitik virüsler, Adjuvanlar, İmmünolojik Hedefler ve Peptit ve kombinasyon ilaç uygulama stratejileri gibi tedavi rejimleri bulunmaktadır.

Sinerjistik bir tedavi, ilaca dirençli PK hücrelerini öldürmek için iyi bir seçenektir. Örneğin, astaksantin, gemsitabin kaynaklı hücre apoptozunu teşvik etmek ve PK hücrelerinin GEM kaynaklı EMT'sini inhibe etmek için HIF1 α /STAT3 sinyal yolunu aktive ederek insan PK hücrelerini GEM'e yeniden duyarlı hale getirebilmektedir. PDAK klinikte en yaygın görülen PK türüdür. Enflamasyon, fibrozis, anjiyogenez,

EMT ve CSC'lerin çoğalması gibi faktörler PK gelişimini ve ilerlemesini indüklemektedir. Birkaç mono veya kombinasyon terapi, PK tedavisi için FDA tarafından onaylanmış olmasına rağmen, 5 yıllık sağkalım oranı hala umut vaat etmemektedir. Onkolitik virüsler aracılığıyla tedaviler ve CAR-T gibi yeni immünoterapilerin geliştirilmesi, kombinasyon terapiler ve immünoterapi sistemleri, terapötik sonuçları artıracak ve PK hastalarında ilaç direnci ile savaşacaktır. Mevcut tedavilerin etkinliğini değerlendirmek ve yeni etkili terapiler bulmak için daha fazla klinik denemeye ihtiyaç bulunmaktadır [29], [30], [31].

2.7.Pankreas Kanseri Kullanan Kemoterapötik İlaçlar

2.7.1. Palbosiklib (PAB)

Palbociclib (PAB) dünyanın ilk sikline bağımlı kinaz (CDK) 4 ve 6 inhibitörüdür. Hücre döngüsünde görev alan bir piperazin piridopirimidindir. Palbosiklibin, yapılan çalışmalarla CDK 4/6 ve siklin D'den oluşan kompleksin aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğuna ve tümör büyümesini bastırdığı düşünülmektedir. Klinik öncesi çalışmada, palbosiklib'e duyarlı hücre hatlarının çoğunun östrojen reseptörü (ER) pozitif olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca palbociclib'in antitümör etkisini gösterebilmesi için retinoblastoma proteini (Rb) ekspresyonunun gerekli olduğu öne sürülmüştür. Sikline bağımlı kinaz (CDK) 4 ve 6'nın inhibitörü olan PAB, CDK4/6, siklin D1'i bağlayarak Rb hiperfosforilasyonuna neden olur. Ayrıca palbosiklib CDK4/6-siklin D1 komplekslerini ayırarak Rb fosforilasyonunu bloke edebilir ve E2F1 salınımını inhibe ederek G1 fazında durmasını ve tümör büyümesinin baskılanmasını sağlar. PAB ve anti-östrojen ilaçlarının kombinasyon uygulamasında ER pozitif insan meme kanseri hücre dizilerinin kullanıldığı klinik öncesi çalışmalarda, her ilacın tek ajan uygulamasıyla karşılaştırıldığında antitümör etkisinin arttığı da doğrulanmıştır. PAB aynı zamanda endokrin bazlı, HER2-negatif ve HR-pozitif ilerlemiş veya metastatik meme kanserini tedavisinde diğer ajanlarla kombine halinde kullanılan kemoterapötik ajandır. PAB'ın eliminasyon yarı ömrü 29 saatter fazladır. Birincil atılım yolları ise dışkı ve böbreklerdir. İn vitro çalışmalar PAB'ın, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına ilerlemesinin inhibisyonu ile HR pozitif meme kanseri hücre hatlarının hücresel proliferasyonunun azalma potansiyelini göstermiştir[32].

2.7.2. Erlotinib (ERL)

Erlotinib (ERL), bazı küçük hücreli dışı akciğer kanseri türlerini ve ilerlemiş pankreas kanserini tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. Tirozin kinaz reseptör inhibitörü sınıfına ait ilaçlardandır. FDA, 2005 yılında PK tedavisi için erlotinibi onaylamıştır. Erlotinib, ErbB reseptör ailesinin bir üyesi olan EGFR üzerinde etkili olan, geri dönüşümlü bir birinci nesil reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Erlotinib, tümör hücresi bölünmesini bloke eden, hücre döngüsünü durduran ve EGFR'yi aşırı eksprese eden insan tümör hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü başlatan EGFR'yi inhibe etmektedir. İlaç hem normal(mutasyonsuz) hem de mutasyonlu EGFR ile etkileşime girer. ErbB, genellikle insanlarda incelenen birçok karsinom tipinin patogeneğinde rol oynayan homodimerler veya heterodimerler oluşturabilir. Reseptör tirozin kinaz inhibitörleri (TKI), hücre sinyal yolunda substratlarının fosforilasyonunu önler. EGFR normalde farklılaşma, çoğalma ve anjiyogenez dahil olmak üzere hepsi kanserin ayırt edici özellikleri olan birçok hücrel fonksiyonda rol oynamaktadır.

Tanı konulan birçok PK vakası, EGFR mutasyonuna sahiptir. Bu mutasyona sahip hastalar daha kötü bir prognoza sahiptir. GEM, PK tedavisi için standart kabul edilmektedir ancak GEM ile diğer anti-kanser ajanların ve ERL'nin kombine kullanımı ile tedavi lokal olarak ilerlemiş veya metastatik PK'de tek GEM kullanımına kıyasla daha faydalı olduğu görülmüştür[33] .

2.7.3. Paklitaksel (PTS)

Başlangıçta taksol olarak adlandırılan paklitaksel, *Taxus brevifolia*'dan (Pasifik porsuk ağacı) ekstrakte edilen doğal olarak oluşan bir diterpenoid bileşiktir . Bilim adamları, paklitakselin kanser hücrelerine karşı ayırt edici sitotoksik özelliklerini keşfettiklerinde, potansiyel antikanser ajanlarını araştırmak için bitki özleri üzerinde yapılan araştırmalarda, bileşiğin hücre döngüsünün durdurulmasına ve apoptoza yol açan mikrotübül depolimerizasyonunu engelleme yeteneği, araştırmacıların ilgisini çekmiş ve kapsamlı araştırmaların yolunu açmıştır. Tüm bunlarla birlikte 1979'da paklitakselin α/β -tübinin heterodimerlerinin tekrarlanarak oluşturduğu alt birimlerden meydana gelen mikrotübüllerin birleşmesinin desteklendiği bildirilmiştir.

Paklitaksel kullanma endikasyonları arasında meme, yumurtalık, mesane, akciğer, prostat, melanom, özofagus, Kaposi sarkomu ve diğer çeşitli katı tümörler dahil olmak üzere koroner kalp hastalığı, renal ve hep fibrozis, inflamasyon ve akson

rejenerasyonunda da kullanılmaktadır. Birçok klinik deneme sonrası FDA, 1992’de yumurtalık kanseri tedavisi için PTS’yi onayladı. O zamandan beri paklitaksel, meme kanseri, kolorektal kanser, mesanenin skuamöz hücreli karsinomu ve PK gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [34].

2.7.4. Sispilatin (SP)

Sisplatin, 1970'lerin sonlarında kullanıma giren antineoplastik bir ajandır. Sitotoksik ilaçların alkilleyici ajan sınıfındadır. Sisplatin oldukça toksik olmasına rağmen hematolojik ve katı tümör maligniteleri için en yoğun kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. İndüksiyon ve neoadjuvan tedavi için tek ajan veya kombine tedavi olarak kullanılmaktadır. Cisplatin, ileri yumurtalık kanseri, testis kanseri ve mesane karsinomunun tedavisi için FDA onaylıdır. Kimyasal adı cis-diamindikloroplatin 2 olarak anılan sisplatin, cis konfigürasyon oryantasyonunda 2 lingand klorür içermektedir. Etki mekanizması DNA’daki pürin bazlarına kovalent bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu kovalent bağlanma, iplikçik içi ve iplikçikler arası çapraz bağlantılara yol açarak daha sonra iplik kopmalarına neden olur. DNA onarım mekanizmaları devredeyken, hasarlı DNA, RNA ve proteinlerin kalıntıları nedeniyle hücreler sıklıkla apoptotik veya apoptotik olmayan hücre ölümüne maruz kalır. Ancak ilaç direnci dolayısıyla genç hastalarda böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyona karşı bağışıklık düşüşü ve kanama gibi istenmeyen yan etkiler oluşabilir. Sisplatin diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılabilir ve bu kombine tedavilerin ilaç direncini ve toksisiteyi azalttığı yapılan çalışmalarla kabul görmüştür [35].

2.7.5. Gemsitabin (GEM)

Gemsitabin (GEM), 2',2'-difloro-2'-deoksisitidin (dFdC) olarak da bilinen işlevi temel olarak DNA sentezinin inhibisyonlarına bağlı olan, dolayısıyla proliferasyonu inhibe eden ve G1/S faz sınırında hücre döngüsü sürecini bloke eden hücre içinde birçok etki alanına sahip bir deoksisitidin nükleosid analogudur.

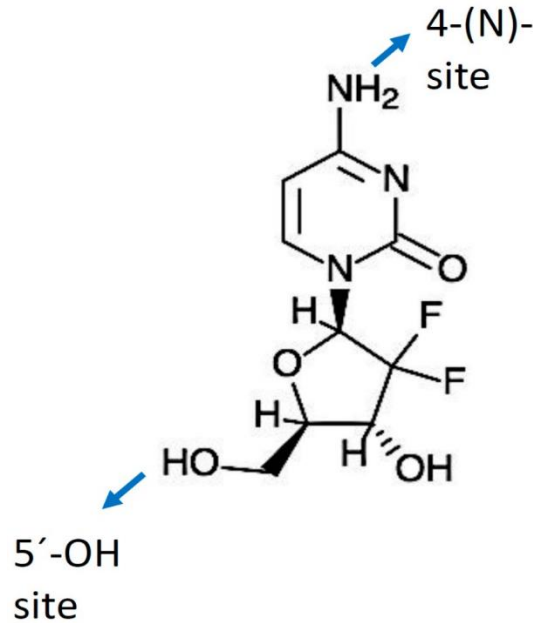
GEM, PDAK için birinci basamak bir tedavidir ancak yumurtalık, mesane, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi kanser türleri tedavisinde de kullanılarak geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur. GEM, lokal olarak ilerlemiş (rezeke edilemeyen Evre II/Evre III) veya metastatik (Evre IV) PDAK olan hastalar için birinci basamak tedavi olarak kabul edilir. Aynı zamanda GEM daha önce fluorourasil ile tedavi gören hastalar için de kullanılmaktadır .

GEM'in yaygın kullanımına rağmen içsel ve edinilmiş kemorezistans yaygındır. Genel anlamda bu kemorezistansın altındaki mekanizmalar ayrıntılı anlaşılmamakla birlikte üzerinde birçok çalışma yapılmaya devam edilmektedir. PDAC hastalarında OS'yi artırabilen gemsitabin ve diğer kemoterapötik ajanları içeren çeşitli kombinasyon tedavileri vardır; Gemsitabin + nab-p ve Gemsitabin + Erlotinib gibi EGFR inhibitörleri, tek başına GEM'e kıyasla sağ kalım açısından iyileşme gösteren kombinasyonların örnekleridir .

2.8.Gemsitabin Farmakolojisi

2.8.1. Kimyasal Yapı ve Özellikleri

Gemsitabin (dFdC), anti-proliferatif özellikleri ile DNA sentezi üzerinde çeşitli inhibitör etkilere bağlı olan ve G1/S fazı sınırında hücre döngüsü ilerlemesini bloke eden bir deoksisitidin nükleosid analogudur. Klinik açıdan yararlı ilk nükleozid analogu olan sitozin arabinosid (Ara-C) ile karşılaştırıldığında gemsitabinin birçok benzersiz özelliği ve spesifik bir aktivite spektrumu vardır. Gemsitabinin hücresel farmakolojisi, metabolizması ve etki mekanizmaları ile ilgili ayırt edici özellikleri, gemsitabinin furanoz halkasının ikinci pozisyonundaki flor ornatlıkları arasındaki yapısal farklılıktan kaynaklanmaktadır.

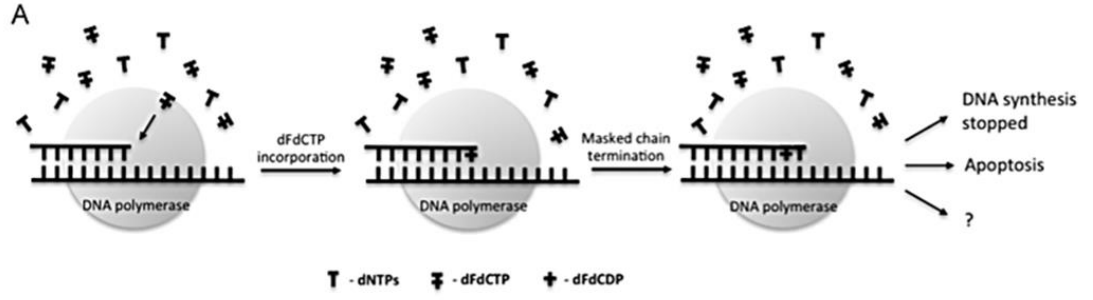


Şekil 8. Gemsitabin molekülü ve modifikasyon bölgeleri (4-(N) ve 5'-OH)[36] .

2.8.2. Taşıma, Metabolizma ve Etki Mekanizması

GEM'in alındıktan sonra işlev görmesi için hücre içi fosforilasyona ihtiyacı vardır. Aktivasyonu ve taşınması çeşitli enzimler tarafından yönetilir. Bu nedenle nükleozit taşıma aktivitesi, hücre büyümesi inhibisyonu için bir ön koşuldur. Molekül, doğası gereği hidrofiliktir ve bu nedenle çeşitli insan nükleozit taşıyıcıları (hNT'ler) tarafından hücrelere taşınır. Bunlar arasında insan konsantre nükleozit taşıyıcıları (hCNTs) ailesi SLC28 ve insan dengeleyici nükleozit taşıyıcıları (hENTs) ailesi SLC29 yer alır. hCNT ailesi üyeleri, nükleozidlerin hücrelere tek yönlü taşınmasına aracılık eden sodyuma bağımlı ortak taşıyıcılardır, hENT'ler ise biyolojik membranlar bir konsantrasyon gradyanı boyunca çift yönlü nükleozit taşınmasına aracılık eder. GEM'in hücrelere NT, hCNT1, hCNT2, hCNT3 ve ayrıca hENT1 ve hENT2 tarafından taşındığı bilinmektedir. Bununla birlikte, insan hücre hatları üzerinde yapılan kinetik çalışmalar, dFdC'nin hücre içi alımına öncelikle hENT1 (SLC29A1) ve bir dereceye kadar hENT2 (SLC29A2), hCNT1 (SLC28A1) ve hCNT3 (SLC28A3) aracılık ettiğini göstermiştir. Kısaca esas olarak dFdC'nin hücre içi alımına hENT1 aracılık ederken, hCNT ailesi nükleosidlerin hücrelere tek yönlü taşınmasına aracılık etmektedir. Hücre içine girdikten sonra GEM, deoksisitidin kinaz (dCK) tarafından gemitabin monofosfata (dFdCMP) fosforile edilmektedir. Ardından gemitabin difosfat (dFdCDP) formuna, pirimidin nükleozit monofosfat kinaz (NMPK, ayrıca UMP/CMP olarak da bilinir) tarafından ve gemitabin trifosfat (dFdCTP) formuna nükleozit difosfat kinaz (NDPK) tarafından fosforile edilmektedir.

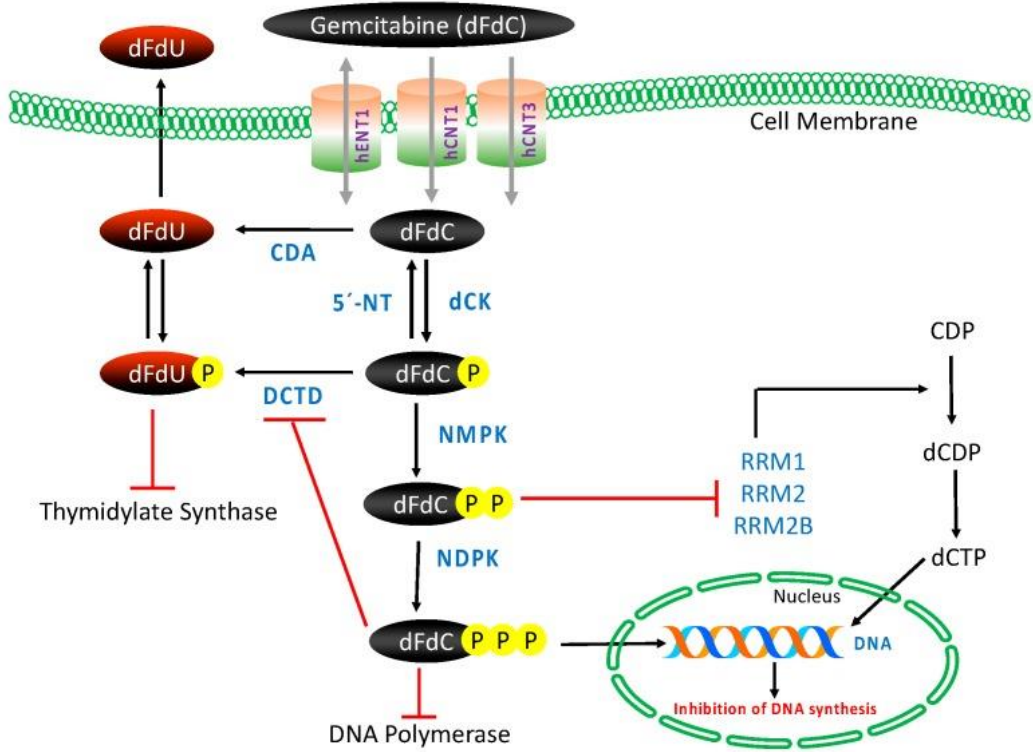
Gemitabinin ana hücresel metaboliti olan dFdCTP (gemitabin trifosfat), deoksisitidin trifosfatın (dCTP) bir substratı olarak görev yapar. Bu, dFdCTP'nin replikasyon sırasında DNA'ya dahil edilmesine olanak tanır ve böylece DNA'nın zincir uzamasını inhibe eder ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olur. 'Maskeli zincir sonlandırma' süreci GEM'i DNA'ya kilitliyormuş gibi görünmektedir. Bu süreçte dFdCTP, uzatılmış DNA zincirinin ucuna dahil edilir ve ardından deoksinükleotid eklendiğinde, DNA polimerazlar ilerleyemez ve proof-reading ekzonükleazlar, gemitabin nükleotidini zincirde bulunduğu konumdan çıkaramadığı için ilaç DNA'ya kitleniyor gibi görünür ve DNA sentezi inhibe edilir. Yani böylece proliferasyon inhibe olur ve G1/S fazı sınırında hücre döngüsü süreci bloke edilmiş olur.



Şekil 9. Gemcitabinin DNA tamir mekanizması inhibisyonu.

Bu hücre içi aktivasyon yolunda, dFdC'nin dFdCMP'ye dCK aracılı fosforilasyonunun, gemcitabinin aktif metabolitlerinin daha sonraki üretimi için hız sınırlayıcı (rate-limiting) basamak olarak kabul edilmektedir. Ancak uygulanan gemcitabinin çoğu, sitidin deaminaz (CDA) tarafından indüklenen hızlı deaminasyonla inaktive edilir, böylece daha az aktif metabolit olan gemcitabinin yüksek konsantrasyonları üretilir. Gemcitabinin fosforile metabolitleri hücre 5'-nükleotidaz (5'-NT) tarafından indirgenir ve monofosfat formu dFdCMP, deoksisitidilat deaminaz (DCTD) tarafından 2'-deoksi-2',2'-difluorouridin monofosfata (dFdUMP) dönüştürülür ve inaktive edilir.

GEM ayrıca kendi aktivasyonunu artıran, "kendi kendini güçlendirme" adı verilen bir mekanizmaya sahiptir. GEM metaboliti dFdCDP, nükleosid trifosfatların (NTP'ler) oluşumunu kontrol ederek DNA biyosentezini düzenleyen bir enzim olan ribonükleosit redüktazı (RR) inhibe eder. RR, CDP'yi dCDP'ye dönüştürür ve bunun inhibisyonu, DNA sentezi için gerekli olan deoksiribonükleotid havuzlarının azalmasına neden olmaktadır. Bu süreç dFdCTP'nin DNA'ya dahil edilmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, dFdCTP ve dCTP'nin hücre içi indirgenmesi, aktivitesi için yeterli düzeyde aktif dCTP sağlar ise DCTD tarafından dFdCMP'nin inaktivasyonu baskılanabilmektedir[36], [37].



Şekil 10. Gempitabinin etki mekanizması. Gempitabin aktivasyonu ve taşınması çeşitli enzimler tarafından yönetilir. hCNT'ler ve hENT'leri içerir. Gempitabin hücre zarına girdikten sonra, dCK ilk fosforile hız sınırlayıcı enzimdir ve gempitabin'i dFdCMP fosforile eder. Daha sonra kompleks hücre içi, dFdCDP ve dFdCTP'ye dönüşür. Gempitabin metaboliti dFdCTP, nükleosid trifosfatların (NTP'ler) oluşumunu kontrol ederek DNA biyosentezini düzenleyen bir enzim olan RR'yi inhibe eder. RR, CDP'yi dCDP'ye dönüştürür ve bunun önleyici etkisi, DNA sentezi için gerekli olan dCTP havuz hücrelerinin konsantrasyonunun azalmasına yol açar, böylece dFdCTP'nin DNA'ya bağlanmasını desteklenir.

2.9.Kemorezistansta Gempitabin Mekanizmaları

Kemorezistans iki kategoriye ayrılabilir, bu bir başlangıç özelliği olarak içsel olabilir ancak aynı zamanda ilaç tedavisi sırasında edinilmiş direnç olabilmektedir. İlaç taşıyıcıları, aktive edici ve inaktif enzimler ve bunların hedefleri ile ilgili ilaca dirençli mekanizmalar gösterilmiştir. Gempitabinin taşınması, aktivasyonu ve metabolizması çeşitli enzimler tarafından etkilenir ve düzenlenir dolayısıyla ilaç direncinin oluşumu, tümör mikro ortamı, epitelyal-mezenkimal geçiş ve mikroRNA gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir.

Tablo 4. Pankreas kanserinde gemsitabin metabolizması ile ilişkili kemorezistans varlıkları.

Hedef	Gemsitabin metabolizmasındaki rolü	Direnç paterni
Nükleozit taşıyıcıları	İlaç taşınması	Aşağı regülasyon
Deoksisitidin kinaz	Hücre içi ilaç aktivasyonu	Aşağı regülasyon
Sitidin deaminaz	İlaç inaktivasyonu	Yukarı regülasyon
Ribonükleotid redüktaz	DNA sentezi inhibisyonu	Yukarı regülasyon
Timidilat sentaz	DNA sentezi inhibisyonu	Yukarı regülasyon

2.10. Nükleozit Taşıyıcıları

Gemsitabinin, plazma membranından geçmek ve farmakolojik aktivite sergilemek için bir nükleosid taşıyıcıya (NT) ihtiyaç duyduğu bilinmektedir. HENT1 ekspresyonunu azaltarak GEM'in hücre içi alımının kısıtlanması, ilaç direncinin yerleşik bir mekanizmasıdır. Nükleozit taşıyıcılarının tümör ekspresyonu düşük olan PK hastalarında, gemsitabin tedavisini takiben yüksek hENT1 ve hCNT3 seviyeleri olan hastalara kıyasla önemli ölçüde daha kötü sağkalım göstermektedir. Ayrıca, NT'den yoksun hücrelerin gemicitabin kaynaklı sitotoksositeye karşı da dirençli olduğu gösterilmiştir. hENT1 ve hCNT1 seviyeleri, gemsitabin duyarlılığı ve OS ile ilişkilidir, bu da onları pankreas kanseri hastalarında gemsitabin yanıtı için iyi öngörücü belirteçler haline getirir; çünkü yüksek hENT1 ekspresyonu, pankreas kanseri hastalarının daha uzun genel sağ kalımı (overall survival (OS)) ve hastalıksız sağkalım (DFS) ile ilişkilidir. hENT1 seviyeleri, *in vitro* gemsitabin tepkisi ile ilişkilidir, hENT1'in yukarı regülasyonu gemsitabinin sitotoksik etkisini arttırmakta, hENT1 kaybı ise gemsitabine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. GEM'in hücre içi akışında azalmış hENT1 ekspresyonunun, iyi bilinen bir olgu olduğu bilinmektedir. Bu gözlemler, tümör hücrelerinde artan hENT1 ekspresyonunun, GEM tedavisinden sonra muhtemelen ek hayatta kalma faydaları sağlayabileceğini düşündürülebilir. Son zamanlarda, timidilat sentaz (TS) inhibitörleriyle yapılan ön tedavi, tümör hücrelerinde hENT1 ekspresyonunun artmasına neden olduğundan ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak bu etkinin *in vivo* deneysel modellere ve klinik ortamlara aktarılıp aktarılamayacağını doğrulamak için ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

GEM kısmen hENT2 ile hücelere taşınır ancak *Xenopus* oositlerinde rekombinant hENT1/ hENT2 tarafından GEM taşınmasının kinetiğinde belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. hENT1, gemitabin'i yüksek afinite ve düşük kapasite ile taşırken, hENT2 , GEM'i düşük afinite ve yüksek kapasite ile taşımaktadır.

Normal pankreas ve pankreatik duktal epitel hüceleri karşılaştırıldığında, pankreas tümörlerinde ve pankreas kanseri hücre hatlarında hCNT1 ekspresyonunun sıklıkla azaldığını görülmektedir. Gemitabine dirençli PK hüceleri sınırlı, hücre döngüsüne bağlı hCNT1 ekspresyonu ve gemitabin içeri girişini sergiler. Bununla birlikte, hCNT1 degradasyonunun farmakolojik inhibisyonunun hücrel GEM taşınmasını orta derecede artırabildiği gösterilmiştir, bu da GEM taşınmasını ve duyarlılığı artırmaya yönelik olası bir mekanizmayı düşündürmektedir.

NT'lerin aktivitesini düzenleyen farklı mekanizmalar da görülmüştür. Transmembran glikoprotein müsin 4 (MUC4), PK'de anormal bir şekilde eksprese edilir. Artan invazivlik ile ilişkili iken prognoz ile ters orantılıdır. MUC4 eksprese eden PK hüceleri, anti-apoptotik yolların aktivasyonu yoluyla GEM'e karşı MUC4 negatif hücelere göre daha fazla direnç sergiler ve böylece hücrenin hayatta kalmasını destekler. Ayrıca, MUC4'ün, NF- κ B yolu aracılığıyla hCNT1 ekspresyonunu inhibe ettiği, MUC4'ün inhibisyonunun ise hem hCNT1 hem de hCNT3 düzeylerinde artışa neden olduğu ve bunun da gemitabin duyarlılığının artmasına yol açtığı gösterilmiştir. MUC4'ün membran ortağı olan onkojenik reseptör ErbB2, pankreas kanseri hücelerinde fiziksel olarak etkileşime girer ve ErbB2'nin susturulması, hCNT1 ve hCNT3 ekspresyonunun yukarı regülasyonu yoluyla gemitabin duyarlılığının artmasına neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Son olarak hCNT1 degradasyonunun ilaçla inhibisyonu, GEM taşınmasını artırabilir ve GEM'in etki mekanizmasını iyileştirilebilmektedir [37].

2.11. Nükleozit Enzimleri

Gemitabin, NT'ler ile hücelere taşındığında, deoksisitidin kinaz, gemitabinin hücre içi aktivasyonu ve metabolizması için sınırlayıcı enzim haline gelmektedir. dCK'nin inaktivasyonu gemitabin direncinin anahtar mekanizmalarından biridir. Gemitabin duyarlılığı ile dCK aktivitesi arasındaki anlamlı korelasyon, insan ve fare ksenograftlarında doğrulanmıştır. PDAK hücre hatlarının gemitabine karşı elde

edilen bu direnci, dCK'nin sıklıkla inaktif olduğunu düşündürmektedir. dCK geninin inhibisyonu sıklıkla GEM direncine sebep olmaktadır. dCK'nin aşırı ekspresyonu ise gemcitabine dirençli hücre hatlarında GEM kemosenitivitesini eski haline getirebilir. Çok sayıda çalışma, PK dokusundaki dCK ekspresyon seviyesinin, progresyonsuz sağkalımın (PFS) güvenilir bir prognostik göstergesi olduğunu göstermiştir, bu nedenle dCK, gemsitabin ile tedavi edilen PC hastaları için dFdC duyarlılığının en iyi biyolojik belirteci olabilir.

Hu antijen R (HuR), dCK'yı transkripsiyon sonrası düzenleyen bir RNA-bağlayıcı proteindir. Aynı zamanda gemsitabinin etkinliği ile de ilişkilidir. HuR'yi aşırı eksprese eden kanser hücreleri, gemsitabin tedavisine yaklaşık 30 kat daha duyarlıdır. HuR, pankreas kanseri hücrelerinde dCK ayrıca mRNA ile ilişkilidir. GEM ile tedavi edilen PK hücreleri, dCK mRNA'yı zenginleştirebilir ve sitoplazmatik HuR seviyelerini artırabilir. Bu nedenle, HuR'un aşırı ekspresyonu, dCK protein ekspresyonunu artıracak ve HuR'un susturulması, dCK protein ekspresyonunu azaltacaktır, böylece pankreas kanserinde GEM tepkisi üretecektir.

Gemsitabin direncinde rol oynayan diğer bir anahtar enzim ise ribonükleotid redüktazdır (RR). RR, DNA sentez yolunda hız sınırlayıcı bir enzimdir. Öncelikle DNA onarımı için kritik olan ribonükleotidlerin dNTP'lere dönüştürülmesinden sorumludur. RR, M1 ve M2 olmak üzere iki alt birimden oluşur. dFdCDP tarafından indüklenen RR'nin inhibisyonu, GEM aktivitesinin arttırılması için en önemli mekanizmadır. Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, yüksek RRM1 ekspresyonu olan hastaların, düşük RRM1 ekspresyonu olanlara göre büyük ölçüde daha zayıf OS ve DFS'ye sahip olduğunu göstermiştir, bu da RRM1 ekspresyonunun, gemsitabin kemoterapisini kabul eden pankreas kanseri hastalarında kötü sağkalımın bir göstergesi olduğunu öne sürmektedir. Deneyler, PK hücre hattındaki RRM1 ve RRM2 proteinlerinin aşırı ekspresyonunun, stabil genetik GEM direncine ulaşabileceğini doğrulamıştır. Artan RR aktivitesi, dNTP havuzunu arttırmış ve dFdCTP'nin DNA'ya eklenmesini inhibe etmiştir. Genişletilmiş dNTP havuzu, dCK aktivitesini daha da azaltmış ve negatif feedback yoluyla gemsitabin fosforilasyonunu azaltmıştır. Aşırı dCTP, dCMP deaminazın pozitif bir feedback mekanizması olabileceği ve GEM metabolizmasının artmasına yol açabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle RR, pankreas kanserinde kazanılmış ilaç direncinin tedavisinde etkili bir hedef olabilmektedir[36], [37].

2.12. Epiyelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT)

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), tümör hücrelerinde daha yüksek agresif bir mezenkimal fenotipi destekleyen bir fenotipik değişim aşamasıdır. Bu süreç genellikle kanser hücrelerindeki morfolojik değişiklikler, genom ve protein seviyelerindeki değişiklikler eşlik etmektedir. EMT sürecine çeşitli anahtar genler ve hücresel sinyal yolları aracılık eder. Yapılan çalışmalarda E-kadherin ile Zeb-1 arasında güçlü bir negatif korelasyon içerisinde bulunduğu ve kemorezistansla yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Zeb-1 ve diğer EMT modülatörlerinin varlığı, insan PK hücrelerinde ilaç direncini korumaktadır.

Zeb-1 geni susturulduğunda, E-kadherinin protein ekspresyonunun yukarı regülasyon ile düzenlendiği ve epitelyal belirteçler EVA1 ve MAL2'nin ekspresyonu geliştirilerek ilaç duyarlılığı yeniden sağlandığı görülmüştür. Snail ve Twist EMT'den sorumlu iki transkripsiyon faktörüdür. Yine yapılan çalışmalarda EMT sürecinin inhibisyonu, tümörlerde nükleozit taşıyıcılarının ekspresyonunun artmasına neden olduğu ve böylece GEM tedavisine duyarlılığın arttığı görülmüştür. Notch, tümör nekroz faktörü alfa (TNF α), TGF- β ve HIF1 α gibi sinyal yolları, PK hücrelerinde EMT'nin indüksiyonunda rol oynamaktadır. Bununla birlikte MAPK aktivasyonu, taşıyıcılar ve gempitabin metabolizma enzimleri gibi bağımsız EMT yolları da GEM direncine neden olabilmektedir, dolayısıyla bu, sürecin karmaşıklığını arttırmaktadır. Ayrıca yapılan araştırmalarda, USP27X'in TGF β -indüklü Snail1 ekspresyonu için gerekli olduğunu ve EMT sırasında TGF β tarafından yukarı regüle edildiğini göstermiştir. USP27X'in tükenmesi, Snail1-bağımlı hücre invazyonu ve migrasyonu ile metastaz oluşumunu etkili bir şekilde azaltmakta ve TGF β -indüklü EMT ve fibroblast aktivasyonunu önlemektedir. USP27X inhibisyonunun, Snail1-bağımlı tümör invazyonu ve kemorezistans için bir hedef olarak önerildiği belirtilmektedir.

EMT fenotipi yalnızca kanser hücresi proliferasyonu ile ilişkili değildir, aynı zamanda GEM direncinin oluşumunda da rol oynar. *Arumugam ve arkadaşları*, gempitabin ve 5-florourasile karşı farklı hassasiyetlere sahip PDAK hücre hatlarından oluşan bir kullanarak, küresel gen ekspresyon profillerine baktılar ve ilaca dirençli hücrelerin EMT ile tutarlı birçok özellik içerdiğini doğruladılar. Zeb-1'in susturulması yoluyla EMT'nin tersine çevrilmesi, yalnızca tipik epitelyal işaretleyici genlerin ekspresyonunu düzeltmekle kalmamış, aynı zamanda hücrelerin terapötik ajanlara

duyarlılığını da arttırmıştır. Bu, Zeb-1 ve diğer EMT düzenleyici faktörlerin insan PK hücrelerinde ilaç direncini koruduğunu düşündürmektedir. Son zamanlarda PK'de kötü prognozun olası bir belirteci olarak görülen morfolojik özellik, tümör tomurcuklanmasıdır (TB). TB'nin, tümör epitel hücrelerinin daha fazla mezenkimal fenotip elde etmesine olanak tanıyan, böylece invazyon ve migrasyon yeteneklerini artırarak kemoterapi ilaçlarına direnç geliştirmelerine yardımcı olan EMT sürecini morfolojik olarak yansıttığı düşünülmektedir. Şu anda, çok sayıda çalışma, tümör tomurcuklanmasının EMT ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu, TB hücrelerde vimentin, ZEB1 ve ZEB2 gibi mezenkimal belirteçlerin artmış ekspresyonu nedeniyle olurken, E-kadherin ve sitokeratin gibi epitel belirteçlerinin azalmış ekspresyonu görülmektedir.

PK'de yüksek dereceli tümör tomurcuklanmasının prognostik rolüyle ilgili bir meta-analiz, EMT'nin PK'de TB varlığını belirlemede merkezi bir süreç olduğunu ve yüksek dereceli TB'nin PDAC prognozunu kategorize etmenin klinik öneme sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, tümör tomurcuklanması ile vimentin ekspresyonu arasındaki ilişki, EMT'nin PDAK'de progresyon ve ilaç direncinden sorumlu temel bir süreç olduğu fikrini desteklemiştir. Tomurcuklanma ve EMT arasında önemli bir korelasyon olsa da, EMT ilaç direncinin oluşumunda yer alsa da, TB'nin histolojik incelemesi yoluyla potansiyel kemorezistansı tahmin etmek için hala kapsamlı klinik uygulama ve daha fazla araştırma gerektirmektedir[37].

apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol alan ve kanser olgularında düzensiz aktivasyonu ile ilaca direnç sürecinde de görev yapan bir sinyal mekanizmasıdır. GEM hücre proliferasyonunu inhibe eder ve AMPK / mTOR yolunun aktivasyonu ile hücre apoptozunu indükler. AMPK ekspresyonunu artırır ve mTOR ekspresyonunu azaltır, hücre otofajisini destekler. AMPK ilişkili protein kinaz 5 (ARK5), ilaç dirençli PK hücrelerinin epitelial-mezankimal geçişini (EMT) indükler. Yapılan çalışmalarda oksijen koşullarını modüle etmek üzere yapılan ARK5'in inhibisyonunun, pankreas hücrelerini gempitabine duyarlı hale getirdiği kanıtlanmıştır. PI3K/Akt ve Erk1/2 yollarının artan aktivasyonu kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesini engellenir. Bu yollar üzerine yapılan çalışmalarda da PI3K/Akt aktivasyonunun prostat kanseri hücrelerinde ABCC1 geni ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir [38]. YAP ve TAZ, Hippo sinyal yolağının inhibe ettiği majör regülatörlerdir [38]. YAP ve TAZ ifadesindeki artışın meme ve yumurtalık kanser hücrelerinde taksol ve sisplatin ilaçlarına karşı direnç oluşmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, kanser olgularında düşük seviyede görülen hippo sinyali yolağında rol alan STE20-benzeri protein kinaz 1/2 (MST1/2) ve geniş tümör baskılayıcı 1/2 (LATS1/ 2) çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı direnç ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bunun yanında düşük seviyede TAZ ifadesi veya MST1 yüksek ifadesinin taksol ve sisplatin'e karşı meme kanseri ve prostat kanseri hücrelerini duyarlılaştırdığı incelenmiştir[39]. Wnt sinyal yolu, embriyonik gelişim, hücre polaritesi, proliferasyonu, göçü, hayatta kalması gibi çeşitli fonksiyonları düzenler. Anahtar işlevlere dahil olması nedeniyle, Wnt yolunun düzensizliği birçok insan hastalığında rol oynamaktadır. 226 PDAK örneğinin ve 65 normal pankreas dokusu örneğinin mikrodizi analizi, Wnt ve P53 sinyal yollarının PDAC onkogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir [38], [40]. Bu sebeple bu sinyal yollarını hedef alan terapilerin geliştirilmesi önemli bir hedeftir. Buna göre, Wnt yolağı, kanser kemo-direncinde önemli bir düzenleyici olarak kabul edilmekte ve bu yolu düzenleyen mekanizmaların daha iyi anlaşılması, daha etkili kanser tedavisi için yeni ipuçları sağlayabilecektir.

Çeşitli antikanser ilaçlara direnç kazanmanın en yaygın sebebi, ilaçları saptayan ve hücreden çıkışına sebep olan bir enerjiye bağımlı taşıyıcının aşırı ekspresyonudur ve bu da çoklu ilaç direnci (MDR) ile sonuçlanmaktadır. Kemoterapiye karşı çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişimi, kanser hastalığının tedavi sürecinde zorluk yaratmaya devam etmektedir. Etkili olan her antikanser ilaca karşı bir direnç görülebilmektedir.

Bununla birlikte, artan ilaç akışı, ilaç hedefindeki değişiklikler, ilaç alımının azalması, detoksifikasyon sistemlerinin aktivasyonu, DNA onarımı, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptozdan kaçınma gibi birçok nedenden dolayı ilaç direnci ortaya çıkmaktadır.

Dirence sebep olabilen bir diğer faktörlerden biri de mikroRNA'ların tedavi sürecindeki rolüdür. Gen ekspresyonlarını hızlı ve etkili olarak değiştirebilen mikroRNA'lar (miRNA) tedavi etkinliğinde de rol oynar. miRNA'ların yüksek ve düşük anlatımı, çoklu hedef mRNA'ların ve dolayısıyla birden fazla proteinin ekspresyonunu etkileyebilir ve çeşitli hücresel süreçler yoluyla kanser hücrelerinin ilaca direncinde değişikliklere yol açabilir. Sirküler miRNA'lar da ökaryotik organizmalarda doku gelişim süreçlerinde rol alan yüksek oranda korunmuş, doku, serum veya üründe bulunabilen benzersiz tek zincirli kapalı halkasal yapısı ile ekzonukleaz aracılı degradasyona dirençlidirler. Bu sebeple kanser dahil birçok hastalığın teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilecek potansiyele sahiptirler[38]

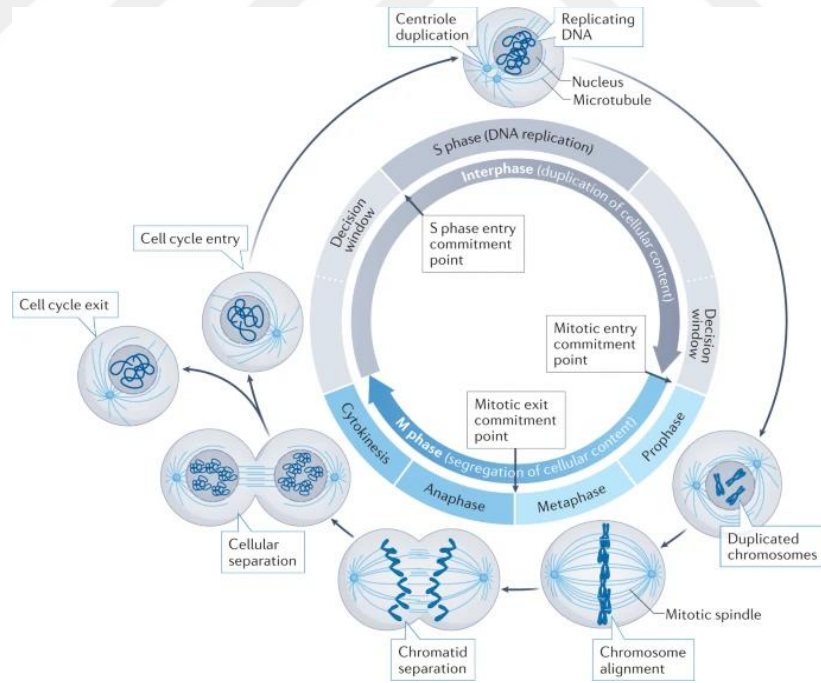
2.14. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsünün en temel işlevi , kromozomlardaki büyük miktardaki DNA'yı doğru bir şekilde eşlemek ve daha sonra kopyaları, genetik olarak özdeş iki yavru hücreye ayırmaktır. Bu süreçler hücre döngüsünün iki aşamasını tanımlar; Mitoz ve İnterfaz. Mitoz (nükleer bölünme), yavru kromozomların ayrılmasına karşılık gelir ve genellikle hücre bölünmesi ile (sitokinez) sona erer. Bununla birlikte, mitoz ve sitokinez yalnızca 1 saat kadar sürer, dolayısıyla hücre döngüsünün ~%95'i interfazda, yani mitozlar arasındaki dönemde harcanır. İnterfaz sırasında, kromozomlar yoğunlaşır ve çekirdek boyunca dağıtılır , böylece çekirdek morfolojik olarak tekdüze görünür. Ancak moleküler düzeyde interfaz, hücre bölünmesine hazırlık sırasında hem hücre büyümesinin hem de DNA replikasyonunun düzenli bir şekilde gerçekleştiği süredir .

