



**T.C.**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEMSİTABİN VE POLİDATİNİN İNSAN PANKREAS KANSERİ  
(PANC-1) HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRES VE  
ENFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYŞENUR BOZOĞLUER**

**TEMMUZ 2021**

**AYŞENUR BOZOĞLUER**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEMMUZ 2021**

**GEMSİTABİN VE POLİDATİNİN İNSAN PANKREAS KANSERİ (PANC-1)  
HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRES VE ENFLAMASYON ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Ayşenur BOZOĞLUER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ**

**İkinci Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2021**

Ayşenur BOZOĞLUER tarafından hazırlanan “Gemsitabin ve Polidatinin İnsan Pankreas Kanseri (Panc-1) Hücrelerinde Oksidatif Stres ve Enflamasyon Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir

**Danışman:** Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ

Biyoloji, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Başkan :** Prof. Dr. Ahmet DURSUN

Biyoloji, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Üye :** Prof. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik, Ordu Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2021

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Ayşenur BOZOĞULER

14/07/2021

# GEMSİTABİN VE POLİDATİNİN İNSAN PANKREAS KANSERİ (PANC-1) HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRES VE ENFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşenur BOZOĞLUER

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2021

## ÖZET

Pankreas kanserlerinde kullanılan gemsitabin (GEM)'e karşı zamanla ilaç direncinin geliştiği görülmüştür. Bu nedenle, GEM ile birlikte kullanılarak tümörleri tedaviye duyarlı hale getirebilecek ajanların belirlenmesi ihtiyacı doğmaktadır. Bu nedenle, çok çeşitli farmakolojik özelliği sahip polidatin (PD)'i GEM ile birlikte insan pankreas kanser hücreleri (PANC-1) üzerine etkisini araştırdık. GEM, PD ve bunların kombinasyonları PANC-1'e verilerek sitotoksosite, enflamasyon ve oksidatif stres parametreleri değerlendirildi. Sitotoksosite için MTT testi, COX-2 ve IL-8 ekspresyonları için real-time PZR ve redükte glutatyon (GSH), lipid peroksidasyonu (LP) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tayini için kolorimetrik yöntemler kullanıldı. Polidatin GEM ile birlikte verildiğinde (72. saat) GEM ile sinerjistik etki göstererek onun sitotoksitesini artırmıştır. COX-2 ve IL-8 ekspresyon düzeyleri düşük doz GEM ve PD kombinasyonlarında GEM'in tek başına uygulandığı gruplara göre anlamlı düzeyde artmıştır. GEM tek başına PANC-1'e verildiğinde LP seviyesinin artarak, GSH seviyesinin azalarak ve GPx aktivitesini baskılayarak oksidatif stresi artırmıştır. Düşük doz PD kombinasyonlarında GEM tarafından indüklenen oksidatif stresin azaldığı fakat yüksek doz PD kombinasyonlarında bu azalmanın ortadan kalktığı görülmüştür. Sonuç olarak, PD oksidatif stres ve enflamasyonu modüle ederek PANC-1 hücrelerinde GEM sitotoksitesini artırmıştır. Bulgularımız PD'nin GEM tedavisinin yanıtını artırmak için potansiyel neoadjuvan tedavi olabileceğini düşündürmektedir.

Sayfa Adedi : 75  
Anahtar Kelimeler : Cox-2, Gemsitabin, Glutatyon, IL-8, Lipit Peroksidasyonu, PANC-1, Polidatin  
Danışman : Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ

EFFECT OF GEMCITABIN AND POLYDATIN ON OXIDATIVE STRESS AND  
INFLAMMATION IN HUMAN PANCREATIC CANCER (PANC-1) CELLS

(M. Sc. Thesis)

Ayşenur BOZOĞLUER

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2021

ABSTRACT

It is observed that drug resistance develops over time against gemcitabine (GEM) used in pancreatic cancers. There is a need to identify agents that can sensitize tumors to treatment by using them together with GEM. Therefore, we investigated the effect of polydatin (PD), which has a wide variety of pharmacological properties, together with GEM on human pancreatic cancer cells (PANC-1). GEM, PD and their combinations were given to PANC-1 to evaluate cytotoxicity, inflammation and oxidative stress parameters. MTT test for cytotoxicity, real-time PCR for COX-2 and IL-8 expressions and colorimetric methods were used determination for reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LP) and glutathione peroxidase (GPx). When polydatin was given together with GEM (72nd hour), it showed a synergistic effect with GEM and increased its cytotoxicity. COX-2 and IL-8 expression levels were significantly increased in low-dose GEM and PD combinations compared to GEM alone groups. When GEM was given to PANC-1 alone, it increased oxidative stress by increasing LP level, decreasing GSH level and suppressing GPx activity. It was observed that the oxidative stress induced by GEM decreased in low-dose PD combinations, but this decrease disappeared in high-dose PD combinations.

Page Number : 75

Keywords : Cox-2, Gemcitabine, Glutathione, IL-8, Lipid Peroxidation, PANC-1, Polydatin

Supervisor : Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ

## ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez konusunu bana veren, çalışmalarım boyunca destekleyen, yönlendiren ve yazımı sırasında bana zaman ayırarak yardımını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ'a, Prof. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU, Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN hocama teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez dönemi boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim. Bu tez çalışması **FMB-BAP 18-0314** Proje No' su ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi kapsamında desteklenmiştir.





## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.GEMSİTABİN (GEM) .....	4
2.1.1.Kimyasal yapısı.....	4
2.1.2.Etki mekanizmaları.....	5
2.2.POLYDATİN (PD).....	6
2.3.KANSER.....	7
2.3.1.Kanser Nedenleri.....	8
2.3.2.Kanserden Korunma Yolları .....	8
2.4.Pankreasın Yapısı ve Görevleri .....	9
2.5.Pankreas Kanseri .....	10
2.5.1 Pankreas Kanseri Belirtileri .....	11
2.5.2 Pankreas Kanserinin Nedenleri .....	12
2.5.3.Pankreas Kanserinde Mortalite ve Morbidite Oranı.....	12
2.6.Enflamasyon ve Kanser .....	13
2.7. Siklooksigenaz-2 (COX-2).....	14
2.8.İnterlökinler (IL).....	15
2.9.Reaktif Oksijen Türleri (ROT) .....	19