Tek hücreli ve çok hücreli ökaryotlarda hücre bölünmesi, bir hücrenin bölünmeye başlamadan ve hücre döngüsü sürecinde ilerlemeden önce hata yapılmamasını sağlamak için düzenleyici mekanizmalar ve kontrol noktalarından geçer. Mitotik hücre döngüsü, DNA replikasyonunu içeren interfaz ve replike kromozomların iki ayrı özdeş hücreye ayrılmasını içeren M fazı olmak üzere iki aşamaya ayrılır (Şekil 12). Hücre döngüsünü oluşturan düzenleyici ajanların amacı genomik DNA'nın zamanında ve

doğru bir biçimde eşleşmesini ve ayrılmasını sağlamaktır. İnterfaz evresi de G1, S ve G2 evrelerinden oluşmaktadır. DNA replikasyonu S fazında gerçekleşir. DNA replikasyonu sonrası hücre genetik materyalin düzenlendiği, yoğunlaşmaya başladığı ve bölünme hazırlıklarının yapıldığı G2 fazına geçer. G2 fazından sonra hücre bölünmesinin gerçekleşmesi için M fazına geçilir. Mitoz evresi ise, profaz, metefaz, anafaz ve telofaz aşamalarını içerir. G1 ve G2 olarak bilinen S fazı ve mitozu iki Gap fazı ayırır. Bunlar hareketsizlik dönemleri değil, hücrelerin kütle kazandığı, büyüme sinyallerini entegre ettiği, eşlenmiş bir genomu organize ettiği ve kromozom ayrışmasına hazırlandığı dönemlerdir.

Hücre döngüsü ilerlemesini yönlendiren merkezi sistem, sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler)'dir. Bunlar, DNA sentezini ve mitotik ilerlemeyi desteklemek için anahtar substratları fosforile eden serin/treonin protein kinazlardır. Siklin bağlanması, aktif olmayan CDK'ların, monomerik ve aktif kinazlara benzer aktif bir konfigürasyonu benimsemesine olanak tanır. Bu düzenlemenin üstüne ek olarak CDK aktivitesi de küçük inhibitör proteinlerin (CKI'ler) bağlanmasıyla veya substratlara fosfat transferini bloke eden inhibitör tirozin fosforilasyonu ile negatif olarak düzenlenebilir.



Şekil 12 Hücre Döngüsü [41]

Ayrıca hücre döngüsünün farklı aşamalarında meydana gelen olayların, uygun sırayla gerçekleşmesi için birbiriyle koordine olması gerekmektedir. Ör: genom replikasyonu tamamlanana kadar hücrenin mitozu başlatmaması kritik öneme sahiptir. Yavru hücrelerin genetik materyalin tam replikasyonunu alamadıkları hasarlı bir hücre bölünmesi olabilir. Çoğu hücrede, hücre döngüsünün farklı aşamaları arasındaki bu koordinasyon, önceki aşamanın olayları tamamlanana kadar hücre döngüsünün bir sonraki aşamasına girişi önleyen bir kontrol noktaları ve geri bildirim kontrolleri sistemine bağlıdır.

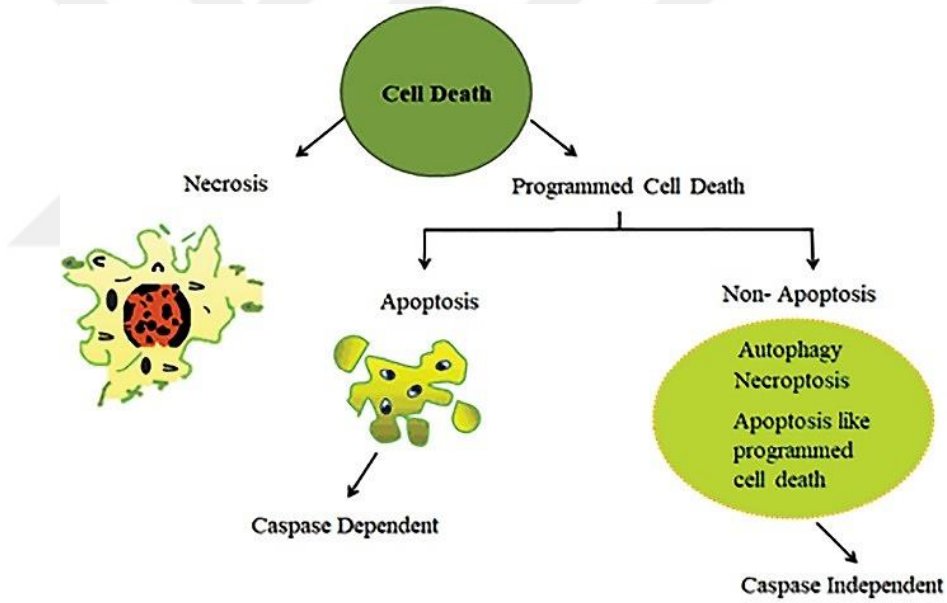
Eksik veya hasarlı kromozomların kopyalanmaması ve hücrelere aktarılmaması için için çeşitli hücre döngüsü kontrol noktaları işlev görür. Bu kontrol noktalarından G2'de meydana gelir. DNA replikasyonu tamamlanana kadar mitozun başlamasını engeller. Bu G2 kontrol noktası, hücre döngüsünün durmasına yol açan bir sinyal üreten eşlenmemiş DNA'yı algılar. Bu nedenle G2 kontrol noktasının çalışması, S fazı tamamlanmadan önce M fazının başlatılmasını önler, böylece genom tamamen kopyalanana kadar hücreler G2 fazında kalır. Bu şekilde G2 inhibisyonu hafifletilir ve hücrenin mitozu başlatmasına ve tamamen kopyalanmış kromozomları yavru hücrelere dağıtmasına izin verilir [40].

2.15. Hücre Ölüm ve Sağ Kalım İlişkili Sinyal Yolakları

2.15.1. Apoptoz

Hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişimi, doku homeostazı ve bütünlüğünde önemli bir süreçtir. Yetişkin organizmada fizyolojik homeostazı sürdürmek için hücre çoğalması ve eliminasyonu gereklidir. İstenmeyen hücreler metamorfoz, embriyogenez, patogenez ve doku yenilenmesi süreci sırasında uzaklaştırılır. Hücre ölümü tipik olarak geniş anlamda tanımlanmış iki mekanizmayı içerir: programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve nekroz. Belirli sinyallere yanıt olarak genetik olarak programlanmış hücre ölümü sürecine 'apoptoz' adı verilir. Genellikle programlanmış hücre ölümü, hücre ortamı ve hücre içi sinyaller tarafından yönlendirilen çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyaller tarafından kontrol edilir. Programlanmış hücre ölümü, farklı morfolojik özelliklere sahip olması, doku homeostazisini koruması ve istenmeyen hücreleri ortadan kaldırarak çok hücreli organizmalarda uygun hücre sayısını düzenlemesi nedeniyle hücre nekrozundan ayrılmaktadır.

Apoptoz, sadece normal olarak gelişim süreci ve yaşlanma sırasında homeostatik mekanizma olarak ortaya çıkmaz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında veya hücrelerin bir hastalıkla ya da toksik ajanlar ile hasar gördüğünde ortaya çıkan bir savunma mekanizması olarak da görülebilmektedir. Yani aynı zamanda normal gelişim ve morfogenez sırasında da meydana gelen, programlanmış ölümün bir mekanizması olarak kapsamlı bir şekilde tanımlanır. Apoptotik hücre ölümünün etki mekanizması tipik olarak kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdekte meydana gelen DNA parçalanması, hücre büzülmesi, dinamik membran taşması ve hücre dışı matrislere yapışma kaybı ile karakterize edilir. Ayrıca biyokimyasal değişiklikler arasında; fosfatidilserinin dışsallaştırılması ve kaspaz adı verilen sistein aspartil proteazların aktivasyonu hücre ölümüne yol açar. Apoptozu tetikleyen hem fizyolojik hem de patolojik birçok çeşitli uyarın bulunmaktadır fakat tüm hücreler her uyarana yanıt olarak mutlaka ölmeyecektir.



Şekil 13 Kanser hücresi ölümünün genel şekli. Kanser hücresi ölümü genel olarak tanımlanmış iki mekanizmayı içerir: programlanmış hücre ölümü ve nekroz.

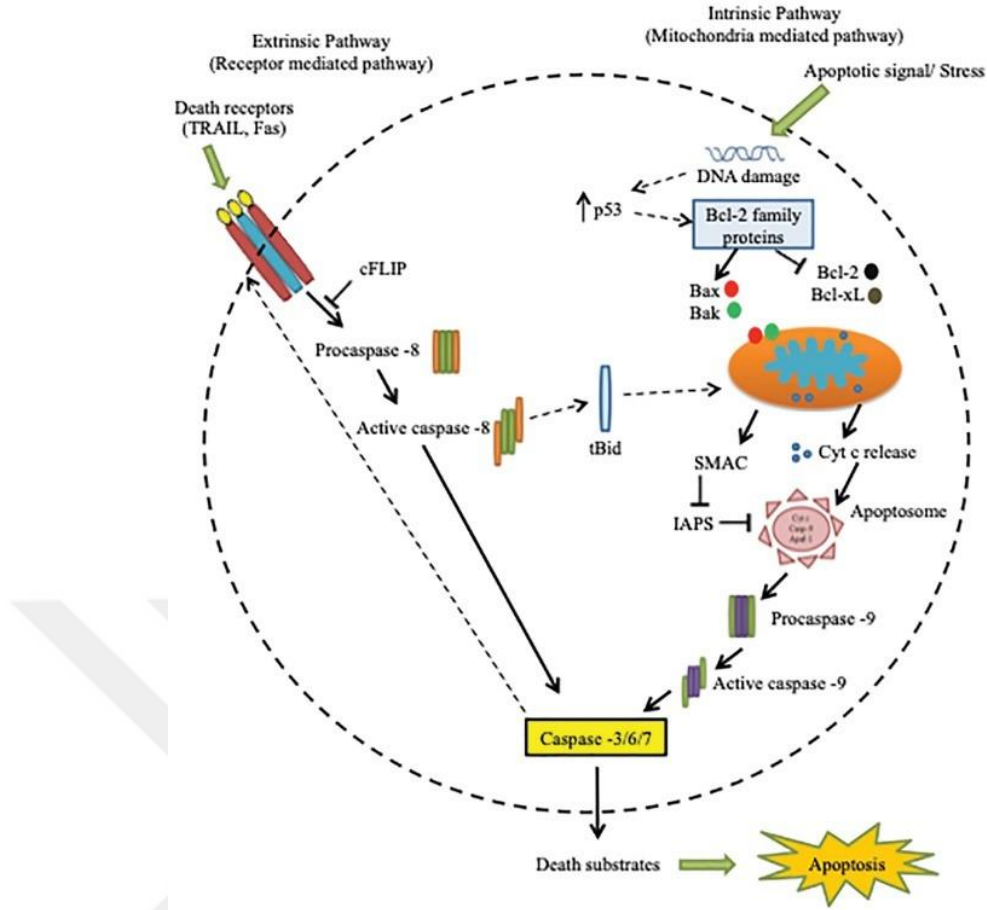
Apoptoz mekanizması temel olarak apoptozun indüklenmesinde rol oynayan iki temel yoldan oluşur; dışsal (İntrinsik) yol ve içsel (Ekstrinsik) yol. Ekstrinsik yol, transmembran reseptörleri (TR) aracılı yola karşılık gelir. İçsel yol, mitokondriyal aracılı bir yoldur. Dışsal apoptoz yolağı kaspaz bağımlı iken içsel apoptoz yolağı hem kaspaz bağımlı hem de kaspazdan bağımsız sinyalleşme ile ortaya çıkabilir. Kaspazlar hücre ölümünün yanı sıra farklılaşma, çoğalma ve inflamasyon yayan hücre içi sistein

bağımlı olan aspartata özgü proteazların bir ailesidir. Ekstrinsik apoptoza, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine ait spesifik transmembran reseptörler ile aracılık eder. TNF, Fas-L (Fas ligandı) ve TRAIL (TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand) gibi hücre dışı ligandlar, TR'nin hücre dışı alanına bağlandığında, dışsal yol boyunca apoptotik sinyalleme devreye girer.

Bu nedenle, Fas ligandı, TNF- α veya TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörü 1 veya 2'ye bağlanır. Bu durum hücre yüzeyinde oligomerizasyon gerçekleşmesine ve hücrede apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanan bir sinyalleşme kaskadının başlamasına neden olmaktadır. Fas'ın hedef hücreler üzerindeki ligasyonu, plazma zarında multiprotein kompleksinin birikmesine neden olur. Adaptör protein fas ile ilişkili ölüm domainine sahip protein (FADD), Fas'a bağlanır. FADD daha sonra ölüm domaininin dimerizasyonu ile prokaspaz-8 ile birleşir. Ortaya çıkan kompleks ise prokaspaz-8'in katalitik aktivasyonu ile sonuçlanır ve ölümü indükleyen bir sinyal kompleksi (DISK) olarak adlandırılır. Kaspaz 8, kaspaz 8'in ön alanı DISK'te kalacak şekilde aktive olurken aktif kaspaz 8, apoptozun yürütme aşamasını oluşturan kaspaz aktivasyonu kademesini başlatmak için DISC'den ayrılır. DISK kaspaz aktivasyonu için bir platform görevi görür. Tip II olarak adlandırılan hücre tiplerinde, DISK'te kaspaz-8'in katalitik aktivasyonu direkt olarak pro-kaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e proteolizine yol açar ve mitokondriden bağımsız olarak apoptoz ile sonuçlanır. Kaspazlar apoptozun temel başlatıcıları ve uygulayıcılarıdır ve işlevleri, farklı substrat tercihlerine sahip olan yapısıyla çok yakından ilişkilidir. Bazı kaspazlar, diğer proteinlerle etkileşime izin veren ve sinyal yollarına bağlanan, ölüm efektör alanı (DED) ve kaspaz toplama alanları (CARD) gibi belirli motifleri içeren uzun pro- alanlara sahiptir. DED kaspaz-8 ve kaspaz-10'u içerirken CARD kaspaz-1, kaspaz-2, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-9, kaspaz-11 ve kaspaz-12'yi içermektedir. Kaspazlar apoptotik sinyalleşme basamaklarındaki konumlarına göre geleneksel olarak başlatıcı, efektör veya yürütücü kaspazlar olarak sınıflandırılır.

Tip II olarak adlandırılan diğer hücrelerde, kaspaz-8 yalnızca BH3 proteini olan Bid'in kesilmesine aracılık eder. Kesilmiş bid (tBid) mitokondri hedeflidir ve mitokondride ölüm sinyalinin amplifikasyonuna neden olur. cFLIP (hücresel FLICE benzeri inhibitör protein) ve cIAP'ler (apoptoz proteinlerinin hücresel inhibitörü) gibi başka proteinler de dışsal apoptozu düzenlemektedir.

Bunlar Pro-apoptotik ve anti-apoptotik türde olabilir türde olabilir. Bugüne kadar toplam 25 kadar gen tanımlanmıştır. Anti-apoptotik proteinlerin bazıları Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG'i içerir. Pro-apoptotik genlerin bazıları ise Bcl-10, Bax, Bak, Bim, Bik, Bid ve Bad'ı içermektedir. Bu proteinler hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirleyebildiklerinden dolayı kritik bir öneme sahiptir. Bu protein ailesinin temel etki mekanizmasının, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi ile birlikte mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir. Proapoptotik proteinlerin ikinci grubu olan AIF, endonükleaz G ve CAD, apoptoz esnasında mitokondriden salınır ancak bu olay hücre programlı ölüm kararı verdikten sonra gerçekleşen geç bir olaydır. AIF çekirdeğe doğru yer değiştirir ve DNA'nın yaklaşık 50-300 kb'lık parçalara ayrılmasına ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olur, bu şekline "evre I" yoğunlaşma denir. Endonükleaz G ve AIF kaspazdan bağımsız şekilde çalışırlar. CAD ise mitokondriden salınır, kaspas-3 tarafından kesilir ve oligonükleozomal DNA kırılmasına aynı zamanda daha belirgin ve gelişmiş kromatin yoğunlaşmasına neden olduğu çekirdeğe doğru yer değiştirir. Bu da "evre II" yoğunlaşma olarak adlandırılır. Puma ve Noxa, Bcl2 pro-apoptoz ailesinin iki üyesidir. Puma, p53 aracılığı ile apoptozda önemli bir rol oynar. *In vitro* çalışmalarda, Puma'nın artan ekspresyonu, artan Bax ekspresyonu ile Bax'ta konformasyonel değişiklik, mitokondriye translokasyon, sitokrom c salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma göstermiştir. Noxa ayrıca p53 ile indüklenen apoptoz aracısıdır. Çalışmalar, proteinin mitokondriye yerleşebildiğini ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi ile etkileşime girerek kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Hem Puma hem Noxa, p53 tarafından uyarıldığından, genotoksik hasar veya onkogen aktivasyonu ile oluşan apoptoza aracılık edebilmektedirler. Aynı zamanda Myc onkoproteininin hem p53'e bağımlı hem de bağımsız olarak apoptozu indükleyebileceği yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir. Apoptoz normal hücrelerin temel düzenleyici mekanizmasıdır; apoptozdaki herhangi bir hasar hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını tetikleyebilir. Bu düzenleyici süreç, genel olarak çok önemli bir rol oynayan farklı bir protein yoluyla dışsal ve içsel yolları içeren biyokimyasal özelliklerin yanı sıra bir dizi spesifik morfolojik değişikliklerle karakterize edilir. Bu sebeple, etkili kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için apoptotik sinyal yollarının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, bununla birlikte, olgunlaşan klinik verilerde olumlu sonuçlar elde etmek için kanser hücrelerinde apoptozdan kaçınmanın daha iyi anlaşılması gerekmektedir [42].



Şekil 14 Apoptoz [42].

2.15.2. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı

Hücreler ve dokular, insulin, glukoz, büyüme faktörleri, sitokinler, integrinler, B ve T hücre reseptörleri, hormonlar ve kemokinler gibi çeşitli moleküllerin hücre yüzeyindeki tirozin kinazlar (RTK'ler) veya G-protein reseptörleri (GPCR'ler) ile bağlanması yoluyla birbirleriyle iletişim kurar. Bu, sınıf I fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Protein kinaz B (AKT)/rapamisin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolu gibi hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır

. PI3K'ler, her biri dört homolog bölgeye sahip olan ve kinaz alanının en çok korunan olduğu üç sınıfa ayrılır. PI3K l'in iki alt sınıfı vardır; RTK'lar tarafından etkinleştirilen PI3K sınıf IA ve GPCR'ler tarafından etkinleştirilen PI3K sınıf IB ve her ikisi de kanserli hücre büyümesi, hayatta kalması ve invazyonunda rol oynamaktadır. PI3K, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatı (PIP2) fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata (PIP3) fosforile ederek AKT aktivasyonuna yol açar. PTEN, PIP3 üzerinde etkili olan, onun defosforilasyonuna neden olan ve dolayısıyla sinyal yolunun negatif düzenleyicisi

olarak kabul edilen bir lipit fosfatazdır. AKT aktivasyonu, iki fosforilasyon sürecinden oluşmaktadır. Bunlardan biri, memeli rapamisin hedefi kompleksi 2 (mTORC2) tarafından serin 473 amino asidinde gerçekleştirilir. İkincisi ise treonin 308 amino asidinde fosfoinositid-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından yapılmaktadır. Ökaryotlarda AKT kinazın yüksek homolojiye sahip üç izoformu vardır: AKT1, AKT2 ve AKT3. İlk iki izoform her yerde ifade edilir. AKT2 ağırlıklı olarak insüline duyarlı hücrelerde bulunurken, AKT3 çoğunlukla nöronlarda ve testislerde bulunuyor gibi görünüyor. AKT1 ve AKT2 gen mutasyonları insülin direncinde ve ayrıca diyabet patogeneğinde rol oynar. AKT aktivasyonu, tüberoz skleroz proteini 2 (TSC2) inhibisyonunu indükler ve bunun TSC1 ile etkileşimini bozar. TSC1 hücre büyümesi ve çoğalması, hayatta kalma ve otofajide rol oynar. Aktive edildikten sonra AKT, mTOR aktivasyonu ve TSC1 ve TSC2 inhibisyonu yoluyla protein sentezini ve hücre büyümesini indükler.

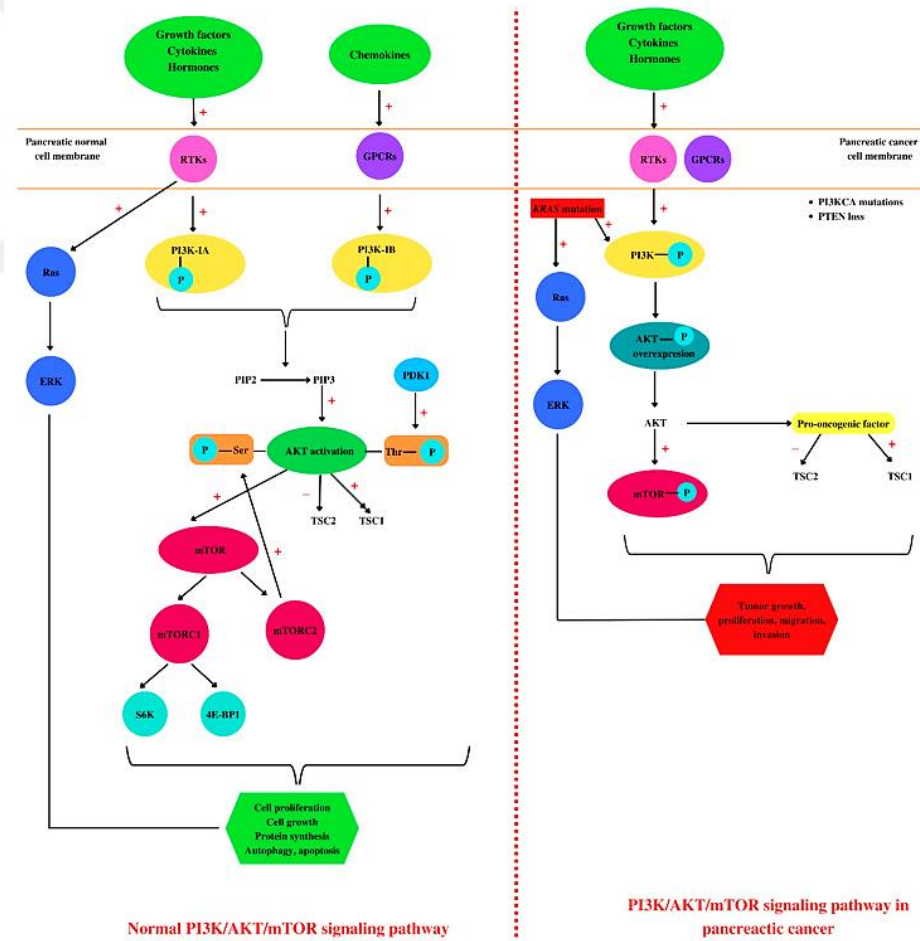
mTOR'un iki kompleksi vardır: mTORC1 kompleksi, mTOR, raptor, mLST8 ve PRAS40'tan oluşur; ikinci kompleks ise mTORC2, mTOR, riktör, mLST8 ve Sin1'den oluşur. mTOR, ribozomal protein S6 kinazları (S6K) ve 4E-bağlayıcı protein 1 (4E-BP1) fosforilasyonu yoluyla translasyonu düzenlemektedir. 4E-BP1'in aktivasyonu, ökariyotik translasyon başlatma faktörü 4E (eIF4E)'nin salınmasına neden olur. mTOR yolağı, hücre büyümesi ve proliferasyonu, protein sentezi ve otofaji gibi memelilerin temel metabolizmasını düzenleyen bir sinyal yoludur. mTOR, apoptoz düzenlenmesinde, hücre büyümesini ve immün hücre düzenlemesini, farklılaşmasını ve işlevlerini uyarmada önemli bir rol oynamaktadır. Büyüme faktörleri, besin enerjisi ve hatta stres, normal veya düzensiz süreçleri tetikleyen mTOR'u aktive veya inaktive edebilmektedir.

Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/Akt ve mTOR sinyal yollarının memeli hedefi, hem fizyolojik hem de patolojik açıdan hücre büyümesi ve hayatta kalma için oldukça önemlidir. PI3K/Akt ve mTOR yolları birçok proteinin etkileşimi ile birbirlerine oldukça bağlı yollardır. Yine PK'nin patogeneğinde PI3K/AKT/mTOR ve Notch, Wnt ve Hedgehog gibi birkaç anahtar sinyal yolu rol oynamaktadır. PI3K/AKT/mTOR yolunun aşırı ekspresyonu, PK dahil çok sayıda malignitede gözlemlenmiştir.

Bu nedenle PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu hücrenin hayatta kalması, büyümesi, çoğalması, metabolizması ve hareketliliğinde önemli roller oynar. Ayrıca bu protein kinazlar, fosforilasyon süreçleri yoluyla, transkripsiyon ve translasyon gibi çeşitli

hücresel işlevlerde rol oynarlar. AKT, hem normal hem de kanserli hücrelerde bazı hayatta kalma yanlısı ve anti-apoptotik proteinler Bcl-XL ve NF- κ B'yi düzenleyerek hücrenin hayatta kalması ve apoptozda rol oynar; dolayısıyla bu molekülü hedeflemek, pankreas duktal adenokarsinomunun tedavisi için umut verici bir terapötik yaklaşım olarak kabul edilmektedir.

Patolojik durumlarda sitokinler, kemokinler ve Fc reseptörleri PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu aktive eder. VEGF, IGF-1, FGF, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve TGF- α ve - β , RTK'lere bağlanır ve PI3K'leri aktive eder. VEGF ve PDGF, nöroendokrin tümörlerde anjiyogenezi indükleyerek nöroendokrin tümör gelişimine katkıda bulunur. PI3K, AKT ve mTOR, düzensizliğe maruz kalan ve kanserin ilerlemesini tetikleyen üç ana sinyalizasyondur. Ayrıca genomik anormallikler çeşitli PK türlerinde de PI3K'yi aktive etmektedir [43], [44].



Şekil 15. PI3K/Akt/mTOR normal ve PK sinyal yolağı [43].

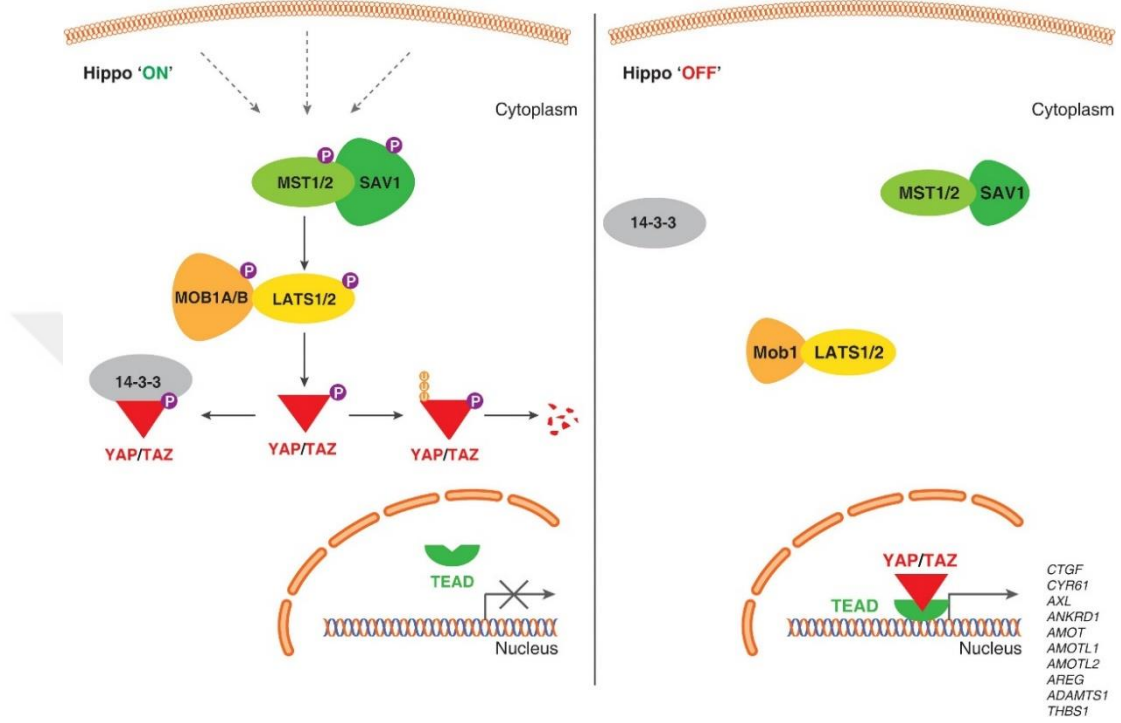
2.16. Hippo sinyal yolu

Hippo sinyal yolu, kontrol organı boyutu ve gelişiminde rol oynadığı bilinen sinyal yolları ailesine en son eklenen, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yoludur. Hippo yolu, orijinal olarak meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) tanımlanmış, evrimsel olarak korunmuş bir serin/treonin kinaz sinyalleme kaskadıdır. Hippo sinyalizasyonu, hücre çoğalmasını, organ büyümesini ve rejenerasyonunu düzenlemede temel bir rol oynayan sinyal yoludur. Çekirdeği, serin/treonin kinazları Mammalian Sterile 20-like kinase 1'i (MST1 ve MST2, HPO; *Drosophila*) ve large tumor suppressor 1 ve 2'yi (LATS1 ve LATS2) içerir. MST1 ve 2, Salvador homolog 1 (SAV1) ile birlikte çalışarak LATS1 ve 2 kinazlarını fosforile ederek ve aktive eder. Daha sonra, LATS1 ve -2 kinazlar, adaptör MOB kinaz aktivatörü 1 (MOB1) ile birleşir ve Hippo transdükleri YES ile ilişkili protein (YAP) ve PDZ bağlayıcı motifi olan transkripsiyonel koaktivatör (TAZ)'ın fosforilasyonuna neden olur. Fosforilasyon sayesinde, YAP ve TAZ, çekirdeğe birikmesi ve TEA transkripsiyon faktörü (TEAD)-1, TEAD2,3,4 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşim olasılığı engellenir.

Düzenleyici modül devre dışı bırakıldığında veya Hippo kinazlarından bağımsız olarak YAP/TAZ'ı aktive eden uyarıcılardan var olduğunda, Hippo transdükleri YAP/TAZ çekirdekte birikir ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer; böylece bağ doku büyüme faktörü (CTGF), sistin zengin anjiyojen indükleyici 61 (CYR61), ankirin tekrar etki alanı 1 (ANKRD1), apoptozu engelleyen Survivin (BIRC5) ve AXL reseptör tirozin kinazı (AXL) gibi hedef genlerin transkripsiyonunu eşlik eder. Hippo yolu, diğer sinyal yollarıyla (transforman büyüme faktör-beta, Wnt, Sonic hedgehog ve Notch gibi) geniş kapsamlı bir etkileşim ağı içermektedir.

Yapılan çalışmalarda, PK hastalarından alınan tümör örneklerinde YAP'ın aşırı eksprese edildiğini gösterilmiştir. KRAS'taki aktive edici mutasyonlar PK'de en sık görülenler arasındadır. YAP, modellerde pankreas karsinogenezini yönlendirmede mutant KRAS'ın ortağı olarak tanımlanmıştır. YAP'ın, neoplastik proliferasyonu, stromal yanıtı ve invaziv karsinomaya ilerlemeyi teşvik eden genlerin ekspresyonunu arttırtarak KRAS'ta transkripsiyonel anahtar görevi gördüğü bildirilmektedir. Aynı zamanda YAP'ı içeren bypass mekanizmalarıyla tümör hücrelerinin KRAS sinyali olmadan da hayatta kalabildiği gösterilmiştir. Bir çalışma, YAP aşırı ekspresyonunun, GEM direncine neden olabilen AKT kaskadını aktive ederek pankreas kanseri

hücrelerinde EMT'yi indüklediğini söylemektedir. Başka bir çalışmada PK örneklerinde microRNA 181c'nin aşırı eksprese edildiği ve kötü prognozla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. miRNA 181c , MST1, LATS2, MOB1 ve SAV1'i doğrudan baskılayarak YAP ve TAZ aktivasyonuna ve *in vitro* ve *in vivo* GEM direncine yol açtığı gösterilmiştir [45].



Şekil 16. Hippo sinyali 4 çekirdek kinazdan oluşur: MST1/ 2 ve LATS1/ 2, SAV1 ve MOB1 adaptör proteinlerdir. Hippo sinyali açık olduğunda MST1/ 2-SAV1 ve LATS1 /2-MOB1 fosforile durumda aktif ve YAP/TAZ proteinlerini fosforilleyip ubiquitinleyerek YAP/TAZ kompleksinin sitoplazmada degrade olmasını sağlayarak, nukleusa geçmesini engeller. Hippo sinyali kapalı olduğunda ise YAP/TAZ proteinleri ubiquitinlenemez ve transkripsiyon aktivatörü olarak nukleusa geçer. TEA domain (TEAD) bölgesine bağlanarak tümör gelişimi, hücre çoğalması, hücre sağkalımı ve kemorezistans ile ilgili genleri (CTGF, BIRC5, BCL2) transkribe eder [45].

2.17. WNT / β -catenin sinyal yolu

Wnt1 geni ilk 1980'lerin başında *Drosophila melanogaster*'daki gelişim kalıpları için mutajenez taramasıyla tanımlandı. Daha sonraki genetik taramalar Wnt ailesinin diğer üyelerini tanımladı. Wnt sinyal yolu, embriyonik gelişim, hücre polaritesi, proliferasyonu, göçü, hayatta kalması ve somatik kök hücrelerin bakımı gibi çeşitli fonksiyonları düzenler ve hücre döngüsü ilerlemesini, apoptozu, EMT'yi, anjiyogenezi, tümör mikro ortamını düzenleyerek pankreas karsinogenezinde rol

oynamaktadır. Bu nedenle Wnt yolunun düzensizliği birçok insan hastalığında ve pankreas kanseri ilaç direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Wnt yolunun bileşenleri arasında salgılanan glikoproteinler, kıvrımlı transmembran reseptör ailesi, lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein (LRP) yardımcı reseptör ailesi ve diğer bileşenleri bulunmaktadır. Kanonik (β -katenin bağımlı) ve kanonik olmayan (β -katenin bağımsız) yollar iki ana Wnt sinyal yolunu oluşturmaktadır [46].

Kanonik Yol : Kanonik yol ile sinyalleme, β -katenin bozunmasını engellemekte ve bu da çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir [46]. Kanonik Wnt sinyallemesi, frizzled (FZD) reseptör ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü 5/6'nın (LRP5/6) WNT ligandıyla oligomerizasyonunu içermekte ve klasik olarak β -katenin stabilizasyonu ve nükleer translokasyonu ile sonuçlanan sinyalleme başlatmaktadır [47]. Wnt ligandı, lipid modifikasyonu gerektiren, salgılanan bir glikoproteindir. Endoplazmik retikulumda yer alan, membrana bağlı bir O-asiltransferaz olan kirpi tarafından açılır. Wnt, frizzled-related family (sFRP)'ye bağlanarak LRP5/6 ile daha büyük bir hücre yüzeyi kompleksinin oluşmasına yol açmaktadır. E3 ubiquitin-protein ligazları ZNRF3 ve RNF43, kıvrılmış Wnt reseptör kompleksi bileşenlerini ve LRP6'yı parçalayarak Wnt yolunun negatif düzenleyicileri olarak görev yapabilmektedir. ZNRF3 ve RNF43'ün aktivitesi R-spondin tarafından inhibe edilebilir. Wnt antagonisti Dickkopf-1 (DKK1), Wnt ligandının LRP5/6 reseptörleriyle kompleks oluşturmasını da önleyebilir. Wnt ligandının yokluğunda, yapısal olarak eksprese edilen β -katenin, CK1 ve APC/Axin/GSK-3 β kompleksi tarafından fosforile edilmekte, bu da β -katenin'in her yerde bulunmasına ve proteozomal bozulmasına yol açmaktadır. Otokrin veya parakrin sinyalleme yoluyla etki eden Wnt ligandları, darmadağınık (Dsh)'yi aktive eden bir fosforilasyon kademesini başlatmak için LRP5/6 yardımcı reseptörleriyle birlikte çalışan frizzled reseptörlere bağlanır. Bu, β -katenin bozunma kompleksi APC/Axin/GSK-3 β 'nin ayrılmasına izin verir ve β -katenin'nin nükleer membran boyunca translokasyonuna izin verir. Ardından β -katenin, TCF/LEF transkripsiyon faktör ailesine bağlanır ve hedef genlerin ve transkripsiyon koaktivatörlerinin, örneğin cAMP response element-binding protein (CBP, CREB bağlayıcı proteini) bağlama proteini, E1A ile ilişkili protein p300, Pygopus (PYGO), BCL-9 ve Brahma ile ilişkili gen 1 (BRG1) transkripsiyon aktivasyonunu sağlar. TCF/LEF bağlanmasının yanı sıra β -katenin, FOXO transkripsiyon faktör ailesiyle ilişki kurarak da transkripsiyon aktivasyonu

gerçekleştirmektedir [46], [47]. β -katenin'den bağımsız olarak, WNT-FZD-LRP5/6 kompleksleri, çoklu kesecikli cisimlerde glikojen sentaz kinaz 3-beta'yı (GSK3 β) sekestre eder ve hedef substratların fosforilasyonunu önler.

Sonuç olarak, kanonik WNT sinyali, proteinlerin WNT stabilizasyonu (WNT-STOP) işlemi yoluyla çok sayıda hedef substratın GSK3 β fosforilasyonu ile başlatılan ubiquitin aracılı bozunmasını inhibe eder. GSK3 β sekestrasyonu ayrıca WNT (WNT-MTOR) tarafından indüklenen rapamisin sinyalleşmesinin memeli hedefi gibi fosforilasyonu ile modüle edilen diğer sinyal yollarına da etki etmektedir [47].

Kanonik Olmayan Yol : Kanonik olmayan Wnt sinyali iki yolu içermektedir; düzlemsel hücre polaritesi (PCP) ve Wnt/Ca²⁺ yolu. PCP yolunda Wnt, frizzled transmembran reseptörlerine bağlanır ve hücre zarında Dsh'yi aktive eder. Dsh, küçük GTPazlar RAC1'i ve Ras homolog gen ailesi üyesi A'yı (RHOA) aktive eder, bu da RhoA-Rho ile ilişkili kinaz eksenini (ROCK) ve c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive etmektedir. Bu yolun hücre polaritesi ve hücre iskeleti organizasyonu üzerinde etki gösterdiği bilinmektedir. Kalsiyum birçok önemli hücresel süreçte çok önemli bir faktördür. Wnt/Ca²⁺ yolunda, frizzled reseptörler, heterotrimerik G proteinlerinin aktivasyonuna aracılık ederek endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımına neden olur. Yüksek Ca²⁺ seviyeleri, protein kinaz C (PKC), kalsinörin ve kalmodulin bağımlı kinaz II (CamKII) dahil olmak üzere kalsiyum bağlayıcı proteinleri aktive eder. Bu bileşenler, transkripsiyon faktörü NFAT'nin fosforilasyonunu tetikleyerek nükleer translokasyona ve ardından cell fate ve migrasyonu kontrol eden çeşitli genlerin düzenlenmesine neden olmaktadır [46].

2.18. Pankreas Kanseri Wnt/ β -Katenin Sinyalleşmesi

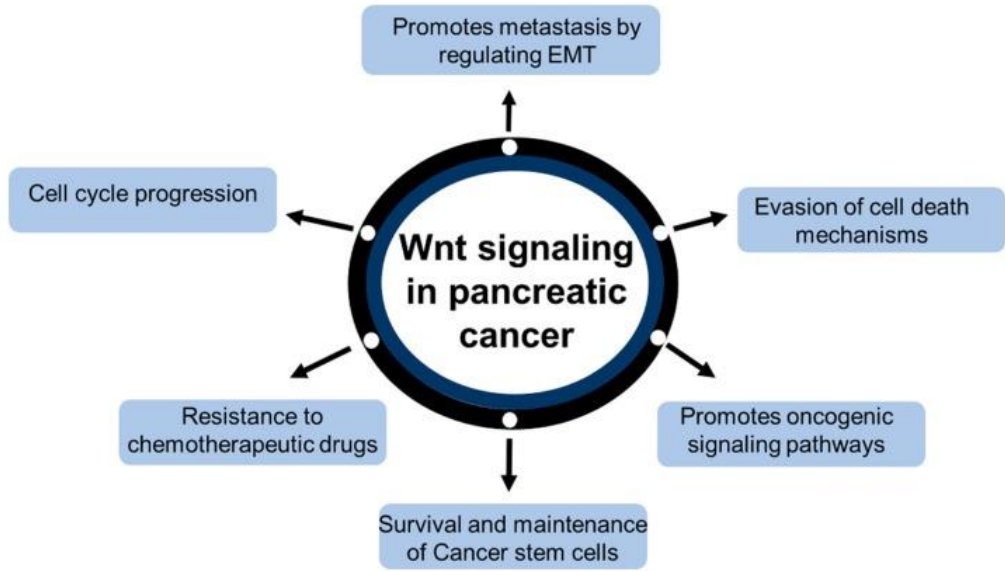
Wnt sinyal yolu pankreas karsinogenezinde oldukça rol oynar. Çok sayıda ligand, reseptör ve ikincil haberci, siklin D1, siklin E, MMP-7, c-myc, VEGF ve diğerleri gibi genlerin transkripsiyonunu yapan β -katenin'in nükleer translokasyonunda birleşir. Bu genler, hücre döngüsünün ilerlemesi, epitelial-mezenkimal geçiş (EMT) ve anjiyogenez gibi kanserin çeşitli işaretlerinde rol oynar. Ayrıca, Wnt sinyal yolunun apoptoz direncini ve kanser kök hücrelerinin korunmasını teşvik ederek pankreas kanserinin patogeneze neden olduğu gösterilmiştir.

Wnt2, Wnt5a ve Wnt7a'lar gibi kanonik Wnt ligandlarının ekspresyonunun arttığı, pankreas kanseri dokularında Wnt yolunun kalıcı aktivasyonu ile birlikte kanserin ilerlemesine yol açtığı gözlemlenmiştir.

Yukarıda bahsedilen kanonik ligandlara ek olarak Wnt yolu ayrıca kanonik olmayan ligandlar tarafından da aktive edilir. Wnt yolunun GATA6, R-spondin, R-spondin2, CDK8, K-ras, Rab5a/11a ve MUC1/MCU4 gibi kanonik olmayan ligandlar tarafından aktivasyonu, PK'nin ilerlemesine neden olabilmektedir. Ayrıca K-ras sinyali, β -katenin'in, histonları asetile ederek gen ekspresyonunu arttırdığı bilinen bir histon asetiltransferaz olan CBP ile etkileşimini arttırmaktadır. CBP ayrıca çeşitli transkripsiyon faktörlerini asetilleyerek onların aktivitelerini modüle eder. Ayrıca hipoksik koşullar, anti-kanser ajanlarının sitotoksik potansiyelini azaltır. Pankreas tümörlerindeki hipoksik koşullar, β -katenin ile kompleks oluşturan HIF-2a'yı stabilize eder, β -katenin aktivitesini artırırken tümörün ilerlemesini de desteklemektedir. Ayrıca, HIF-2 α pankreas tümörü hücrelerinde β -katenin ve Smad4 seviyelerini transkripsiyonla sürdürmektedir. β -katenin'in proteazomal bozulması, fosforilasyonu ve übikitinasyonu ile düzenlenmektedir. Pankreas kanserinde seviyeleri yukarı regülasyon gösteren çinko parmak proteini 281 (ZNF 281), β -katenin'in übikitinasyonunu azaltır ve Wnt yolunu aktive eder. Benzer şekilde, leucine-rich flightless-1 interacting protein 1 (LRRFIP-1), β -katenin fosforilasyonunu azaltarak PK ilerlemesini destekler.

Wnt yolağı aynı zamanda reseptör seviyesindeki proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları ile de düzenlenmektedir. Wnt sinyalleşmesinin, Apoptoz İnhibitörü (IAP) gen ailesinin bir üyesi olan survivin ekspresyonunu artırarak pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği de gösterilmiştir.

MikroRNA'lar birçok kanserin ayırt edici özelliklerinde yer alan çok sayıda genin ifadesini düzenleyen, kodlamayan küçük RNA'lardır. Düzensiz miRNA ekspresyonu, başta PK olmak üzere farklı türden malignitelerin gelişiminde rol oynamaktadır. Azalan microRNA-195 ve miR148a seviyeleri, pankreas kanserinde Wnt sinyalinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. MikroRNA'lar, Wnt/ β -katenin yolunu inhibe ederek pankreas tümör büyümesindeki azalmayla ilişkilendirilmiştir [46], [47].



Şekil 17. Pankreas kanserinde Wnt / β -katenin sinyalinin onkogenik rolü [46].

2.19. MikroRNA'lar ve Kemorezistans

2.19.1. mikroRNA'lar (miRNA)

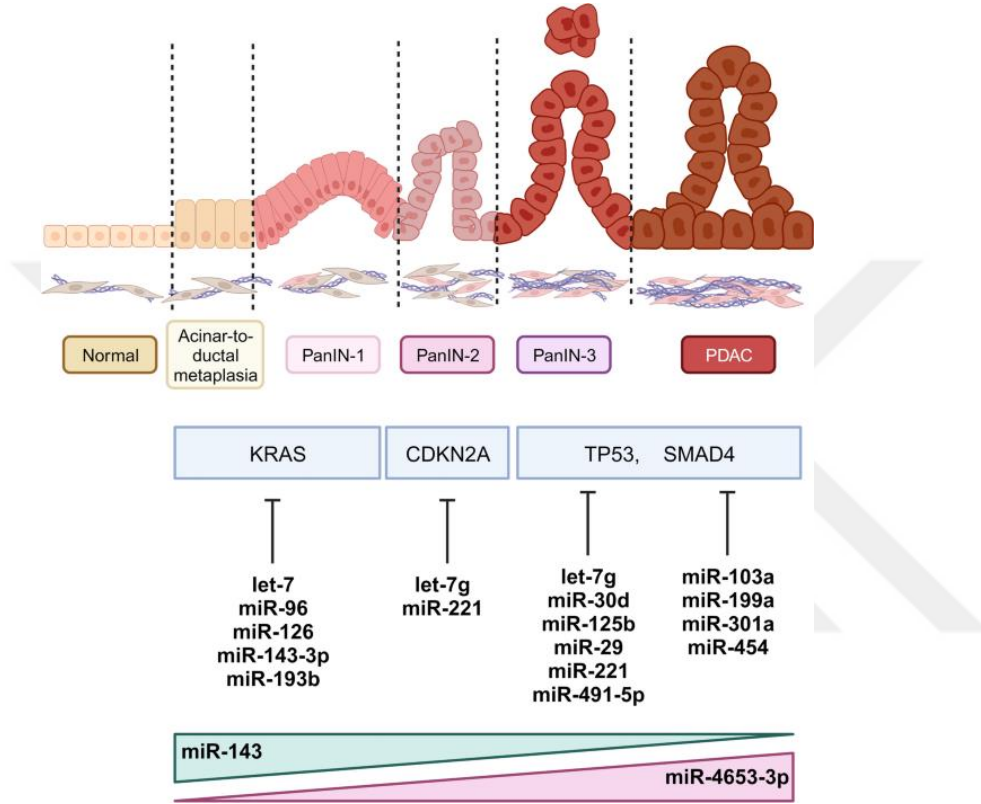
miRNA'lar, mRNA bozulması veya translasyon inhibisyonu ile gen ekspresyonunu düzenleyen, kodlamayan RNA'ların bir alt grubunu oluşturur. miRNA'lar, 3'UTR bölgelerine kusurlu bir şekilde bağlanarak hedef mRNA stabilitesini ve translasyonunu düzenleyen 18-24 nükleotitten oluşan küçük kodlamayan RNA'lardır. MiRNA'ların kanserin ilerlemesi ve invazyonundaki rolünün yanı sıra, bunların farklı ekspresyonları hastanın sağ kalımı ve kemoterapötik ilaçlara karşı direnç veya duyarlılık tepkisinin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir [48]. Yaklaşık olarak miRNA'ların %50'si proteine kodlamayan bölgelerde kodlanmakta ve bağımsız olarak transkribe edilmektedir. Geriye kalan miRNA'lar ise protein kodlayan transkriptlerin intronlarında kodlanmıştır. miRNA biyogenezi, RNA polimeraz II/III transkriptlerinin transkripsiyon sonrası veya birlikte işlenmesiyle başlar. Şu anda tanımlanan tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan gen ekzonundan işlenirken geri kalanı intergeniktir, bir konakçı genden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir[48], [49].

2.19.2. Pankreas Kanseri Sinyal mekanizmalarının ve Gemsitabin Metabolizmasının miRNA'larla İlişkisi

MiRNA ekspresyonunun düzenlenmesinin, çeşitli ökaryotik organizmalarda gelişim, hücre büyümesi ve farklılaşma süreçlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Genellikle miRNA'lar kanserlerde düzensizdir. Bazı miRNA'lar, kanser ilerlemesinin erken evresinde geçici olarak aşırı eksprese edilir ve proliferasyonu teşvik ederek ve/veya apoptozu baskılayarak onkogenler gibi davranmaktadırlar. Tersine, tümör supresör işlevleri olan bazı miRNA'lar kanserlerde aşağı regüle edilir. miRNA ekspresyon profilleri farklı tümörlerde ve farklı kökenlerden benzersiz olabilir. Hem normal hem de malign kanser dokuları spesifik miRNA ekspresyona sahip olabilmekte ve tümör tipleri arasında farklı ekspresyon gösterebilmektedir[48].

PI3K-AKT sinyal yolu, PK'de hücre çoğalması ve apoptozun inhibisyonu ile ilişkilidir. Spesifik olarak, PTEN tarafından baskılanan PI3K-AKT-mTOR sinyali miR-21, miR-221 ve miR-181a tarafından hedeflenebilir. miR-21, hücre döngüsü durmasını, apoptozu ve gemsitabin duyarlılığını inhibe eder dolayısıyla miR-221'in inhibisyonu, PK hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonuna ve göçüne yol açabilir. Benzer şekilde miR-29a ekspresyon seviyeleri, hem PK hücrelerinin gemsitabine direnciyle hem de Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkilidir. Üstelik bu yol, WNT reseptörünün hücre zarı ligandlarına bağlandığında aktive edilebilir, bu da β -katenin'in sitoplazmaya salınmasına yol açmaktadır. PK vakalarının çoğunda, özellikle de PanIN lezyonu gelişiminin sonraki aşamalarında yüksek β -katenin ekspresyonu gözlemlenmektedir. *Amponsah ve ark.* yakın zamanda miRNA'ların, taşıyıcılar ve gemsitabin ile ilgili enzimler dahil olmak üzere gemsitabin metabolizması üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturmuştur. Bu çalışma, ABCC5 genini hedefleyerek miR-210'un gemsitabin duyarlılığından sorumlu olduğunu göstermiştir. *Gu ve ark.* miR-3178'in, ABC taşıyıcı aracılı RhoB/PI3K/Akt yolunu yukarı doğru düzenleyerek gemsitabine karşı kemorezistansı desteklediğini belirtmiştir. Ek olarak miR-93, PTEN'i hedefleyerek ABCB1 ekspresyonu ve Akt fosforilasyonunu arttırmaktadır. Ayrıca miR-331, pankreas kanseri hücrelerinde ST7L yoluyla Wnt/ β -katenin yolunu aktive ederek ABCB1 ekspresyonunu indüklemektedir. Son yapılan çalışmalarda, miR-101-3p ve miR-211'in sırasıyla RRM1 ve RRM2'yi inhibe ederek gemsitabin duyarlılığını arttırdığını göstermiştir. *Butia ve ark.* let-7'nin RRM2'yi negatif olarak düzenlediğini ve gemsitabine duyarlı hale getirdiğini ortaya çıkarmıştır.

Ayrıca *Rajabpour ve ark.* miR-608'in gempitabin duyarlılığının artmasına, RRM1 ve CDA ekspresyonunun azalmasına yol açtığını göstermiştir. *Lu ve ark.* miR-20a-5p'nin, RRM2'yi hedef alarak gempitabin duyarlılığını artırdığını öne sürmüştür. *Patel ve ark.* ayrıca yakın zamanda miR-155'in baskılanmasının dCK seviyelerini indüklediğini ve gempitabin duyarlılığını düzelttiğini göstermiştir. Bu, çalışmalar miRNA'ların GEM metabolizmasına dirençle bağlantılı olduğunu göstermektedir [50].



Şekil 18. PDAK'ın ilerlemesi genellikle birkaç miRNA tarafından doğrudan modüle edilebilen KRAS , CDKN2A , TP53 ve SMAD4 ifadelerinin mutasyonları ile ilişkisi gösterilmiştir. PDAK gelişiminin farklı aşamalarında belirli miRNA'ların ekspresyonunun arttığı/azaldığı da bulunmuştur [50].

miRNA'ların yukarı ve/veya aşağı regülasyonu, birden fazla hedef mRNA'nın ve dolayısıyla birden fazla proteinin ekspresyonunu etkileyebilir ve çeşitli hücresel süreçler yoluyla kanser hücrelerinin kemosenitivitesinde değişikliklere yol açabilir[49]. Pankreas kanserinde proliferasyon, apoptoz, migrasyon, invazyon ve gempitabine direnç üzerine yapılan çalışmalarda rol alan sirküler miRNA'lar önemli bir çalışma konusu olmuştur [51]. PK tümör dokularından alınan örnekler ve PK hücrelerinden 95 adet miRNA profillemesinin yapıldığı çalışmada normal hücrelere göre miR-196a, miR-190, miR-221, miR-222, miR-200b, miR-15b and miR-95

ifadelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir [52]. miR-34a gemsitabine dirençli pankreas kanser durumlarında serumda yüksek seviye görülmüştür [53]. miR-21 ifadesinin hücrede invazyonda görev alan vaskular endotel büyüme faktörü (VEGF), matriks metalloproteinaz 9 ifadelerine etki ederek hücre çoğalmasını ve metastazı tetiklediği, bunun yanında gemsitabine duyarlılığı azalttığı gösterilmiştir [54]. miR-21 ifadesi baskılanması ile Bcl-2 anti-apoptotik protein ifadesinde azalmaya bağlı olarak, gemsitabinin PK hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [55]. Diğer bir çalışmada miR-365'in adaptör protein SHC1 ve pro-apoptotik düzenleyici BAX'ı hedefleyerek PK hücrelerinde gemsitabin direncini indüklediği gösterilmiştir [56]. miR-181 ifadesinin pankreas kanseri hücrelerinde yüksek ifade edildiği ve hippo sinyalini inhibe ederek gemsitabine karşı direnç oluşturduğu gözlenmiştir. Mimik miR-181 transfeksiyonu pankreas kanseri hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonunu sağlayarak hücreleri duyarlı hale getirmiştir [57]. miR-125a'nın PK hasta doku ve hücrelerinde A20 genini baskılayarak gemsitabine karşı kemorezistansı artırdığı gösterilmiştir [58]. Özetle, kapsamlı *in silico*, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, miRNA'ların hücre proliferasyonunu, büyümesini, metabolizmasını ve ölümünü düzenlemede yoğun bir şekilde rol oynadığını göstermektedir [46].

Sun Y ve ark. yaptığı bir çalışmada, MTT ve bir klonojenik tahlil, miRNA-148a'nın restorasyonunun PK hücrelerinin çoğalmasını ve koloni oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir. Western blot analizi, miR-148a transdüksiyonunun, PK hücrelerinde C-myc, siklin D1 ve p-katenin ekspresyon seviyelerini belirgin şekilde azalttığını ortaya çıkardı. MiR-148a'nın metilasyonu, yalnızca endojen β -katenin seviyelerini azaltmakla kalmadığı, aynı zamanda hücre döngüsü ilerlemesini geciktirmek için β -katenin'in nükleer translokasyonunu da inhibe ettiği de görülmüştür. Ayrıca PK hücrelerinde miR-148a'nın ektopik aşırı ekspresyonu, bir hayvan deneyinde tümör oluşumunu inhibe ettiği de gösterilmiştir [59].

Kanser örneklerinde anormal şekilde eksprese edilen miRNA'lar arasında miR-424, miR-100, miR-301, miR-212 ve miR-125b-1 aşırı eksprese edilirken **miR-345**, miR-142-P ve miR-139 normal pankreas numunelerine göre daha az eksprese edildi.

Ek olarak miR-141, miR-148a, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-216, miR-217 ve miR-375 yüksek ekspresyon seviyeleri sergilerken miR-133a, miR-143, miR-145

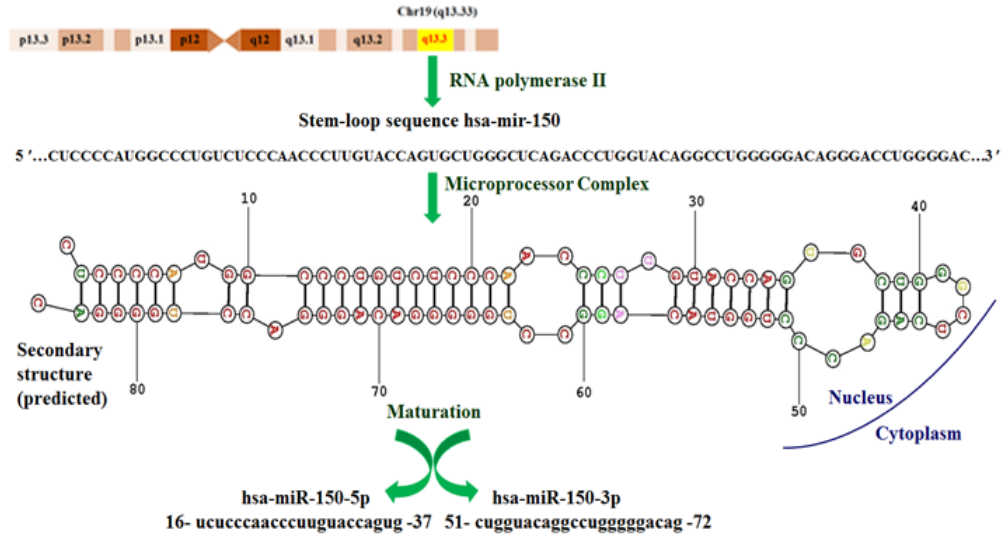
ve **miR-150**, diğ er 33 insan dokusuyla karşılaştırıldığında normal pankreas dokusunda düşük ekspresyon seviyeleri sergilediğ i bildirilmiştir[60] .

2.19.3. miR-150 ve Kans er

Kodlama yapmayan RNA sınıfından olan miR-150, Homo sapiens'te 19q13.33'te bulunan bir gen tarafından kodlanan ve iki olgun forma (miR-150-5p ve miR-150-3p) iş lenen kısa ve tek sarmallı bir miRNA'dır. miR-150, proliferasyon ve apoptozda rol oynayan hücre reseptörlerini hedefleyerek hücre büyümesini düzenleyebilmektedir. miR-150 başlangıçta hematopoetik hücreye özgü bir miRNA olarak tanımlanmıştır [61].

miR-150, tümör hücresi ilerlemesi ve metastazı sırasında çok önemli bir role sahip olan miRNA'lardan biridir. Yapılan çalışmalara göre miR-150, kötü huylu hücrelerde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak davranabilmektedir. Kans er hücresi invazyonu, migrasyonu ve anjiyogenezi ile yakından ilişkili olan metastatik hücrelerde anormal miR-150 seviyeleri tespit edilebileceğ i görülmüştür. miR-150'nin, tümör hücresi migrasyonu ve metastazında önemli olan EMT sürecini düzenlemedeki rolü vurgulanmıştır [62]. Kans er hücresi tipine ve gen ekspresyon profiline bağı lı olarak miR-150 seviyeleri ve temel hücresel süreçteki potansiyel hedef genler farklı olabilir. Yapılan çalışmalar miR-150'nin lenfoma ve lösemi gibi hematopoietik maligniteler ve katı tümörler dahil olmak üzere insan tümörlerinde de rol oynadığ ı göstermiştir [61]. Yine, oncomiR olarak miR-150 akciğ er kanserinde aşırı eksprese edildiğ i ve tanımlanan hedeflerinin p53 ve BAK1 olduğ u , meme ve mide kanserinde ise hücre çoğ almasını desteklediğ i gözlemlenmiştir. Bunların aksine, miR-150'nin malign pankreas dokularında aş ağı regüle edildiğ i görülmüştür[61] .

PK hücrelerinde miR-150 seviyesinin değ erlendirilmesi, ekspresyonunun azaldığ ını ve apoptozun indüksiyonu ile negatif bir korelasyona sahip olduğ unu göstermiştir [63]. Dolayısıyla MiR-150, kans er metastazında önemli bir rol oynadığ ı ve metastatik kanserin önlenmesi ve tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olduğ u gösterilmiştir [61], [62].



Şekil 19. miR-150'nin yer aldığı kromozom ile hsa-miR-150-5p ve hsa-miR-150-3p* iplikleri ve diziler gösterilmektedir [64].

2.19.4. Pankreas Kanserinde miR-345, miR-92 ve miR-27'nin Rolü

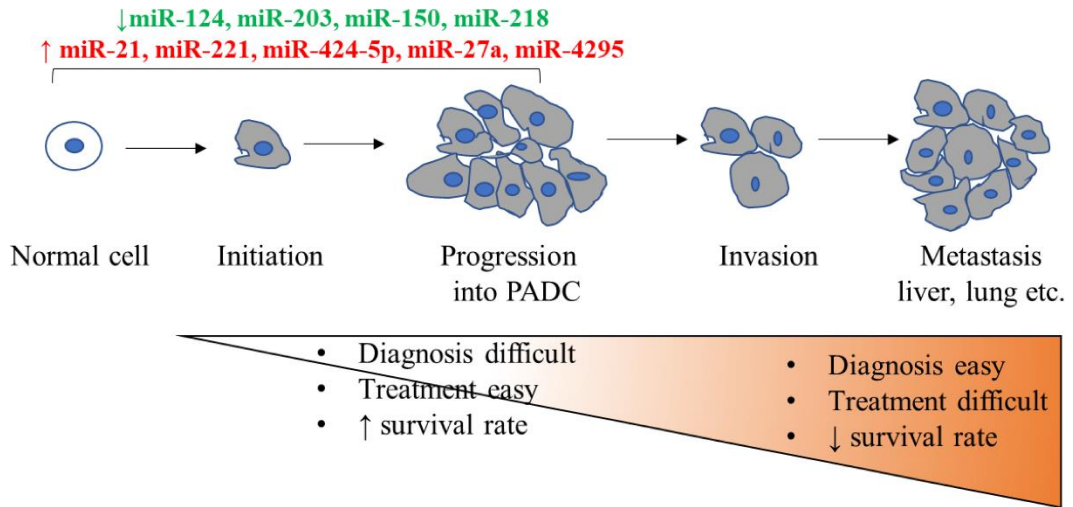
miR-345, insan kromozomu 14q32.2'de bulunan ve çeşitli insan patolojilerinde dinamik rollere sahip olduğu bildirilen küçük, kodlamayan bir RNA'dır. PDAK mide kanseri (GC), kolorektal karsinom (CRC), prostat kanseri (PCa) ve meme kanseri gibi birçok insan malignitesinin kanında ve dokularında miR-345'in farklı ekspresyonu rapor edilmiştir. MiR-345'in bu farklı ekspresyonları, kanser gelişimi ve metastazının özellikleri olan aşırı hücre proliferasyonu, invazyon ve migrasyon ile ilişkilendirilmiştir. miR-345, EMT'nin metastaz sinyal yollarına aracılık etmeye yardımcı olan en önemli miRNA'lardan biridir. Yapılan çalışmalar miR-345'in PI3K/AKT, mTOR ve YAP/TAZ sinyalleme sisteminin yukarı ve aşağı regülasyonu ile düzenleyebildiğini göstermiştir [60].

MiR-27a ekspresyonu PK'de anormal şekilde yukarı regülasyon göstermektedir. miR-27a'nın inhibisyonu, pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini, koloni oluşumunu ve migrasyonunu baskılamaktadır. Yapılan bir çalışma, KRAS'ı düzenleyen Sprouty2'yi kodlayan mRNA'nın miR-27a'nın hedefi olduğunu ortaya çıkarmıştır[65]. Mevcut literatür, miR-27a'nın mide kanseri hücrelerinde B hücresi translokasyon geni 2'yi (BTG2) doğrudan hedef aldığını göstermiştir. BTG2, pankreas da dahil olmak üzere normal dokuların çoğunda yüksek düzeyi tespit edilen, DNA hasarı onarımında, çoğalmayı önlemede, hücre apoptozunda ve farklılaşmasında rol oynadığı gösterilen bir ani erken yanıt proteinidir.

BTG2, pankreas duktal adenokarsinomunda bir tümör inhibitörü olarak kabul edilir ve miR-21, miR-23a ve miR-27a'nın kontrolü altında PC'nin ilerlemesi ve büyümesinde rol oynadığı gösterilmiştir [66].

Yapılan çalışmada miR-92a'nın JNK sinyalini teşvik etmek ve PK hücresi çoğalmasını teşvik etmek için DUSP10'u hedeflediğini bulunmuştur. miR-92a/DUSP10/JNK sinyal yolu, pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını düzenlediğini ve bunun miR-92a/DUSP10/JNK sinyallemesinin aktivasyonunun modülasyonunun, PK terapötik stratejisinin hedeflerinden biri olabileceğini göstermektedir [67].

Yine yapılan bir çalışmada miR-17 ~ 92 kümesinin bir üyesi olan miR-92a-3p'nin, pankreas kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarında apoptotik sürecin önemli bir düzenleyicisi olduğunu ortaya çıkarmıştır [68].



Şekil 20. Pankreas duktal adenokarsinomunun başlangıç ve ilerleme aşamalarında yukarı regüle (kırmızı renkte) ve aşağı regüle edilen (yeşil renkte) miRNA'lar listelenmiştir.

2.20. 3B *in vitro* Modeller

Hücre kültürü, hücre biyolojisi, doku morfolojisi ve hastalıkların mekanizmaları, ilaç etkisi, protein üretimi ve doku mühendisliğinin gelişimi hakkındaki anlayışımızı geliştirmek için yaygın olarak kullanılan bir *in vitro* araçtır. Kanser biyolojisine ilişkin araştırmaların çoğu, iki boyutlu (2B) hücre kültürlerinin *in vitro* kullanıldığı deneylere dayanmaktadır [69]. Uzun süredir 2B *in vitro* hücre kültürleri, biyofiziksel ve biyokimyasal uyaranlara karşı verilen hücresel tepkileri incelemek için kullanılmaktadır.

Her ne kadar bu yaklaşımlar hücre kültürü kavramını geliştirmiş olsa da, 2B sistemlerin, kanser hücrelerinin bazı özelliklerini uygun şekilde modelleyemediği ve *in vivo* tepkiyi saptıran hücre biyoaktiviteleriyle sonuçlanabileceğini göstermektedir.

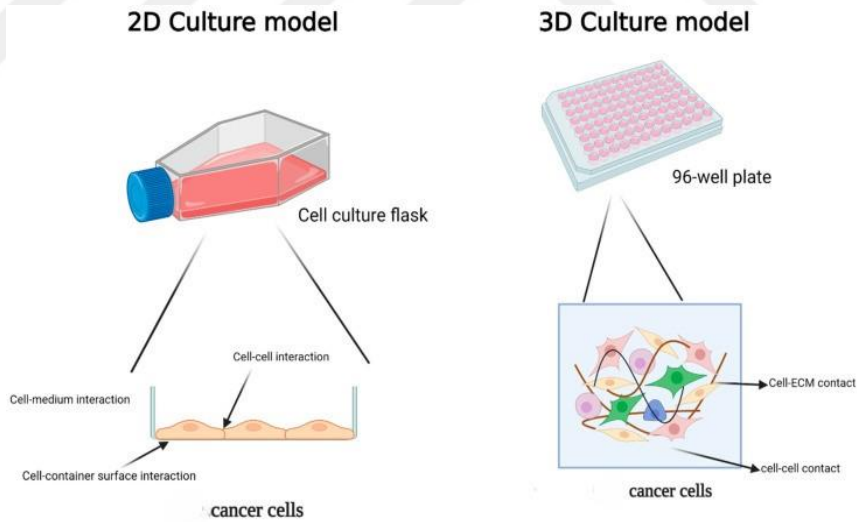
2D hücre kültürleri dokuların veya tümörlerin doğal yapılarını taklit etmemektedir. Bu kültür yönteminde hücre-hücre ve hücre-hücre dışı etkileşimler, tümör kitlesindeki gibi taklit edememektedir. Bu etkileşimler hücre farklılaşması, çoğalması, canlılığı, genlerin ve proteinlerin ifadesi, uyarılara yanıt, ilaç metabolizması ve diğer hücresel işlevlerden sorumludur. Dokudan izole edildikten ve 2B koşullara aktarıldıktan sonra hücrelerin morfolojisi ve hücre bölünmesi modu değişir. Çeşitli fenotip kaybı aynı zamanda 2B kültürlemenin bir sonucudur. Hücrelerin değişen morfolojisi, işlevlerini, salgılamayı ve hücre sinyal iletimini etkileyebilir. Dış çevre ile etkileşimleri değişen yapışık bir şekilde büyüyen hücreler polaritelerini kaybeder, dolayısıyla hücrelerin apoptoz gibi çeşitli olaylara tepkisi de değişmiş olmaktadır. 2B kültürün diğer bir dezavantajı, tek katmandaki hücrelerin oksijen, besinler, metabolitler ve sinyal molekülleri gibi ortamın bileşenlerine sınırsız erişime sahip olmasıdır. *In vivo* kanser hücreleri için besinlerin, oksijenin vb. mevcudiyeti, tümör kitlesinin doğal yapısından dolayı daha değişken olmaktadır [69]. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, *in vivo* koşulları daha iyi taklit edebilecek yeni 3B hücre kültürü oluşturulmakta ve sferoid veya organoid kültür olarak da adlandırılmaktadır [70]. 2B'de kültürlenmiş kanser hücreleri, 3B'de kültürlenmiş hücrelerle aynı morfolojiye, heterojen fenotipe, hücre dışı matrise (ECM) veya gen ve protein ekspresyon profiline sahip değildir. Bununla birlikte, 2B *in vitro* modelleri tümörün fiziksel geometrisini taklit edememekte, çok hücreli modellerdeki besiyeri çapraz kontaminasyonundan kaçamamaktadır [71]. Ek olarak, tek katmanın fiziksel organizasyonu, hücre-hücre etkileşimlerini büyük ölçüde sınırlandırır ve bir taşıma gradyanının oluşumunu engeller. 2B boyutlu kültürlerde hücrelerin besinlere eşit ve sınırsız erişimi vardır ve kemoterapi gibi moleküler ipuçlarına tepkileri *in vivo* durumdan farklıdır [72]. Bu engellerin üstesinden gelmek için sferoidler,

Üç boyutlu (3B) boyutlu gelişmiş *in vitro* sistemler geliştirilmiştir. Doku ve organların *in vivo* etkileşimlerini modellemeyi amaçlayan 3B hücre kültürü yaklaşımlarının tanıtılması, altta yatan biyokimyasal ve biyomekanik sinyallerin incelenmesinde yeni olanaklar açmıştır. Doku ve hücre mühendisliğinde iyi tasarlanmış bir mikro ortam,

çoğalmayı, göçü, matris üretimini ve kök hücre farklılaşmasını teşvik etmek için kullanılabilir [70].

Üç boyutlu (3B) kültürlerde hücreler çok katmanlı olarak bulunur ve bu nedenle kan damarlarından uzaklıklarına bağlı olarak aynı konsantrasyonda oksijene, besinlere ve sinyal moleküllerine maruz kalmazlar. Bu taşıma gradyanına, yani proliferasyon ve anjiyogeneze dayalı çeşitli fizyolojik süreçler vardır[71], [72].

Hücre biyolojisi ve doku mühendisliğindeki son gelişmeler, çok çeşitli 3B hücre kültürü teknolojilerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır . Bu modeller, çok hücreli tümör sferoid oluşumu (sıvı kaplama kültürü ve asılı damla yöntemi), organoidler, çok katmanlı hücre kültürleri, biyoreaktör tabanlı kültür, 3B biyo-baskı, hidrojel ve yapı iskeleleri gibi farklı yaklaşımlara dayanmaktadır [73][74]. 3B sistemler, oksijen ve büyüme faktörü gradyanlarındaki değişiklikler, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimi ve ilaç difüzyonunu sınırlayan yoğun hücresel yapı gibi *in vivo* ortama yapısal olarak benzer koşullar sağlar [75][76]. 3B modeller, klinik olarak 2B hücre kültürlerinden çok daha önemlidir.



Şekil 21. 2 boyutlu ve 3 boyutlu modellerin karşılaştırılması [71].

3. MATERYAL VE METOT

3.3.3.1. Materyaller

3.3.1. Kullanılan Cihazların Listesi

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Ekler bölümünde EK A’da yer almaktadır.

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi

Çalışmada hücre kültüründe kullanılan donanımların listesi Ekler bölümünde EK B’de yer almaktadır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar Listesi

Çalışmada kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde EK C’de yer almaktadır.

3.1.4. Kullanılan Tamponların İçerik Listesi

Çalışmada kullanılan tamponların içeriği Ekler bölümünde EK D’de yer almaktadır.

3.4. Metot

3.4.1. Hücre Kültürü

4 tip hücre hattı kullanılmıştır. MIA PaCa-2 (MP) ve PANC-1 (PC) hücreleri, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) elde edilmiştir. Her hücre hattı kültür flasklarına hücre ekimi yapılarak kültürlenebilir. MiaPaCa-2 hücrelerinin tam büyüme için besi yeri DMEM ortamında %10 Fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içermektedir. Hücre hattı yaklaşık 40 saatlik ikiye katlanma süresine ve agarda yaklaşık %19’luk bir koloni oluşturma verimine sahiptir. PC ve CP hücrelerinin tam büyüme besi yeri de DMEM ortamında %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisindir. PC hücre hattının yaklaşık 52 saatlik ikiye katlanma süresi vardır. CF hücrelerinin tam büyüme besi yeri RPMI 1640 ortamında %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 2mM glutamindir. İkiye katlanma süresi yaklaşık 32 saattir.

Hücreler hazırlanmış medya içeriği ile birlikte T25 flasklarda ve 6 oyuklu plakalarda sabit olarak %5 CO₂ ile 37°C sıcaklık bulunan inkübatörlerde steril şekilde inkübe edilmiştir.

3.4.2. Dirençli Hücre Hatları

GM+ olarak belirlenen çoklu GM direnç hatları, MP ve PC hücre hatları ile artan GM konsantrasyonları ile inkübe edilerek belirlenmiştir. Artan GM dozu ile birlikte sürekli olarak adaptasyon aşamasında ilaç konsantrasyonu 10 nM, 20 nM, 50 nM ve 100 nM olarak kademli bir artışla 24 ve 48 saat boyunca GEM ile muamele edildi. Doza bağımlı her işlemten sonra apoptotik hücreler atıldı ve hayatta kalan hücreler GM'siz ortamda büyütüldü ve tekrar bir sonraki GM dozuna maruz bırakıldı. Bu işlem her ilaçlama ve doz artışı sonrası tekrarlandı. 20 nM GEM ile başlatıldı ve IC50'ye (sitotoksosite) karşılık gelen 50 nM ile 16 hafta sürekli inkübasyon ile devam etti. Ardından 50 nM ve 100 nM GEM'e sürekli maruziyet altında ilaca dirençli bir popülasyon ortaya çıkmıştır. İşlem toplam 4 ay sürmüştür. Artan sitotoksik ilaç basıncı kademeli olarak arttırılmıştır. Direnç kazanmış hücreler Gem+ olarak adlandırılmıştır.

3.4.3. Hücre Dondurma

Gemcitabine dirençli hücre hatlarını stok olarak saklamak için hücre dondurma işlemi gerçekleştirilir. T25 flask ve 6 well plate'de logaritmik büyüme fazında belirli yoğunluğa ulaşmış hücreler kültür ortamındaki besi yerinden uzaklaştırılır. Ortama 1 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenir ve yıkama işlemi gerçekleştirilir. Ardından PBS uzaklaştırılır ve adherent özellikteki hücreleri kaldırmak amacı ile 1 ml Tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) eklenir ve 5 dakika 37°C inkübatörde bekletilir. İnkübatörden alınan hücreler ışık mikroskobu altında incelenir. Tripsinin aktivitesini inhibe edebilmek için kullanılan tripsin-EDTA oranında tekrar 1 ml besi yeri eklenir ve kalkan hücreler toplanarak 15 ml'lik falcon içerisine alınır. 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj işlemine tabii tutulur. Çöktürülen hücrelerin üst fazı atılır ve pellet üzerine 1 ml dondurma ortamı (Freezing media) eklenerek pipetaj yapılır. Ardından hızlıca kriyo tüplere aktarılır ve etiketleme yapılarak -80°C veya sıvı azot ortamına kaldırılan hücreler bu şekilde saklanır.

3.4.4. Hücrelerin Pasajlanması

Çoğalarak belirli yoğunluğa ulaşmış, log fazında çalışılması uygun olan, flaskın %80'nini kaplayan hücrelere pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işleminde kültür ortamındaki medya uzaklaştırılmış ve ardından PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml Tripsin-EDTA eklenir ve 5 dakika 37°C'de inkübatörde bekletilmiştir. Ardından flask ışık mikroskobunda kontrol edilmiştir ve

tripsinin aktivitesini inhibe edebilmek için tripsin ile aynı oranda besi yeri eklenmiştir. 15 ml'lik falcona toplanan hücreler 2500 rpm 4 dakika santrifüje tabii tutulmuştur. Üst faz uzaklaştırılır ve 1ml besi yeri içerisinde pipetaj ile süspanse hale getirilmiş ve sayımı yapılan hücreler belirli oranda yeni flasklara ekilmiştir. Gempitabine dirençli hücrelerin ilaçlanma kesildikten sonraki süreçte 16 pasajdan fazla direncini koruduğu ve fenotipin stabil olduğu kabul edilmiştir [52]

3.4.5. MTT Hücre Proliferasyon Yöntemi

GM ile dirençli hale getirilen MP ve PC PK hücre hatları, 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğuna 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. MP, PC, CP ve CF hücre hatlarından GM uygulanmayan kontrol grupları oluşturulup her hücre hattından seçilen kuyulara 1×10^4 hücre ekilmiştir. Aynı şekilde GM'e dirençli hücre hatları seçilen kuyulara aynı sayıda ekilip gece boyunca yapışması için 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün besi yeri değiştirilen hücrelere kontrol grupları hariç 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM ve 1000 nM konsantrasyonları ile gempitabin uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon ardından her 96 kuyuya 10 µl MTT reagent ajanı eklendi ve 4 saat boyunca inkübatörde bekletildi. 4 saatin sonunda tüm besi yeri çekildi ve 96 kuyucuğun tümüne 100 µl DMSO eklendi. Karanlıkta 5 dakika bekletildikten sonra plate ELISA okuyucuya alınmıştır ve 570 nm ve 655 nm'deki dalga boylarında absorbans ölçümü yapıp sonuçlar alınmıştır.

3.4.6. Floresan Boyama

- **DiOC₆ (3', 3'- Diheksiloksakarbosiyanin iyodür) Boyama**

Gempitabine dirençli pankreas kanseri hücre hatları ve kontrol grubu hücreleri MP ve PC olmak üzere, 6 kuyucuklu 2 petriye; her petride 2 hücre hattı olacak şekilde 3'er kuyu 6×10^4 hücre sayısından ekilmiştir. Hücreler yapışması için 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından hücrelere 100 nM GM uygulanmıştır. 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonun ardından hücrelerin besi yeri 4 nM DiOC₆ içeren besi yeri ile değiştirilip 15 dakika bekletilmiştir. İlaç etkinliğinin karşısında sağlıklı kalan dirençli hücrelerin mitokondri membranını boyayarak canlı hücre seçilimi sağlamıştır. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler eksitasyon 488 nm, emisyon 525 nm'de floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir.

3.4.7. Koloni Oluşumu Yöntemi

Gemsitabine dirençli pankreas kanseri hücre hatları ve kontrol grubu hücreleri MP ve PC, 6 kuyucuklu petriye her kuyuda $2,5 \times 10^3$ hücre olacak şekilde ekilmiştir ve hücrelerin yapışması için uygun kültür koşulu 37°C , %5 CO_2 içeren inkübatörde 48 saat bekletilmiştir. Ardından kontrol grubu hücrelerine 50 nM, 100 nM, dirençli hücrelere 100 nM GM uygulanmıştır. 48 saatlik ilaç uygulaması ardından ilaçlı besi yeri atılıp normal besi yeri eklenmiştir. 14 gün boyunca %5 CO_2 içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir ve her 3 günde bir besi yeri değiştirilmiştir. Kontrol grubu hücreleri %80 yoğunluğa ulaştığında kuyulardaki besi yeri uzaklaştırılarak 2 defa 1X PBS ile yıkama yapıldı ve PBS uzaklaştırıldı. Fiksasyon için 3:1 oranında Metanol-Asetik asit karışımı hazırlandı ve her kuyuya 300 µl eklendi, 5 dakika inkübe edildi. Ardından 300 µl kristal viyole eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile su ile fazla boya uzaklaştırıldı ve böylece boyanın nüfuz ettiği hücreler görünür hale getirildi. Petrinin kuruması için 1 gün boyunca filtre kağıdına sarılı biçimde bekletildi. Sonuçlar ise Chemidoc-XP görüntüleme cihazında (Bio-Rad) görüntü alınarak elde edildi.

3.4.8. Yumuşak Agar Deneyi

Agaroz kullanılarak yaratılan 3B kültür ortamında hücrelerin bazal yüzeye yapışmadan (anchorage-independent) koloni oluşturmak amaçlanmıştır. Gem+ ve normal MP ve PC hücreleri kullanılmıştır. Yumuşak agar iki tabakadan oluşmaktadır. Zemin tabakasını oluşturmak için %0,5 lik agaroz % 20 FBS ve %2 Pen./Strep. İçeren 2X DMEM ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Agarozun donmaması için besiyerleri 37°C 'de kullanılmıştır. 6 kuyucuklu petri kabı 1 ml zemin solüsyonu ile homojen olarak kaplanmıştır. $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde % 0.3 agaroz ve 2x DMEM içeren üst jel solüsyonu 1:1 oranda hazırlanmıştır. Bu aşamada, ilaçlama yapılacak hücreler için üst tabaka solüsyonu içerisine belirlenen dozlarda gemsitabin eklenmiştir. Agaroz jelin kurumaması için en üste ilaç içeren veya içermeyen 500 µl besiyeri eklenmiştir. 14. gün sonunda koloni çapları incelenip, koloni çapları Gem+ ve normal PK hücreleri arasında kıyaslanacak, istatistiksel analiz yapılacaktır.

3.4.9. Asılı Damla Modeli

Gemcitabine dirençli hücre hatları MP ve PC hücreleri 60mm² petrilerin kapak kısımlarına 20 µl besi yeri içerisinde 1 x 10⁴ olacak şekilde damla formunda bırakılır. GM uygulaması için 1 x 10⁴ hücre 100 nM GM içeren besi yerinde 20 µl final hacmi ile hazırlanır ve 60mm² petri kapağına damla damla bırakılır. Petrilerin içerisine 1 ml PBS eklenir ve kapak dikkatli biçimde üzerine kapatılır. Petri ve hücreler hareket ettirilmeden 24 saat 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilirler. Birden kez tekrarlı olacak şekilde yapılan asılı damla modeli deneyi, belirlenen süre inkübasyonu sonucunda damla formu bozulmadan 24, 72, 96 ve 120 saat sonra invert ışık mikroskop (Olympus) kullanılarak küresel morfolojiler değerlendirilmiştir.

3.4.10. miRNA izolasyonu ve RT PCR

2B ve 3B kültürlerdeki Gem+ ve normal MP ve PC PK hücrelerinden miRNA ve diğer küçük RNA'ların da bulunduğu total RNA purifikasyonu mirneasy miRNA isolation Kit (Qiagen, Kat No: 217004) ile ticari kitin öngördüğü protokol ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA konsantrasyonu ölçümleri implen (NP80) nanodrop ile ölçülmüştür.

cDNA çevirimi (Reverse Transcription) ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RealTime- PCR): Seçili miRNA'ların ifade analizi için ilk basamak cDNA'ya çevirme işlemidir. Bu işlem için miScript II RT Kit (Qiagen Kat No: 218161) kullanılarak ve ticari kitin önerdiği protokol basamakları takip edilmiştir. cDNA'ya çevirim işleminin ardından Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, CFX Connect (BioRad) cihazında, microRNA (<http://www.microrna.org/>), Target Scan Human (<http://www.targetscan.org/>) ve miRBase (<http://www.mirbase.org/>) platformlarından karşılaştırmalı olarak belirlenen seçili miRNA primerleri ve endojen kontrol RNU6B primeri ile miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Kat No: 218073) kullanılmış, 94 C°'de 15 sn denatürasyon, 55°C'de 30 sn bağlanma ve 70°C'de 30 sn uzama basamaklarını takiben 40 siklus devam ettirilmiştir. Veri analizi, her örneğe ait miRNA'ların ΔCT değerleri ile internal kontrol RNU6B ye göre normalize edilmiştir ve en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5. Seçili miRNA’ların dizi ve hedefleri ve pankreas kanserindeki rolü.

miRNA	İnsan miRNA Dizisi	Hedef	Rolü
miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	DLG1 ENSG00000075711 DVL2 ENSG00000004975	Tümör baskılayıcı
miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	SNAI2 ENSG00000019549 WNT3A ENSG00000154342 YAP1 ENSG00000137693	Tümör baskılayıcı
miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	GSK3B ENSG00000082701 SMAD2 ENSG00000175387 PTEN ENSG00000171862	OnkomiR
miR-150-5p	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG	SMAD3 ENSG00000166949 PPP2CB ENSG00000104695	Tümör baskılayıcı

3.4.11. İmmünoiblotlama

Gemcitabine dirençli ve normal MP ve PC hücrelerinin Hippo/Wnt sinyallerinin yanı sıra hücre sağkalımı ve metastazı ile ilgili PI3K/Akt/mTOR ve EMT sinyallerinde görev alan protein ifadeleri ile ayrıca apoptotik hücre ölümü etkisi de immünoiblotlama ile incelenmiştir. Bu hücreler 60 mm çapında petrilere ekilip uygun miktarda besi yeri eklenip yapışması ve çoğalması için bekletilmiştir. Petrilere, uygun ilaç dozları olan 50 nM ve 100 nM gemcitabin eklenmiştir ve 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından kontrol grubu medyaları atılmıştır, ilaçlı grup ise mikrofüj tüpüne toplanmış ve santrifüje tabii tutulur. Petrilere 1 ml soğuk PBS eklendikten sonra mekanik etki olan kazıma işlemi ile hücreler kaldırılır. Kaldırılan hücreler tekrar mikrofüj tüpüne toplanarak 2 dakika 16000 rpm’de santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve bu işlem tekrarlanır. Kalan pellet yoğunluğuna bağlı olarak yaklaşık 30-40 µl olacak şekilde Thermo Fisher Scientific firmasına ait M-PER (%10 proteaz inhibitörü) eklenmiştir ve iyice pipetaj yapılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletilir ve +4°C sıcaklıkta 16000 rpm’de 20 dakika santrifüje tabii tutulur. Bu işlemden sonra süpernatantta olan proteinler ayrı bir mikrofüj tüpüne alınır ve -80°C’de saklanır.