2.10. Antioksidanlar .....	20
2.10.1. Enzim olan doğal antioksidanlar .....	21
2.10.2. Enzimatik olmayan doğal antioksidanlar.....	23
2.11. Lipit Peroksidasyonu (LP).....	24
2.12. Oksidatif Stres .....	26
2.12.1 Oksidatif stres ve kanser ilişkisi.....	27
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>29</b>
3.1. Materyal .....	29
3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler .....	29
3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler .....	29
3.2. Metot .....	30
3.2.1. Test Maddelerinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması .....	30
3.2.2. Hücre Kültürü Analizleri .....	30
3.2.3. Hücre <i>In-vitro</i> Sitotoksite Testi (MTT) .....	30
3.2.4. Total RNA İzolasyonu ve Analizi.....	31
3.2.5. c DNA Sentezi.....	32
3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR.....	32
3.2.7. PANC-1 Hücrelerinde Oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi.....	34
3.2.8. Protein Tayini.....	35
3.2.9. İstatiksel Analiz.....	35
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
4.1. Hücre canlılığı ve Sitotoksite Testleri.....	36
4.2. Gemsitabin ve Polidatinin PANC-1 hücrelerinde Oksidatif Stres Parametrelerine Etkileri .....	40
4.2.1 Lipit Peroksidasyon Seviyesi.....	40
4.2.2 Redükte Glutasyon Seviyesi.....	41
4.2.3 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi .....	42

4.3. Gemsitabin ve Polidatinin PANC-1 hücrelerinde <i>Cox-2</i> ve <i>IL-8</i> Gen İfadesi Üzerine Etkileri .....	44
4.4. Gemsitabin ve Polidatinin Pankreas Kanseri Hücresi (PANC-1) <i>IL-8</i> mRNA ekspresyon düzeyine etkisi .....	45
5. TARTIŞMA .....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	52
7. KAYNAKLAR.....	53
8. ÖZGEÇMİŞ .....	67



**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan primer dizileri.....	33
Tablo 3.2. Gerçek zamanlı PZR karışım oranları .....	34
Tablo 3.3. PZR amplifikasyon koşulları .....	34
Tablo 3.4. Gemsitabin, polidatin ve kombinasyonlarından oluşan gruplar (72. saat) .....	39



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Gemsitabinin kimyasal yapısı .....	5
Şekil 2.2. Gemsitabinin etki mekanizması .....	6
Şekil 2.3. Polidatin'in kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2.4. Kanser hücrelerinin oluşumu .....	8
Şekil 2.5. Pankreasın yapısı .....	9
Şekil 2.6. Pankreas hücreleri .....	10
Şekil 2.7. Pankreas kanserinin yayılımı .....	11
Şekil 2.8. Cox enzimlerinin buldukları dokular ve fonksiyonları .....	15
Şekil 2.9. Hücrenin antioksidan mekanizması .....	21
Şekil 2.10. Hidrojen peroksidin, NADPH tarafından glutatyon aracılığıyla indirgenmesi	24
Şekil 2.11. Lipit peroksidasyon mekanizması .....	25
Şekil 2.12. Oksidatif stres sonuçları.....	27
Şekil 4.1. Gemsitabinin PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi .....	36
Şekil 4.2. Polidatinin PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi .....	37
Şekil 4.3. Gemsitabin ve polidatin kombinasyonlarının PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi .....	39
Şekil 4.4. Gemsitabin ve polidatine 72 saat süre ile maruz bırakılan PANC-1 hücrelerinin mikroskopisi .....	40
Şekil 4.5. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeyine etkisi. ....	42
Şekil 4.6. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde redükte glutatyon seviyesine etkileri.....	43
Şekil 4.7. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde glutatyon redüktaz aktivitesine etkisi .....	44
Şekil 4.8. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde COX-2 mRNA ekspresyon düzeyine etkisi. ....	45
Şekil 4.9. Gemsitabin ve Polidatinin PANC-1 hücrelerinde IL-8 mRNA ekspresyon düzeyine etkisi .....	46

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

Simgeler	Açıklama
$O_2^{\bullet-}$	süperoksit radikali
$OH^{\bullet}$	hidroksil radikali
$H_2O_2$	hidrojen peroksit

### Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
GEM	Gemsitabin
PD	Polidatin
COX-2	Siklooksijenaz -2
IL	İnterlökin
IL-8	İnterlökin-8
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	SüperoksitDismutaz
CAT	Katalaz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
MDA	Malondialdehit
PANC-1	Pankreas kanser hücresi
LP	Lipid Peroksidasyonu
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NSAID	Steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar

## 1. GİRİŞ

Gemcitabin (2'2'diflorodeksisitidin, dFdC, GEM) özellikle pankreas kanseri gibi radyoterapi ve kemoterapiye dirençli olmaları ile bilinen solid tümörlere karşı önemli etki gösterebilen bir primidin analogudur (Kılıç, 1999). GEM, kanser türlerini tedavi etmek hedefiyle kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Bu kanserler arasında pankreas kanseri, mesane kanseri, yumurtalık kanseri ve akciğer kanseri bulunur. GEM, DNA sentezini inhibe ederek hücre çoğalmasını ve bölünmesini durdurur. Farklı pankreas kanser hücre hatlarında GEM ile indüklenen apoptozisin bcl-2 ekspresyonu ile korele olduğu görülmüştür. Aynı zamanda GEM insan pankreas kanser hücrelerinde (PANC-1) muhtemelen bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve aynı zamanda kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek apoptozisi indüklemektedir. Buna rağmen GEM'in tek başına başarı şansı çok düşüktür. Bunun nedeni ise apoptoza direnç göstermesidir. Polidatin (PD), resveratrolün C-3 konumuna bağlı glikozit grubunun stilben fitoaleksine ait bir hidroksil grubudur. (3,40, 5-trihidroksistilben) (Mikulski ve Molski, 2010). PD; üzüm, yer fıstığı, şerbetçiotu külahları, kırmızı şaraplar, kakao içeren ürünler, çikolata ürünleri gibi doğada en çok bulunan resveratrol türüdür. PD birçok terapötik özelliğe sahiptir: anti-enflamatuvar, serbest radikal süpürücü ve anti-oksidatif stres, anti-iskemik reperfüzyon hasarı, karaciğer koruması, anti-apoptoz, gelişmiş otofaji, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik hastalıklar, tümörler, sinir sistemi hastalıkları ve bulaşıcı hastalıklara karşı da etkili olduğu kanıtlanmıştır (Tang ve Tana, 2019). Enflamasyon, vücut dokularının patojenler, hasarlı hücreler veya tahrip edici maddeler gibi zararlı uyarılara karşı kompleks biyolojik tepkisinin bir kısmıdır ve bağışıklık hücrelerini, kan damarlarını ve moleküler araçları kapsayan koruyucu bir tepkidir. Enflamasyonun görevi, hücre hasarının ilk sebebinin yok etmek, orijinal hasar ve enflamatuvar süreçten zarar görmüş nekrotik hücreleri ve dokuları temizlemek ve doku onarımını sağlamaktır (Abbas ve Litchman, 2009). Akut enflamasyon savunma cevabının bir parçasıyken, kronik enflamasyon diyabete, kansere, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklara neden olur (Aggarwal vd., 2006). Enflamasyonun tümör progresyonunun önemli bir bileşeni olduğu düşünülmektedir. Çoğu kanser; kronik tahriş, iltihaplanma ve enfeksiyon bölgelerinden kaynaklanır. Pankreas kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri açısından dördüncü sırada, agresif seyirli, erken tanısı zor olan ve tedaviye dirençli bir hastalıktır (Li, Go ve Sarkar, 2015). Pankreas kanserinin en bilinen belirtileri açıklanamayan kilo kaybı, iştahsızlık, karın/sırt ağrısı, açık renkli dışkı, koyu renkli idrar ve sarı cilt olduğu düşünülmektedir. Genellikle hastalığın erken evrelerinde hiçbir belirti görülmez ve pankreas kanserini