Bradford analizi ile elde edilen proteinlerin konsantrasyonları tayin edilmiştir. 96 oyuklu plakaya 2 tekrarlı şekilde 1 µl – 5 µl arasında olacak şekilde konsantrasyonunu bildiğimiz protein standardı sığır serum albumin (BSA) ve protein örneklerimizden 1

µl olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. Kuyuların her birine 200 µl Bradford reagent ajanı eklenip 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Ardından ELISA okuyucuda 595 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Standartların absorbans-konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, grafiğin denklemi girilerek absorbans değerleri ölçülen proteinlerin konsantrasyonları tespit edilmiştir.

Tüm bu işlemlerin ardından immünoablota için hazırladığımız protein örnekleri 5X laemmli tamponu ile 1:5 oranında karıştırılarak 95°C’de 5 dakika denatüre edildi. Ardından %4-12 sodyum dodesil sülfat içeren poliakrilamid jel hazırlanarak, hesaplanan örnekler jel üzerindeki kuyulara ilk kuyuda protein belirteci olacak şekilde sırası ile yüklenmiş ve yürütme tamponu olan tankta 90 V’de 3 saat yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi sonrasında jelde yürüyen örnekler transfer edilmeden önce 0.45 µM PVDF membran metanol ile aktifleştirilmiştir ve jeldeki proteinler transfer tamponu ile dolu tankta kDa’ya bağlı olarak değişen değerlerde PVDF membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi ardından membranlar %5’lik yağsız süt tozu ve %0.1 Tween içeren 1X TBS içeren ortamda 1 saat oda sıcaklığında bloklama işlemi için çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu süt ortamında bekleyen membranlar 1:1000 oranında hazırlanan primer antikoru içerisinde +4°C’de 1 gün boyunca roller üzerinde bekletilmiştir. Primer antikor işaretlemesi ardından ikinci antikor işlemine geçmeden membran 10’ar dakikadan 3 kez 1X TBS-T içerisinde yıkanmıştır. Ardından 1:3000 hazırlanan uygun ikinci antikora alınıp yine +4°C’de bir gün boyunca roller üzerinde bekletilmiştir. 24 saat sonra membran, 10’ar dakika 3 kez TBS-T çözeltisi içerisinde ve 5 dakika 1 kez TBS çözeltisi içerisinde yıkanmıştır. Belirli değerler ile kemilüminesans çözeltisi hazırlanmıştır ve membranlar karanlıkta 2 dakika boyunca bu çözelti ile muamele edilmiş ardından ChemidocMP ile 2 dakika süresince 30 farklı görüntü kaydedilmiştir.

3.4.12. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu (RT PCR)

Elde edilen RNA örneklerinden, cDNA çevirimi (Reverse Transcription) ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real- Time PCR) gerçekleştirilmiştir. miScript II RT Kit ticari kitinin öngördüğü protokol ile cDNA çevirimi yapılmıştır. Serumdan izole edilen 50 ng RNA örneği Reverse Transcriptase enzimi ve gerekli tampon karışımları ile 1 saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra 95 °C’de 5 dakika inkubasyon ile reaksiyon sonlandırılmıştır. cDNA kantifikasyonu, A260/280 saflık değerinin 1.8-2.0 aralığında olmasına dikkat edilmesi koşulu ile Nanofotometre İmplen cihazı ile yapılmış ardından Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), CFX Connect (BioRad) cihazında, miScript SYBR Green PCR Kit’in öngördüğü protokol doğrultusunda gerçekleştirilecektir Her bir reaksiyonda, 20 ng cDNA kalıbı, 2x konsantre SYBR Green PCR Karışımı, 10x Universal Reverse Primer ve 10x miRNA spesifik Forward Primer ile 2 tekrar olacak şekilde 25 µl’ye RNaz-DNAz içermeyen su ile tamamlanmıştır. PCR kondüsyonları, 94°C’de 15 sn denatürasyon, 55°C’de 30sn bağlanma ve 70°C’de 30sn uzama basamaklarını takiben 40 siklus devam ettirilmiş ve her bir PCR deneyinde her bir örnek 2 tekrarlı olarak hazırlanmıştır.

3.4.13. miRNA mimik/Anti-miR transfeksiyonu

Hasta ve sağlıklı gruplardan yapılan miRNA analizine göre onkomir ya da tümör baskılayıcı karakterde miRNA’lar belirlenmiş ve miRNA ifadesinin arttırılması ile hücreler mimik miRNA-150-5p ile transfekte edilmiştir. Belirlenen miRNA’ların hücre içinde modülasyonu için öncelikle hücrelerin 6 kuyucuklu hücre kaplarına her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Ekildikleri kuyucukların tüm yüzeyini kaplayacak yoğunluklara geldiklerinde hücrelere transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon karışımı için her kuyucuk için 100 µl olacak miktarda serum ve antibiyotik içermeyen DMEM hücre medyası içerisine miRNA oranının 3 katı olacak şekilde 3 µl (3:1) transfeksiyon ajanı (İN-fectTM in vitro transfection reagent, Cat No. 15081) eklenmiştir. 5 dk inkübasyonda bekletildikten sonra miRNA mimik 150-5p (Qiagen, Ana stok: 20 µM, İstenen miktar: 5nM) eklenerek 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan transfeksiyon karışımı damla damla hücrelere eklenmiş ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mimik miRNA -20°C’de, transfeksiyon ajanı ise +4°C’de saklanmıştır. Transfeksiyon sonrası 2B ve 3B kültürler oluşturulmuştur.

3.4.14. Hücre sağkalım testi DiOC₆ boyama

Gem⁺ ve normal MP ve PC hücrelerinin miRNA modülasyonu sonrası hücre sağkalımı ve çoğalma hızı incelenmiştir. Bunun için miRNA mimik transfeksiyonlarını takiben 24-48-72 ve 96 saat sonrası hücre çoğalma hızları DiOC₆ floresan boyama ile incelenmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli kaybı hücre ölümü ile ilişkili olup, membran potansiyeli kaybı hücrelerin DiOC₆ ile boyanmasını engelleyen bu boya ile ekimi yapılan hücreler, 4 mM DiOC₆ ile 15 dk 37 derecede inkübasyon sonrası floresan mikroskopunda görüntülenmiştir.

3.4.15. miRNA modülasyonu sonrası immunoblotlama

miRNA mimik transfeksiyonları yapılan ve yapılmayan MP ve PC hücrelerinin belirlenen ilgili proteinlerin ifadeleri incelenecektir. Transfeksiyon işlemlerini takiben immunoblotlama işlemi belirtildiği gibi devam edilmiştir. Membranlar primer antikor Wnt yolağı (Wnt3a/b, β -katenin, LRP6, Dvl2, Hippo yolağı (P-YAP(S127), YAP/TAZ, MOB1, LATS2), PI3K yolağı (PI3K, AKT, mTOR, GSK-3 β), EMT sinyali (E-kaderin, N-kaderin, Vimentin), pro ve anti-apoptotik sinyali (PARP, Kaspaz 9, Bak, Bax) ile gece boyunca 4 °C’te inkübe edilmiştir. 1xTBS ve 1xTBS-T yıkamaları sonrasında uygun sekonder (Anti-tavşan/fare) ile gece boyunca 4 °Cde inkübe edilmiş ve kemilüminesans solüsyonları ile muamele edilen membranlar ChemiDoc (BioRad) ile analiz edilmiştir.

3.4.16. Propidyum iyodür ile boyama, hücre akış sitometrisi

2B kültür ortamındaki MP ve PC Gem⁺ ve normal hücrelerin subG1, G1, S ve G2/M fazlarındaki popülasyonları incelenmiştir. subG1 popülasyonu apoptotik hücre grupları hakkında bilgi verecektir. Gem⁺ ve normal MP ve PC hücrelerine miRNA transfeksiyonlarını 24, 48 ve 72 saat takiben 2B kültürdeki hücreler toplanmış ve santrifüj işlemi oda sıcaklığında 500 g de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 1x PBS ile yıkama işlemi, hücre zarına zarar vermeyecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işlemi 2 gün boyunca % 70 etanolde yapılmış, ardından hücreler 4 mg/ml propidyum iyodür (PI), 20 μ M RNaz ve 500 μ l 1x PBS ile 37°C’de 30 dk boyanmıştır. Boyanan hücreler hücre akış sitometrisinde her bir grup 10⁴ hücre olacak şekilde okutularak, analiz edilmiştir.

3.4.17. İstatistiksel analiz

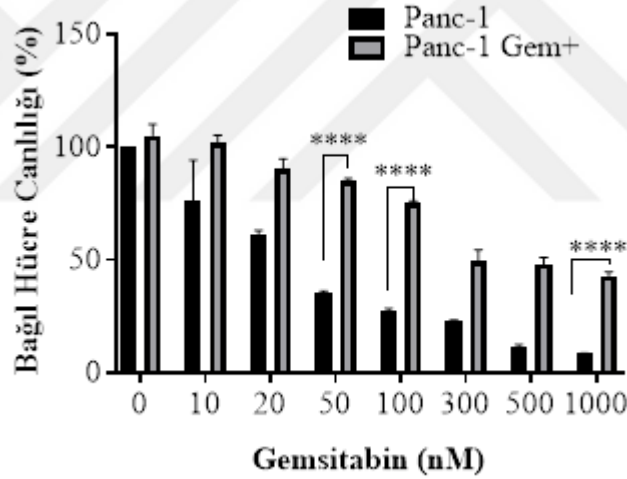
En az 2 tekrarlı olacak deney sonuçlarının istatistiksel analizi için Graphpad Yazılımı (4.04 versiyon) kullanılacaktır. Hasta verileri kullanılarak gerçekleştirilen miRNA ifadeleri belirtilen hastaların farklı karakteristik özelliklerine (yaş, cinsiyet, histolojik evre, metastatik/metastatik olmayan) göre anlamlılık testi uygulanabilmiştir. İmmunoblotlama sonuçları Image J analiz programı ile sayısal olarak hesaplanacak ve her band profilinin kendi β -aktin değerlerine göre normalize edilerek 2-way ANOVA Bonferroni çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel verileri elde edilmiştir. [78].



4. SONUÇLAR

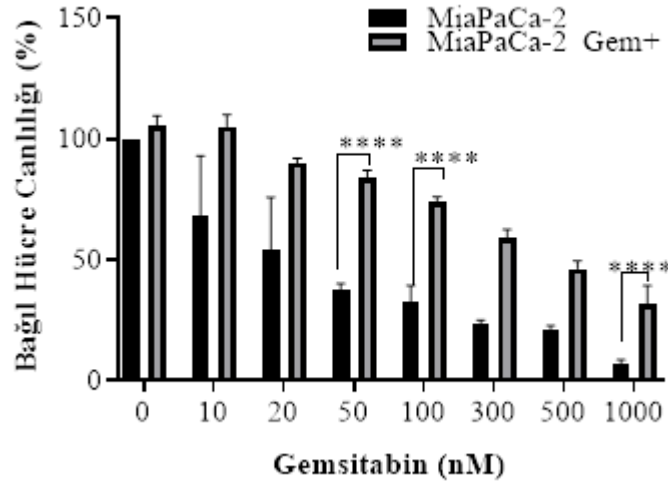
4.3.Gemsitabin Uygulaması, İlaça Dirençli Hücre Grubuna Göre Hücre Canlılığını Azaltıcı Yönde Etki Etmiştir.

Gemsitabine direnç mekanizmalarını araştırmak amacıyla, gemsitabine sürekli maruziyet altında stabil hücre hatları oluşturmak için PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücre hattı seçilmiştir. Seçim, 48 saatlik MTT tahlili ile belirlenen yaklaşık IC50'ye karşılık gelen 20 nM GEM dozunda başlatılmıştır. Artan gemsitabin konsantrasyonları ile 16 haftalık sürekli inkübasyonun ardından, 100 nM gemsitabine sürekli maruz kalma altında ilaca dirençli bir popülasyon ortaya çıkmıştır.



Şekil 22. PANC-1 hücre hattında canlılığın belirlenmesi (24 s)

Sitotoksik etkiye sahip 50 ve 100 nM gemsitabin tedavisiyle 24 saatte hücre canlılığında yüzde 25-40 azalma tespit edildiğinden, bu konsantrasyonlar çalışmalar için seçilmiştir. Sitotoksik ilaç seçim dozunun artmasıyla direnç kademeli olarak artmıştır ve artan ilaç dozu, 100 nM gemsitabinin sürekli varlığında çoğalan popülasyonların oluşmasıyla sonuçlanmıştır. Fenotip, 100 nM gemsitabin varlığında çoğaltılan hücrelerin ilahtan uzaklaştırılmasının ardından 16 pasajdan fazla direnç gösterdiğinde stabil kabul edilmiştir (Şekil 22-23).

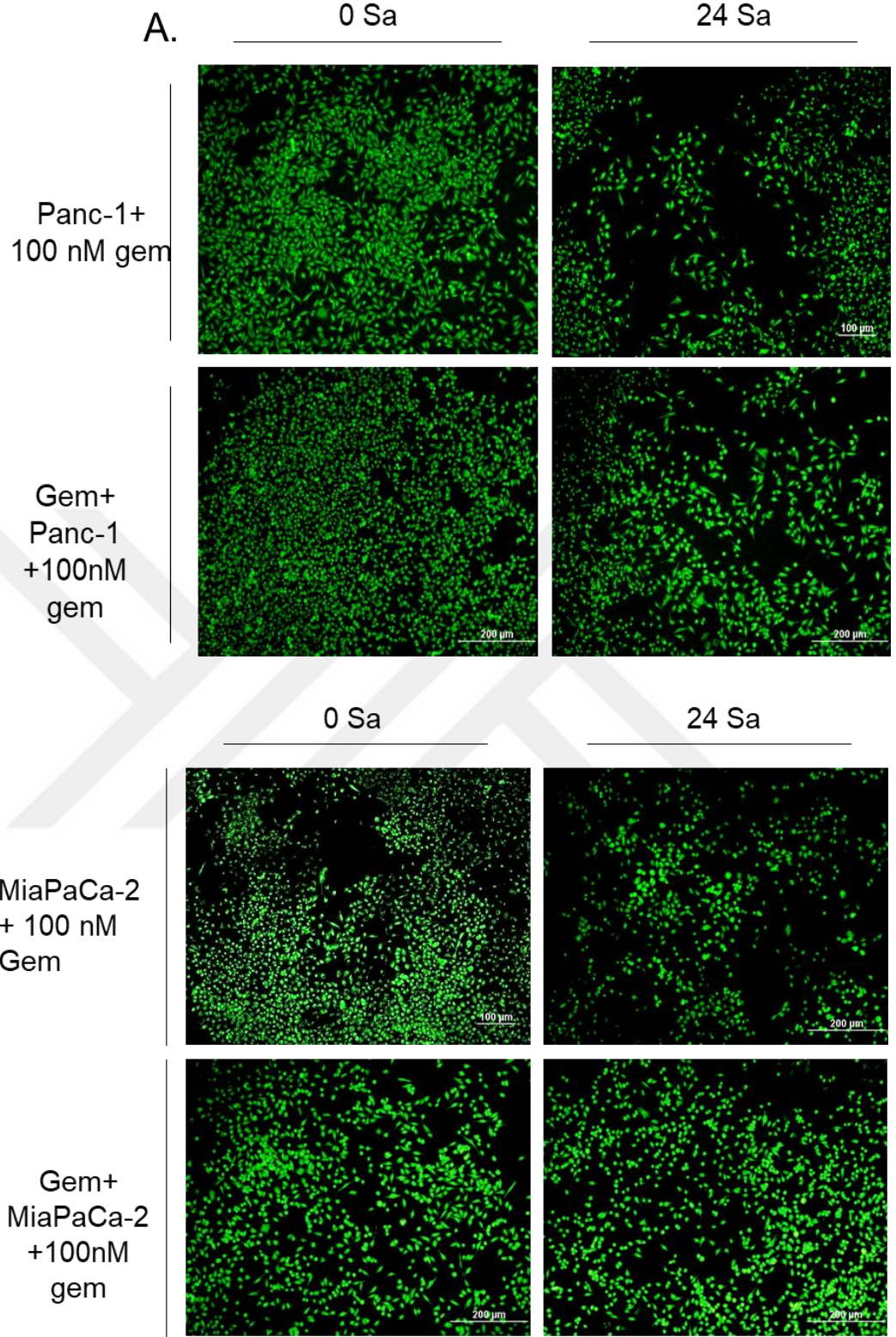


Şekil 23. MiaPaCa-2 hücre hattında canlılığın belirlenmesi (24 s) Gemsitabine dirençli hücre hatlarının in vitro büyüme inhibisyonu. Kolomimetrik 24 saatlik MTT tahlili tetrazolyum boyasının formazana metabolizması hücre canlılığını test etmek için kullanıldı. PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin ve GEM'e dirençli hücre hatlarının doza bağlı büyüme inhibisyonu. Kullanılan GEM dozları 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM ve 1000 nM

4.4.PANC-1, MiaPaCa-2 ve Dirençli (Gem+) Hücre Hatlarında Gemsitabin Uygulamasının Mitokondri Membran Potansiyeli ve Morfolojik Değişim Üzerine Etkisinin Floresan Boya ile İncelenmesi.

Hücre canlılığı testi DIOC₆ ile gösterilmiştir. 3,3'Diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DIOC₆) pozitif yüklü bir floresan boyadır. Negatif yüklü mitokondriler tarafından tutunmasını sağlar ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) bozulmuş apoptotik hücrelerde boya tutunamamaktadır. DIOC₆ boyama ile MMP kaybı belirlenmiştir. Hücre hatlarına 24 saat ilaç uygulanmasını takiben boyama gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerdeki dikkat çekici özelliklerden biri hücre morfolojideki değişim olmuştur. Kontrol grubu hücreleri sıkı bağlantılara (tight junction) ve potlu görünümü ile oldukça kolonize bir morfoloji sergilerken, dirençli hücre grubu hücre-hücre temas kaybıyla iç benzeri bir görüntü ve boyut olarak daha büyük bir morfoloji sergiler.



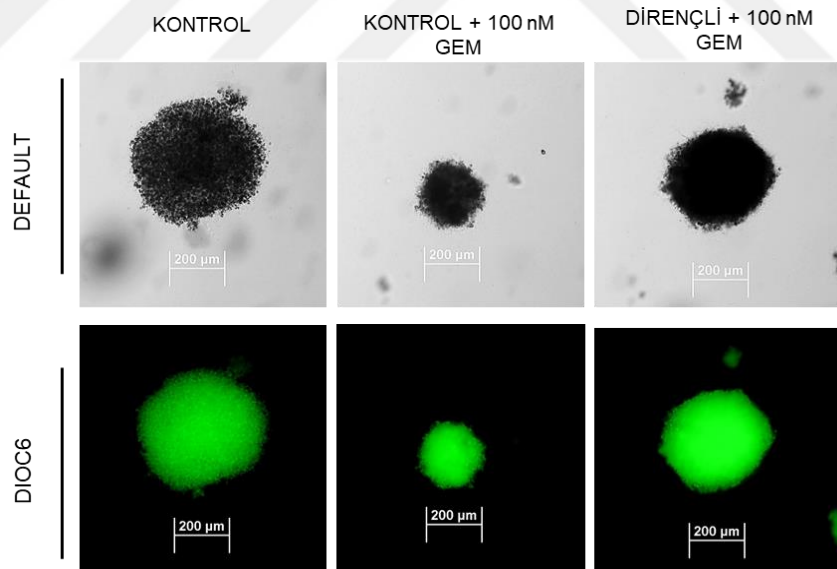
Şekil 24. MIA PaCa-2, PANC-1 ve dirençli hücre hatlarında gemsitabinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisinin floresan mikroskobunda incelenmesi. Gemsitabin (100 nM) uygulaması MİAPaCa-2 ve PANC-1 ve dirençli hücrelerde 24 saat boyunca uygulanmıştır. DIOC6 ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelenmiştir (x10).

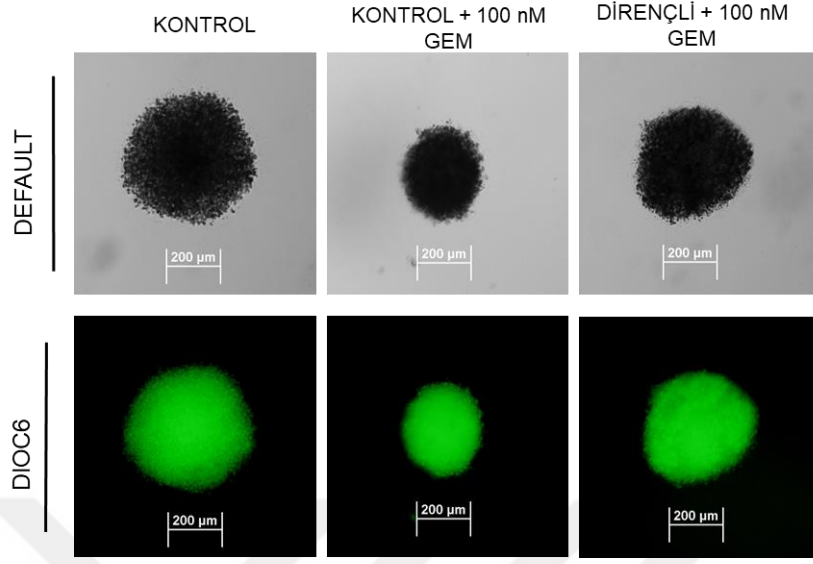
Bu morfolojik özellikler sıklıkla fibroblast benzeri veya EMT benzeri bir fenotip ile ilişkilidir. Kontrol grubunda uygulanan 100 nM GEM'in dirençli hücre grubuna kıyasla hücre sayısında anlamlı bir azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Gemsitabin'nin PANC-1 hücrelerinde MiaPaCa-2 hücresinden daha etkili olması MMP kaybının daha da artmasına yol açmıştır. Bu sonuçlar ile birlikte MMP kaybında artış ile içsel yolak aracılığıyla apoptotik hücre ölümünün temel göstergesi olan MMP bozulması ile apoptotik ölüm belirlenmiş olmaktadır (Şekil 24).

4.5.Gemsitabinin'nin Üç Boyutlu (3B) Hücre Formlarına Etkisinin Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Deneyi ile İncelenmesi

Çalışmamızda PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin hücresel yüzeyden bağımsız ortamda oluşturdukları 3B hücre formları yumuşak agar yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin oluşturdukları 3B formları 3. haftada ışık mikroskobu altında ölçülmüştür. DIOC₆ floresan boyama ile MMP gösterilmiştir.

PANC-1



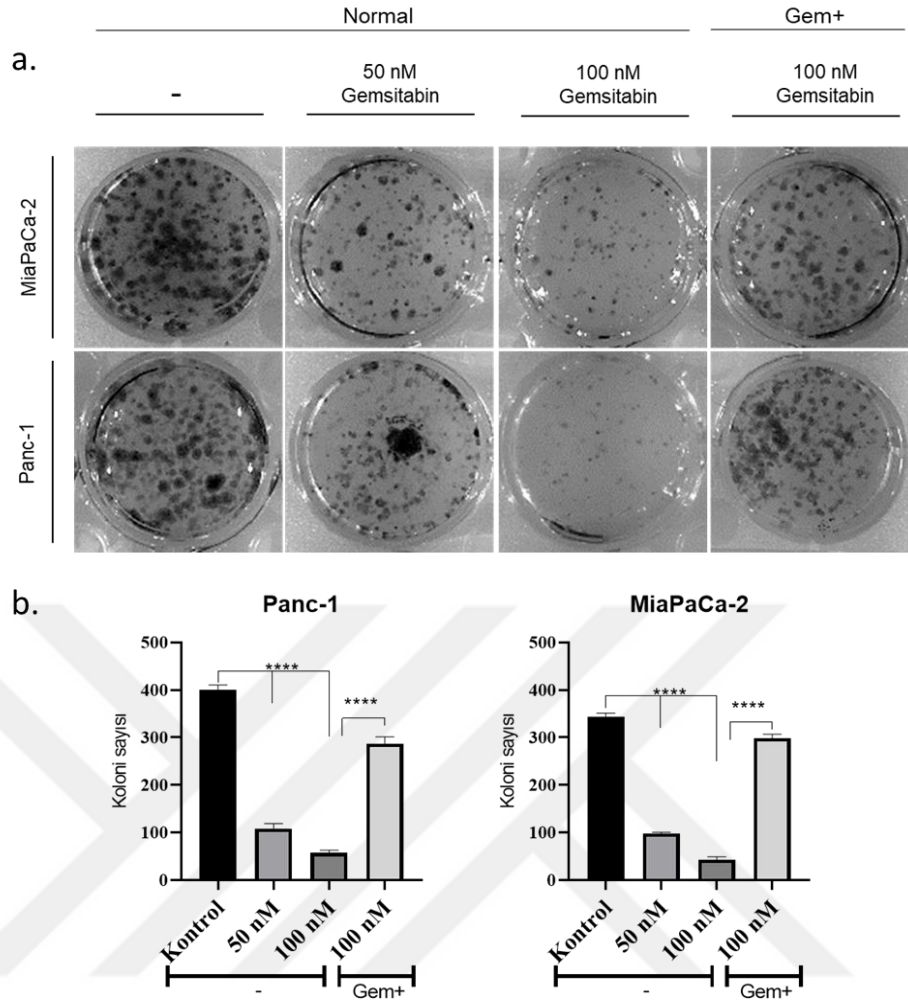


Şekil 25. Yumuşak agar deneyi ile sferoid oluşumunda Gemsitabin etkisinin gösterilmesi. PANC-1 ve MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine gemsitabin uygulamasının sferoid yapılarına etkisi. Üçüncü haftada ışık mikroskobu altında gözlemlendi.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında GEM’e dirençli hücrelerde, sferoid formlarının çaplarında artış gözlenmiştir. Kontrol hücre grubunda Gemsitabin uygulamasını takiben görülen azalmaya bağlı olarak 3B hücre formu oluşumunun önemli ölçüde baskılandığı gözlemlenmiştir (Şekil 25).

4.6.Gemsitabin Uygulaması PANC-1 ve MiaPaCa-2 Hücre Hatlarında Dirençli Hücrelere Kıyasla Koloni Oluşturma Potansiyeline Ket Vurmuştur.

Koloni formasyon testi *in vitro* ortamda kemoterapötik bir ajanın uygulanması sonrası hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin gözlemlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Koloni en az 50 hücrenin bir araya gelerek oluşturduğu hücre popülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Kristal viyole ile boyamanın ardından ışık mikroskobu altında koloni sayıları ölçülmüştür.

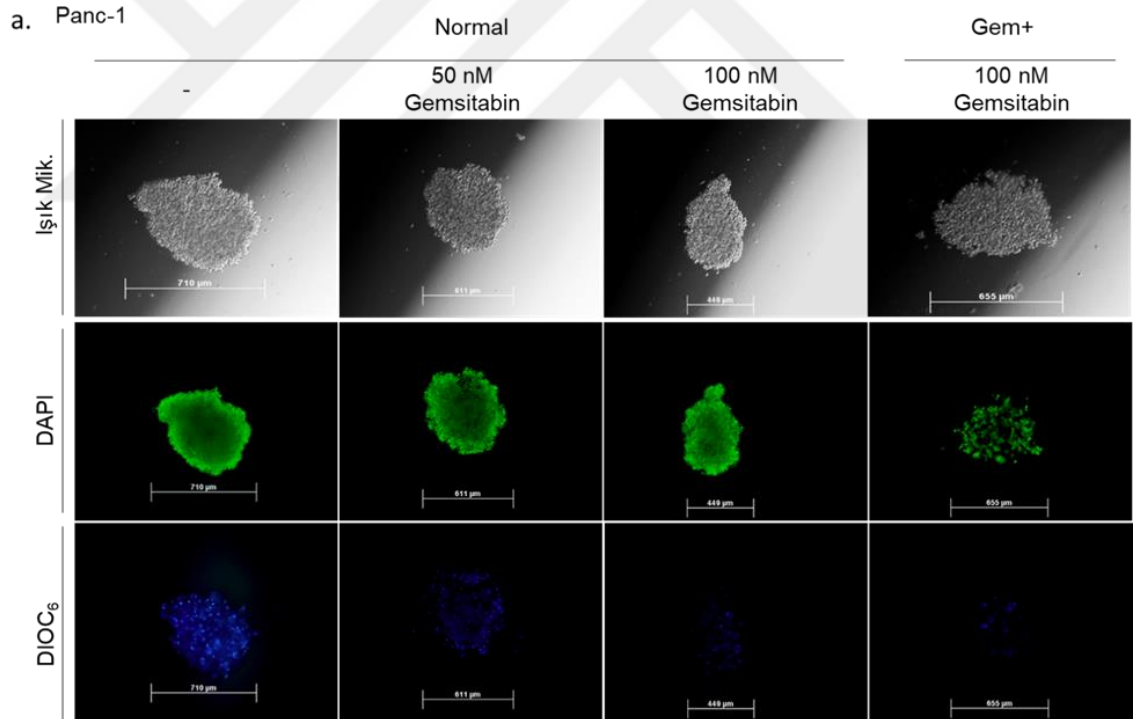


Şekil 26. hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. a. Hücreler koloni deneyi için ekimlerinin yapılması ile kristal viyole boyamasının ardından koloni oluşturma potansiyelleri tespit edildi. b. MiaPaCa-2, PANC-1 ve dirençli hücre hatlarından elde edilen koloni sayıları ışık mikroskobu altında görüntülendi ve ölçüldü.

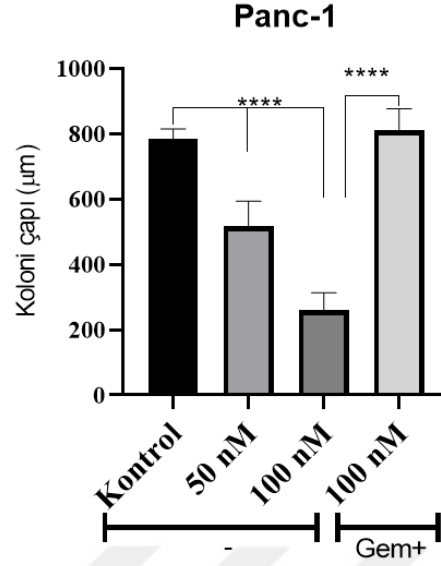
MTT hücre canlılığı testinde incelenen GEM dozlarının hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerini önemli derecede baskılandığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunun koloni formasyon potansiyelinin dirençli grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı görüldü. MTT hücre canlılığı testinin desteklenmesi amacıyla 48 saat süresince uygulanan GEM ilacı dozlarının verdiği sonuçlarda gözlemlendiği üzere kontrol hücre gruplarında dirençli hücre gruplarına göre koloni oluşturma potansiyellerinde azalma yarattığı, ket vurucu bir etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 26).

4.7. Asılı Damla Deneyi ile Pankreas Kanseri Hücrelerinde Gempitabin Uygulamasının Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi

Üç boyutlu (3B) hücre kültürü oluşturmak üzere kullanılan bir diğer yöntem ise asılı damla modelidir. Hücrelerin yumuşak agar koloni oluşturma deneyinde agar içerisinde oluşturdukları 3B hücre formasyonlarından farklı olarak, hücre süspansiyonu ile oluşturulan bir damla içerisindeki ortamda hücreler arası etkileşimle sferoid formlarının oluşturulmasını sağlayan asılı damla modelidir. Gempitabin'nin PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin invazyon potansiyeli üzerindeki etkisini anlamak için 3 boyutlu sferoid hücre kültürü tekniği yapılmıştır. 20 µl taze kültür ortamına (DMEM) $2,5 \times 10^3$ hücre damla damla petri kabına ekildi ve 72 saat süreyle inkübe edildi. Gempitabinin etkisine bağlı olarak kontrol grubu ve dirençli hücre grubunun 3 Boyutlu Sferoid Kültür oluşturma potansiyeli asılı damla modeli deneyi ile incelenmiştir.

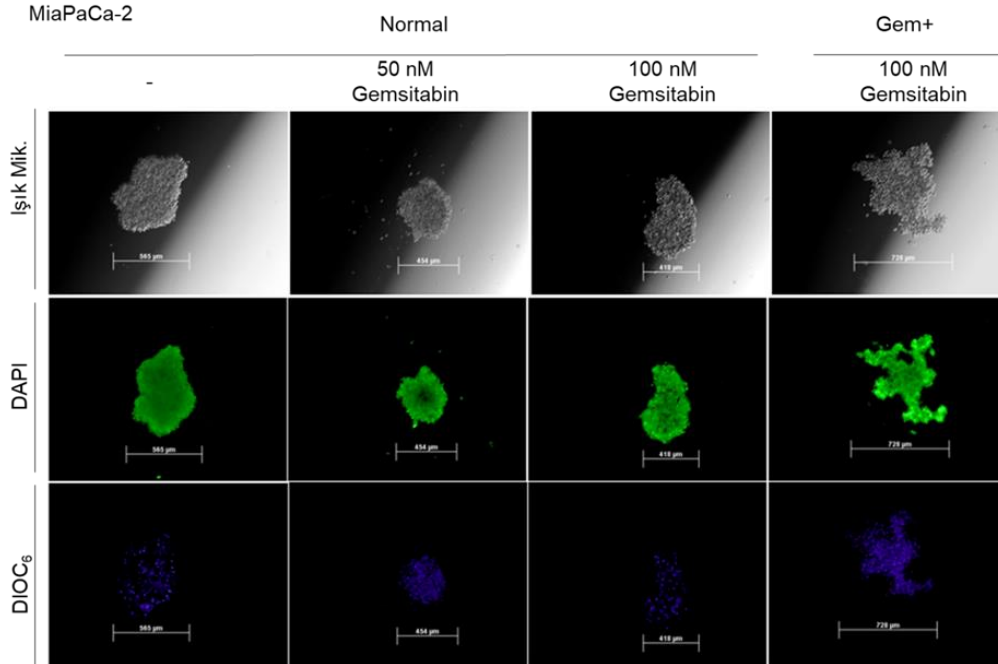


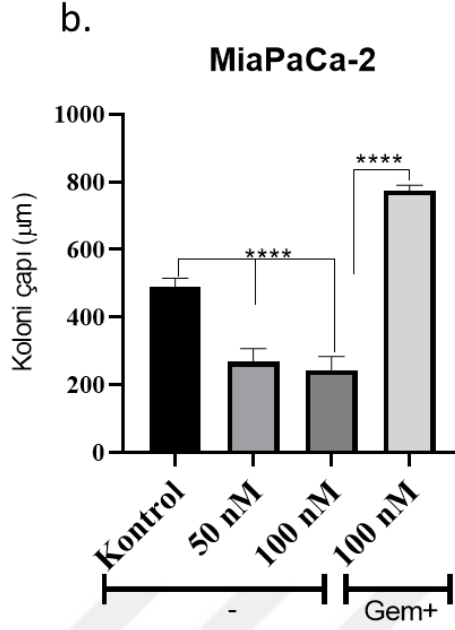
b.



Şekil 27. Asılı damla yöntemi ile PANC-1 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. PANC-1 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları 72. saatte ölçüldü. 72 saat ışık çekiminden önce DAPI ve DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. b. 72 saat sonunda deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi.

a.



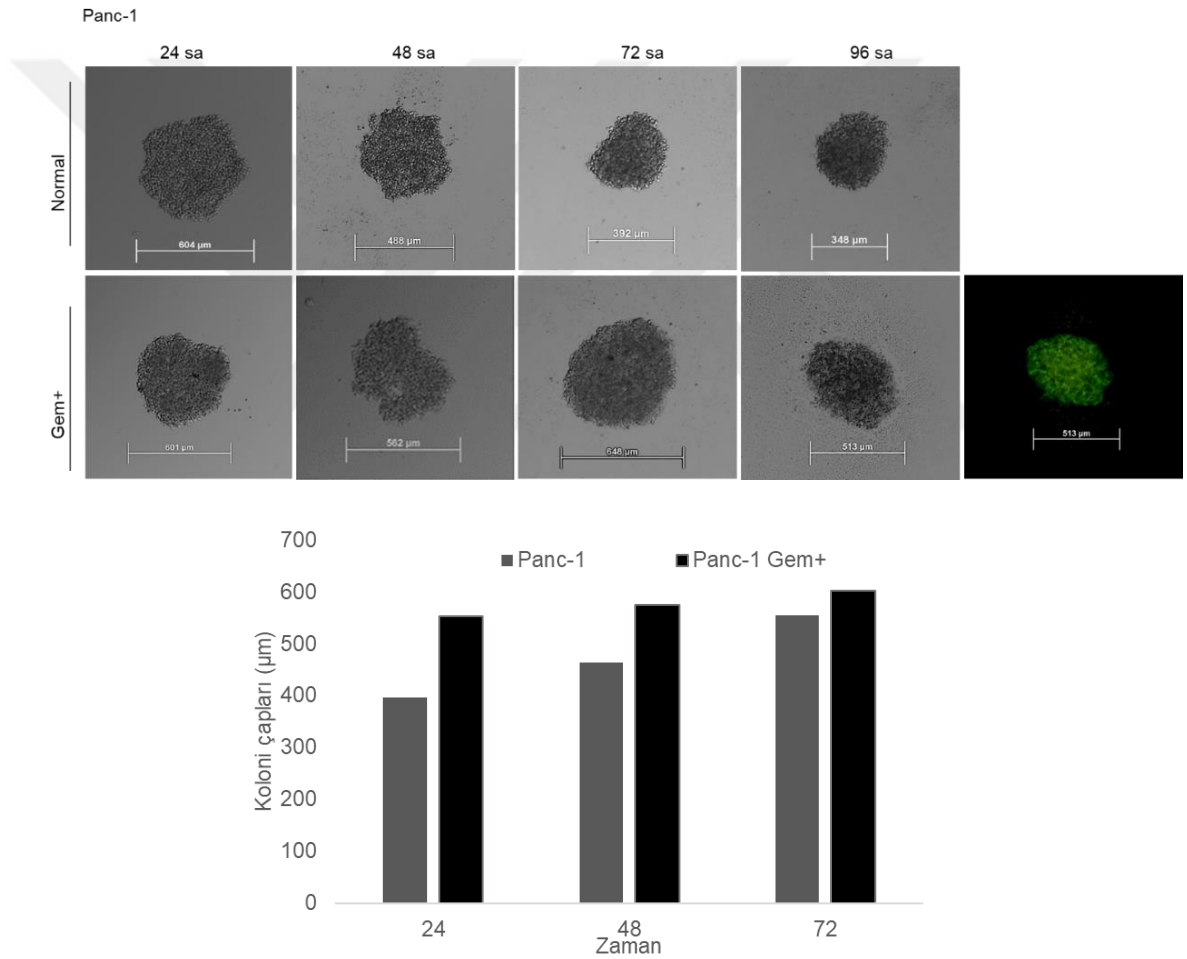


Şekil 28. Asılı damla yöntemi ile MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. MiaPaCa-2 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları 72. saatte ölçüldü. 72 saat ışık çekiminden önce DAPI ve DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntüldü. b. 72 saat sonunda deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi.

Asılı damla modeli deneylerinde zamana bağlı GEM uygulamasının PANC-1 ve MiaPaCa-2 kontrol grubu hücrelerinde 72 saat içerisinde etki gösterdiği ve 3 Boyutlu Sferoid kültür oluşturma potansiyellerine ket vurduğu ve anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir.. Dirençli hücre gruplarına baktığımızda ise bu etkinin azaldığı küçülme görülmediği ayrıca bazı koloni boyutlarında artış olduğu gözlemlenmiştir. 72s sonundaki DAPI ve DIOC₆ floresan boyama ile çekirdek ve MMP gösterilmiştir. 72 saat sonunda deney gruplarının koloni çapları ölçüldü ve çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi. Tüm bu sonuçlar 2 hücre hattında da benzerlik göstermiştir (Şekil 27-28).

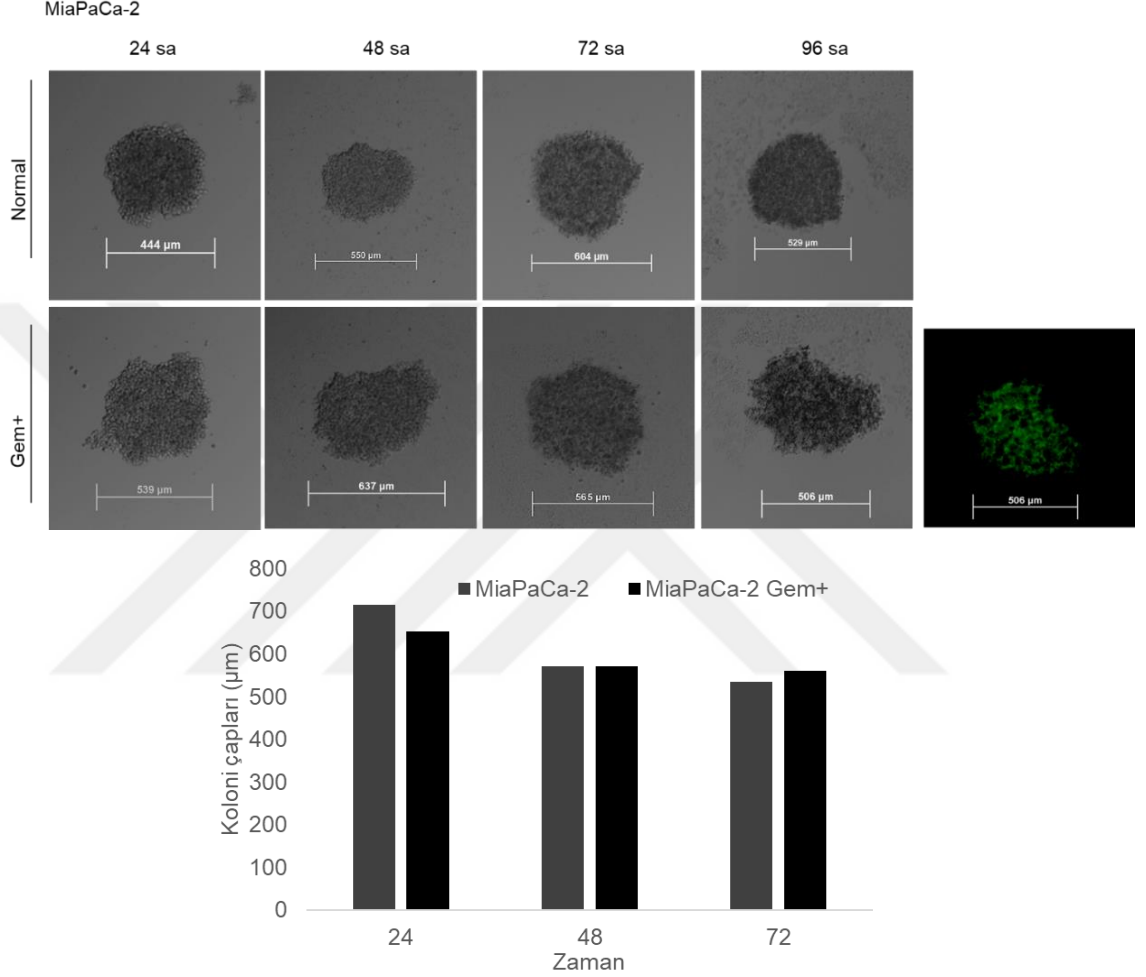
4.8. Asılı Damla Deneyi ile PANC-1 ve MiaPaCa-2 Hücrelerinde Gemsitabin Uygulamasının zamana bağlı Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi

Sferoid ve organoid formlar 2B hücre kültürlerine göre ECM ve hücre-hücre etkileşimi açısından tümör dokusu mimik edebilen yapılar olmalarının yanı sıra kanser kök hücre (KKH) davranışının ve farklılaşmasının analiz edilebileceği formlardır. Asılı damla modeli deneylerinde zamana bağlı GEM uygulamasının PANC-1 ve MiaPaCa-2 kontrol grubu ve dirençli hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saat içerisinde etkisi incelenmiştir.



Şekil 29. Asılı damla yöntemi ile PANC-1 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. PANC-1 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları 72. saatte ölçüldü. 24, 48, 72 ve 96 saat ışık çekiminden önce DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. b. Deney sonunda hücre gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi.

İlaç uygulamasının 3 Boyutlu Sferoid kültür oluşturma potansiyellerine ket vurduğu ve koloni çaplarını belirgin bir biçimde azalttığı gözlemlenmiştir. Zaman ve koloni çaplarının grafiksel analizine bakıldığında zamana oranla koloni çaplarının PANC-1 hücre hattında arttığı ve GEM ajanının etkisinin azaldığı görüldü. Ancak kontrole kıyasla dirençli hücre grubundaki koloni çaplarının artışı anlamlı bulundu (Şekil 29).

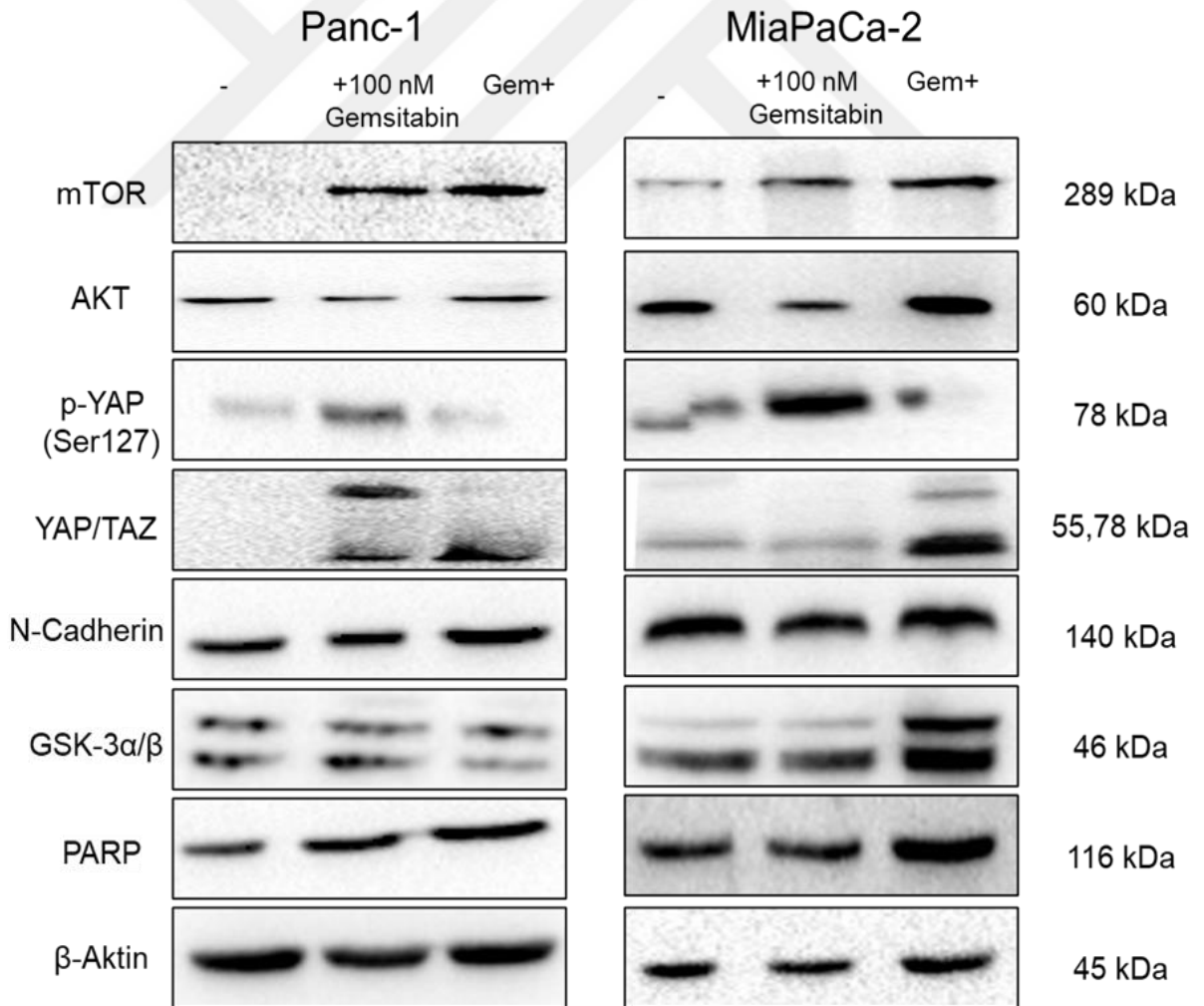


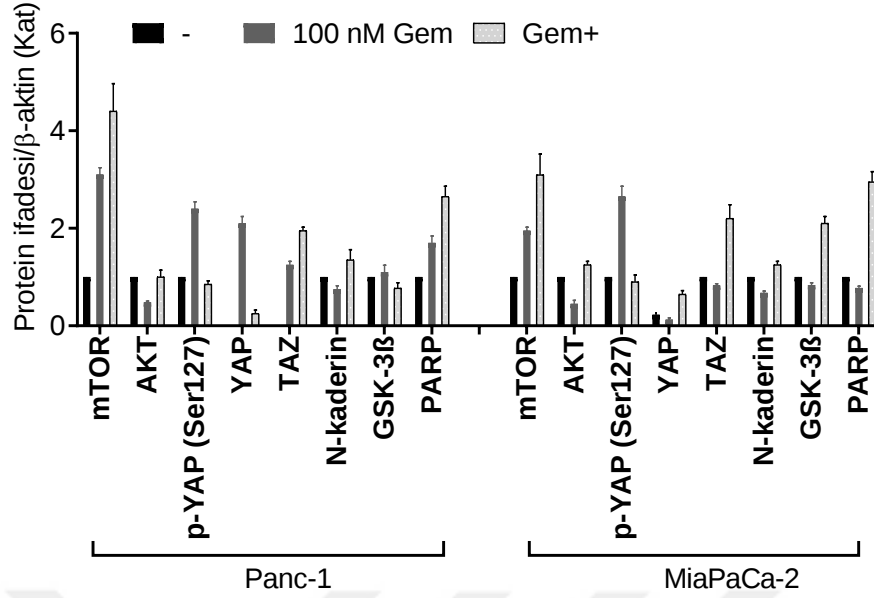
Şekil 30. Asılı damla yöntemi ile MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine GEM uygulamasının 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. MiaPaCa-2 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları 72. saatte ölçüldü. 24, 48, 72 ve 96 saat ışık çekiminden önce DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. b. Deney sonunda hücre gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi.

MiaPaCa-2 hücrelerinin grafiksel oranına bakıldığında ilk 24 saatten sonra koloni çaplarında genel bir azalma görüldü. Kontrol grubunda GEM ajanının etkili olduğu ve bu etkinin koloni çaplarını anlamlı ölçüde azalttığı görüldü. Dirençli hücre grubunda ise ilk 24 saatten sonra bazı koloni boyutlarında azalma olduğu görülmüş ancak sonraki süreçte koloni çaplarının stabil kaldığı görüldü. 96 saat sonunda hücre canlılığı DIOC₆ boyama ile mitokondri membran potansiyeli gösterildi (Şekil 30).

4.9. Gemsitabin Uygulamasının Direnç Mekanizmasında Görev Alan Protein İfadelerine Etkisi

Gemsitabine dirençli ve normal 2B ortamdaki Panc-1/MiaPaCa-2 hücrelerinin Hippo/Wnt sinyallerinin yanı sıra hücre sağkalımı ve metastazı ile ilgili PI3K/Akt/mTOR ve EMT sinyallerinde görev alan protein ifadeleri ve ayrıca apoptotik hücre ölümüne etkisi de immunoblotlama ile incelenmiştir.





Şekil 31. PANC-1, MiaPaCa-2 ve dirençli 2B hücre formlarında Gemsitabin varlığının Direnç mekanizmalarındaki sinyal yollarına etkisi. Total protein izolasyonu sonrası 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. mTOR, AKT, p-YAP, YAP/TAZ, N-kaderin, GSK-3β, ve PARP ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. B-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Western blot sonuçları, PANC-1 ve MiaPaCa-1 hücrelerinde GEM direncinin gelişimi sırasında, dirençli iki hücre hattında da mTOR ve AKT ekspresyonunun anlamlı ölçüde yukarı regüle edildiğini, p-YAP proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin aşağı regüle edildiğini ve YAP proteininin ekspresyon seviyesinin ise yukarı regüle edildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, hücre içi enerji metabolizmasının kontrol eden PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının ve doku homeostazı, organogenez, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol alan Hippo sinyal yolağının, PK hücrelerinin GEM'e direncinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir.

Epitel belirteç olan N-kaderin seviyeleri iki hücre hattında da incelenmiştir. PANC-1 ve MiaPaCa-1 hücrelerinde yapılan immunoblotlama sonuçlarına göre 2B hücre formlarında Gemsitabine dirençli hücrelerde, N-kaderin seviyesinde anlamlı bir fark görülmüştür.

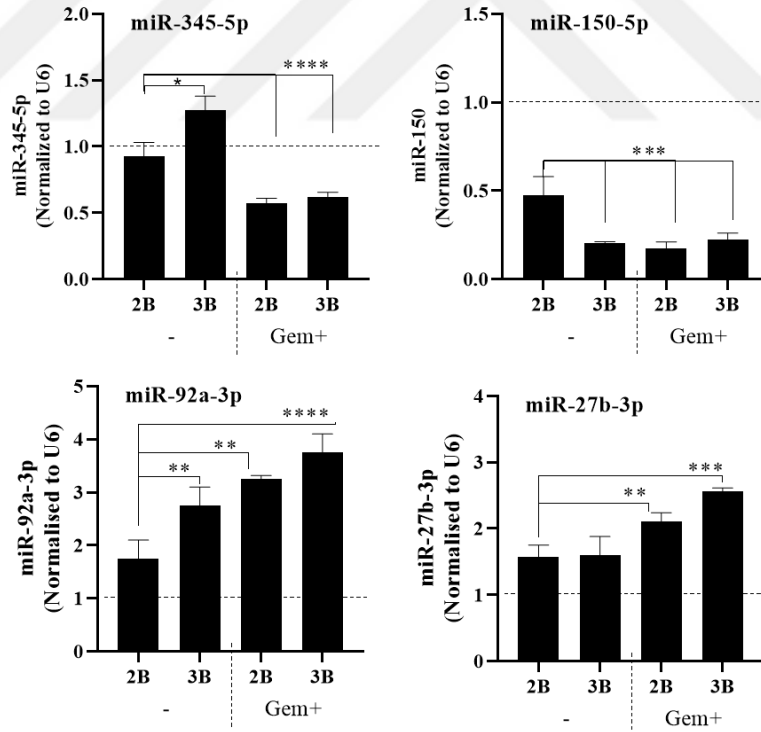
Proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, invazyon ve anjiyogenezi düzenleyen Wnt/ β -katenin sinyal yolağında Akt-GSK3 β yolunun aktivasyonu gemsitabin direnci için önemlidir. immunoblotlama sonuçlarında, PANC-1 ve MiaPaCa-1 hücrelerinde GEM direncinin gelişimi sırasında, dirençli iki hücre hattında da kontrol grubuna kıyasla

GSK-3 β ekspresyonunun anlamlı ölçüde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, DNA onarımı, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptotik mekanizmada önemli rolleri olan PARP, direnç mekanizmasında rol almasıyla birçok kanser türünde araştırılmıştır. Çalışmamızda normal ve GEM'e dirençli hücrelerdeki PARP seviyelerine bakıldığında dirençli hücrelerdeki PARP ifadesinde önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 31).

4.10. 2B Ve 3B Kültürlerdeki Gem+ Ve Normal PANC-1/Miapaca-2 PK Hücrelerinde Seçili miRna Analizi

Araştırmamızda, normal ve Gem+ hücrelerden oluşturulan 3B sferoid yapıları ile 2B Panc-1/MiaPaCa-2 hücrelerinde Hippo ve Wnt sinyal yolağını hedefleyen belirli miRNA'ların (miR-27b-3p, miR-92a-3p, miR-150-5p ve miR-345) ifadeleri analiz edilmiştir.

Panc-1



Şekil 32. Gem+ ve normal Panc-1 hücrelerinin 2B ve 3B formlarında miR-345, miR-150, miR-92a-3p ve miR-27b-3p ekspresyon seviyelerinin incelenmesi. Bağlı miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR reaksiyonu ile incelendi ve sonuçlar RNU6 internal kontrole göre normalize edildi. Elde edilen sonuçlar üç yarı deneyin iki tekrarlı sonucunun ortalama/st.sapma değerleridir. *p<0,05, **p<0,02, ***p=0,001, ****p<0,0001

İlaça dirençliliğe ek olarak 3B kültür ortamının Hippo/Wnt sinyal yollarını hedefleyen miRNA ifadelerine etkisi kontrol grupları ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Doku onarımı, organogenez gibi hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol alan Hippo ve Wnt sinyallerinin 3B kültür ortamında hedeflenmesi tümör gelişimini baskılamada rol oynayan sinyal molekülünün belirlenmesi açısından önemlidir.

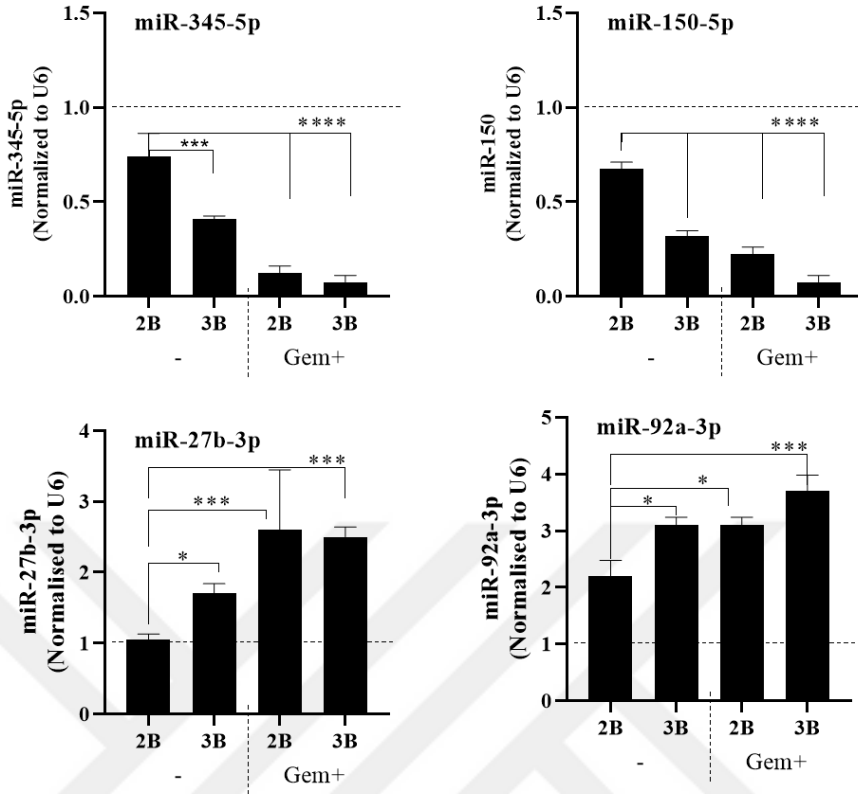
PANC-1 2B ve 3B hücrelerinde gerçekleştirilen miRNA analizinde miR345 ifadesinin 2B hücre grubunda 0,9 seviyesinde olduğu, 3B hücre grubunda ise miR-345 ifadesinin 1,4 seviyesine arttığı görüldü. Dirençli gruba bakıldığında ise 2B ve 3B hücrelerin miR-345 ekspresyon seviyesinin normal hücre grubuna göre neredeyse yarı yarıya oranla düştüğü ancak dirençli 2B ve 3B hücre grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

miR-150 analizinde ise PANC-1 normal 3B hücre grubunda, 2B hücrelere kıyasla miR-150 seviyesinde anlamlı bir azalma görüldü. Dirençli hücrelerde ise miR-150 ekspresyon seviyesinin 2B hücrelerde 0,1 oranına, 3B hücrelerde 0,2 oranına düşüş gösterdiği görüldü. Genel olarak miR-150 ekspresyonunda kontrole kıyasla azalma görülmüş olsa da 3B hücrelerde korelasyon görülmedi.

Yapılan miR-92 analizinde normal 3B hücrelerde miR-27 ekspresyon seviyesinin 2B hücrelere oranla oldukça arttığı ve 1,9 oranından, 2,8'e çıktığı ancak dirençli 2B ve 3B hücrelerdeki kontrole oranla 0,99-1,3 aralığındaki miR-27 artışının korele bir sonuç olmadığı görüldü.

miR-27 üzerinde yapılan PZR analizinde 2B ve 3B normal hücre gruplarında miR-27 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark görülmemiş aynı ekspresyon seviyesinde olduğu görülmüştür. Dirençli hücre grubunda 2B hücrelerde miR-27 ekspresyon seviyesinin 2,1'e çıktığı 3B hücrelerde ise bu oranın 2,4 seviyesine çıktığı görülmüş ancak sonuç anlamlı bulunmamıştır. Normal ve dirençli grubu kendi içerisinde kıyaslandığında ise miR-27 ekspresyon seviyesinin dirençli hücrelerde yukarı regülasyon gösterdiği görüldü (Şekil 32).

MiaPaCa-2



Şekil 33. Gem+ ve normal MiaPaCa-2 hücrelerinin 2B ve 3B formlarında miR-345, miR-150, miR-92a-3p ve miR-27b-3p ekspresyon seviyelerinin incelenmesi. Bağlı miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR reaksiyonu ile incelendi ve sonuçlar RNU6 internal kontrole göre normalize edildi. Elde edilen sonuçlar üç yarı deneyin iki tekrarlı sonucunun ortalama/st.sapma değerleridir. *p<0,05, **p<0,02, ***p=0,001, ****p<0,0001

MiaPaCa-2 2B ve 3B hücrelerinde gerçekleştirilen miRNA analizinde miR345 ifadesinin 2B hücre grubunda 0,7 seviyesinde olduğu, 3B hücre grubunda ise miR-345 ifadesinin 0,3 düzeyine düştüğü görüldü. Dirençli gruba bakıldığında ise 2B ve 3B hücrelerin miR-345 seviyesinin normal hücre grubuna göre neredeyse yarı yarıya düştüğü ancak 2B ve 3B dirençli hücrelerin arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

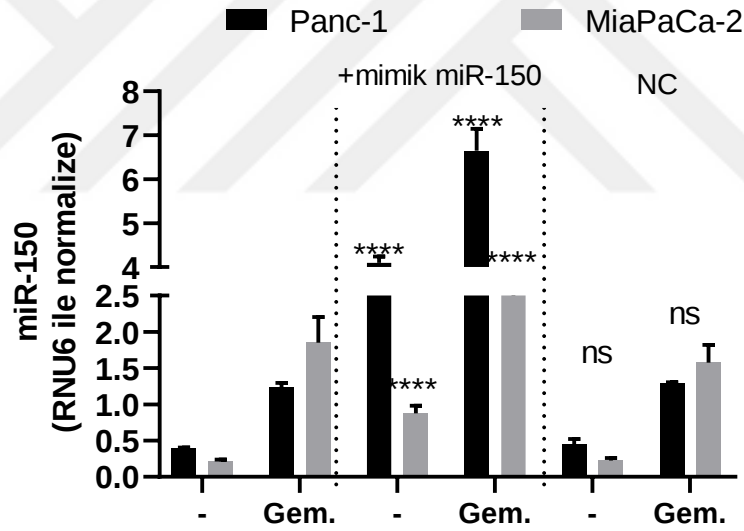
miR-150 analizinde ise normal MiaPaCa-2 3B hücrelerinin, 2B hücrelere kıyasla miR-150 seviyesinde anlamlı bir azalma görüldü. Dirençli hücrelerde ise miR-150 seviyesinin 2B hücrelerde 0,3 oranından, 3B hücrelerde 0,1 oranına düştüğü görüldü.

Yapılan miR-27 analizinde normal 3B hücrelerde miR-27 seviyesinin 2B hücrelere oranla arttığı ve 1,8 seviyesinde olduğu ancak dirençli 2B ve 3B hücrelerdeki miR-27 artışının sonuçlarla korele olmadığı görüldü.

Yapılan PZR analizinde miR-92 ekspresyon seviyesinin 2B hücrelerde 2,1 seviyesinde olduğu 3B hücrelerde ise bu seviyenin 2,9 oranında çıktığı ve anlamlı bir artış olmadığı görüldü. Dirençli hücre grubunda ise benzer sonuçla karşılaşıldı. miR-92 ekspresyon seviyesinin 3B hücrelerde 2B hücrelere kıyasla 0,3 oranında bir artış görüldü. 2B/3B kontrol ve dirençli hücreler gruplarında miR-92 ekspresyon seviyesi artışının birbiri ile korele olduğu görülse de bu artış anlamlı bulunmadı (Şekil 33).

4.11. PANC-1 ve MiaPaCa-2 Pankreas Kanseri Hücrelerine miR-150 Transfeksiyonu ve Gemsitabin Uygulaması

PANC-1 ve MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine Gemsitabin uygulamaları ve sentetik miR-150 transfeksiyonu sonrası miR-150 ifadesi gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmiştir. PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde GEM uygulamasını takiben miRNA analizi gerçekleştirilmiştir.

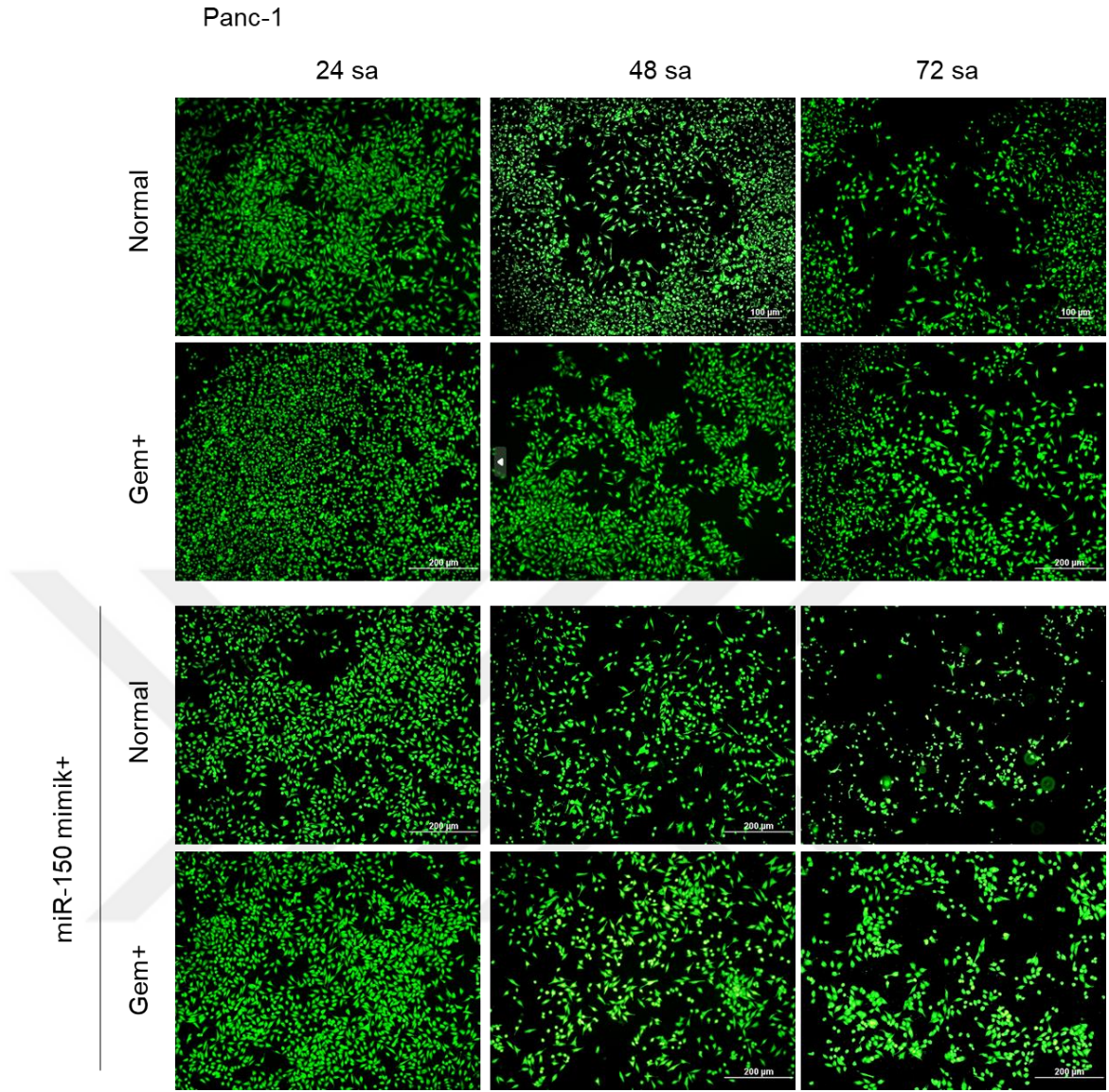


Şekil 34. PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyonu sonrası Gemsitabinin belirtilen miRNA ifadesine etkisi. PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri sentetik miR-150 ve negatif kontrol (NC) ile 48 saat boyunca transfekte edildi. miRNA izolasyonu sonrası miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak belirlendi. Normalizasyon internal endojen kontrol RNU6 ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar iki farklı deneyin 2 tekrarlı verilerinin ortalama/St. Sapma değerleridir (*p<0,05, ****p<0,0001).

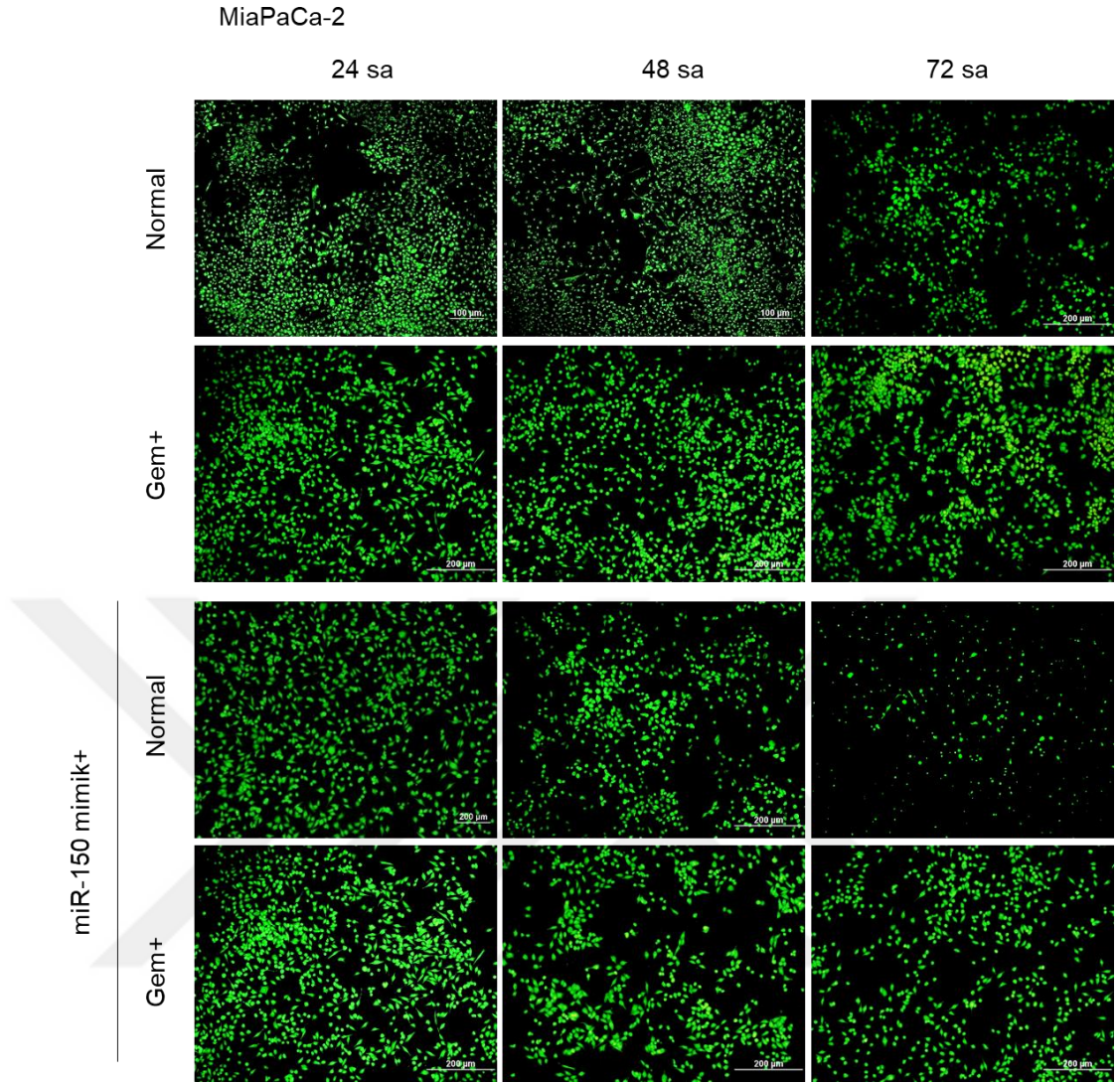
İlaç uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla miR-150 seviyesinde artış görülmüştür. Sentetik miR-150 transfeksiyonu ile PANC-1 2,5 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi 0,75 kat artmıştır. Kontrol grubuna kıyasla miR-150 mimik transfekte edilen PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerine Gemsitabin uygulaması miR-150 ifadesini PANC-1’da 6,5 kat MiaPaCa-2’de ise 2,5 kat arttırmıştır. NC ise negatif kontrol olarak, bilinen miRNA işlevi üzerinde tanımlanabilir bir etkisi olmayan transfeksiyon kalitesini kontrol etmek ve hedef gen ekspresyonu üzerinde deneysel miRNA mimik/anti-miR'nin değerlendirilmesi için kullanıldı. Kontrol grubu ile kıyaslandığın NC transfeksiyonunu ile anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 34).

4.12. Pankreas Kanseri Hücrelerinin miR-150 ve Gemsitabin Uygulamaları ile Zamana Bağlı Sağkalım Analizi

2B PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde transfeksiyon protokolünü takiben hücreler 24 saat Gemsitabin ile muamele edildi. Ardından canlı hücrelerin mitokondriyel membranlarına nüfuz eden DiOC6 floresan boyası ile canlı hücreler floresan mikroskobu ile gözlemlenmiştir. PANC-1 transfekte edilmeyen kontrol grubunda GEM uygulanmış normal ve dirençli hücreler kıyaslandığında ilaç uygulamasının dirençli hücrelerin hücre canlılığında anlamlı bir etki yaratmadığı görülmüyorken buna kıyasla, miR-150 ifadesi arttırılan grupta hücre canlılığında, anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 35).



Şekil 35. 2B PANC-1 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Gemsitabinin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücelere miR-150 ifadesinin arttırılmasının ardından, miR-150+ ve normal PANC-1 hücrelerinde 100 nM GEM varlığında (24 sa) ve yokluğunda DiOC6 boyaması yapılarak hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Boyanmanın ardından hücreler floresan mikroskopta incelenmiştir.

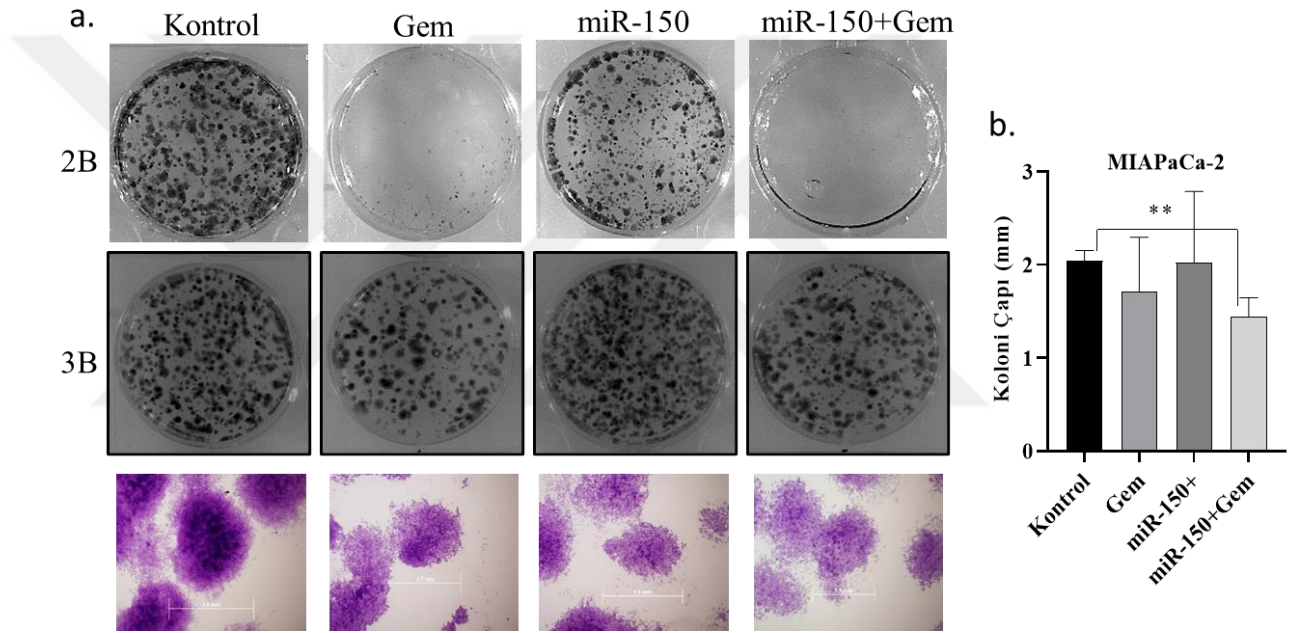


Şekil 36. 2B MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Gemsitabinin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücelere miR-150 ifadesinin artırılmasının ardından, miR-150+ ve normal MiaPaCa-2 hücrelerinde 100 nM GEM varlığında (24 sa) ve yokluğunda DiOC6 boyaması yapılarak hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Boyanmanın ardından hücreler floresan mikroskopta incelenmiştir.

2B miR-150+ MiaPaCa-2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Gemsitabin hücre canlılığını azaltmada oldukça etkili olmuştur. MiaPaCa-2 dirençli hücrelerinin hücre canlılığı da miR-150+ transfeksiyonu sonrasında GEM uygulanan grubun hücre canlılığında anlamlı şekilde azalma görülmüştür (Şekil 36) .

4.13. miR-150 Mimik Transfeksiyonu ve Gempitabin Uygulamasının Pankreas Kanseri Hücrelerinde Koloni Oluşturma Etkisinin Gösterilmesi

Asılı damla modeli ile MiaPaCa-2 hücrelerinden elde edilen sferoid formlardan 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekim yapılmış ve deney gruplarının 3B hücre formlarında koloni oluşturabilme potansiyelleri incelenmiştir. Ek olarak 2B hücrelere miR-150 transfeksiyonunu takiben normal ve dirençli hücrelerde Gempitabinin koloni oluşturma potansiyeline etkisi incelenmiştir. Kristal viyole ile boyamanın ardından ışık mikroskobu altında kolonilerin çapları ölçülmüş ve analizi yapılmıştır.

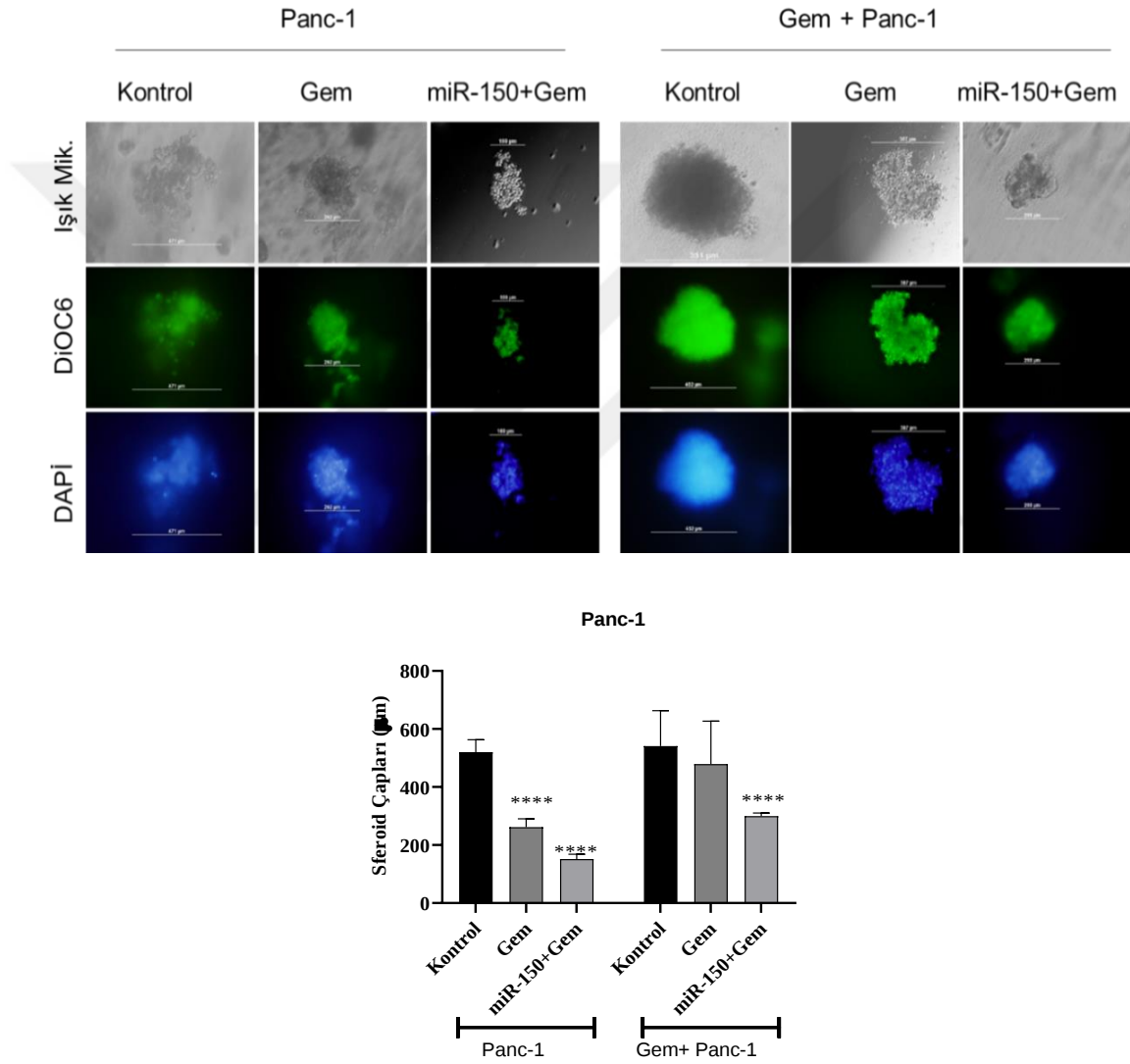


Şekil 37. a. miR-150+ ve/veya GEM uygulanan MiaPaCa-2 hücrelerinin ekimlerinin yapılması ile kristal viyole boyamasının ardından koloni oluşturma potansiyelleri tespit edildi. Kolonilerin çapları ışık mikroskobu altında görüntülendi ve çapları ölçüldü. b. MiaPaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerinde deney grupları arasında çoklu karşılaştırma analizi ile anlamlı fark bulundu.

MiaPaCa-2 +miR-150+Gem grubunun koloni formasyon potansiyelinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı görülmektedir (Şekil 38). Aynı sayıda ekim yapılan 2B hücreleri ile kıyaslandığında hücrelerin 3B hücrelerinden elde edilen sonuçlara göre anlamlı ölçüde koloni oluşturduğu görülmüştür. 3B MiaPaCa-2 hücre formlarından yapılan ekim sonucunda deney grupları arasında miR-150 ifadesindeki artış ile GEM uygulamasının dirençli hücre hattındaki koloni çaplarının anlamlı ölçüde küçülmesi ve azalmasına neden olduğu grafik analizi ile gösterilmektedir.

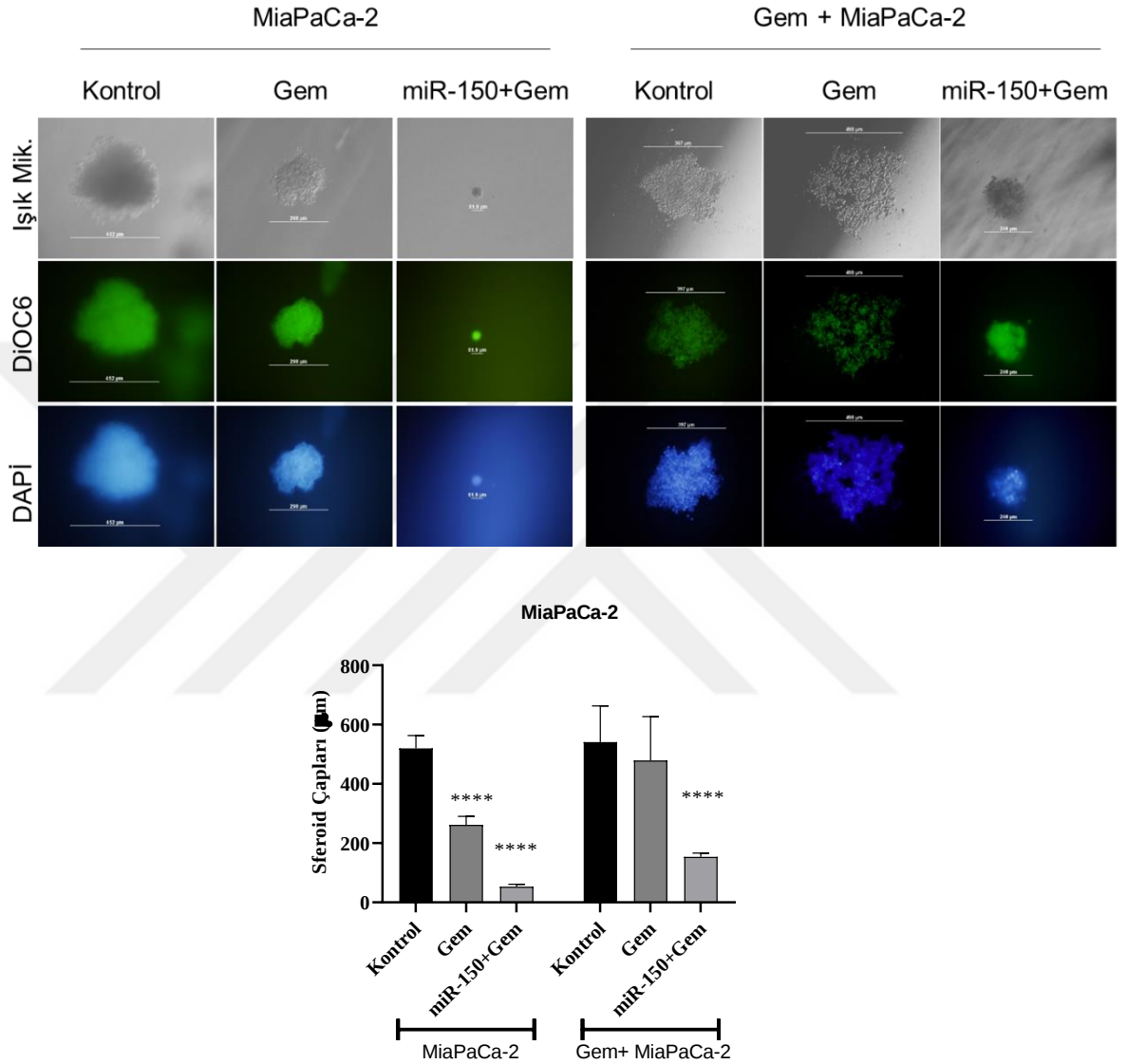
4.14. miR-150 Mimik Transfeksiyonu ve Gempitabin Uygulamasının Pankreas Kanseri Hücrelerinin 3B Hücre Formlarına Etkisinin Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Deneyi ile İncelenmesi

Çalışmamızda PANC-1 ve MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin, yüzeyden bağımsız ortamda oluşturdukları 3B formları yumuşak agar yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin oluşturdukları 3B formların çapları 3. ve 4. haftalarda ışık mikroskobu altında ölçülmüştür.