düşündürecek kadar spesifik belirtiler tipik olarak hastalık ileri bir aşamaya gelene kadar gelişmez. Yaş, cinsiyet ve etnik köken ile birlikte pankreas kanseri gelişme riski artar. Vakaların çoğunluğu 65 yaşından sonra ortaya çıkarken 40 yaş ve altı vakalar seyreklerdir. Hastalık erkeklerde kadınlardan biraz daha yaygındır. Sigara ve alkol tüketimi, işlenmiş gıdaların pankreas kanserinde önemli risk faktörlerindedir. Ayrıca pankreas kanserinde Diabetes mellitus önemli bir risk faktörüdür ve yeni başlayan diyabet de hastalığın erken bir belirtisi olabilir. Interlökin-8 (IL-8), CXC kemokin ailesine ait kanser hücrelerinin çevresinde oluşturulan pro-enflamasyonel sitokinlerden biridir. IL-8, makrofajlar, epiteliyal hücreler ve plateletlerden salgılanır, nötrofilleri hedef alarak onların aktivasyonu ve kemotaksisinde rol oynar. Son zamanlarda, IL-8'in kanser invazyonu, anjiyogenez ve metastazda kritik bir rol oynadığı ve tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olarak kabul edildiği gösterilmiştir (Grivennikov ve Karin, 2010). IL-8, pankreastaki iltihaplanma ve kanser arasındaki boşluğu dolduran önemli bir efektör molekül görevi görür. Enflamatuvar rolüne ek olarak, IL 8'in pankreas adenokarsinom ve pankreatik nöroendokrin tümörlerde bir otokrin büyüme faktörü olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Hussain, Wang ve Ahmed, 2010). COX-2, prostaglanin endoperoksit sentaz olarak da bilinen, arasıdonik asiti prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar gibi pro-inflamatuvar sitokinlere dönüştüren enzimdir. COX-2'nin enflamasyonda rol oynayan diğer birçok enflamasyon faktörü gibi pankreas kanserinin başlangıç ve ilerleme aşamalarında önemli rol oynadığına ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Ling, Feng, Jia, 2014). Pankreatik duktal adenokarsinomlarının %57- 80'inde COX-2'nin artmış ekspresyonu bildirilmektedir (Molina, Sitja-Arnau ve Lemoine, 1999). COX-2' nin hücre çoğalmasını artırdığını ve apoptosizi inhibe ettiği ve bununla birlikte vasküler endotelial büyüme faktörünü artırarak angiogenesizi artırdığını görülmüştür (Eibl, 2003; Ling, 2014). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin sistemik saldırısı ile biyolojik bir sistemin reaktif ara ürünleri kolayca detoksifiye etme veya ortaya çıkan hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizliği yansıtır. Oksidatif stres, hücre sel sinyalleşmenin normal mekanizmalarında bozulmalara sebep olabilir. İnsanlarda oksidatif stresin; kanser, Parkinson hastalığı, Lafora hastalığı, Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, kalp yetmezliği gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif stres, kanserin başlangıcından tümör oluşumuna, tedaviden korunmaya kadar kanserin tüm evreleriyle yakından ilişkilidir. İnsan vücudu devamlı olarak eksojen kökenlerden kaynaklanan oksidatif strese maruz kalır (örneğin, ultraviyole ışınları, egzoz dumanı). Bu tür oksidatif stres, oksidasyon-redüksiyon sisteminin kapasitesini aştığında vücudun, gen mutasyonları veya hücre içi sinyal iletimi ile sonuçlanabilir ve transkripsiyon faktörleri



doğrudan veya antioksidanlar yoluyla etkilenerek kanser oluşumuna neden olabilir. Hücreler reaktif oksijen türleri (ROT)'ni ortadan kaldırmak ve etkilerini minimize etmek için non-enzimatik antioksidanlar redükte glutatyon (GSH), Vitamin A, E ve flavonoid yanında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik antioksidanlarda bulundurulur. Maalesef, bazen bu antioksidan mekanizma ROT'ni ortadan kaldırmak için yeterli gelmez ve bu durumda oksidatif stres meydana gelir (Martindale ve Holbrook, 2002). Lipit peroksidasyon (LP) ürünü olarak malondialdehit (MDA)'deki artış, antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx ve çok önemli hücrel antioksidan olan GSH'daki azalma oksidatif stresin en önemli belirteçleridir (Sohretoglu, Yüzbaşıoğlu ve Randolph, 2018). Bu çalışmada PD ve GEM ile birlikte pankreas kanser hücreleri üzerine olan sitotoksitelerini oksidatif stres ve enflamasyon parametreleri açısından değerlendirmeyi amaçladık. Çalışmamızda hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda GEM PANC-1 hücrelerinde kontrol grubuna göre LP seviyesini artırarak, GSH ve GPx seviyesini azaltarak anlamlı derecede oksidatif strese neden olduğunu gözlemledik.