Şekil 38. Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile miR-150 transfeksiyonu sonrası koloni oluşturma etkisinin gösterilmesi. Panc-1 ve Gem+ Panc-1 hücrelerinde miR-150 transfeksiyonu ile gerçekleştirilen GEM kombine uygulamalarının sferoid oluşumundaki etkisi 3 hafta sonra gözlemlendi ve sferoid çapları ölçüldü. DAPI ve DiOC6 boyalarının uygulanması ile sferoidler ışık ve floresan mikroskobu altında uygun filtreler aracılığı ile görüntüldü. (****p<0,0001).

Dirençli hücre grubu kendi kontrol grubu ile kıyaslandığında miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerde, koloni çaplarındaki azalmaya bağlı olarak mirR150+ etkili Gemitabin uygulamasının 3B hücre formu oluşumunu önemli ölçüde baskıladığı gözlenmiştir (Şekil39-40).



Şekil 39. Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile gemitabinin miR-150 transfeksiyonunun sonrası koloni oluşturma üzerindeki etkisinin gösterilmesi. MiaPaCa-2 ve Gem+ MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 transfeksiyonu ile gerçekleştirilen kombine uygulamalarının 3B formu oluşumundaki etkisi 3 hafta sonra gözlemlendi ve sferoid çapları ölçüldü. DAPI ve DiOC6 boyalarının uygulanmasının ardından deney gruplarının oluşturduğu sferoidler ışık ve floresan mikroskobu altında uygun filtreler aracılığı ile görüntülendi. (****p<0,0001).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerde, koloni formlarının çaplarındaki azalmaya bağlı olarak 3B hücre formu oluşumunun önemli ölçüde baskılandığı gözlenmiştir. Aynı zamanda 3B hücre formlarında kontrol grubuna kıyasla miR-150 ifadesi arttırılan normal ve dirençli hücreler ile Gemitabin uygulaması yapılan hücre grubundaki koloni çaplarında anlamlı ölçüde küçülme gözlemlenmiştir.

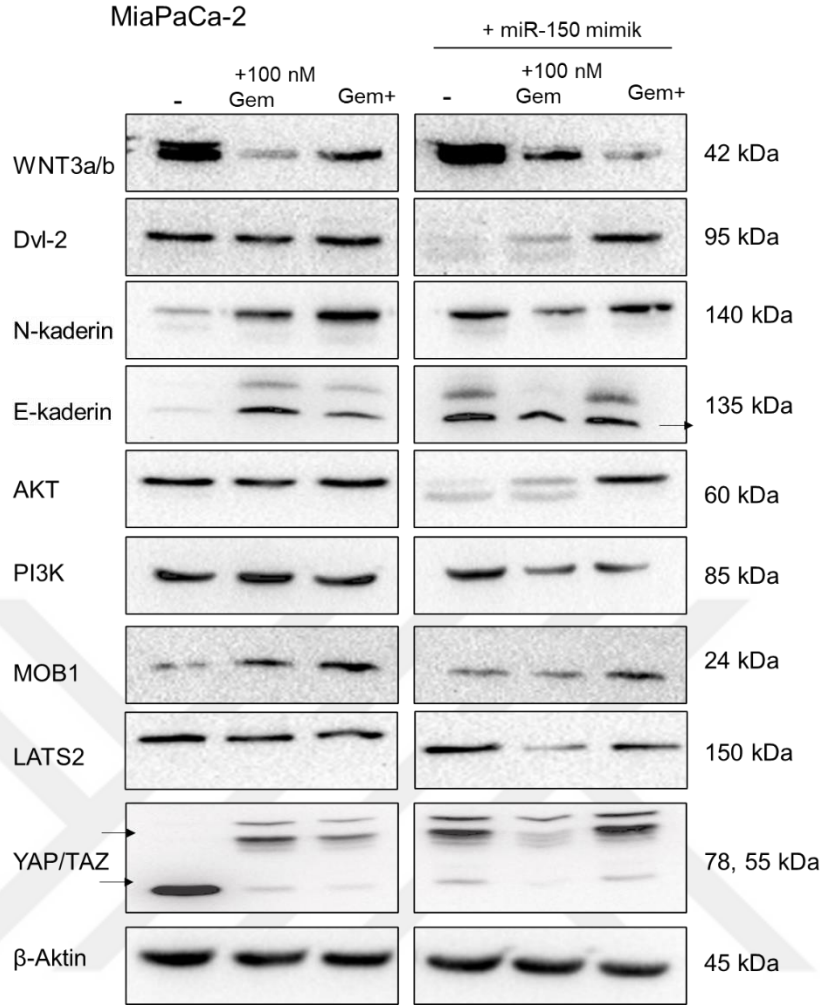
Hem MiaPaCa-2+miR-150+GEM hem de PANC-1+miR-150+GEM grubunda kontrol grubuna kıyasla koloni çaplarında anlamlı ölçüde azalma görülmektedir. PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde artan miR-150 ifadesi ve GEM uygulamasının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde koloni çaplarının küçülmesine neden olduğu grafik analizi ile gösterilmektedir.

4.15. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyon ile Gemitabin Uygulamasının Direnç Mekanizmasında Rol Alan Protein İfadelerine Etkisi

2B ve 3B hücre formlarında direnç mekanizmaları miR-150 transfeksiyonlarını takiben Gemitabin varlığında ve yokluğunda immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. Hippo/Wnt sinyallerinin yanı sıra hücre sağkalımı ve metastazı ile ilgili PI3K/Akt/mTOR ve EMT sinyallerinde görev alan protein ifadeleri incelenmiştir (Şekil 41-42).

MiaPaCa-2 2B hücrelerinde yapılan immunoblotlamda epitel belirteç olan E-kaderin ve N-kaderin seviyeleri incelenmiştir. miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerde N-kaderin ifadesinin kaybı görülürken, E-kaderin ifadesinin arttığı görüldü. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ekspresyon seviyesindeki bu fark miR-150 ifadesinin arttırılmasının Gemitabin kaynaklı EMT'yi önlediğini gösterir.

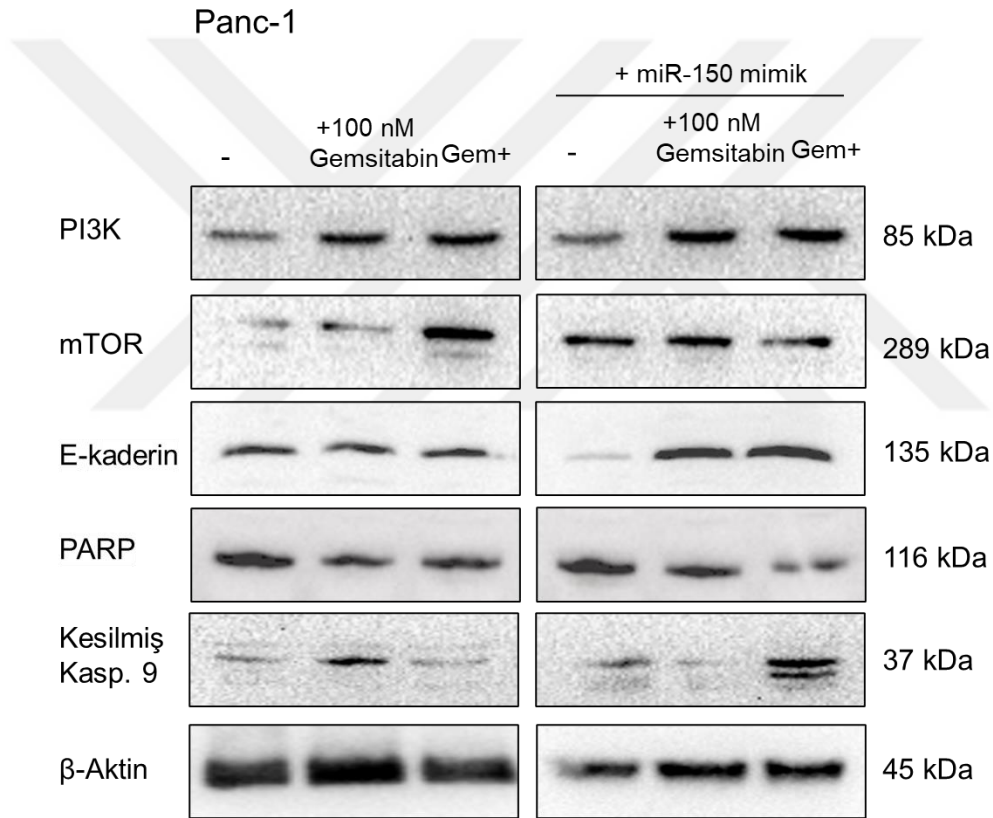
Western blot sonuçları, MiaPaCa-1 hücrelerinde GEM direncinin gelişimi sırasında, dirençli hattında mTOR ve AKT ekspresyonunun anlamlı ölçüde yukarı regüle edildiğini göstermişti. miR-150 ifadesi arttırılmış dirençli hücreler ile kontrol grubunu kıyaslandığında ise miR-150 ifadesi arttırılmış dirençli hücrelerdeki mTOR ve PI3K ekspresyonunun gözle görülür bir şekilde azaldığı görüldü.



Şekil 40. MiaPaCa-2 2B hücre formlarında miR-150'nin Gempitabin varlığında direnç mekanizmalarına etkisi. miR-150 transfeksiyonlarını takiben 24 sa 100 µM Gempitabin uygulaması yapıldı. Total protein izolasyonu sonrası 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. WNT3a/b, Dvl-2, E-kaderin, N-kaderin, AKT, PI3K, MOB1, LATS2 ve YAP/TAZ ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. β-aktin, yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Önemli rolü ve kanser kök hücrelerin (KKH) self renewal ve farklılaşma özelliklerinin düzenlenmesi olan Wnt/β-katenin sinyal yolağında Wnt3a/b protein ekspresyonunun dirençli hücrelerde yukarı regüle edildiği ancak miR-150 ile ifadesi arttırılmış MiaPaCa-2 hücrelerine bakıldığında bu protein ekspresyon seviyesinin anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Bu yolağın anormal aktivasyonu pankreas kanserinde gempitabin kaynaklı direnç ile ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda Dvl-2 protein ifadesine bakıldığında miR-150 ifadesinin arttırılması ile birlikte hem normal hücrelerde hem de dirençli hücrelerde Gempitabin uygulamasının etkili olduğu ve Dvl-2 ifadesinin baskılandığı görüldü.

Normal hücrelerde p-YAP proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin aşağı regüle edildiğini ve YAP/TAZ proteininin ekspresyon seviyesinin ise yukarı regüle edildiğini görülmüştü. miR-150 ifadesinin arttırılmasını takiben YAP/TAZ protein ekspresyon seviyesinin aşağı regüle edildiği kaydedildi. Aynı şekilde MOB1 protein ifadesine bakıldığında miR-150 ifadesinin arttırılan normal ve dirençli hücrelerde kontrol grubuna kıyasla protein ifadesinin düştüğü görüldü. LATS2 protein anlatımına bakıldığında ise benzer şekilde miR-150 ifadesinin arttırılmış olan normal ve dirençli hücrelerde kontrol grubuna kıyasla iki hücre grubunda da protein ifadesinin düştüğü görüldü. Bu sonuçlar, Hippo sinyal yolağının, PK hücrelerinin GEM'e direncinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 41. PANC-1 2B hücre formlarında miR-150'nin Gemcitabin varlığında direnç mekanizmalarına etkisi. miR-150 transfeksiyonlarını takiben 24 sa 100 μ M Gemcitabin uygulaması yapıldı. Total protein izolasyonu sonrası 30 μ g protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. PI3K, mTOR, E-kaderin, PARP ve kesilmiş cas9 ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. β -aktin, yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Western blot sonuçları, PANC-1 hücrelerinde GEM direncinin gelişimi sırasında, dirençli hücre hattında mTOR ve AKT ekspresyonunun anlamlı ölçüde yukarı regüle edildiğini göstermişti. miR-150 ifadesi arttırılmış dirençli hücreler ile kontrol grubunu

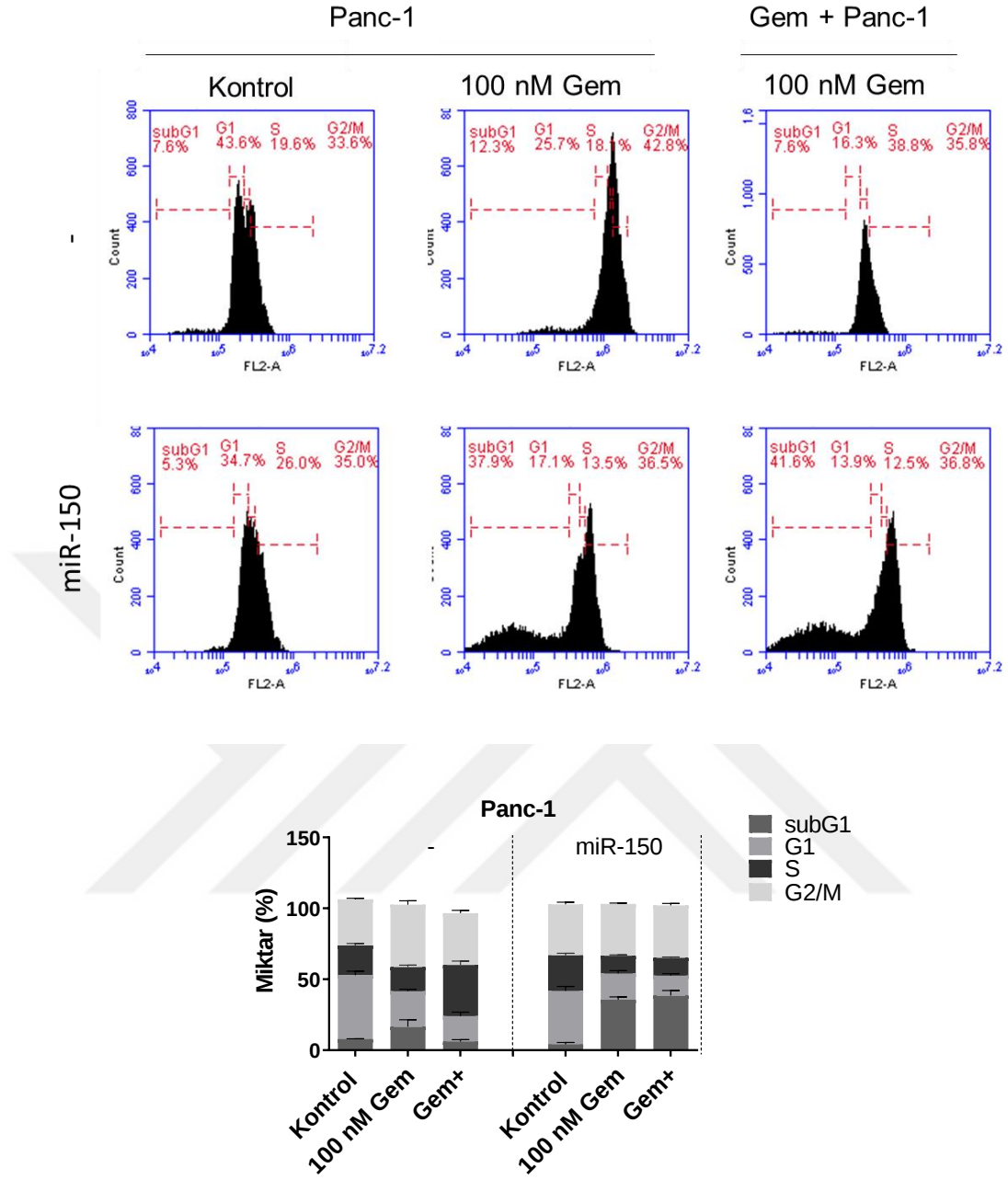
kıyaslandığında ise miR-150 ifadesi arttırılmış dirençli hücrelerdeki mTOR ve PI3K ekspresyonunun gözle görülür bir şekilde azaldığı ancak gemitabin uygulanmış normal hücrelerde bu protein ifadeleri aşağı regüle edilirken mimik miR-150 uygulaması sonucu miR-150 ifadesi arttırılmış normal ve normal + GEM grubu hücrelerde mTOR ve PI3K protein ifadesi anlamlı derecede artmış olduğu görüldü.

Epitel belirteç olan E-kaderin seviyeleri incelenmiştir. PANC-1 hücrelerinde yapılan immunoblotlama sonuçlarına göre Gemitabine dirençli hücrelerde, E-kaderin protein ifadesin aşağı regüle edildiği görülmüştü. miR-150 ifadesinin arttırılmasını takiben hem normal + GEM hem de dirençli grupta E-kaderin ekspresyon seviyesinde belirgin artış olduğu görüldü.

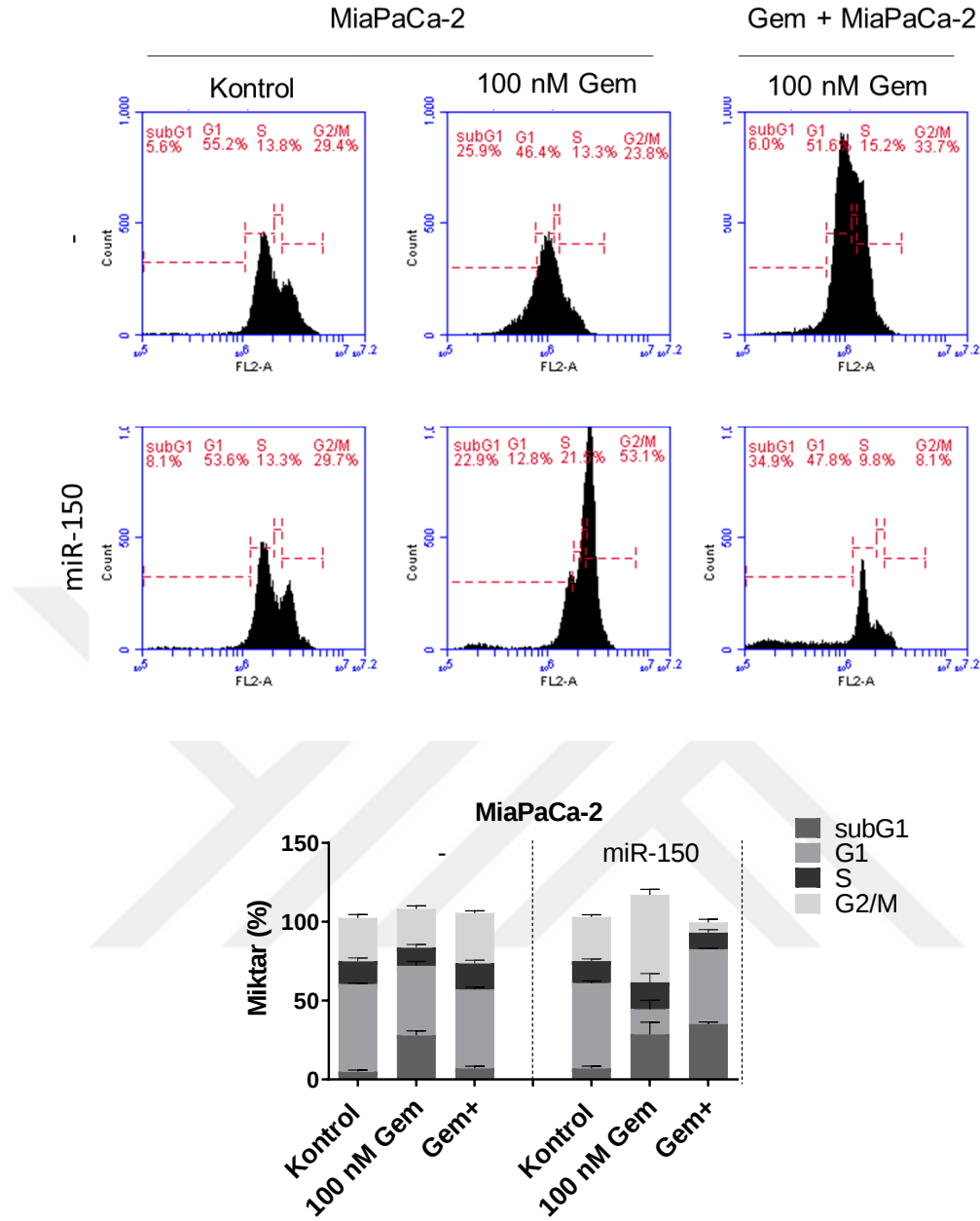
PANC-1 normal ve GEM'e dirençli hücrelerdeki PARP seviyelerine bakıldığında dirençli hücrelerdeki PARP ifadesinde önemli bir artış olduğu gözlemlenmişti, mimik miR-150 uygulaması sonucu miR-150 ifadesi arttırılmış normal ve dirençli hücrelerde ise PARP ifadesinin anlamlı derecede azaldığı görüldü. Yine kesilmiş kaspaz 9 protein ifadesine bakıldığında miR-150 ifadesi artmış olan hücre gruplarında yüksek derecede yukarı regüle olduğu görüldü. Bu durum, miR-150 ifadesinin arttırılması ile Gemitabin aracılı apoptozun indüklendiğini gösterir.

4.16. Mir-150 Mimik Transfeksiyonu Yapılan PANC-1 Ve Miapaca-2 Hücrelerinde Gemitabinin Hücre Döngüsü Fazları Üzerindeki Etkisi.

Gemitabin direncine sahip hücrelerin miR-150 mimik transfeksiyonlarının ardından hücre döngüsüne ve apoptotik hücre ölümüne etkisi Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde propidium iyodür boyaması ardından hücre akış sitometrisinde incelenmiştir.



Şekil 42. miR-150 mimik transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Gem+ Panc-1 hücrelerinde gemsitabinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisi. PI ile boyanan hücreler hücre akış sitometrisinde 104 hücre okutularak gerçekleştirildi. Histogram analizi ile temsil edilen sonuçlar iki ayrı deneyin ortalama $\pm$ Std.Sap. olarak sunuldu.



Şekil 43. miR-150 mimik transfeksiyonu yapılan MiaPaCa-2 ve Gem+ MiaPaCa-2 hücrelerinde gemsitabinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisi. PI ile boyanan hücreler hücre akış sitometrisinde 104 hücre okutularak gerçekleştirildi. Histogram analizi ile temsil edilen sonuçlar iki ayrı deneyin ortalama $\pm$ Std.Sap. olarak sunuldu.

Panc-1 hücrelerine gemsitabin uygulaması subG1 popülasyonunun %15 seviyelerine arttırmıştır. Ek olarak, G2/M fazında %10 luk bir artışa sebep olarak, apoptotik olmayan hücrelerin G2/M fazında tutulu kalmasına sebep olmuştur. Gemsitabine dirençli olan hücrelerde S ve G2/M oranı sırasıyla ortalama % 35 ve % 38 oranında gözlenmiştir. miR-150 ifadesi arttırıldığında gemsitabin varlığında apoptotik hücre

ölümü %37 seviyesine yükselmiştir. En önemlisi gempitabine dirençli Panc-1 hücreleri %41 oranında apoptotik hücre popülasyonu gözlenmiştir (Şekil 33).

MiaPaCa-2 hücrelerine gempitabin uygulandığında apoptotik popülasyon %26 oranında gözlenmiştir. Gem+ MiaPaCa-2 hücrelerinde G1 oranı %51, S oranı %15 ve G2/M oranı %33 seviyesinde olup, ilaç uygulanmayan kontrol gurubu ile benzer oranlara sahiptir. miR-150 ifadesi arttırıldığında gempitabin uygulanan MiaPaCa-2 hücrelerinde G2/M fazında bir tutulma gözlenmiş, bu fazdaki popülasyon oranı % 30 artmıştır. Gem+ MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyonu sonrası ortalama %30 oranında apoptotik hücre popülasyonunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 34). Sonuç olarak miR-150 ifadesinin gempitabine dirençli iki farklı hücre grubunda programlı hücre ölümü arttırdığı analiz edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Hücreesel genetik değişiklikler kanser hastalığına yol açabilir. Kanser genetik bir hastalıktır ve temel olarak onkogenlerin aktivasyonu, tümör supresör genlerin hasarı veya dış faktörlere bağlı mutajenez gibi çeşitli risk faktörlerinden dolayı ortaya çıkar. Kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasındadır. 2022 yılında dünya çapında yaklaşık 20 milyon yeni vaka ve 9,7 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. Kanserinin moleküler seyrine müdahale etmeyi amaçlayan hedefe yönelik tedaviler ve teşhis stratejilerinin geliştirilmesi devam etmektedir [79].

Kanserin ilerlemesi evrimsel bir süreçtir. Bu süreç içerisinde evrim geçiren kanser hücre popülasyonları, vücutta primer tümör, dolaşım sistemi ve çeşitli metastatik bölgeler gibi vücutta çeşitli ekolojik nişlerle karşılaşır. Kanser ilerlemesi bir evrimsel süreçtir. Bu süreçte evrim geçiren kanser hücre popülasyonları, ana tümör, dolaşım sistemi ve çeşitli metastatik siteler gibi vücudun içinde kısıtlayıcı ekolojik boşluklarla karşılaşır. Kanser evrimini ve ilerlemesini önlemek veya geciktirmek için, altta yatan moleküler süreçlerin ayrıntılı anlaşılması gerekmektedir [80].

PDAK, ölüm oranının en yüksek olduğu kanser türlerinin başında gelmektedir. Sistemik tedavilerde gelişmelere rağmen sağkalım oranı hala düşüktür. Hastaların sadece %5'inin azının teşhis sonrası sağ kalım süresi 5 yıl olmaktadır. Agresifliği nedeniyle PK, yüksek mortalite ve kötü prognoz ile karakterizedir. Cerrahi rezeksiyon en etkili PK tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir; ancak belirgin semptomların ve etkili tümör biyobelirteçlerinin bulunmaması nedeniyle, nispeten az sayıda tanı konulmuş hastalarda ileri aşamaya gelmeden önce ilk rezeksiyon yapılabilir. Bu nedenle kemoterapi, lokal ileri evre, rezekte edilemeyen, metastatik PK hastalarının tedavisinde giderek daha önemli hale gelmiştir [81].

Tek başına gempitabin (GEM) ve GEM bazlı kemoterapiler, PK için standart tedaviler olarak kabul edilmiştir; ancak kanser hücrelerinin antikanser ajanlara karşı direnç geliştirmesi, malign tümörlerde kemoterapinin başarısızlığının ana nedenidir. Bu hem içsel direnci hem de kazanılmış direnci içerir. Kazanılmış direnç, antikanser ilaçların doğal seleksiyonunun bir sonucudur, başlangıçta hassas olan bir kanserde, antikanser ilaç tedavisi sırasında yavaş yavaş gelişen bir dirençten oluşur ve tüm kanser hastalarının neredeyse yarısında ortaya çıkar. GEM'e karşı içsel veya edinilmiş direnç görülebilir. Genellikle gempitabine dirençli pankreas kanseri, PK hastalarında ortaya

ıkan kazanılmış dirençlerden biridir ve bu PK hastalarında kemorezistans ile sonuçlanmaktadır [82], [83]. Bugüne kadar GEM direnciyle ilgili birçok önemli moleküler hedef ve yolak ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu mekanizmalar, ilaç taşınması ve metabolizmasının düzenlenmesi, DNA hasarı onarım aktivasyonu, apoptoz sinyal yolu düzenlenmesi, pro-survival sinyal yolu aktivasyonu ve EMT olarak örnek verilebilir. Ayrıca Akt, EGFR, Notch, MAPK, NF-B ve Wnt/ β -katenin, SHH gibi büyüme, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, invazyon ve anjiyogenezi düzenleyen sinyal yolakları doğrudan veya dolaylı olarak pankreas tümörü kemosenitivitesini etkilediği görülmüştür. PK de dahil olmak üzere birçok tümör tipinde kemorezistans önemli bir faktördür ancak kesin etki mekanizması tam olarak anlaşılamaması ve geri dönüşü olmayan terapötik direncin oluşması, kemoterapi alan hastalar için bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, PK'de GEM direncinin altında yatan mekanizmaların kapsamlı bir alışması, GEM bazlı kemoterapi alan hastaların kemorezistansının ve prognozunun öngörülmesi için potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesine yardımcı olabilir[82].

miRNA'ların PK tümör oluşumuna dahil olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. miRNA'ların yüksek veya düşük anlatımı, çoklu hedef mRNA'ları ve dolayısıyla birden fazla proteinin ekspresyonunu etkileyebilir ve çeşitli hüresel süreçler yoluyla kanser hrelerinin ilaca direncinde rol oynayabilir. Bu sebeple kanser dahil birçok hastalığın teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilecek umut vadedici potansiyele sahiptirler [81]. PK hrelerinden alınan örnekler ile 95 adet miRNA profillemesinin yapıldığı çalışmada normal hücelere göre miR-196a, miR-190, miR-221, miR-222, miR-200b, miR-15b and miR-95 ifadelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir [52]. Yapılan çalışmalara baktığımızda *Gu* ve *ark*. miR-3178'in, PANC-1 hrelerine kıyasla gemsitabin dirençli PANC-1 hrelerinde ABC taşıyıcı aracılı RhoB/PI3K/Akt yolunu yukarı regüle ederek gemsitabine karşı kemorezistansı desteklediğini belirtmiştir [84]. *Wang* ve *ark*. ise gemsitabin direncinden bahsetmeseler de miR-520h ile ABCG2 arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir [85]. Yine yapılan bir çalışmada, miR-21 ifadesi baskılanması ile Bcl-2 anti-apoptotik protein ifadesinde azalmaya bağlı olarak, gemsitabinin PK hrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [55]. Pankreas kanseri patogenezinde rol alan miR-150-5p'nin, azalan ifade seviyesinin karsinogenez ile negatif ilişkili olduğu literatürde yer almaktadır. miR-150-5p üzerinde yapılan bir çalışmada, miR-150 ekspresyonunun tiroid kanseri

dokularında anlamlı ölçüde azaldığı, RAB11A aracılı WNT/ β -katenin yolunu inhibe ederek tiroit kanseri hücrelerinde baskılayıcı bir gen olarak işlev görebileceği bulunmuştur [86]. Anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların neden olduğu kemorezistansın moleküler mekanizmasını incelemek gelecekte spesifik miRNA'ların ekspresyon profilleri ve bireysel tümörlerin başlamadan önce farklı tedavilere direnci hakkında yeni bilgiler sağlayabilir [81].

Son zamanlarda 3B *in vitro* modeller, hem kanser hem de çeşitli hastalık türlerinin araştırmalarında kapsamlı bir şekilde geliştirilmiştir [74]. 3B modeller, klinik olarak 2B hücre kültürlerinden çok daha önemli modellerdir. Hem kanser heterojenliği hem de hücrel etkileşimleri ve dokuları daha iyi taklit edebilme özellikleri sayesinde hastalık çalışmaları için tercih edilmektedir. Sferoid ve organoid formlar 2B hücre kültürlerine göre ECM ve hücre-hücre etkileşimi açısından tümör dokusu taklit edebilen yapılar olmalarıyla birlikte kanser kök hücre (KKH) davranışı ve farklılaşmasının analiz edilebileceği formlardır. Dolayısıyla dirençli hücrelerin oluşturacağı 3B modellerin KKH popülasyonu açısından zengin olacağı öngörülmektedir. Bu kazanımlara göre, 3B hücre kültürünün yeni tedavi stratejileri için kullanılması diğer tedavi yöntemlerinden çok daha öne çıkmaktadır [70], [72].

Çalışmamızda metastatik profile sahip PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri gemsitabine dirençli hale getirilmesinin ardından sferoid yapıda 3B kültür formları oluşturulacaktır. Bu şekilde 2B ve 3B hücre kültürlerinde gemsitabin artı miRNA bazlı tedavilerin, PK kemorezistansı üzerindeki keşfi için belirlediğimiz miRNA'lar ile ilaç yanıtı/direnç arasındaki ilişki değerlendirilecektir.

İlk olarak Gemsitabine dirençli (Gem+) ve normal PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücre hatlarının gemsitabine karşı hücre canlılığı testi, MTT hücre canlılığı analizi ile yapılmıştır. Her iki hücre hattının 10 nM gemsitabine dirençli olduğu gözlenmiştir. 20 nM gemsitabin PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücre canlılığında sırasıyla %40 ve %45 azalmaya sebep olurken, Gem+ PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücre canlılığında ancak %10 ve %20 azalma gözlenmiştir. 50 nM ve 100 nM gemsitabin PANC-1 hücre canlılığında sırasıyla %35 ve %27 azalmaya sebep olurken, dirençli hücrelerde bu oran %85 ve %75 olmuştur. Mia-PaCa-2 hücrelerine baktığımızda 50 nM ve 100 nM gemsitabin hücre canlılığında sırasıyla %50 ve %32 azalmaya sebep olurken, dirençli hücrelerde bu oran %83 ve %74 olmuştur (Şekil 22, Şekil 23).

Dirençli hücrelerde hücre canlılığının iki hücre hattında da benzerlik göstermesi ve kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığının %50'nin altına düşmeyip azalmaması, 100 nM gempitabin varlığında büyütülen bu dirençli hücrelerin, ilaçtan 10 pasajdan fazla uzaklaştırıldığında da direncini koruduğu ve fenotipin stabil olduğu kabul edilmiş, gempitabine dirençli hücre hattı elde edildiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, gempitabine direnç mekanizmalarını araştırılmak üzere sürekli gempitabin maruziyeti altında MiaPaCa-2 hücre hattı seçilmiş ve 20 nM gempitabin dozu ile başlanmıştır. Artan gempitabin konsantrasyonları ile 16 haftalık sürekli inkübasyonun ardından, 90 nM gempitabine sürekli maruziyet altında ilaca dirençli bir popülasyon ortaya çıktığı görülmüştür. Direnç, sitotoksik ilaç dozunun artmasıyla kademeli olarak artmış ve 200 nM gempitabin varlığında büyüyen hücreler, ilaçtan 16 geçişten fazla uzaklaştırıldıktan sonra direnci koruduğunda fenotipin stabil olduğu kabul edilmiştir [87]. PANC-1 ve MiaPaCa-2 PK hücre hatlarının GEM'e karşı gösterdiği edinilmiş direnç farklılık gösterebilir. Bunun sebebi kanser hücre hatlarının moleküler ve genomik olarak farklılıkları söylenebilir. Pankreas tümörlerinin kemoresistansında rol oynayan 165'ten fazla gen tanımlanmıştır. PANC-1 hücreleri RAS ve CDK2N/p16 genlerinin mutasyonuna sahip metastatik profil gösterirken, MiaPaCa-2 hücreleri ise KRAS, TP53 ve CDK2N/p16 gen mutasyonuna sahip yüksek metastatik profil göstermektedir [88] .

Hücre sağ kalımının gözlenebilmesi ve hücre canlılığı ile ilgili yapılan analizler ile uyumluluğun tartışılabilmesi için DIOC₆ (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin iyodür) boyaması gerçekleştirilmiştir. DIOC₆ floresan boyama ile mitokondri membran potansiyel (MMP) kaybı belirlenip gözlemlenmiştir. DIOC₆ boyası pozitif yüklü bir boya olup negatif yüklü mitokondriler tarafından tutulur. Diğer yandan MMP bozulmuş apoptotik hücrelerde boya tutunamamaktadır. Bu analiz ile hücre sağ kalımı gözlemlenmektedir. Hücrelerdeki morfoloji değişime baktığımızda 100 nM GEM uygulanmış kontrol grubu ve dirençli (Gem⁺) hücrelerle kıyasla gözle görülür şekilde farklılık gözlemlenmiştir. Kontrol grubu hücreleri tight junction ve parke taşına benzer görünümü ile oldukça kolonize bir morfoloji sergilerken, dirençli hücre grubu hücre-hücre teması kaybıyla, iğ benzeri (spindle-like) bir görünümün yanında psödopod benzeri oluşum da dahil olmak üzere boyut olarak parental hücre grubuna kıyasla daha büyük bir morfoloji sergilemiştir. Bu morfolojik özellikler sıklıkla fibroblast veya EMT benzeri bir fenotip ile ilişkilendirilmektedir. *Zhiwei W, Yiwei Li. ve ark.*

Gemsitabine dirençli hücrelerin uzun ve fibroblastoid benzeri bir morfoloji sergilediği ve buna bağlı kanser kök hücresi benzeri, EMT fenotipini edindiğini; fenotipteki bu değişikliklerin, gemsitabine dirençli hücrelerinin daha önce bildirildiği gibi EMT'ye tabi tutulduğunu göstermiştir [89]. Bununla birlikte *Shah, AN, Summy, JM, Zhang, J. ve ark.* yaptığı çalışmada da gemsitabine dirençli PANC-1 hücrelerinin EMT özellikleri kazandığı gösterilmiştir [90].

Hücre sağ kalımına bakıldığında, canlı hücre sayısındaki değişimler kontrol hücre gruplarında gemsitabine bağlı olarak azalırken dirençli hücre grubundaki GEM'e karşı olan kemorezistans açıkça görülmüştür. Kontrol grubuna 24 sa süreyle 100 nM GEM uygulaması sonucunda MMP'nin azalması, bize tedavi başlangıcındaki PK hücrelerinin GEM'den etkilendiğini ancak kazanılmış dirence sahip PK hücrelerinin aynı doz GEM'den aynı oranda etkilenmediğini göstermektedir (Şekil 24). Bu sonuçlar, aynı zamanda GEM taşıma mekanizmalarının ve ilaç metabolizmasının modifikasyonunu gösterir, bu da hücre içi anti-apoptotik sinyallerin aktivasyonu anlamına gelmektedir. *Chen R, Lai LA, ve ark.* çalışmasında MiaPaCa-2 ve gemsitabine dirençli MiaPaCa-2 hücre hattı geliştirmiştir. Yaptıkları immünofloresan boyama ile dirençli MiaPaCa-2 hücrelerinde sitoplazma ve nükleer boyutlardaki artışla birlikte psödopod oluşumu da dahil olmak üzere MiaPaCa-2 parental hücre hattı ile arasındaki morfolojik fark açıkça gösterilmiştir [91]. Elde edilen sonuçların hem literatür hem de yapılan hücre canlılığı analizi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Yumuşak agar koloni oluşumu tahlili, bu yeteneği in vitro olarak karakterize etmek için oluşturulmuş bir yöntemdir [92]. Kanser hücreleri hücreSEL yüzeyden bağımsız olarak büyüme özelliğine sahiptirler. Yumuşak agar deneyinde oluşturulan in vitro ortam kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Bu amaç ile yumuşak agar koloni oluşturma deneyinde PANC-1 ve MiaPaCa-2 PK hücrelerinin agar ortamında 3B hücre formu oluşturulmaları sağlanmıştır. 3. ve 4. haftalarda GEM uygulamasına bağlı olarak PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin kontrol gruplarındaki sferoid çaplarında azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, gemsitabinin koloni oluşumunu inhibe edici etkisi ile 3B form oluşturma potansiyelindeki etkisini göstermektedir. Dirençli hücre grubuna bakıldığında ise yine diğer sonuçlarla korele olarak GEM uygulamasının etkisinin olmadığı, sferoid çaplarında belirgin bir azalma yaratmadığı görülmüştür (Şekil 25). Bununla birlikte Sferoid kültürlerde DIOC6 boyama ile MMP görselleştirilmiş bu sayede hücrelerin

canlılığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçlara göre, PK hücrelerinin GEM'e direnç kazandığını ancak tedavi öncesinde GEM'in PK hücre hatlarında etkili olduğunu söylemek mümkündür.

PANC-1, MiaPaCa-2 ve Gem+ hücrelerinin gemitabin uygulamasına bağlı olarak koloni oluşturma potansiyellerinin, klonojenik deney olan koloni formasyon deneyi ile incelenmesi amaçlanmıştır. Koloni oluşumları, hücre kolonilerinin fiksasyonunun ardından kristal viyole ile boyanması ile değerlendirilmiştir. Koloni formasyon deneyi, tek bir hücrenin koloni oluşturma yeteneğine dayanan *in vitro* hücre canlılığı deneyidir. Yapılan analizde PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücre hatlarına sırasıyla 50 nM ve 100 nM, dirençli (Gem+) hücre hatlarına 100 nM GEM uygulaması yapılmıştır. 24 sa ilaç uygulamasına tabi tutulan hücrelerin inkübasyonunun ardından koloni oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanan 50 nM GEM'nin koloni boyutlarında yarattığı küçülme ile birlikte koloni oluşturma yeteneklerini engellediği, 100 nM GEM dozunun ise koloni oluşumunu neredeyse tamamen inhibe ettiği görülmüştür. PANC-1 hücrelerinde 50 nM ve 100 nM GEM uygulaması sırasıyla koloni sayısını %75 ve %85 oranında azaltırken, MiaPaCa-2 hücrelerinde 50 nM ve 100 nM GEM uygulaması sırasıyla koloni sayılarını %71 ve %87 oranında azaltmıştır. Dirençli hücre grubuna baktığımızda 100 nM GEM uygulamasının PANC-1 ve MiaPaCa-2 Gem+ hücrelerinde kontrole kıyasla koloni oluşturma potansiyellerinde belirgin bir azalma ve küçülme görülmediği, PANC-1 ve MiaPaCa-2 Gem+ hücrelerinde 100 nM GEM uygulaması ardından koloni sayılarının sırasıyla %25 ve %14 oranında azaldığı görülmüştür. Dirençli hücre grubun da koloni oluşturmak için kontrol grubu kadar bir yetenek gösterdiği görülmektedir (Şekil 26). Bu sonuca göre kontrol grubunda 100 nM GEM uygulamasının, 50 nM GEM uygulamasına kıyasla sitotoksik bir etki gösterdiğini ve koloni oluşturma potansiyellerine ket vurduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca sonuçlar bize erken başlangıçlı GEM uygulamasının PK hücreleri üzerinde etkili olduğunu ayrıca koloni oluşturma yeteneklerine ket vurucu bir etki yarattığını ancak yüksek dozda uygulanan GEM'in ise sitotoksik olduğunu göstermiştir.

PANC-1 ve MiaPaCa-2 Gem+ hücre hatlarına bakıldığında 100 nM GEM uygulaması sonrası koloni oluşturma yeteneklerinin, ilaç uygulanmış parental gruba kıyasla azalmadığı görülmektedir.

Hücrelerin GEM'e belli süre maruz kalmasının ardından epigenetik veya genetik değişiklikler geçirmesi ve bu sayede elde edilmiş olan kazanılmış direnç sonucu koloni sayılarının parental kontrol hücre grubu ile paralel olması literatür ile uyumludur. Majör değişiklikler değerlendirildiğinde, GEM'e dirençli hücre hatlarında AKT ekspresyonunun indüklenmesi aracılığıyla hücre sağ kalımını arttırıcı bir etkisi olduğu düşünülmüştür ve bu potansiyel değerlendirilmiştir. Gao, Y., Zhang, Z. ve ark. yaptığı çalışmada kullanılan BxPC-3 ve gemsitabine dirençli hücrelerinin koloni formasyon deneyi ile *in vitro* koloni oluşturma yetenekleri gösterilmiştir. BxPC-3-Gem hücreleri BxPC-3 ile karşılaştırıldığında koloni oluşturmak için kontrol grubu kadar bir yetenek gösterdiği ve hücre sayısı ile iki grup arasındaki koloni oluşturma potansiyelleri arasındaki önem gösterilmiştir [93].

Hücrelerin 3 boyutlu sferoid kültür oluşturma potansiyellerinin incelenmesi için asılı damla metodu kullanılarak ekimler yapılmıştır. Asılı damla deneyi, 3B hücre kültürü tekniklerinden biridir. Hücre kültür süspansiyonundan oluşturulan damla içerisindeki hücreler yakınlarındaki hücrelerle kurdukları etkileşim ile sferoid form almaktadır. Gemitabinin etkisine bağlı olarak PANC-1, MiaPaCa-2 ve Gem+ hücre grubunun 3 Boyutlu sferoid kültür oluşturma potansiyeli asılı damla modeli deneyi ile gösterilmiştir. Asılı damla modeli deneylerinde zamana bağlı olarak PANC-1 ve MiaPaCa-2 kontrol grubu hücrelerine 50nM ve 100 nM GEM uygulaması yapılmış ve 24, 48 ve 72 saat sürelerince etkisi incelenmiştir, GEM uygulamasının PANC-1 kontrol hücrelerinin 3B sferoid kültür oluşturma potansiyellerine ket vurup, hücre çaplarının belirgin bir biçimde azalttığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ölçülen sferoid çaplarının ortalaması 50 nM GEM uygulaması ile %40 azalırken, 100 nM GEM uygulaması sonucu koloni çaplarının %70 oranında azaldığı görülmüştür. Dirençli (Gem+) hücre grubuna baktığımızda 100 nM GEM uygulamasının etkisinin azaldığını, sferoid çaplarında belirgin bir küçülme görülmediği gibi ayrıca bazı sferoid boyutlarında artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 27, Şekil 28 **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**).

MiaPaCa-2 hücre grubuna bakıldığında GEM uygulamasının kontrol hücrelerinde yine 3B sferoid kültür oluşturma potansiyellerine ket vurduğu, 50 nM GEM uygulamasının hücre çaplarını %50 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. 100 nM GEM uygulaması sonucu ise koloni çaplarının yaklaşık %60 oranında azaldığı görülmüştür. Dirençli (Gem+) hücre grubuna baktığımızda 100 nM GEM uygulamasını takiben

etkinin azaldığı, koloni çaplarında belirgin bir küçülme görülmediği gibi 3B sferoid formda da bozulmalar görülmüştür. Bu duruma bağlı olarak koloni boyutlarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Tüm bu sonuçlar iki hücre hattında da benzerlik göstermektedir.. Sferoid kültürlerde DAPI ve DIOC₆ boyama ile çekirdek ve MMP görselleştirilmiş bu sayede hücrelerin canlılığı kanıtlanmış ve MMP'i gösterilmiştir (Şekil 29, Şekil 30).

Hücrelerin zamana bağlı gemitabin uygulaması ile 3 boyutlu sferoid kültür oluşturma potansiyelleri ve gemitabinin etkisi incelenmiştir. PANC-1 ve Gem+ hücre hatları incelendiğinde gemitabin etkisi parental hücrelerde 48 saatten sonra görülmüş, koloni çaplarında 48 ve 72 saatlerde, 24. saate kıyasla sırasıyla %16 ve %28'lik küçülme gözlemlenmiştir. Gem+ hücrelerde ise gemitabinin etkisinin olmadığı aksine bu dirençli hücrelerin koloni çaplarında artış olduğu gözlemlenmiştir. 24 saate kıyasla ortalama %8'lik bir artış görülmüştür. Gem+ hücrelerdeki bu artış anlamlı ölçüde olmasa da kontrol grubuna kıyasla GEM duyarlılığının azaldığı gösterilmiştir. MiaPaCa-2 hücre hattına bakıldığında ise 24. Saate kıyasla kontrol hücre grubunda 48 ve 72 saatlerinde sırasıyla %18 ve %23'lük bir azalma gösterilmiştir. Gem+ hücre hattına bakıldığında ise koloni çaplarında ortalama %12'lik bir azalma görülmüştür. GEM duyarlılığının kontrol grubunda daha fazla olduğunu ve iki hücre hattı kıyaslandığında PANC-1 hücre hattında daha sinerjistik bir azalma görülmüştür (Şekil 28Şekil 29). *Ashwaq H.S. Yehya, Muhammad Asif ve ark.* yaptığı bir çalışmada tümör canlılığını araştırmak için, farklı proliferatif ve metabolik durumlardaki hücrelerden oluşan ve böylece doğal dokuyu daha doğru bir şekilde taklit eden sferoid tümör modelini kullanmış ve kullanılan ajanın, gemitabine dirençli PANC-1 hücrelerinin canlılığını, işlenmemiş PANC-1 hücrelerine kıyasla sinerjistik olarak azalttığını göstermişlerdir [94].

GEM direncinde rol oynayan sinyal yollarının etkisinin gösterilmesi amacıyla parental ve dirençli hücrelerin protein ifadeleri immunoblotlama analizi ile incelenmiştir. Yapılan western blot çalışmasını sonuçlarına bakıldığında, PANC-1 ve MiaPaCa-1 hücrelerinde GEM direncinin gelişimi sırasında, dirençli iki hücre hattında da mTOR ve AKT ekspresyonunun anlamlı ölçüde yukarı regüle edildiği görülmüştür.

PI3K/AKT/mTOR yolunun pankreas kanseri, meme kanseri gibi birçok malign tümörde anormal şekilde aktive olduğu ve kemorezistansta rol oynadığı bildirilmiştir.

Literatürde PI3K/AKT/mTOR yolunun kemodirenci arttırdığı ve GEM ile kombine olarak PI3K inhibitörü kullanımının GEM sitotoksitesini arttırdığı görülmüştür. Bununla korale olarak mTOR ve AKT ekspresyonunun dirençli PK hücrelerinde artışının anlamlı olduğu gözlemlenmiştir [95].

Diğer bir yandan Anormal hücre metabolizması kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir ve bu değişen glikoz metabolizması ile yansıtılır. Tümör hücreleri, aerobik glikoliz ve mitokondriyal oksidasyon fosforilasyonunun azalması yoluyla büyük miktarda laktik asit üretir; bu durum, "Warburg etkisi" olarak bilinir. Aşırı laktik asit üretimi, tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu destekleyen asidik bir tümör mikro ortamı oluşturur. Glikoz metabolizmasında yer alan bir dizi onkogen ve yolların tümör oluşumundaki potansiyel rolü araştırılmaktadır. PI3K/AKT/mTOR yolu, çeşitli tümör hücrelerinde anormal şekilde aktive edilerek tümör oluşumunu, gelişimini, ilaç direncini ve Warburg etkisini düzenleyen yollardan biridir. Ayrıca PI3K/AKT'nin, metabolizmayla ilgili enzimlerin ekspresyonunu yukarı regüle ederek ve Warburg etkisini tetikleyerek anormal fibroblast proliferasyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu çıkarımlarla birlikte Cui, J., Guo, Y., Wu, H. Ve ark. yaptığı çalışmada pankreas kanseri hücrelerinde glikoz metabolizmasını, migrasyonu ve apoptozu düzenleyen PI3K/AKT/mTOR yolunun anormal aktivasyonu ile birlikte gempitabine dirençli hücrelerde AKT ve mTOR ekspresyonunun yapılan western blot deneyi ile yukarı regüle olduğu görülmüş ve gempitabine kombine olarak mTOR inhibitörünün etkisi araştırılmıştır [96].

p-YAP proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin aşağı regüle edildiğini ve bununla birlikte YAP/TAZ kompleksinde YAP ifadesinin yine dirençli PANC-1 ve MiaPaCa-2 azaldığı görülmüştür. TAZ ifadesinin ise PANC-1 ve MiaPaCa-2 Gem+ hücrelerinde ise yukarı regüle edildiği yani protein ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, doku homeostazı, organogenez, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol alan Hippo sinyal yolağının, PK hücrelerinin GEM'e direncinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Literatürde YAP/TAZ yolunun GEM direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada miR-455'in doğrudan TAZ'ı hedef alarak TAZ ifadesini arttırdığı ve PK'de proliferasyon ve ilaç direncinde rol oynadığı gösterilmiştir [97].

Mezenkimal belirteç olan N-kaderin seviyeleri iki hücre hattında da incelenmiştir. PANC-1 ve MiaPaCa-1 hücrelerinde yapılan immunoblotlama sonuçlarına göre 2B hücre formlarında Gemsitabine dirençli hücrelerde, N-kaderin seviyesinde anlamlı bir fark görülmüştür.

T. Namba, R. Kodama ve ark. yaptığı çalışmada gemsitabine dirençli hücrelerin duyarlılığını arttırmaya yönelik anti viral ilaçlar kullanılmıştır. Çalışmada yapılan analizlerde, GSK-3 β fosforilasyonu ile hücre çoğalmasında görevli büyüme faktörü TGB- β ve Snail gibi transkripsiyon seviyelerini arttırdığı ve E-kaderinin baskılanmasını desteklediği görülmüştür. Böylelikle nükleer translokasyon gerçekleştiren β -katenin, hücre döngüsü ve metastaz ilişkili Wnt yolağının hedef genleri TCF-4 ve LEF-1 transkripsiyon faktörlerini aktive ederek N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir . Buna göre Pankreas kanserinin yüksek agresifliği, EMT fenotipi ve kanser kök hücreleriyle ilişkili olan pankreas kanseri hücrelerinin kemoterapiye dirençli özelliklerine atfedilebilir.

Buna bağlı olarak yine proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, invazyon ve anjiyogenezi düzenleyen Wnt/ β -katenin sinyal yolağında Akt-GSK3 β yolunun aktivasyonu gemsitabin direnci için önemlidir. immünoblotlama sonuçlarında, PANC-1 ve MiaPaCa-1 Gem+ hücre hatlarında parental gruba kıyasla GSK-3 β ifadesinin anlamlı ölçüde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Şekil 31). Yapılan çalışmada gemsitabin direnci kaynaklı oluşan GSK3 β -Snail1 aktivasyonu hENT1 ekspresyonunun baskılandığı dolayısıyla ilaç alımının kısıtlandığı ve buna bağlı EMT fenotipinin uyarıldığı gösterilmiştir [98].

DNA onarımı, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptotik mekanizmada önemli rolleri olan PARP, direnç mekanizmasında rol almasıyla birçok kanser türünde araştırılmıştır. Çalışmamızda normal ve GEM'e dirençli hücrelerdeki PARP seviyelerine bakıldığında dirençli hücrelerdeki PARP ifadesinde önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 31). PARP, DNA hasarını onarma sürecinde kritik bir role sahiptir. PARP ifadesinin artışı gemsitabine dirençli hücreler, DNA hasarı yaratan gemsitabine karşı daha dirençli hale gelmek ve sağ kalımı arttırmak için apoptozdan kaçması ile açıklayabiliriz.

Quiñonero F, Mesas C ve ark. son zamanlarda PK hücreleri ile gerçekleştirilen in vitro çalışmaların PARP1'in sitoplazmik ekspresyonunun , TRAIL reseptörlerinin aracılık

ettiği ve apoptozdan kaçınarak hücre ölümü direncini indüklediğini gösterdiğini ve PARP1'in aşırı ekspresyonu aynı zamanda bazı karsinom türlerinde meme, rahim, yumurtalık, akciğer, deri ve lenfomalarda da tanımlandığını söylemişlerdir. PARP1'in, Panc02 hücre hattında fare pankreas dokusuna göre 15 kat daha fazla aşırı eksprese edildiğini ve bir PARP inhibitörünün (Olaparib) kullanımının PK hücrelerinin GEM'e duyarlılığını artırabildiğini göstermişlerdir [99].

Pankreas Kanseri 2B Ve 3B kültürlerdeki normal PANC-1, Miapaca-2 ve Gem+ hücrelerinde seçili miRNA'ların düzeyi, gerçek zamanlı qPCR (RT-qPCR) ile belirlenmiştir. MiRNA'ların GEM direnci üzerindeki *in vitro* biyolojik rolünü araştırmak için fonksiyonel deneyler kullanılmıştır. Sonuçların literatürle uyumlu olup olmadığı ve anlamlı sonuçlar elde edilip edilmediği tartışılmış ve bu bulgulara göre çalışmanın devamı için bir miRNA biyo-belirteci seçilmiştir.

Literatürde, kanser örneklerinde anormal ifade edilen miRNA'lar arasında miR-424, miR-100, miR-301, miR-212 ve miR-125b-1 aşırı eksprese edildiği gösterilirken, miR-345, miR-142-P ve miR-139 normal pankreas örneklerine göre daha az eksprese edildiği belirtilmiştir. MiR-345'in, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre hatlarındaki ektopik aşırı ekspresyonu, büyümeyi, klonojeniteyi, migrasyon ve invazyonunu azalttığı ancak hücre-hücre etkileşimini arttırdığı buna bağlı miR-345'i aşırı eksprese eden hücreler, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında ayırt edilebilir morfolojik farklılıklara sahip oldukları ve artan epitelyal işaretleyici (E-kadherin) ekspresyonunun yanı sıra mezenkimal (N-kadherin, vimentin, Snail1) belirteçlerin ekspresyonunda azalma görüldüğü kaydedilmiştir. Ayrıca veriler, miR-345'i aşırı eksprese eden PK hücrelerinin, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında GEM'e karşı daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, miR-345'in PK'de tümör baskılayıcı rollerini ortaya koymakta ve miR-345 aşağı regülasyonunun, PK'nin kemo direncinin altında yatan mekanizmalardan biri olabileceğini göstermektedir [100].

PANC-1, MiaPaCa-2 ve Gem+ hücrelerinde miR-345-5p ifade seviyeleri gerçek zamanlı PZR analizi ile belirlenmiştir. PANC-1 parental hücre grubu ile dirençli hücre grubu karşılaştırıldığında, iki hücre hattında analiz edilen miR-345 seviyesinde farklılık tespit edilmiştir. Analiz sonucuna göre normal hücrelerin 2B ve 3B formlarında miR-345 seviyesinde anlamlı düzeyde olmayan yaklaşık 1,5 kat artış görülürken dirençli grup ile kıyaslandığında bu artışın, düştüğü ve miR-345 ifadesinin

2B ve 3B grupta yaklaşık 2 kat azaldığı görülmüştür. Literatürde miR-345 ifadesinin azalmasının PK kemo direncini arttırdığı gösterilmiş, ayrıca pankreas dokularından alınan örneklerin miR-345 ifadesinde görülen yüksek seviyenin 3B hücrelerle de korele olduğu dolayısıyla bu sonucun literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

MiaPaCa-2 hücre hattı PZR analizi sonuçlarına bakıldığında parental ve dirençli grup arasındaki miR-345 seviyesi farklılığı ortaya konmuştur. Normal 2B hücre grubunda ifade edilen miR-345 seviyesinin 3B grubuna kıyasla yaklaşık 3 kat fazla olduğu görülmüştür. Dirençli gruba bakıldığında ise normal hücrelere kıyasla neredeyse yaklaşık 4 kat bir düşüş tespit edilmiştir. MiR-345 ifade seviyesindeki bu azalma kendi hücre grubu içerisinde anlamlı bulunmuştur ancak 2B ve 3B hücreler arasındaki farklılık ve PANC-1 hücre hattı ile negatif korele olduğu tespit edilmiş olan miR-345 çalışmanın devamında bir biyo-belirteç olarak kullanılmamıştır.

Chen, D., Si, W., Shen, J. ve ark. yaptığı çalışmada meme kanseri hücrelerinde miR-27b ekspresyonunu qRT-PCR ile analiz etmiş ve miR-27b'nin meme kanseri hücre hatlarında belirgin şekilde aşağı regüle edildiğini bulmuşlardır. Sonuçlarda miR-27b'nin aşağı regülasyonu, meme kanserinde kemorezistans, malignite ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [101]. Başka bir çalışma, MiR-27a-3p ekspresyonunun, pankreas karsinomu dokularında ve hücre hatlarında önemli ölçüde yukarı doğru regüle olduğu ve yüksek oranda eksprese edilen miR-27a-3p'nin pankreas karsinomlu hastalarda daha fazla lenf nodu metastazı, peritoneal metastaz ve kötü prognoz ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir [102]. Yapılan bir çalışmada, pankreas kanseri teşhisi için yaptıkları araştırma sonucunda pankreas kanseri hastaları, sağlıklı gruptaki deneklerle karşılaştırıldığında miR-27a-3p, miR-16-5p ve miR-15b-5p'nin anlamlı düzeyde yukarı regüle edildiği ve miR-27a-3p'nin klinik ortamda erken teşhis için önemli bir biyo-belirteç olabileceği öngörülmüştür [103]. MiR-27b-3p ifade seviyelerine bakıldığında PANC-1 hücre hattında normal 2B ve 3B hücre grupları arasındaki miR-27 ifade seviyesinin aynı seyrettiği ve dirençli hücreler parental grupla kıyaslandığında ise 2B hücreler arasında 1,3 kat artış, 3B hücreler arasında ise 1,7 kat artış görülmüştür. Bu artışların normal ve dirençli grup arasında anlamlı bir düzeyde olmadığı görülmüştür. MiaPaCa-2 hücre hattı incelendiğinde miR-27 ifade seviyelerinin normal 2B ve 3B hücre grupları arasında yaklaşık 1,8 kat artış olduğu ve dirençli hücreler parental grupla kıyaslandığında ise 2B hücreler arasında 2,5 kat artış, 3B hücreler arasında ise yaklaşık 1,5 kat artış görülmüştür. Bu

artışların yine anlamlı düzeyde olmadığı ve iki hücre hattında da korele sonuçlar elde edilemediği tespit edilmiştir.

Liu Yu, Hu Qing ve ark. yaptığı çalışmada pankreas kanseri hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen miR-92a-3p'nin PTEN'in protein ifadesini azaltabileceği, böylece pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve metastaz aktivitesini arttırabileceği bildirilmiştir [104]. Ayrıca miR-92a-3p'nin, pankreas kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarında apoptotik sürecin önemli bir düzenleyicisi olduğunu buna istinaden miR-92a-3p'nin, yalnızca KRAS'ın mutasyona uğradığı hücrelerde değil aynı zamanda TP53 değişikliğini barındıran hücrelerde de sisplatin karşı akciğer adenokarsinomunda duyarlılığının önemli bir belirleyicisi olduğu da gösterilmiştir [105].

PANC-1 hücre hattında miR-92a-3p'nin sonuçları incelendiğinde normal 2B ve 3B hücre grupları arasında yaklaşık 1,8 kat artış olduğu ve dirençli hücreler parental grupla kıyaslandığında ise Gem+ 2B hücreler arasında 2 kat artış, 3B hücreler arasında ise yaklaşık 1,4 kat artış görülmüştür. Bu artışların anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür. MiaPaCa-2 hücre hattı incelendiğinde normal 2B ve 3B hücre grupları arasında yaklaşık 1,5 kat artış olduğu ve dirençli hücreler parental grupla kıyaslandığında ise 2B hücreler arasında 1,5 kat artış, 3B hücreler arasında ise yaklaşık 1,2 kat artış görülmüştür. Bu artışların anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. İki hücre hattı karşılaştırıldığında miR-92 seviyelerinde anlamlı bir sonuç elde edilememesi ile birlikte iki hücre hattı için de pozitif korele bir sonuç elde edilememiştir.

Pankreas kanseri patogenezi miR-150-5p, azalan ifade seviyesiyle karsinogenez ile negatif korele olduğu literatürde yer almaktadır. Çalışmalarda MiR-150, bazı transkripsiyon faktörleri ve sinyal yollarını düzenleyerek EMT'ye dahil olduğu ayrıca sadece PK'de değil kolorektal kanserde Wnt/ β -katenin ve CREB sinyal yollarının sırasıyla miR-150'nin yukarı ve/veya aşağı regüle olduğu moleküler bir mekanizmayı tanımlamışlardır [106].

Bir çalışmada PK hücrelerinde MUC4 (hücre yüzeyiyle ilişkili, müsin 4) protein ifadesi ile microRNA-150 ekspresyonu seviyesi arasında ters bir korelasyon gözlenmiş ve MUC4 ifadesinde artış görülmüştür. Bu artışın, kanser hücrelerinin dokulara infiltrasyon ve metastaz yapma yeteneklerinin artmasıyla ilişkili olduğunu ayrıca

MUC4 proteini miktarının PK hücrelerinde azalan miR-150 ekspresyonu seviyeleriyle ilgi olduğunu söylemişlerdir. PK’de düşük miR-150 ifade seviyesinin arttırılmasına bağlı olarak tümörigenez ilişkili hedef olan c-Myb ve MUC4 seviyelerini azaltarak in vitro migrasyonu, invazyonu baskıladığı, koloni oluşturma yeteneklerini azalttığı ve in vivo çalışmada da tümör büyümesini azalttığı belirtilmiştir. LINC0015’in, uzun LncRNA olarak miR-150-5p’yi baskılayarak PK’de onkogen bir karakter gösterdiği belirtilmiştir [107].

Çalışmamızda gerçekleştirilen PZR analizi ile miR-150-5p seviyeleri incelenmiştir. Bulgulara göre PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücre hatlarında miR-150 ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir. İki hücre hattında da korele olan bu bulgular PANC-1 hücre hattında 2B ve 3B hücre grupları arasında yaklaşık 2 kat azalma olduğu ve dirençli hücreler parental grupla kıyaslandığında ise 2B hücreler arasında 1,3 kat azalma, 3B hücreler arasında ise yaklaşık yine 1,2 kat azalma görülmüştür. Bu azalmanın dirençli hücrelerde daha fazla görüldüğü ve literatürle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. MiaPaCa-2 hücre hattında yapılan analiz sonucunda miR-150’nin az ifade edildiği görülmüş ve dirençli hücreler ile normal hücreler kıyaslandığında 2B hücrelerde 2 kat azalma, 3B hücrelerde ise yine 2 kat azalmanın görülmüş ve iki hücre hattında da korele sonuçlar ve literatür uyumu tespit edilmiştir. Bu bulgular göz önüne alındığında kemorezistanta etkisi araştırılmak üzere, hem EMT sürecini düzenlenmesiyle ve çeşitli sinyal yollarında rol oynaması hem de pankreas kanserinde tümör baskılayıcı özellikte bulunması nedeniyle GEM+miR-150 kombinasyonu seçilmiştir. Bu doğrultuda genomik özelliklerine göre farklılık gösteren KRAS, TP53, CDK2N/p16 mutasyonlarına sahip invaziv, agresif ve metastatik MiaPaCa-2 ile KRAS, TP53, CDK2N mutasyonu bulunan metastatik PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinin iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültüründeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

PANC-1, MiaPaCa-2 ve dirençli pankreas kanseri hücre gruplarında sentetik miR-150 transfeksiyonu ve 100 nM GEM kombinasyonu sonrası hücrelerdeki miR-150 ifade seviyeleri gerçek zamanlı PZR analizi ile belirlenmiştir. Normal hücre grubunda GEM uygulanmamış ve sadece GEM uygulanmış deney grubu karşılaştırıldığında, iki hücre hattında miR-150 ifadesinde farklılık tespit edilmiştir. Analiz sonucuna göre PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin kendi kontrol gruplarında miR-150 ifade seviyesini anlamlı olarak azaldığı, GEM uygulaması sonrası ise PANC-1 hücrelerinin ise miR-150 seviyesinin 3 kat, MiaPaCa-2’da ise 8 kat arttığı belirlenmiştir. miR-150 mimik

transfeksiyonunun ardından PANC-1+miR-150 hücrelerindeki seçili miRNA ifade seviyesi 6 kat, GEM varlığında ise 5,5 kat artmıştır. MiaPaCa-2 hücrelerine miRNA transfeksiyon uygulaması ile MiaPaCa-2+miR-150 hücrelerinde miR-150 ifadesinin 4,5 kat, GEM varlığında ise 1,3 kat arttığı tespit edilmiştir. İki hücre hattı karşılaştırıldığında miR-150 transfeksiyonu+100 nM GEM kombinasyonunun MiaPaCa-2 hücrelerine kıyasla PANC-1 hücrelerinde miR-150 ifadesindeki artışın anlamlı düzeyde fazla olduğu belirlenmiştir.

PZR analizi sonucunda tek başına ilaç uygulamasının iki hücre hattında farklı yanıtlar verebildiği ancak sentetik miR-150 transfeksiyonunun GEM ile kombine edilmesiyle pankreas kanserinde tümör baskılayıcı rolü bulunan miR-150 ifadesinin iki hücre hattında da arttığı tespit görülmüştür. Bu bulgularla birlikte, arttırılan miR-150 ifadesi ile GEM uygulamasının 2B ve 3B hücre formlarında incelenmesine devam edilmiştir.

2B PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde arttırılan miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak gemsitabinin hücre canlılığına etkisi DIOC₆ ile MMP'ye ve zamana bağlı olarak incelenmiştir. miR-150 ifadesi arttırılan PANC-1, MiaPaCa-2 ve Gem+ hücrelerinin GEM uygulaması sonucunda kontrole oranla MMP'de azalma gözlemlenmiştir. PANC-1 hücre hattında kontrole kıyasla miR-150+GEM kombinesinin 72. Saate oldukça etkili olduğu buna karşılık dirençli hücrelerde GEM'in etkisi parental gruba kıyasla oldukça düşük kalırken miR-150+GEM kombinesinin dirençli hücreler üzerinde de oldukça etkili olduğu ve GEM duyarlılığını arttırdığı görülmüştür.

MiaPaCa-2 hücre hattına bakıldığında ise dirençli grupta 72. saatte bile GEM etkisi gözlemlenemezken miR-150+GEM kombinesinin 72. saatte parental grupta %85 oranında etkili olduğu, dirençli grupta ise kombine tedavinin %70 oranında etkili olduğu görülmüştür. Bu bulgular miR 150+GEM kombinesinin iki hücre hattında da gemsitabin duyarlılığını arttırdığını göstermiştir.

2B ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelleri incelenmiş ve kolonilerin çapları ölçülmüştür. 2B hücrelerde MiaPaCa-2+miR-150+GEM grubunun koloni oluşturma potansiyellerine kontrol grubuna göre ket vurduğu görülmektedir. 3B hücreler ile 2B grup kıyaslandığında aynı sayıda ekim yapılan hücrelerin 3B formlarında anlamlı ölçüde daha fazla koloni oluşturduğu gözlemlenmiştir. 2B MiaPaCa-2 hücrelerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artan miR-150 ifadesi ile GEM uygulamasına karşı duyarlı olduğu ve kombine edildiğinde hücrelerin koloni

oluşumunu neredeyse %90 oranında inhibe edebildiği, koloni oluşturma yeteneklerine ket vurduğu görülmektedir. Bir çalışmada, bu bulgulara benzer bir sonuç olarak 2B farklı PK hücreleriyle yapılan bir çalışmada, miR-150 PK hücrelerinin büyümesini ve klonojenitesini azalttığı ve buna bağlı yapılan deneyde miR-150 ifadesinin artışının koloni sayısını azalttığı belirtilmiştir [108].

3B hücre formlarından yapılan ekim sonucunda deney grupları arasında miR-150 ifadesindeki artış ile GEM kombine uygulaması koloni çaplarını %25 oranında azalttığı görülmüştür. 2B hücrelerde gözlemlenen koloni potansiyellerine kıyasla daha az bir etki gözlemlenmiştir. Bununla birlikte 3B hücre formlarının daha agresif ve ilaca duyarlılıklarının 2B hücrelere göre daha az oldukları bilinse de, MiR150+GEM kombine uygulaması hücre etkileşimlerini daha iyi taklit edebilen 3B hücre formlarında bile gemsitabine duyarlılığı arttırmıştır. 2B ve 3B formlarda üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin farklı kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlılıklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada 3B hücre formlarının 2B hücrelere kıyasla daha dirençli olduğu belirtilmiştir [109].

Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile miR-150+GEM kombinasyonunun sferoid oluşturma üzerindeki etkisi incelenmiştir. 3. ve 4. haftalarda zamana bağlı olarak PANC-1, MiaPaCa-2 ve Gem+ hücrelerinin kontrol gruplarında sferoid çaplarında artış görülmüştür. PANC-1 parental ve dirençli grup kıyaslandığında dirençli hücrelerde %5lik bir artış tespit edilmiştir. Parental hücrelerde kontrol ve GEM uygulanmış gruplar kıyaslandığında yaklaşık %50lik bir azalma görülürken, kontrol miR-150+GEM kombinesi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında %72 oranında bir azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgulara bakıldığında miR-150+GEM kombinesinin yalnızca GEM uygulamasından daha etkili olduğu görülmüştür. Aynı sonuçlar dirençli hücre grubu üzerinden incelendiğinde GEM etkisinin dirençli sferoid formlarına neredeyse etki etmediği ancak miR-150+GEM kombinesinin, GEM duyarlılığını arttırdığı ve %64 oranında sferoid çaplarını küçülttüğü tespit edilmiştir. MiaPaCa-2 hücre hattına bakıldığında da benzer sonuçların görüldüğü ancak parental hücre grubunda miR-150+GEM kombinesinin PANC-1 hücre grubuna kıyasla çok daha etkili olduğu kontrole oranla %65 oranında bir azalma görülmüştür. Dirençli hücre grubuna bakıldığında ise yine benzer sonuçlar ile karşılaşılması olup miR-150+GEM kombinesinin dirençli kontrol grubu hücrelerine kıyasla sferoid çaplarını %60 oranında küçülttüğü görülmüştür. Her iki hücre hattında miR-150+GEM kombinesi

gerçekleştirilen gruptaki sferoid çaplarının zamana bağlı olarak anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, PK dirençli hücre hatlarında da miR-150+GEM kombine tedavisinin koloni oluşumunu inhibe edici etkisi ile 3B form oluşturma potansiyeline etki ettiğini göstermektedir. *Srivastava S, Bhardwaj A. ve ark.* yaptığı çalışmada HPAF ve Panc10.05 PK hücre hatları kullanılmış ve yapılan asılı damla deneyinde arttırılan miR-150 ifadesinin hücreler arasında etkileşimin artış gösterdiği belirtilmiştir [108]. Bulgulara göre tümör supresör miR-150'nin ifadesinin arttırılması ile GEM etkinliğinin 3B pankreas kanserlerinde önemli derecede arttığını ve dirençli hücrelerde yine miR-150'nin ifadesinin artışına bağlı hücrelerde GEM duyarlılığının arttığını söylemek mümkündür.

PANC-1, MiaPaCa-2 ve dirençli PK hücrelerinde transfeksiyon sonrası artan miR-150 ifadesinin ve GEM'in protein ifadelerine etkisi immunoblotlama analizi ile incelenmiştir.

PI3K/AKT/mTOR yolunun birçok malign tümörde anormal şekilde aktive olduğu ve kemorezistansta rol oynadığı ve literatürde PI3K/AKT/mTOR yolunun kemodirenci arttırdığını söylemiştik. Yapılan çalışmalarda da GEM ile kombine olarak PI3K inhibitörü kullanımının GEM sitotoksitesini arttırdığı görülmüştür. Bununla korele olarak PI3K protein ekspresyonunun MiaPaCa-2 hücrelerine bakıldığında kontrol ve dirençli hücre grubunun ekspresyonlarında anlamlı bir fark görülmediği ancak GEM uygulanmış grupta PI3K ifadesinin biraz arttığı görülmüştür. MiR-150 transfeksiyonu sonrası PI3K ifadesine bakıldığında PK örneklerinde görülen PI3K/Akt yolunun aktivitesinin artan miR-150 ifadesi varlığında azaldığı görülmüştür.

PANC-1 hücre grubuna bakıldığında ise PI3K seviyesinin iki çalışmada da aynı kaldığı miR-150 ifadesi artışının PI3K ekspresyon seviyelerinde bir değişiklik yaratmadığı görülmüştür. Diğer deneylere kıyasla çıkan bu sonucun anlamlı olmadığı ve MiaPaCa-2 hücre hattı ile korele olmadığı tespit edilmiştir. PI3K/Akt sinyal yolu kanser proliferasyonu ve glikoz metabolizması ile yakından ilişkili olduğundan Akt protein ifadesi genellikle PK'de artış ile karakterizedir. Akt'ın fosforile formlarının artışının ise kemodirenc ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir [96].

Bu bilgilere göre MiaPaCa-2 hücre hattında kontrol ve GEM uygulanmış gruba kıyasla Akt ifadesi artan dirençli grubun immunoblotlama analizinin literatürle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Kontrol grubundaki Akt ekspresyonunun GEM'e bağlı

azalması ancak dirençli grupta artış görülmesi anlamlı bulunmuştur. miR-150 transfeksiyonu sonrası yapılan analizde MiaPaCa-2 hücrelerinin kontrol ve GEM uygulanmış grubunda artan miR-150 ifadesiyle birlikte Akt ifadesinin nerdeyse tamamen inhibe edildiğini ancak doğru çıkarımlara varabilmek için p-Akt ifadelerinin de ileriki çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği tespit edilmiştir. MiR-150 ifadesi arttırılmış dirençli gruba bakıldığında kontrole kıyasla Akt protein ifadesinin azaldığı ve bunda miR-150 artışının etkili olduğu düşünülmüştür. Ancak literatürde p-Akt seviyelerinin de dirençli PK hücrelerinde yüksek ifade edildiği bilindiğinden doğru çıkarımlara varabilmek için yine p-Akt ifadelerinin ileriki çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, miR-150'nin aşırı ekspresyonu veya AKT3'ün susturulmasının JNK ve NF-κB yollarını inhibe ettiği ve miR-150'nin AKT3'ü hedef alarak LPS kaynaklı akut akciğer hasarını hafiflettiği gösterilmiştir [110].

Gemcitabine dirençli PK hücre hatlarında mTOR protein ifadesinin artışı hücre proliferasyonu ve kemorezistans ile karakterize olduğu ve GEM'e direnç gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir. PI3K/mTOR'un hedeflenmesinin gemcitabine yanıtı teşvik edecek bir tedavi seçeneğini oluşturabileceği söylenmiştir. Gerçekleştirilen analizde hsa-miR-3178, ABC taşıyıcılarının PI3K/Akt yolu aracılı yukarı regülasyonunu aktive ederek PK'de gemsitabin direncini arttırdığı görülmüştür [111].

PANC-1 dirençli hücre hattında kontrole göre artan mTOR ifadesinin, miR-150 transfeksiyonu sonrasında anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür. Kemorezistans ile karakterize olan mTOR ifadesinin artışı, miR-150 artışına bağlı olarak azalmıştır ancak kontrol+miR-150 ve 100nM GEM+miR-150 gruplarında mTOR ifadesinde kontrol grubuna kıyasla artış görülmüştür.

YAP ifadesinin dirençli PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde azaldığı, TAZ ifadesinin ise PANC-1 ve MiaPaCa-2 Gem+ hücrelerinde yukarı regüle edildiği önceki sonuçlarda görülmüştü. Bu sonuçlar, Hippo sinyal yolağının, PK hücrelerinin GEM'e direncinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Literatürde YAP/TAZ yolunun GEM direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada miR-455'in doğrudan TAZ'ı hedef alarak TAZ ifadesini arttırdığı ve PK'de proliferasyon ve ilaç direncinde rol oynadığı gösterilmiştir [97]. MiR-150 transfeksiyonu sonrası yapılan analizde MiaPACa-2 hücrelerinde YAP ifadesinin miR-150 ifadesine bağlı azaldığını,

TAZ ifadesinin ise miR-150 ekspresyonuna bağılı olarak sadece kontrol grubunda arttığı görülmüştür. Sonucun önceki sonuçlarla korele bulunmadığı literatürdeki bu öncül çalışmanın geliştirilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

PANC-1 ve MiaPaCa-1 hücrelerinde yapılan immunoblotlama önceki sonuçlarına göre 2B hücre formlarında Gempitabine dirençli hücrelerde, N-kaderin seviyesinde anlamlı bir fark görülmüştü. MiaPaCa-2 hücrelerinde yapılan analizde, kontrol grubunda Hücre-hücre adezyon moleküllerinden biri olan E-kaderinin azalıp, mezenkimal belirteç olan N-kaderinin artışı literatür ile uyumludur. MiR-150 ifadesi arttırılmış grupta ise E-kaderin ekspresyon seviyesinin artışı ile N-kaderin ifadesinde özellikle dirençli grupta bir azalma gözlemlenmiştir. PANC-1 hücre hattında yapılan analizde ise E-kaderinin azalan seviyesinin miR-150 ifadesinin artışına bağılı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 40Şekil 41). Buna bağılı Literatürdeki farklı PK hücreleri ile yapılan çalışmalarda da E-kaderin protein seviyesinin artış gösterdiği böylelikle hücrelerin toplu göç edebilmesini desteklediği öne sürülmektedir. Tümör migrasyonunda rol alan ZEB-1, EMT sürecinde E-kaderini baskılamakta ve β -kateninin nükleer translokasyonu ile invaziv hedeflerin aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [112]. Elde edilen bulgulara benzer olarak yapılan bir çalışmada, miR-150 ifade artışı ve pablosiklib kombinasyonu ile PK hücrelerinde mezenkimal belirteçlerin seviyelerinin baskılandığı, E-kaderin seviyesinin de arttığı görülmüştür [113]. Buna bağılı olarak miR-150+GEM kombinasyonunun mezenkimal belirteçlerin baskılanmasında pozitif rol oynadığı gözlemlenmiştir.

Wnt5A, p-AKT ve siklin D1 PK dokularında yüksek oranda eksprese edildiği ve Wnt5A ekspresyonu kanser evreleri ile korele olduğu bildirilmiştir. *In vitro*, Wnt5A ekspresyonu gempitabin kemorezistansı ile ilişkilendirilmiş ve PANC-1'de Wnt5A'nın susturulmasından sonra hücrelerin yüzdesinin G0/G1 fazında arttığı ve S fazında azaldığı gösterilmiştir. Wnt5A, AKT'nin fosforilasyonu yoluyla Siklin D1 ekspresyonunu desteklediği ve sonuç olarak G1-S geçişini ve gempitabin direncini arttırdığı da gösterilmiştir. Sonuçta, Wnt5A'nın pankreas kanseri hücrelerinde G1-S geçişinin düzenlenmesi yoluyla kemorezistansı indüklediği ve Wnt5A, gempitabin yanıtının bir göstergesi ve tümör kemoterapisi için potansiyel bir hedef olduğu gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise Wnt3a/b'nin ekspresyonu MiaPaCa-2'de ilaçlı gruba göre dirençli hücrelerde artmıştır. MiR-150 tedavisi sonrası ise Wnt3a/b ifadesinin dirençli hücrelerde azalması, kemorezistansı indükleyen Wnt ifadesinin

miR-150 aracılı olarak düzenlendiği görülmüş, literatürle anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 40, Şekil 41).

Yapılan bir çalışmada, DVL2 ekspresyonunun, normal dokularla karşılaştırıldığında PK dokularında önemli ölçüde arttığını göstermiştir. DVL2 ekspresyon seviyesinin belirli bir aralıkta tutulması gerekir. Pankreas hücrelerindeki aşırı yüksek DVL2 ekspresyonu, potansiyel bir terapötik hedef haline getirirken, normal pankreas hücrelerindeki DVL2'nin yokluğu veya baskılanması hücre sağkalımı için tehlikeli olmuştur. DVL2'nin, pankreas gelişimi, adacık fonksiyonu, insülin üretimi ve salgılanmasında rol oynayan ve kanonik ve kanonik olmayan WNT sinyallemesine katılan bir sinyal transdüksiyon proteini olduğu rapor edilmiştir. Mevcut çalışma, PANC-1 ve CFPAC-1 hücrelerinde DVL2'nin susturulmasının hücre çoğalmasını, migrasyonu ve invazyonu inhibe ettiğini ve *in vivo* olarak tümör büyümesini ve metastazı baskıladığını ortaya çıkarmıştır. Birlikte ele alındığında, bu çalışmanın sonuçları DVL2'nin PK'nin çoğalması ve invazyonu için kritik olduğunu göstermiştir [114]. MiaPaCa-2 hücrelerinde Dvl2 protein ifadesine bakıldığında artış gösteren Dvl-2 ekspresyonunun miR-150 ifadesinin arttırılması ve GEM uygulaması ile inhibe edildiği görülmüştür. Dirençli hücrelerde ise protein ifadesinde bir azalma görülmemekle birlikte kontrol grubunda artış görülen GEM duyarlılığının dirençli hücrelerdeki etkisinin araştırılması için dirençli miR-150 ifadesi arttırılmış hücre grubuna GEM uygulaması ile çalışmalar yapılmasının gerekliliği tespit edilmiştir.

Önceki sonuçlarda normal ve GEM'e dirençli hücrelerdeki PARP seviyelerine bakıldığında dirençli hücrelerdeki PARP ifadesinde önemli bir artış olduğu görülmüştü (Şekil 31). PARP, DNA hasarını onarma sürecinde kritik bir role sahiptir. PARP1'in, Panc02 hücre hattında fare pankreas dokusuna göre 15 kat daha fazla aşırı eksprese edildiğini ve bir PARP inhibitörünün (Olaparib) kullanımının PK hücrelerinin GEM'e duyarlılığını artırabildiğini göstermişlerdir [99]. PARP ifadesinin artışı gempitabine dirençli hücreler, DNA hasarı yaratan gempitabine karşı daha dirençli hale gelmek ve sağ kalımı arttırmak için apoptozdan kaçması ile açıklamıştık. PANC-1 hücrelerinde yapılan analizde miR-150 transfeksiyonu sonrası normal hücrelerdeki PARP ifade seviyesinin GEM uygulamasına bağlı olarak arttığı ancak dirençli hücrelerde PARP ifadesinin azaldığı görülmüştür. Sonuçlar miR-150+GEM kombinasyonunun dirençli hücrelerde PARP ifadesini inhibe edici rol oynadığını,

kontrol hücrelerinde ise GEM'nin DNA hasarına bağlı yanıt olarak PARP artışının görülebileceğini düşündürmüştür (Şekil 40, Şekil 41).

Mps1 bağlayıcı protein (MOB1), memeli Hippo yolunun temel bileşenlerinden biridir ve kanser gelişiminde önemli roller oynar. MOB1, belirgin bir fonksiyonel alanı olmayan bir adaptör proteindir ve büyük tümör baskılayıcı 1 ve 2 (LATS1/2) kinazların ortak aktivatörü olarak görev yapmaktadır. MOB1 varlığında LATS1/2, Yes İlişkili Proteini (YAP) ve/veya bunun PDZ bağlama motifi (TAZ) ile transkripsiyonel ortak aktivasyonunu fosforile eder. Çalışmada, MOB1'in MST1/2 ve LATS1/2 ile kompleks halinde olduğu ve ayrıca LATS1/2'nin fosforilasyonunu desteklediği rapor edilmiştir. MOB1'in MST1/2 ve LATS1/2'ye bağlandığını, toplam LATS1 düzeylerini arttırdığını ve MST1/2'nin aktive edilmesi durumunda LATS1'in fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. MOB1 ekspresyonunun PK dokularında azaldığı ve tümör farklılaşması, metastaz ve kötü hasta sağkalımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [115]. Çalışmamızda MOB1 ekspresyonunun miR-150 ifadesinin artması ile azaldığı görülmüştür. Azalan bu ifadenin anlamlı bulunmadığı literatür ile negatif korele olduğu tespit edilmiştir. LATS2 protein ifadesine bakıldığında ise kontrole kıyasla miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerde LATS2 seviyesinin azaldığı ve literatürde MOB1 tarafından fosforilasyonu arttırılan LATS2'nin, çalışmamızda miR-150 aracılı ifadesinin azaldığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada LATS2'nin inaktivasyonunun β -hücresi apoptozuna karşı dirençle sonuçlandığına ve glisemiye iyileştirdiğine dair doğrudan kanıt sağladığı gösterilmiştir [116].