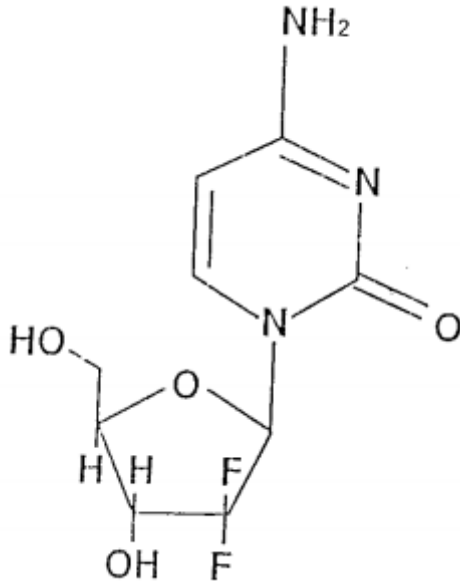
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. GEMSİTABİN (GEM)

Gemcitabin (2'2'diflorodeksisitidin, dFdC, GEM) özellikle pankreas kanseri gibi radyoterapi ve kemoterapiye dirençli olmaları ile bilinen solid tümörlere karşı önemli etki gösterebilen bir primidin analogudur (Kılıç, 1999). Kemoterapötik etkisini DNA sentezini inhibe etmek suretiyle hücreleri apoptoza yönlendirerek gösterir. Genellikle bölünen hücrelerde sitotoksik aktivite gösterdiği için hücre döngüsünde belirteçtir. Hücre döngüsü sırasında S fazı ve G1 fazı aralığındaki hücrelerin programlarını inhibe etmektedir (Hertel, Boder ve Kroin, 1990). GEM, diğerlerinin yanında, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Bu kanserlerden meme kanseri, yumurtalık kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, pankreas kanseri ve mesane kanseri bulunur (Mini, Nobili, Caciagli, Landini ve Mazzei, 2006). GEM bir tür sitotoksik florür nükleozid antimetabolitidir. Ribonükleotidin aktivitesini baskılayarak antitümör rolü oynayan deoksisitidinin çözülebilir analogu olup DNA sentezini inhibe ederek hücre çoğalmasını ve bölünmesini durdurur. Farklı pankreas kanser hücre hatlarında (MIA-PaCa-2, AsPC-1, Panc-1, and Panc-48) GEMle indüklenen apoptosisin bcl-2 ekspresyonu ile korele olduğu görülmüştür. Aynı zamanda GEM PANC-1 hücreleri üzerinde muhtemelen bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve aynı zamanda kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek apoptozisi indüklemektedir. Buna rağmen, henüz GEM'in kanser hücrelerindeki apoptotik mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Pankreas kanserlerinin tedavi başarısı çok düşüktür bunun en önemli nedeni tedavide kullanılan başlıca kemoterapötik ilaç olan GEM'in apoptotik direnç göstermesidir.

#### 2.1.1. Kimyasal yapısı

Kimyasal yapısı deoksiriboz şekerinin iki konumundaki iki hidrojen atomu yerine iki flor atomunun katılmasından oluşur (Bkz Şekil 2.1). Basit formülü ise  $C_9H_{11}F_2N_2O_4$  olup molekül ağırlığı 299,66 dır (Kılıç, 1999).



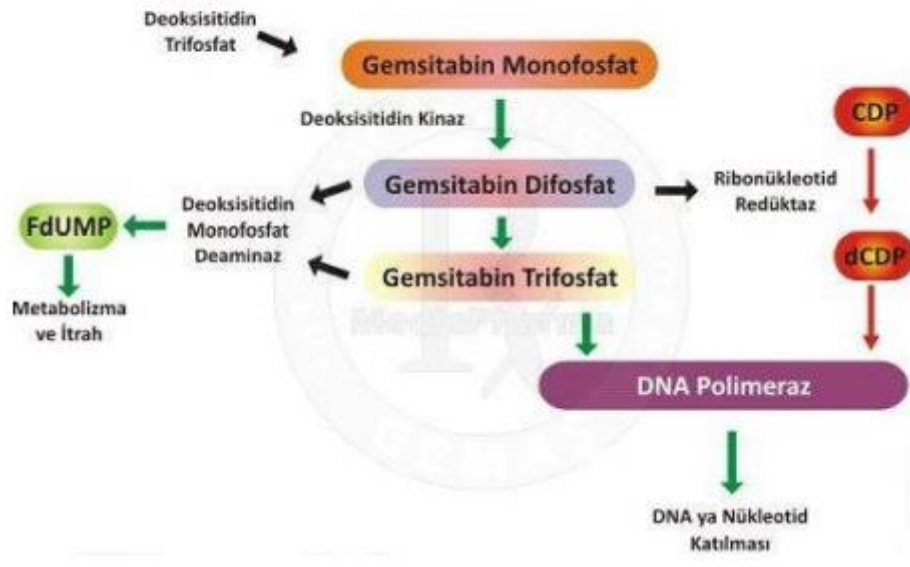
Şekil 2.1. Gemcitabinin kimyasal yapısı (Plunkett, 1996)

### 2.1.2. Etki mekanizmaları

GEM hücre içinde nükleozid kinazlar yoluyla aktif difosfat (dFdCDP: 2,2-diflorodeoksisitidin difosfat) ve trifosfat (dFdCTP: 2,2-diflorodeoksisitidin trifosfat) nükleozidlerine metabolize olur. GEM'in, dFdCDP ve dFdCTP'ye bağlı iki ayrı mekanizma ile DNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etkisini gösterdiği düşünülmektedir.

Birinci mekanizmaya göre; dFdCDP, DNA sentezi için gerekli olan deoksinükleozid trifosfatların oluşmasını sağlayan reaksiyonları katalizlemekten sorumlu olan ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe eder. Bu durum deosiribonükleozidlerin derişimlerinde ve özellikle de dFdCTP'de azalmaya yol açar.

İkinci mekanizmaya göre; dFdCTP, DNA yapısına girmek için dFdCTP ile yarışır. Bu sırada dFdCTP'nin hücre içi derişiminin azalması sonucunda, dFdCTP'nin DNA yapısına girmesi kolaylaşır. Böylece DNA polimeraz enzimi GEM'i uzaklaştırılmaz ve uzayan DNA zincirlerini onaramaz. GEM, DNA yapısına girdikten sonra DNA sentezi inhibe olur (Bkz. Şekil 2.2). Bu da apoptoz olarak adlandırılan programlı hücre ölüm sürecini başlatır (Atmaca, 2020).



Şekil 2.2. Gemcitabinin etki mekanizması

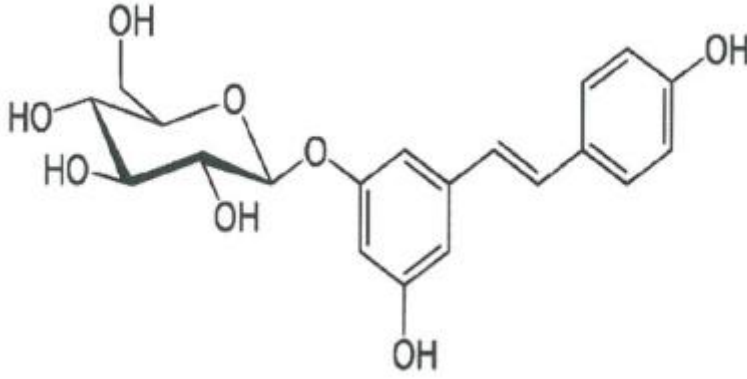
## 2.2. POLYDATİN (PD)

Resveratrolün C-3 konumuna bağlı glikozit grubunun stilben fitoaleksine ait bir hidroksil grubudur (Bkz. Şekil 2.3) (3,40, 5-trihidroksistilben) (Mikulski ve Molski, 2010). *Polygonum cuspidatum Sieb*'den izole edilmiş bir aktif bileşendir. PD, Çin'de uzun süredir analjezik, anti-piretik, idrar söktürücü ve balgam söktürücü olarak kullanılan geleneksel bir Çin tıbbi ürünüdür (Hao, Chen, Huang, Li ve Liu, 2014). PD ayrıca kakao, üzüm, yer fıstığı, kırmızı şaraplar, şerbetçiotu külahları, çikolata ürünleri gibi gıdalar da bulunan doğada en çok görülen resveratrolerendir. PD, kardiyovasküler koruma, nöroproteksiyon, anti-enflamasyon, immünoregülasyon, anti-oksidasyon, anti-tümör ve karaciğer ve akciğer koruyucu etkileri dahil olmak üzere çok sayıda araştırma ile doğrulanan birçok farmakolojik etki gösterir (Mikulski ve Molski, 2010).

PD, artralji tedavisinde Çin Halk Cumhuriyeti tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Hiperkolesterolemi, kronik bronşit, hipertansiyon ve sarılık gibi hastalıkların da tedavisinde kullanılmaktadır (Peng, 2013; Zhao, 2019).

PD birçok terapötik özelliğe sahiptir: anti-enflamatuvar, serbest radikal süpürücü ve anti-oksidatif stres, anti-iskemik reperfüzyon hasarı, karaciğer koruması anti-apoptoz, gelişmiş

otofaji, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik hastalıklar, tümörler, sinir sistemi hastalıkları ve bulaşıcı hastalıklara karşı da etkili olduğu kanıtlanmıştır (Tang ve Tana, 2019).



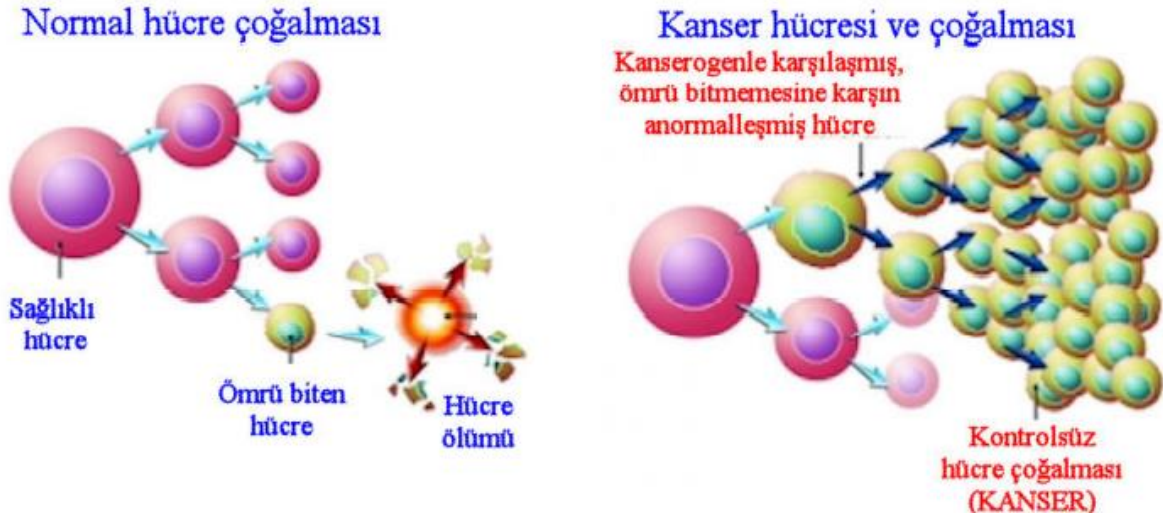
Şekil 2.3. Polidatin'in kimyasal yapısı (Evcimen, 2015)

PD, diyabeti hafifletmek için lipit ve glikoz metabolizmasını modüle eder ve ayrıca vücudu oksidasyona ve çeşitli diyabet komplikasyonlarına karşı korumaya yardımcı olabilecek antioksidan potansiyeline sahiptir (İnce, 2014).

### 2.3. KANSER

Kanser hakkında bilinen bilgiler M.Ö. 3000 yıllarına kadar dayanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen “canker” veya “carcinus” kelimelerinden türemiştir. Tümör terimi ise ilk defa M.Ö. 3. yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için Hipokrat tarafından kullanılmış, Yunan Doktor Galen ise şişme anlamına gelen “oncos” terimini kullanmıştır (Baykara, 2016).

Kanser; büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımıdır ve somatik genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve aynı zamanda en komplike olanıdır (Yokuş ve Çakır, 2012). Bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesidir (Bkz. Şekil 2.4). Tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilir (Baykara, 2016).



Şekil 2.4. Kanser hücresinin oluşumu (TODD, 2017)

### 2.3.1. Kanser Nedenleri

Kanser oluşturan nedenler içinde, çevresel nedenler ve genetik nedenler sayılabilir. Çevresel nedenlerin arasında en önemli faktörler sigara, alkol, işlenmiş gıdalar, fiziksel ve kimyasal ajanlar gösterilebilir. Kanser oluşturan nedenlerin en başında sigara yer alır. Akciğer kanseri, erkeklerde en sık gözlenen kanser olup, tüm dünyada kanser türleri arasında en sık ölüme neden olan kanser türüdür ve tüm dünyada her yıl yaklaşık 1,6 milyon ölüme neden olmaktadır (Doll ve Peto, 1981). Çevresel olarak maruz kaldığımız birçok kimyasal madde, kansere neden olmaktadır. Kötü beslenme, obezite, yağlı yiyecekler, işlenmiş et türleri gibi besinler de kansere sebep olan önemli çevresel faktörlerdendir. Sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni yağlar, naftalin ve asbest de diğer kimyasal kanser sebep olan etmenlerdendir (Yokuş ve Çakır, 2012).