Bcl-2 ailesi üyesi BID, ölüm reseptörü aktivasyonuna yanıt olarak mitokondri aktivasyonuna aracılık eder. BID, mitokondriye transloke edilen aktif kaspaz-8 üreten tBID tarafından kesilir. Kesilmiş tBID, mitokondri membranına entegre olur ve mitokondrinin intermembranöz alanından sitokrom c ve diğer apoptojenik faktörlerin salınmasını indükler. Sitoplazmada sitokrom c, Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1), ATP ve prokaspaz-9 ile apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur. Kaspaz-8 gibi kaspaz-9 da apoptozomdaki bölünmeyle aktive edilen ve esas olarak kaspaz-3, -6 ve -7 olmak üzere yürütücü kaspazları aktive eden bir başlatıcı kaspaz olarak rol oynamaktadır [117]. PK üzerinde yapılan bir çalışmada, kaspaz 9 ifadesinin SW1990/Gem hücrelerinde belirgin şekilde azaldığı görülmüştür [118]

PANC-1 hücrelerinde yapılan analizde kontrol grubundaki ilaçlı hücrelerde kesilmiş kaspaz 9 ifadesinin görüldüğü ancak dirençli hücrelerde apoptozdan kaçmanın bir yanıtı olarak kaspaz 9 ifadesinin neredeyse olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonucun literatür ile uyumlu bulunup anlamlı olduğu görülmüştür. MiR-150 ifadesi artan hücrelerde ise dirençli grupta görülmeyen kesilmiş kaspaz 9 ifadesinin miR-150 aracılı arttığı ve hücrelerin apoptoza gittiği görülmüştür.

Bu sonuçlar doğrultusunda incelenen, PANC-1, MIAPaCa-2 ve dirençli pankreas kanseri hücrelerinde kemorezistans rol oynayan karakterlerin protein ifadelerinin seviyesinin belirlenmesi, artan miR-150 ifadesi ilişkili GEM direncinin inhibe edilebilme etkisini vurgulamaktadır.

MiR-150 mimik transfeksiyonu yapılan PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde gempitabinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisine bakılmıştır. PANC-1 hücrelerinin kontrol grubuna bakıldığında subG1 oranının %7.6, GEM uygulaması ile subG1 popülasyonunun %15 seviyelerine arttığı görülmüştür. Ek olarak, G2/M fazında %10 luk bir artış görülmüştür, bu artış apoptoza uğramayan hücrelerin G2/M fazında tutulu kalmasına sebep olmuştur. Gempitabine dirençli olan hücrelerde S ve G2/M oranı sırasıyla ortalama % 35 ve % 38 oranında gözlenmiştir. Hücrelerin büyümeye ve bölünmeye devam ettiği gözlemlenmiştir. miR-150 ifadesi arttırıldığında ise kontrol grubunda benzer bir sonuç görülmüştür. Gempitabin varlığında ise apoptotik hücre ölümünün %37 seviyesine yükseldiği görülmüştür. Sonucun dikkat çekici kısmı ise gempitabine dirençli PANC-1 hücrelerinde subG1 oranının %41'e çıkması, ile %41 oranında apoptotik hücre popülasyonu görülmesi olmuştur (Şekil 33).

MiaPaCa-2 hücreleri incelendiğinde subG1 oranının %5 olduğu, G1 oranının ise %55 olduğu hücre büyümesinin devam ettiği görülmektedir. Gempitabin uygulandığında ise subG1 apoptotik popülasyon %26 oranında gözlemlenmiştir. Gem+ MiaPaCa-2 hücrelerinde G1 oranı %51, S oranı %15 ve G2/M oranı %33 seviyesinde olup, ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile benzer oranlara sahip olduğu tespit edilmiştir. miR-150 ifadesi arttırıldığında GEM uygulanan MiaPaCa-2 hücrelerinde G2/M fazının %53' çıktığı, G2/M fazında bir tutulma gözlenmiş olduğu ve bu fazdaki popülasyon oranının % 30 arttığı gözlemlenmiştir. MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyonu sonrası kontrol grubunda neredeyse aynı sonucun görülmesi ile birlikte Gem+ hücre grubunda ortalama %30 oranında apoptotik hücre popülasyonunun arttığı

tespit edilmiştir (Şekil 34). Sonuç olarak miR-150 ifadesinin arttırılması ile GEM'e dirençli iki farklı hücre grubunda programlı hücre ölümü arttırdığı analiz edilmiştir.

Bir sitidin analogu olan gemsitabin, hücre döngüsünün S fazındaki replikasyon sırasında DNA'ya dahil edilir. Gemsitabin pankreas, meme, yumurtalık ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri için kemoterapi olarak kullanılır ve bu tümörlere sahip hastalar için birinci basamak tedavidir. Gemsitabin, öncelikle hücre döngüsünün durdurulmasını ve hücre ölümünü indükleyerek etkinliğini gösterir. Yapılan çalışmada gemsitabinin önceki sonuçlarla tutarlı olarak S fazında zamana ve konsantrasyona bağlı bir hücre döngüsü durmasını tetiklediğini göstermiştir. Gemsitabin kaynaklı S fazının durması, hem G0/G1'den geçiş oranında bir artış hem de S fazından G2/M fazına geçiş oranında bir inhibisyon olarak tespit edilmiştir. Gemsitabin konsantrasyonuyla S fazının durdurulması arttığı da görülmüştür [119].

Hastalığın erken teşhisi, daha etkili tedaviler sağlayabilir. Tedavi yanıtı ve hastalığın prognozunun tahmini için daha iyi biyobelirteçler ve araçlar, gelecekte tedavi model ve rejimlerinin özel olarak seçilmesini sağlamak için önemlidir. Çalışmada yer verdiğimiz miR-150'nin hedef genleri, onun bir tümör baskılayıcı miRNA veya oncomiR olarak fonksiyonunu belirler. Tez çalışmasında elde edilen bulgular göz önüne alındığında, PANC-1 ve MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde mimik miR-150 transfeksiyonuyla miR-150 ifadesinin arttırılması ile PDAK tedavisinde ilk basamak olarak kullanılan gemsitabinin, dirençli hücreler üzerinde sferoid çaplarını kontrol gruplarına göre önemli ölçüde azaltmasına neden olarak 3B hücre formlarını oluşumunda etki göstermiştir. Bu sayede PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerindeki direnç mekanizmasını kırdığı görülmüştür. MiR-150 ifadesinin arttırılması ile oluşturulan 3B PK hücre formlarında GEM hem normal hem dirençli hücrelerde koloni oluşturma potansiyelini azaltmış, GEM'in miR-150 ile ilişkili olarak duyarlılığının arttırıldığı ve bu oluşmuş gemsitabin kemo-direncini baskıladığı sonucuna varılmıştır. PANC-1, MiaPaCa-2 ve dirençli hücrelerde gerçekleştirilen EMT ilişkili mRNA ve protein ifade analizlerinin karşılaştırılmasında mezenkimal belirteçlerin arttığı ve artan miR-150 ifadesi ve gem uygulamaları ile bu ifadelerin azaldığı, epitel belirteçlerin ise azalıp artan miR-150 ifadesi ile arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, miR-150 ifadesinin artışı gemsitabin direncinde rol oynayan bazı hedef sinyal yollarının protein ifadelerinin de baskılandığı görülmüştür. Wnt/ β -katenin ve TGF β dahil olmak üzere birçok anahtar sinyal yolları EMT sürecinde miR-150

hedefleri olarak belirlenir. Bununla birlikte Wnt, hücre döngüsü ilerlemesini modüle eder ve pankreas kanseri hücrelerinde kemorezistansa katkıda bulunur. Artan miR-150 ifadesi ve gem uygulamalarına bağlı olarak inhibe edilen wnt ifadesi ile gemitabin kaynaklı kemo-direncini baskılanmıştır. Hasta modelleri üzerinde yapılacak klinik araştırmalarda, erken tanı sürecinde ve GEM kombine terapilerinde kullanılmak üzere daha fazla miRNA üzerinde çalışmalar yapılması ve biyo-belirteç olabilecek potansiyel hedefler bulunması oldukça önemlidir. Bu çalışmada GEM direncinin üstesinden gelebilmek için mimik miR-150 ifadesinin kullanılabileceğine yönelik umut veren öncül sonuçlar elde edilmiştir.



KAYNAKÇA

- [1] N. I. of H. (US) and B. S. C. Study, “Understanding Cancer,” 2007, Accessed: Apr. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- [2] J. S. Bertram, “The molecular biology of cancer,” *Mol Aspects Med*, vol. 21, no. 6, pp. 167–223, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0098-2997(00)00007-8.
- [3] S. J. Jang, J. M. Gardner, and J. Y. Ro, “Diagnostic approach and prognostic factors of cancers,” *Adv Anat Pathol*, vol. 18, no. 2, pp. 165–172, Mar. 2011, doi: 10.1097/PAP.0B013E31820CB39E.
- [4] “Metastazın tanımı - NCI Kanseri Terimleri Sözlüğü - NCI.” Accessed: Apr. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/metastasis>
- [5] S. H. Hassanpour and M. Dehghani, “Review of cancer from perspective of molecular,” *Journal of Cancer Research and Practice*, vol. 4, no. 4, pp. 127–129, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.JCRPR.2017.07.001.
- [6] A. Imran *et al.*, “Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article,” *Iran J Public Health*, vol. 46, no. 11, p. 1475, 2017, Accessed: Nov. 11, 2021. [Online]. Available: </pmc/articles/PMC5696686/>
- [7] Q. Zhang *et al.*, “Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management,” *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8962321.
- [8] A. Gharibi, Y. Adamian, and J. A. Kelber, “Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer,” *Acta Histochem*, vol. 118, no. 3, p. 305, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.ACTHIS.2016.01.009.
- [9] D. Ansari, H. Friess, M. Bauden, J. Samnegård, and R. Andersson, “Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 5, p. 6644, 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.24019.
- [10] D. Ansari, H. Friess, M. Bauden, J. Samnegård, and R. Andersson, “Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment,”

Oncotarget, vol. 9, no. 5, p. 6644, Jan. 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.24019.

- [11] PDQ Adult Treatment Editorial Board, “Pancreatic Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Patient Version,” *PDQ Cancer Information Summaries*, 2002, Accessed: May 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/types/pancreatic/patient/pancreatic-treatment-pdq>
- [12] C. Y. Zhang, S. Liu, and M. Yang, “Clinical diagnosis and management of pancreatic cancer: Markers, molecular mechanisms, and treatment options,” <http://www.wjgnet.com/>, vol. 28, no. 48, pp. 6827–6845, Dec. 2022, doi: 10.3748/WJG.V28.I48.6827.
- [13] A. Z. Daoud, E. J. Mulholland, G. Cole, and H. O. McCarthy, “MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, Nov. 2019, doi: 10.1186/S12885-019-6284-Y/TABLES/2.
- [14] A. Makohon-Moore and C. A. Iacobuzio-Donahue, “Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective,” *Nat Rev Cancer*, vol. 16, no. 9, p. 553, Sep. 2016, doi: 10.1038/NRC.2016.66.
- [15] M. E. Mostafa, I. Erbarut-Seven, B. Pehlivanoglu, and V. Adsay, “Pathologic classification of ‘pancreatic cancers’: current concepts and challenges,” *Chin Clin Oncol*, vol. 6, no. 6, pp. 59–59, Dec. 2018, doi: 10.21037/CCO.2017.12.01.
- [16] E. M. Stoffel, R. E. Brand, and M. Goggins, “Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention,” *Gastroenterology*, vol. 164, no. 5, p. 752, Apr. 2023, doi: 10.1053/J.GASTRO.2023.02.012.
- [17] W. Luo *et al.*, “Epidemiology of pancreatic cancer: New version, new vision,” *Chinese Journal of Cancer Research*, vol. 35, no. 5, p. 438, Oct. 2023, doi: 10.21147/J.ISSN.1000-9604.2023.05.03.
- [18] P. Rawla, T. Sunkara, and V. Gaduputi, “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors,” *World J Oncol*, vol. 10, no. 1, p. 10, 2019, doi: 10.14740/WJON1166.

- [19] S. Nagendram and S. Bhattacharya, "Pancreatic cancer: a glimmer of hope," *Trends in Urology & Men's Health*, vol. 14, no. 2, pp. 5–10, Mar. 2023, doi: 10.1002/TRE.904.
- [20] M. Badheeb *et al.*, "Pancreatic Tumorigenesis: Precursors, Genetic Risk Factors and Screening," *Current Oncology*, vol. 29, no. 11, p. 8693, Nov. 2022, doi: 10.3390/CURRONCOL29110686.
- [21] M. Capasso *et al.*, "Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer," *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, vol. 89, no. Suppl 9, p. 141, 2018, doi: 10.23750/ABM.V89I9-S.7923.
- [22] E. L. Deer *et al.*, "Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines," *Pancreas*, vol. 39, no. 4, p. 425, 2010, doi: 10.1097/MPA.0B013E3181C15963.
- [23] T. J. Grant, K. Hua, and A. Singh, "Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer," *Prog Mol Biol Transl Sci*, vol. 144, p. 241, 2016, doi: 10.1016/BS.PMBTS.2016.09.008.
- [24] P. Espiau-Romera, S. Courtois, B. Parejo-Alonso, and P. Sancho, "Molecular and Metabolic Subtypes Correspondence for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Classification," *J Clin Med*, vol. 9, no. 12, pp. 1–21, Dec. 2020, doi: 10.3390/JCM9124128.
- [25] M. A. Abramson *et al.*, "The Molecular Biology of Pancreatic Cancer," *Gastrointest Cancer Res*, vol. 1, no. 4 Suppl 2, p. S7, 2007, Accessed: May 05, 2024. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC2666839/
- [26] D. Ansari, H. Friess, M. Bauden, J. Samnegård, and R. Andersson, "Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment," *Oncotarget*, vol. 9, no. 5, p. 6644, Jan. 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.24019.
- [27] L. H. Truong and S. Pauklin, "Pancreatic Cancer Microenvironment and Cellular Composition: Current Understandings and Therapeutic Approaches," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 19, Oct. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13195028.

- [28] T. Murakami, Y. Hiroshima, R. Matsuyama, Y. Homma, R. M. Hoffman, and I. Endo, "Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer," *Ann Gastroenterol Surg*, vol. 3, no. 2, p. 130, Mar. 2019, doi: 10.1002/AGS3.12225.
- [29] L. Kumar, S. Kumar, K. Sandeep, and S. K. S. Patel, "Therapeutic Approaches in Pancreatic Cancer: Recent Updates," *Biomedicines*, vol. 11, no. 6, p. 11, Jun. 2023, doi: 10.3390/BIOMEDICINES11061611.
- [30] C. Y. Zhang, S. Liu, and M. Yang, "Clinical diagnosis and management of pancreatic cancer: Markers, molecular mechanisms, and treatment options," <http://www.wjgnet.com/>, vol. 28, no. 48, pp. 6827–6845, Dec. 2022, doi: 10.3748/WJG.V28.I48.6827.
- [31] H. Duan, L. Li, and S. He, "Advances and Prospects in the Treatment of Pancreatic Cancer," *Int J Nanomedicine*, vol. 18, p. 3973, 2023, doi: 10.2147/IJN.S413496.
- [32] T. Harada and A. Iijima, "[Pharmacological profile and clinical findings of palbociclib (IBRANCE® capsule 25 mg/125 mg)]," *Nihon Yakurigaku Zasshi*, vol. 152, no. 6, pp. 306–318, 2018, doi: 10.1254/FPJ.152.306.
- [33] J. Carter and P. Tadi, "Erlotinib," *StatsPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatsPearls Publishing*, Dec. 2022, Accessed: May 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554484/>
- [34] L. Wang and G. H. Du, "Paclitaxel," *Natural Small Molecule Drugs from Plants*, pp. 537–544, Nov. 2023, doi: 10.1007/978-981-10-8022-7_89.
- [35] J. M. Gold and A. Raja, "Cisplatin," *StatPearls*, May 2023, Accessed: May 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547695/>
- [36] M. Amrutkar and I. P. Gladhaug, "Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine," *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 11, Nov. 2017, doi: 10.3390/CANCERS9110157.
- [37] S. Zeng, M. Pöttler, B. Lan, R. Grützmann, C. Pilarsky, and H. Yang, "Chemoresistance in Pancreatic Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 18, Sep. 2019, doi: 10.3390/IJMS20184504.

- [38] J. Du, J. Gu, and J. Li, “Mechanisms of drug resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma at different levels,” *Biosci Rep*, vol. 40, no. 7, p. 20200401, Jul. 2020, doi: 10.1042/BSR20200401.
- [39] G. Chen, J. Xie, P. Huang, and Z. Yang, “Overexpression of TAZ promotes cell proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer,” *Oncol Lett*, vol. 12, no. 3, pp. 1821–1825, Sep. 2016, doi: 10.3892/OL.2016.4829.
- [40] M. R. Makena, H. Gatla, D. Verlekar, S. Sukhavasi, M. K. Pandey, and K. C. Pramanik, “Wnt/ β -Catenin Signaling: The Culprit in Pancreatic Carcinogenesis and Therapeutic Resistance,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 17, Sep. 2019, doi: 10.3390/IJMS20174242.
- [41] H. K. Matthews, C. Bertoli, and R. A. M. de Bruin, “Cell cycle control in cancer,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:1, vol. 23, no. 1, pp. 74–88, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00404-3.
- [42] R. Jan and G. e. S. Chaudhry, “Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics,” *Adv Pharm Bull*, vol. 9, no. 2, p. 205, 2019, doi: 10.15171/APB.2019.024.
- [43] S. Stanciu *et al.*, “Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Pancreatic Cancer: From Molecular to Clinical Aspects,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 17, Sep. 2022, doi: 10.3390/IJMS231710132.
- [44] S. Mehra, N. Deshpande, and N. Nagathihalli, “Targeting PI3K Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Rationale and Progress,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 17, Sep. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13174434.
- [45] G. T. K. Boopathy and W. Hong, “Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ signaling in angiogenesis,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 7, no. APR, p. 440860, Apr. 2019, doi: 10.3389/FCELL.2019.00049/BIBTEX.
- [46] M. R. Makena, H. Gatla, D. Verlekar, S. Sukhavasi, M. K. Pandey, and K. C. Pramanik, “Wnt/ β -Catenin Signaling: The Culprit in Pancreatic Carcinogenesis and Therapeutic Resistance,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 17, Sep. 2019, doi: 10.3390/IJMS20174242.

- [47] K. Y. Aguilera and D. W. Dawson, “WNT Ligand Dependencies in Pancreatic Cancer,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 671022, Apr. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.671022.
- [48] S. Khan, Ansarullah, D. Kumar, M. Jaggi, and S. C. Chauhan, “Targeting microRNAs in Pancreatic Cancer: Microplayers in The Big Game,” *Cancer Res*, vol. 73, no. 22, pp. 6541–6547, Nov. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1288.
- [49] I. Garajová, T. Y. Le Large, A. E. Frampton, C. Rolfo, J. Voortman, and E. Giovannetti, “Molecular Mechanisms Underlying the Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Pancreatic Cancer,” *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/678401.
- [50] E. T. Y. Mok, J. L. Chitty, and T. R. Cox, “miRNAs in pancreatic cancer progression and metastasis,” *Clinical & Experimental Metastasis* 2024, pp. 1–24, Jan. 2024, doi: 10.1007/S10585-023-10256-0.
- [51] Z. Rong *et al.*, “Circular RNA in pancreatic cancer: a novel avenue for the roles of diagnosis and treatment,” *Theranostics*, vol. 11, no. 6, p. 2755, Jan. 2021, doi: 10.7150/THNO.56174.
- [52] Y. Zhang *et al.*, “Profiling of 95 MicroRNAs in Pancreatic Cancer Cell Lines and Surgical Specimens by Real Time PCR Analysis,” *World J Surg*, vol. 33, no. 4, p. 698, Apr. 2009, doi: 10.1007/S00268-008-9833-0.
- [53] T. Wang, J. Wu, X. Liu, and S. Li, “Serum miR-34a is a potential diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma,” *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 10, no. 9, p. 9683, 2017.
- [54] J. Park, E. Lee, C. Esau, T. S.- Pancreas, and undefined 2009, “Antisense inhibition of microRNA-21 or-221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma,” *journals.lww.com*.
- [55] J. Dong, Y. Zhao, L. Zhou, T. Zhang, G. C.-A. of medical, and undefined 2011, “Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells,” *Elsevier*.

- [56] S. Hamada, A. Masamune, S. Miura, K. Satoh, and T. Shimosegawa, "MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX," *Cell Signal*, vol. 26, no. 2, pp. 179–185, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2013.11.003.
- [57] M. Chen, M. Wang, S. Xu, X. Guo, and J. Jiang, "Upregulation of miR-181c contributes to chemoresistance in pancreatic cancer by inactivating the Hippo signaling pathway These authors have contributed equally to this work," vol. 6, no. 42.
- [58] J. Yao, Z. Li, X. Wang, P. Xu, L. Zhao, and J. Qian, "MiR-125a regulates chemo-sensitivity to gemcitabine in human pancreatic cancer cells through targeting A20," *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 48, no. 2, pp. 202–208, Feb. 2016, doi: 10.1093/ABBS/GMV129.
- [59] Y. Sun *et al.*, "Restoration of miRNA-148a in pancreatic cancer reduces invasion and metastasis by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway via downregulating maternally expressed gene-3," *Exp Ther Med*, vol. 17, no. 1, p. 639, Nov. 2019, doi: 10.3892/ETM.2018.7026.
- [60] N. S. Natesh *et al.*, "Emerging Role of miR-345 and Its Effective Delivery as a Potential Therapeutic Candidate in Pancreatic Cancer and Other Cancers," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13121987.
- [61] H. Li *et al.*, "MiR-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4," *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep39001.
- [62] A. Ameri *et al.*, "Diverse activity of miR-150 in Tumor development: shedding light on the potential mechanisms," *Cancer Cell Int*, vol. 23, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/S12935-023-03105-3.
- [63] A. Ameri *et al.*, "Diverse activity of miR-150 in Tumor development: shedding light on the potential mechanisms," *Cancer Cell Int*, vol. 23, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2023, doi: 10.1186/S12935-023-03105-3/TABLES/3.
- [64] "MIR150." Accessed: May 08, 2024. [Online]. Available: <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/50556/mir150>

- [65] K. Yonemori, H. Kurahara, K. Maemura, and S. Natsugoe, "MicroRNA in pancreatic cancer," *Journal of Human Genetics* 2017 62:1, vol. 62, no. 1, pp. 33–40, Jun. 2016, doi: 10.1038/jhg.2016.59.
- [66] D. Shang *et al.*, "Pancreatic cancer cell–derived exosomal microRNA-27a promotes angiogenesis of human microvascular endothelial cells in pancreatic cancer via BTG2," *J Cell Mol Med*, vol. 24, no. 1, p. 588, Jan. 2020, doi: 10.1111/JCMM.14766.
- [67] G. He, L. Zhang, Q. Li, and L. Yang, "miR-92a/DUSP10/JNK signalling axis promotes human pancreatic cancer cells proliferation," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 68, no. 1, pp. 25–30, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2013.11.004.
- [68] R. Larrue *et al.*, "miR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death," *Cell Death & Disease* 2023 14:9, vol. 14, no. 9, pp. 1–10, Sep. 2023, doi: 10.1038/s41419-023-06125-z.
- [69] M. Kapałczyńska *et al.*, "2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures," *Arch Med Sci*, vol. 14, no. 4, p. 910, 2018, doi: 10.5114/AOMS.2016.63743.
- [70] K. Duval *et al.*, "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture," *Physiology*, vol. 32, no. 4, p. 266, Jun. 2017, doi: 10.1152/PHYSIOL.00036.2016.
- [71] E. Dalir Abdolahinia and X. Han, "The Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models in the Study of Oral Cancer Immune Microenvironment," *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 17, Sep. 2023, doi: 10.3390/CANCERS15174266.
- [72] C. Jubelin *et al.*, "Three-dimensional in vitro culture models in oncology research," *Cell & Bioscience* 2022 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–28, Sep. 2022, doi: 10.1186/S13578-022-00887-3.
- [73] L. B. Weiswald, D. Bellet, and V. Dangles-Marie, "Spherical Cancer Models in Tumor Biology," *Neoplasia*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.NEO.2014.12.004.

- [74] X. Xu, M. C. Farach-Carson, and X. Jia, “Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation,” *Biotechnol Adv*, vol. 32, no. 7, pp. 1256–1268, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2014.07.009.
- [75] K. M. Watters, P. Bajwa, and H. A. Kenny, “Organotypic 3D Models of the Ovarian Cancer Tumor Microenvironment,” *Cancers 2018, Vol. 10, Page 265*, vol. 10, no. 8, p. 265, Aug. 2018, doi: 10.3390/CANCERS10080265.
- [76] M. Nowacka, K. Sterzynska, M. Andrzejewska, M. Nowicki, and R. Januchowski, “Drug resistance evaluation in novel 3D in vitro model,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 138, p. 111536, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2021.111536.
- [77] B. K. Samulitis *et al.*, “Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors,” *Cancer Biol Ther*, vol. 16, no. 1, p. 43, 2015, doi: 10.4161/15384047.2014.986967.
- [78] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, Jul. 2012, doi: 10.1038/NMETH.2089.
- [79] A. Imran *et al.*, “Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article,” *Iran J Public Health*, vol. 46, no. 11, p. 1475, 2017, Accessed: May 11, 2024. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC5696686/
- [80] J. A. Somarelli *et al.*, “Molecular Biology and Evolution of Cancer: From Discovery to Action,” *Mol Biol Evol*, vol. 37, no. 2, pp. 320–326, Feb. 2020, doi: 10.1093/MOLBEV/MSZ242.
- [81] I. Garajová, T. Y. Le Large, A. E. Frampton, C. Rolfo, J. Voortman, and E. Giovannetti, “Molecular Mechanisms Underlying the Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Pancreatic Cancer,” *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/678401.
- [82] J. Zhou *et al.*, “Identification of chemoresistance-related mRNAs based on gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines,” *Cancer Med*, vol. 9, no. 3, pp. 1115–1130, Feb. 2020, doi: 10.1002/CAM4.2764.

- [83] H. Tong, Z. Huang, H. Chen, B. Zhou, Y. Liao, and Z. Wang, “Emodin Reverses Gemcitabine Resistance of Pancreatic Cancer Cell Lines Through Inhibition of IKK β /NF- κ B Signaling Pathway,” *Onco Targets Ther*, vol. 13, pp. 9839–9848, Oct. 2020, doi: 10.2147/OTT.S253691.
- [84] J. Gu *et al.*, “Hsa-miR-3178/RhoB/PI3K/Akt, a novel signaling pathway regulates ABC transporters to reverse gemcitabine resistance in pancreatic cancer,” *Mol Cancer*, vol. 21, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12943-022-01587-9.
- [85] F. Wang *et al.*, “hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations,” *Br J Cancer*, vol. 103, no. 4, pp. 567–574, Aug. 2010, doi: 10.1038/SJ.BJC.6605724.
- [86] D. Bai *et al.*, “MiR-150 Inhibits Cell Growth In Vitro and In Vivo by Restraining the RAB11A/WNT/ β -Catenin Pathway in Thyroid Cancer,” *Med Sci Monit*, vol. 23, p. 4885, Oct. 2017, doi: 10.12659/MSM.906997.
- [87] B. K. Samulitis *et al.*, “Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors,” *Cancer Biol Ther*, vol. 16, no. 1, p. 43, 2015, doi: 10.4161/15384047.2014.986967.
- [88] E. L. Deer *et al.*, “Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines,” *Pancreas*, vol. 39, no. 4, pp. 425–435, 2010, doi: 10.1097/MPA.0B013E3181C15963.
- [89] Z. Wang *et al.*, “Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway,” *Cancer Res*, vol. 69, no. 6, pp. 2400–2407, Mar. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4312/654986/P/ACQUISITION-OF-EPITHELIAL-MESENCHYMAL-TRANSITION.
- [90] A. N. Shah, J. M. Summy, J. Zhang, S. I. Park, N. U. Parikh, and G. E. Gallick, “Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells,” *Ann Surg Oncol*, vol. 14, no. 12, pp. 3629–3637, Dec. 2007, doi: 10.1245/S10434-007-9583-5/METRICS.

- [91] R. Chen *et al.*, “Disrupting glutamine metabolic pathways to sensitize gemcitabine-resistant pancreatic cancer,” *Scientific Reports* 2017 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08436-6.
- [92] S. Borowicz *et al.*, “The Soft Agar Colony Formation Assay,” *J Vis Exp*, no. 92, p. 51998, Oct. 2014, doi: 10.3791/51998.
- [93] Y. Gao *et al.*, “Linc-DYNC2H1-4 promotes EMT and CSC phenotypes by acting as a sponge of miR-145 in pancreatic cancer cells,” *Cell Death Dis*, vol. 8, no. 7, p. e2924, 2017, doi: 10.1038/CDDIS.2017.311.
- [94] A. H. S. Yehya, M. Asif, A. M. S. Abdul Majid, and C. E. Oon, “Polymolecular botanical drug of Orthosiphon stamineus extract (C5OSEW5050ESA) as a complementary therapy to overcome gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells,” *J Tradit Complement Med*, vol. 13, no. 1, p. 39, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.JTCME.2022.10.002.
- [95] Y. Mao *et al.*, “Combination of PI3K/Akt Pathway Inhibition and Plk1 Depletion Can Enhance Chemosensitivity to Gemcitabine in Pancreatic Carcinoma,” *Transl Oncol*, vol. 11, no. 4, p. 852, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.TRANON.2018.04.011.
- [96] J. Cui, Y. Guo, H. Wu, J. Xiong, and T. Peng, “Everolimus regulates the activity of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by targeting the Warburg effect via PI3K/AKT/mTOR signaling,” *Molecular Medicine*, vol. 27, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2021, doi: 10.1186/S10020-021-00300-8/FIGURES/7.
- [97] T. Zhan *et al.*, “Downregulation of MicroRNA-455-3p Links to Proliferation and Drug Resistance of Pancreatic Cancer Cells via Targeting TAZ,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 10, p. 215, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.OMTN.2017.12.002.
- [98] T. Namba, R. Kodama, S. Moritomo, T. Hoshino, and T. Mizushima, “Zidovudine, an anti-viral drug, resensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibition of the Akt-GSK3 β -Snail pathway,” *Cell Death Dis*, vol. 6, no. 6, Jun. 2015, doi: 10.1038/CDDIS.2015.172.
- [99] F. Quiñonero *et al.*, “PARP1 inhibition by Olaparib reduces the lethality of pancreatic cancer cells and increases their sensitivity to Gemcitabine,”

Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 155, p. 113669, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2022.113669.

- [100] N. S. Natesh *et al.*, “Emerging Role of miR-345 and Its Effective Delivery as a Potential Therapeutic Candidate in Pancreatic Cancer and Other Cancers,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13121987.
- [101] D. Chen *et al.*, “miR-27b-3p inhibits proliferation and potentially reverses multi-chemoresistance by targeting CBLB/GRB2 in breast cancer cells,” *Cell Death & Disease* 2018 9:2, vol. 9, no. 2, pp. 1–13, Feb. 2018, doi: 10.1038/s41419-017-0211-4.
- [102] X. Rao, L. Wan, Z. Jie, X. Zhu, J. Yin, and H. Cao, “Upregulated miR-27a-3p Indicates a Poor Prognosis in Pancreatic Carcinoma Patients and Promotes the Angiogenesis and Migration by Epigenetic Silencing of GATA6 and Activating VEGFA/VEGFR2 Signaling Pathway,” *Onco Targets Ther*, vol. 12, p. 11241, 2019, doi: 10.2147/OTT.S220621.
- [103] W. S. Wang *et al.*, “Combined serum CA19-9 and miR-27a-3p in peripheral blood mononuclear cells to diagnose pancreatic cancer,” *Cancer Prevention Research*, vol. 6, no. 4, pp. 331–338, Apr. 2013, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0307/35977/AM/COMBINED-SERUM-CA19-9-AND-MIR-27A-3P-IN-PERIPHERAL.
- [104] Y. Liu, Q. Hu, J. Ao, H. Li, and M. Li, “Role of miR - 92a - 3p/PTEN axis in regulation of pancreatic cancer cell proliferation and metastasis,” *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, vol. 45, no. 3, pp. 280–289, Mar. 2020, doi: 10.11817/J.ISSN.1672-7347.2020.180459.
- [105] R. Larrue *et al.*, “miR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death,” *Cell Death Dis*, vol. 14, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.1038/S41419-023-06125-Z.
- [106] A. Ameri *et al.*, “Diverse activity of miR-150 in Tumor development: shedding light on the potential mechanisms,” *Cancer Cell Int*, vol. 23, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/S12935-023-03105-3.

- [107] A. Ameri *et al.*, “Diverse activity of miR-150 in Tumor development: shedding light on the potential mechanisms,” *Cancer Cell Int*, vol. 23, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2023, doi: 10.1186/S12935-023-03105-3/TABLES/3.
- [108] S. K. Srivastava *et al.*, “MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells,” *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 12, p. 1832, Dec. 2011, doi: 10.1093/CARCIN/BGR223.
- [109] M. Muguruma *et al.*, “Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 533, no. 3, pp. 268–274, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.BBRC.2020.08.075.
- [110] P. Li, Y. Yao, Y. Ma, and Y. Chen, “MiR-150 attenuates LPS-induced acute lung injury via targeting AKT3,” *Int Immunopharmacol*, vol. 75, p. 105794, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.INTIMP.2019.105794.
- [111] J. Gu *et al.*, “Hsa-miR-3178/RhoB/PI3K/Akt, a novel signaling pathway regulates ABC transporters to reverse gemcitabine resistance in pancreatic cancer,” *Mol Cancer*, vol. 21, no. 1, pp. 1–17, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12943-022-01587-9/FIGURES/8.
- [112] O. Schmalhofer, S. Brabletz, and T. Brabletz, “E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer,” *Cancer Metastasis Rev*, vol. 28, no. 1–2, pp. 151–166, 2009, doi: 10.1007/S10555-008-9179-Y.
- [113] Ö. Rencüzoğullari and E. D. Arisan, “Palbociclib suppresses the cancer stem cell properties and cell proliferation through increased levels of miR-506 or miR-150 in Panc-1 and MiaPaCa-2 cells,” *Turkish Journal of Biology*, vol. 46, no. 5, p. 342, 2022, doi: 10.55730/1300-0152.2622.
- [114] W. Hu *et al.*, “Inhibition of Dishevelled-2 suppresses the biological behavior of pancreatic cancer by downregulating Wnt/ β -catenin signaling,” *Oncol Lett*, vol. 22, no. 5, Nov. 2021, doi: 10.3892/OL.2021.13030.
- [115] M. Quan *et al.*, “Lysine demethylase 2 (KDM2B) regulates hippo pathway via MOB1 to promote pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) progression,” *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 39, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1186/S13046-019-1489-0.

- [116] T. Yuan *et al.*, “The Hippo kinase LATS2 impairs pancreatic β -cell survival in diabetes through the mTORC1-autophagy axis,” *Nature Communications* 2021 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25145-x.
- [117] S. Westphal and H. Kalthoff, “Apoptosis: Targets in Pancreatic Cancer,” *Molecular Cancer* 2003 2:1, vol. 2, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2003, doi: 10.1186/1476-4598-2-6.
- [118] D. L. Liu *et al.*, “Emodin reverses gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro,” *Int J Oncol*, vol. 40, no. 4, p. 1049, Apr. 2012, doi: 10.3892/IJO.2011.1285.
- [119] D. Namima *et al.*, “The Effect of Gemcitabine on Cell Cycle Arrest and microRNA Signatures in Pancreatic Cancer Cells,” *In Vivo (Brooklyn)*, vol. 34, no. 6, p. 3195, Nov. 2020, doi: 10.21873/INVIVO.12155.

7. EKLER

7.3.EK A: Cihaz Listesi

Tablo 6. Kullanılan Cihazların Listelenmesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
CO2 inkübatörü	50116047	Thermo Fsiher Scientific
Buz Makinesi	AF80	Scotsman
Buharlı Sterilizatör	OT 90L	Nüve
Hemositometre	Neubauer Improved	Assistent Germany
Floresan Mikroskop	IX71	Olympus
Güç Kaynağı	PowerPac Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Isıtıcı Blok	HB120-S	DLAB
İnvert Mikroskop	Model adı: XDS-1B	SOIF
Laminar Flow	HERASAFE KS	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Mini Santrifüj Cihazı	CR-1512	CAPP
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus
Otoklav	OT032	Nüve
Otomatik Hücre Sayacı	EVETM/EVE-MC	NanoEntek
pH Metre	Orion STAR A211	Thermo Scientific
PCR Kapakları, Stripler	AB-0783	Thermo Scientific
Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Santrifüj	NF 200	Nüve
Silindir Döndürücü	SRT6D	Stuart
Su Banyosu	BM302	Nüve
Yüksek Hızlı Santrifüj	5430 R	Eppendorf
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP System 1708280	BioRad
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer Innova U725	New Brunswick Scientific
Distile Su Cihazı	Tank 30 Liter PE/Milipore	Labor Teknik
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	CFX Connect	BioRad
Dikey Jel Elektroforezi Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad

7.4.EK B: Hücre Kültürü Donanım Listesi

Tablo 7. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Capan-2	HTB-80	ATCC
MIAPaCa-2	CRL-1420	ATCC
Eğimli Boyun 25 cm2 Hücre Büyütme Kapları	707001	NEST
25 cm2 Hücre Büyütme Kapları	90026	TPP
75 cm2 Hücre Büyütme Kapları	90076	TPP
40 mm Hücre Büyütme Kapları	93040	TPP
60 mm Hücre Büyütme Kapları	93060	TPP
100 mm Hücre Büyütme Kapları	704001	NEST
150 mm Hücre Büyütme Kapları	715001	NEST
Kriyojenik Şişe	607001	NEST
96 Kuyucuklu Hücre Kabı	92096	TPP
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP
50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
Fetal Sığır Serumı Gelişmiş (FBS)	FBS-11A	Capricorn Scientific
miScript miRNA Mimic	Qiagen	
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
Serolojik Pipet (10 ml)	SP-10-C	CAPPHarmony
Transfeksiyon Ajanı	15081	İNtRON BIOTECHNOLOGY
Trypsin-EDTA (0.25%) (1X)	SH40003.01	HyClone

7.5.EK C: Kimyasal Listesi

Tablo 8. Kullanılan Kimyasalların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Agaroz (Tip 1)	121853	MERCK
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1)	A0011	BIOBASIC
APS	A2941	AppliChem
Asetik Asit	901.013	ISOLAB
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	1610436	BioRad
DEPC	A0881	AppliChem
DMSO	D1370	Duchefa Biochemie
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	R0611	Thermo Scientific
DPBS (10x)	P04-53500	PAN Biotech
Etanol	TK.200650	Teksoll
Glisin	1275KG001	BIOFROXX
Hidrojen Peroksit %35	1086001000	MERCK
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
2-Propanol (İzopropanol)	1096342500	MERCK
Metanol	34860	Honeywell
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
miScript II RT Kit	218161	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	Qiagen
Kloroform	1024452500	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Luminol	A2185	AppliChem
M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi	78505	ThermoFisher Scientific

7.6.Kullanılan Primer Dizileri

Tablo 9. Primer dizileri

miRNA	Baz Dizisi Dizisi 5'-3'
miR-150-5p	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG
miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC
U6-RP	CGCTTCACCGAATTTGCGTGTCAT
U6-FP	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT

7.7.KULLANILAN ÇÖZELTİLER

7.7.1. Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml)

Fetal sığır serumu (FBS) 9 ml Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH₃)₂SO) 1 ml DMSO kullanılarak hücre kültürüne uygun hazırlanan medya 0,22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir.

7.7.2. Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için)

M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent 10 ml, Roche PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli 1 tablet, Roche proteaz inhibitör kokteyli 1 tablet, +4°C'de muhafaza edilir.

7.7.3. 5X Laemmli Tamponunun Hazırlanışı (10 ml)

1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8) 2,0 ml, Bromofenol mavisi (%1) 0,5 ml, Gliserol 5,0 ml, β-merkaptoetanol 2,5 ml, Sodyum dodesil sülfat 2,0 gr, -20°C'de muhafaza edilir.

7.7.4. Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı (250 ml)

Coomassie mavisi (C₄₇H₅₀N₃O₇S₂) 25,0 mg, %95 (hacim/hacim) etanol (C₂H₅OH) 12,5 ml, %85 asetik asit (CH₃COOH) 25,0 ml, Distile su (dH₂O) 212,5 ml, +4°C'de muhafaza edilir.

7.7.5. Amonyum Persülfat (%10)

1 g tartılan APS 10 ml distile su ile çözündürülür. Hazırlanan çözelti -20°C’de saklanır.

7.7.6. Bloklama sütü (%5)

50 ml olarak hazırlanan bloklama sütü için 2,5 g tartılan yağsız süt tozu TBS-T (TBS Tween20) ile tamamlanarak karıştırıcı yardımı ile çözünür.

7.7.7. Bradford Reaktifi

Ana stok 100 mg Coomassie Brilliant Blue(G-250) boyası, %95’lik etanolden 50 ml, %85’lik fosforik asitten 100 ml, 1000 ml distile su içerisinde çözünür. Tamamen çözünen ana stok 0,22 µm por çapına sahip filtreler yardımı ile süzülür ve alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C’de saklanır.

7.7.8. Tris-Baz Çözeltisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı (pH 8,8)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 90,8 gr, dH₂O 500 ml, Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 8,8’e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L’ye tamamlanır.

7.7.9. Tris-Baz Çözeltisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı (pH 6,8)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,25 g, dH₂O 500, ml Tris-baz 800 ml suyun içinde çözülerek pH 6,8’e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L’ye tamamlanır.

7.7.10. %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı

Sodyum dodesil sülfat (SDS) 10,0 g, dH₂O 100 ml. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.7.11. 10X Yürütme Tamponun Hazırlanışı (pH 8,3)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,3 gr Glisin (C₂H₅NO₂) 144,0 g Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 10,0 g Distile su (dH₂O) 1000 ml Tris-baz ve glisin 800 ml distile su içinde çözülerek pH 8,3’e ayarlanır. SDS eklenir ve çözelti hacmi 1 L’ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.7.12. 10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,3 g, Glisin (C₂H₅NO₂) 144,0 g, Distile su (dH₂O) 1000 ml. Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde çözülerek pH 8,3’e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L’ye tamamlanır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.7.13. %12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Tablo 10. Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

KİMYASAL	ALT JEL	ÜST JEL
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-Baz çözeltisi	2,5 ml	1,125 ml
% 10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
%30 Akrilamis/Bisakrilamid	4,0 ml	0,67 ml
%10 APS	0,05 ml	0,025 ml
Tetrametiletildiaminin (TEMED)	0,005 ml	0,005 ml

7.7.14. 10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6)

Tris-baz 12,11 g, Sodyum klorür (NaCl) 86,6 g, Distile su 1000 ml. Kimyasallar 800 ml suyun içinde çözülerek pH 7,6'ya ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve TBS-Tween çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 (hacim/hacim) oranında Tween eklenilerek çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.7.15. %5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml)

Yağsız süt tozu 2,5 g 1X TBS-T çözeltisi 50 ml -20°C'de muhafaza edilir.

7.7.16. Tris-Baz Çözeltisinin (1 M) Hazırlanışı (pH 8,5)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 60,5 g Distile su (dH_2O) 500 ml. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

7.7.17. Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)

P-Kumarik asit ($C_9H_8O_3$) 0,15 g Dimetilsülfoksit (DMSO, $(CH_3)_2SO$) 10 ml +4°C'de muhafaza edilir.

7.7.18. Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml)

Luminol ($C_8H_7N_3O_2$) 0,44 g, Dimetilsülfoksit (DMSO) 10 ml. -20°C'de muhafaza edilir.

7.7.19. 10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4)

NaCl 80,0 g, Potasyum klorür (KCl) 2,0 g, Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) 14,4 g Mono potasyum fosfat (KH_2PO_4) 2,4 g, dH₂O 1000 ml .

7.7.20. Kemiluminesans çözelti hazırlanışı

Tablo 11. Kemiluminesans çözelti hazırlanışı. A ve B çözeltileri hazırlandıktan sonra karıştırılır ve karanlık koşulda çalışılır.

	Kemiluminesans A çözeltisi	Kemiluminesans B çözeltisi
Distile su	9,0 ml	9,0 ml
1M Tris-Baz pH 8,5	1,0 ml	1,0 ml
Kumarik asit	45,0 µl	
Luminol çözeltisi	100,0 µl	
Hidrojen Peroksit		6,0 µl