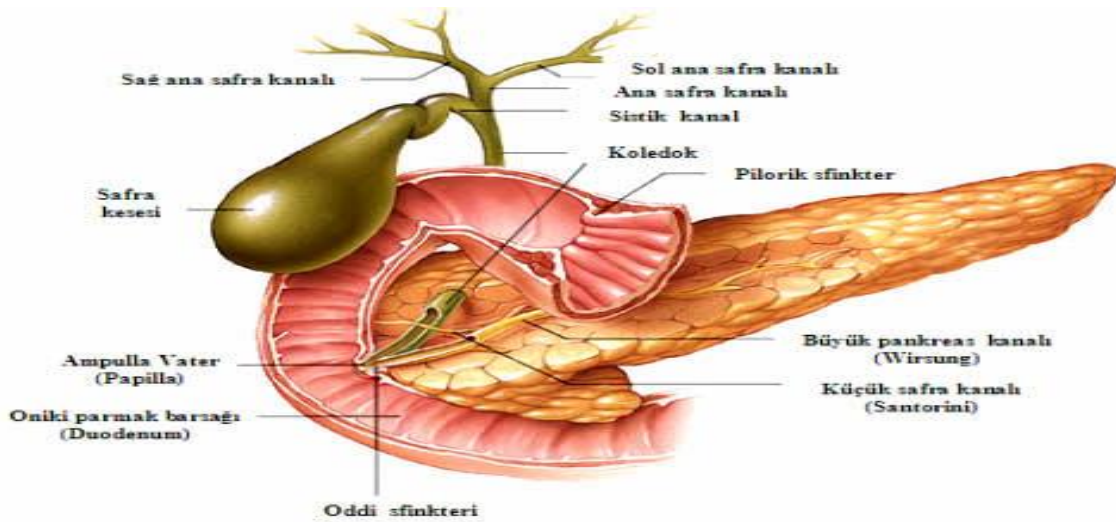
### 2.3.2. Kanserden Korunma Yolları

Modern tıbbın amacı kanseri oluştuktan ziyade tedavi etmektense henüz ortaya çıkmadan engellemektir. Bu nedenle koruyucu önlem olarak sigara başta olmak üzere tütün ürünlerinin kullanımının bırakılması, alkol tüketimini sınırlamak, fiziksel aktiviteyi arttırmak, taze sebze ve meyveler sayesinde vitamin ve mineral desteği, çok fazla kırmızı et ve fast food tüketmemek, pişirme yöntemlerinden kömür ızgarası ve kızartmalardan, tütsülenmiş yiyeceklerden, turşu ve salamura gibi fazla tuzlulardan kaçınmak, düşük ısıda pişirmeye

dikkat etmek, stresi kontrol etmek ve uzun saatler boyunca güneş ışıklarına maruz kalmamak ve koruyucu önlemleri almak kanserin oluşmasını engellemek açısından önemlidir (Arı, 2017; Baykara, 2016).

#### 2.4. Pankreasın Yapısı ve Görevleri

Yunanca *pan* (tüm, bütün) ve *kreas* (et) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Pankreas, insanlarda karın içinde uzanan, midenin arkasından dalağın yanında sol üst karın bölgesine uzanan bir organdır. Yetişkinlerde takribi 12-15 cm uzunluğundadır. Kadınlarda 55 gr erkeklerde 70 gr ağırlığındadır. Anatomik olarak pankreas baş, boyun, gövde ve kuyruğa ayrılmıştır. Önden arkaya doğru yassılaştıran pankreasın düzensiz olan biçimi çengele benzetilebilir (Bkz. Şekil 2.5) (Standring, 2016). Sindirim enzimleri ve hormonlar üreten bir iç (endokrin) ve dış (ekzokrin) salgı organıdır (McHenry ve Strain, 1997). Pankreas karma bir bezdir, yani hem endokrin hem de sindirim ekzokrin işlevi vardır. Pankreasın %99'u ekzokrin, %1'i endokrindir (Gyr, Beglinger ve Stalder, 1985). Ekzokrin kısmında enzim depolanır ve salınır (proteazlar, amilazlar, lipazlar ve nükleazlar gibi). Endokrinin rolü ise pankreas boyunca dağılmış olan pankreas adacıkları (Langerhans adacıkları) adı verilen hücre kümeleri olarak bulunur. Pankreas adacıkları, her biri başka hormon salgılayan alfa hücreleri, beta hücreleri ve delta hücrelerini kapsamaktadır. Bu hücreler, adacık çevresinde yerleşmeye meyilli alfa hücreleri (glukagon salgılayan) ve adacık boyunca daha çok sayıda bulunan beta hücreleri (insülin salgılayan) ile karakteristik konumlara sahiptir (Slack, 1995).

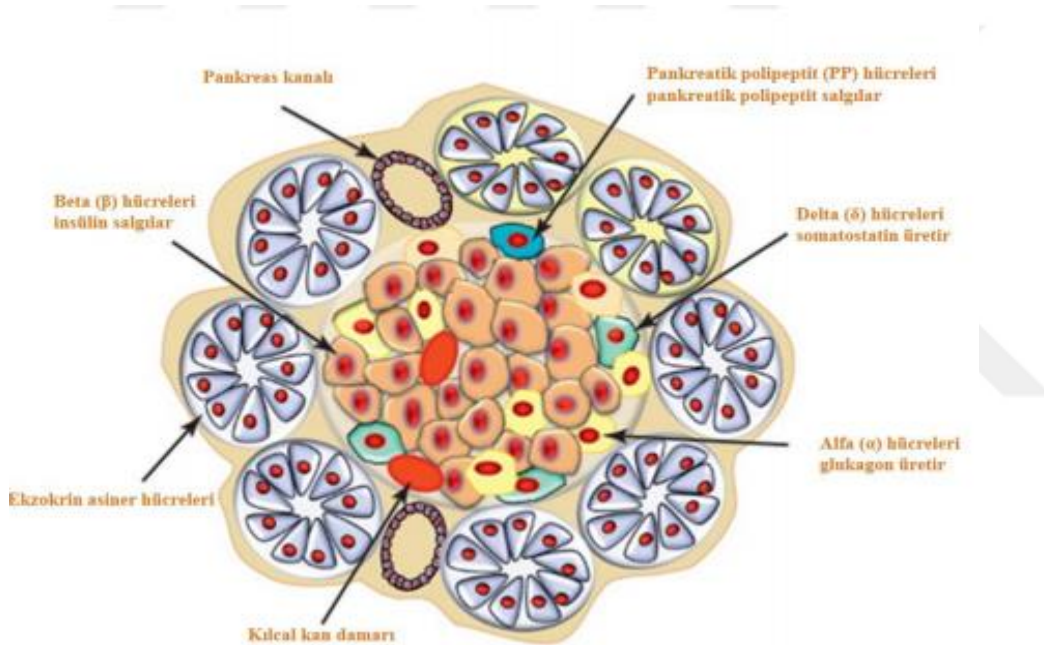


Şekil 2.5. Pankreasın yapısı (Sindirim Sistemi Anatomisi, 2021)



Pankreas salgıladığı sindirim enzimleri, hormonlar ve bikarbonat içeren salgısı ile sindirimde ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır. Pankreas salgısı öncelikle ince bağırsaktan salınan sekretin ve kolesistokinin hormonlarının kontrolü altındadır. Somatostatin ekzokrin pankreas salgısını sekretin ve kolesistokinin hormon salınımını inhibe ederek önleyebilir.

Beta hücrelerinden salgılanan insülin, Alfa hücrelerinden salgılanan glukagon sayesinde kan şekeri seviyeleri kontrol edilir. İnsülin daha sonra vücudun kan şekeri seviyesini düşürmesine ve şekeri yağ, kas, karaciğer ve diğer vücut dokularında 'saklanmasına' yardımcı olur ve gerektiğinde enerji için kullanılabilir (Wheater's Histology, 2013).



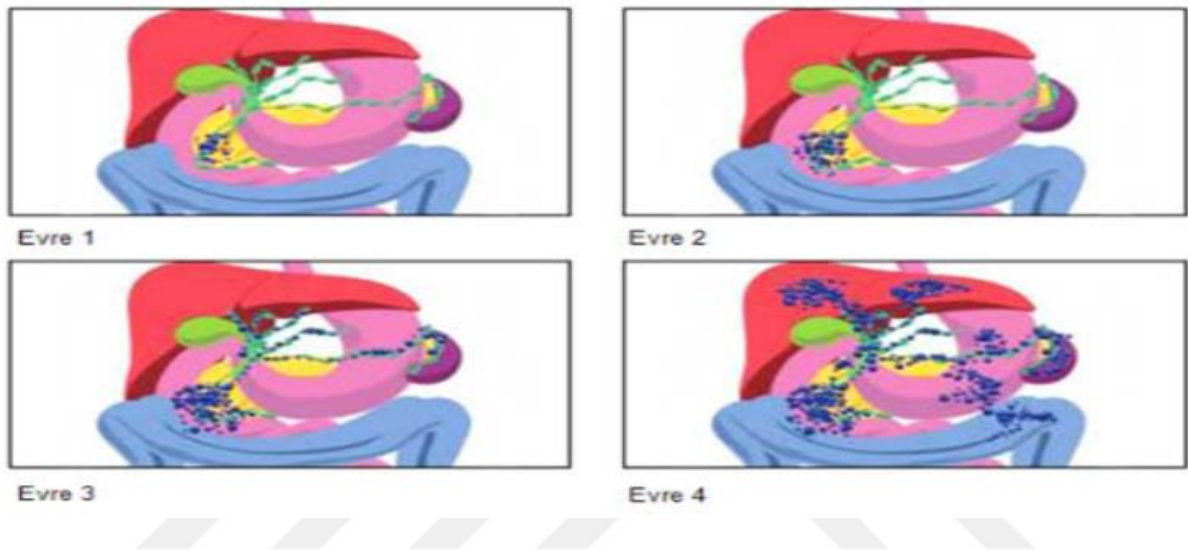
Şekil 2.6. Pankreas hücreleri (Göktürk, 2017)

## 2.5. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri açısından dördüncü sırada, agresif seyirli, erken tanısı zor olan ve tedaviye dirençli bir hastalıktır (Li, Go ve Sarkar, 2015). Pankreas kanseri 1 yıllık genel sağkalım oranı %26 ve 5 yıllık sağkalım oranı %5'ten daha az olan son derece malign solid bir tümördür. Tanı ve tedavide büyük çaba gösterilmesine rağmen, hastalığın prognozu kötüdür. Tanı anında genellikle hastalığın ileri evresi ve uzak organ metastazı ile karşılaşılır (Bkz. Şekil 2.7). Burada en önemli etmen, hastalığın erken evresinde belirgin spesifik belirtilerin olmayışıdır (Çetin ve Dede, 2019). En yaygın belirtileri



iştahsızlık, sarı cilt, açıklanamayan kilo kaybı, koyu renkli idrar, açık renkli dışkı ve karın/sırt ağrısı olabilir. Pankreas kanseri ender olarak 40 yaşından önce rastlanır ve pankreas kanserinin yarısından fazlası 70 yaş ve üzerinde ortaya çıkar. Pankreas kanseri için risk unsurları arasında obezite, diyabet, tütün kullanımı ve bazı ender genetik durumlar yer alır. Vakaların yaklaşık olarak %5-10'u kalıtsal genlere ve %25'i sigara içmeye bağlıdır (Ryan, Hong ve Bardeesy, 2014).



Şekil 2.7. Pankreas kanserinin yayılımı (Yaman, 2021)

### 2.5.1 Pankreas Kanseri Belirtileri

Pankreas kanseri genellikle erken evrelerinde tanınabilir semptomlara neden olmadığından, hastalık tipik olarak pankreasın ötesine geçene kadar teşhis edilmez. Genel olarak midenin çevresinden arka tarafa doğru yayılan ağrı üst karın bölgesinde veya sırtta görülür. Ağrının yeri, bir tümörün bulunduğu pankreas bölümünü gösterebilir. Ağrı geceleri daha kötüleşebilir, gittikçe artarak aralıksız ve şiddetli olabilir (Tobias ve Hochhauser, 2014). Ağrılı veya ağrısız ve muhtemelen koyulaşmış idrarla birlikte gözlerin veya cildin beyazlarında sarı bir renk olan sarılık, pankreasın başındaki bir kanser pankreastan geçerken safra kanalını tıkadığında ortaya çıkar (De La Cruz, Young ve Ruffin, 2014). Açıklanamayan kilo kaybı, iştahsızlıktan veya ekzokrin fonksiyon kaybından dolayı sindirimin zayıflamasına neden olur (Bond-Smith, Banga, Hammond ve Imber, 2012). Mide bulantısı ve kusma en yaygın şikayetlerdir. Safra kesesi veya karaciğer büyümesi, sarılık ve diyabet pankreas kanseri öncesi görülebilen rahatsızlıklardandır. Sarılık, bilirubin birikmesine bağlı

açığa çıkmaktadır ve başında yakalanan pankreas kanserinin en yaygın semptomudur (Göktürk, 2017).

### **2.5.2 Pankreas Kanserinin Nedenleri**

Yaş, cinsiyet ve etnik köken ile birlikte pankreas kanseri gelişme riski artar. Vakaların çoğunluğu 65 yaşından sonra meydana gelirken 40 yaş ve öncesi vakalar seyreklerdir. Hastalık erkeklerde kadınlardan biraz daha yaygın görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Afrika'da görülme oranı düşük olmasına rağmen, Afrikalı Amerikalılarda 1,5 kat daha yaygındır (World Cancer Report, 2014). Sigara tüketimi, pankreas kanserinde en çok bilinen önlenilebilir risk etmenidir, uzun zamandır sigara içenlerde riski yaklaşık iki katına çıkarmaktadır, tüketilen sigara sayısı ve sigara içilen süre ile risk artmaktadır. (Bosetti vd., 2012). Pankreas kanseri vakalarının %5-10'unda kalıtsal faktörler vardır. Hastalık birinci dereceden birden fazla akrabaya sahipse risk büyük ölçüdedir (Peters, Tseng ve Miksad, 2016). Kalıtsal pankreatit, yaşam boyunca pankreas kanseri riskini 70 yaş ve üstü için %30-40 oranında artırmaktadır. Pankreas kanserinde risk faktörü olan "Diabetes mellitus" yeni başlayan diyabet de hastalığın erken bir belirtisi olabilir. 10 yıldan fazla süredir tip 2 diyabet teşhisi konan hastalar, diyabeti olmayanlara göre %50 daha fazla riske sahiptirler (Wolfgang vd., 2013). Belirli gıda çeşitlerinin pankreas kanseri riskine neden olduğu açık şekilde görülmemiştir. Fakat, yapılan bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre kırmızı et, işlenmiş et ve yüksek ısılarda pişirilen etler gibi gıdalar kanser riskini artırdığı görülmektedir (Larsson ve Wolk, 2012).

### **2.5.3. Pankreas Kanserinde Mortalite ve Morbidite Oranı**

Pankreas kanseri hastalığına yakalanmış olan kişilerin %80' ine ameliyat yapma şansı bulunamıyor. Hastalık geç teşhis edilebildiğinden, hastayı kurtarmak mümkün olmuyor. Geriye kalan %20'lik grupta olan hastalar ameliyat edildiğinde, yaşam süresi en fazla 5 yıl olarak kabul edilmektedir. Bunun sebebi olarak, pankreasın vücuttaki konumu itibarıyla ameliyat sırasında tümörlerin tamamına ulaşılmasının mümkün olmamasıdır. Genel olarak, ameliyatla tedavi edilebilen kişiler, ameliyatla tedavi edilmeyenlerden daha uzun yaşama eğilimindedir.

Evrelerine göre 5 yıllık sağ kalım oranları:

Evre I: yaklaşık %14

Evre II: yaklaşık %7

Evre III: Yaklaşık %3

Evre IV: Yaklaşık %1'lik 5 yıllık bir sağ kalım oranına sahiptir (Ermaya, 2019).

Metastazı olan pankreas kanser hastalarına uygulanan cerrahi müdahale sonrası yaşam ömrü iki yıl olurken cerrahi müdahale yapılmadan 6 ay kadar bir süre sağkalım sağlanabilmektedir (Şekerci, 2002).

## 2.6. Enflamasyon ve Kanser

Enflamasyon, vücut dokularının hasarlı hücreler, patojenler veya tahriş edici maddeler gibi zararlı etkenlere karşı komplike biyolojik reaksiyonunun bir parçasıdır ve kan damarlarını, bağışıklık hücrelerini ve moleküler aracılara kapsayan koruyucu bir reaksiyondur. Enflamasyonun görevi, hücre hasarının ilk sebebinin ortadan kaldırmaktır. Orijinal hasar ve enflamatuvardan zarar gören nekrotik hücreleri ve dokuları temizleyerek doku onarımını başlatmaktır (Signore, A., 2013). Hücreleriniz zarar gördüğünde, vücudunuz bağışıklık sisteminde tepkiyi tetikleyen kimyasallar üretir. Bu tepki, proteinlerin ve antikorların salınımını aynı zamanda hasarlı bölgeye doğru kan akışını içerir. Akut enflamasyon durumunda tüm süreç genellikle birkaç saat veya gün sürer. Kronik enflamasyon bu yanıt devam ettiğinde meydana gelir ve vücudunuzu sürekli bir uyarı durumunda bırakır. Zaman geçtikçe, kronik enflamasyon organ ve dokularda olumsuz bir etki oluşturabilir. Bazı araştırmalarda, kronik enflamasyonun astımdan kansere kadar farklı koşullarda da etkili olabileceği öne sürülüyor. Akut enflamasyon genelde kızarıklık, şişme veya ağrı gibi belirtilere neden olur. Ancak kronik enflamasyon belirtileri genellikle daha hafiftir. Bu onları gözden kaçırmayı kolaylaştırır. Enflamasyon uzun zamandır dokunun enfeksiyona, tahrişe veya yaralanmaya karşı şişme, ağrı, kızarıklık ve bazen fonksiyon kaybı ile nitelendirilmiş lokal koruyucu bir belirtisi olarak bilinmesine rağmen, çeşitli hastalıklardaki yeri hakkında yeni bir görüş vardır. Akut enflamasyon savunma cevabının bir parçasıyken, kronik enflamasyon kansere, diyabete, kardiyovasküler, nörolojik ve pulmoner hastalıklara neden olabilir (Aggarwal vd., 2006). Enflamasyonun tümör progresyonunun önemli bir bileşeni

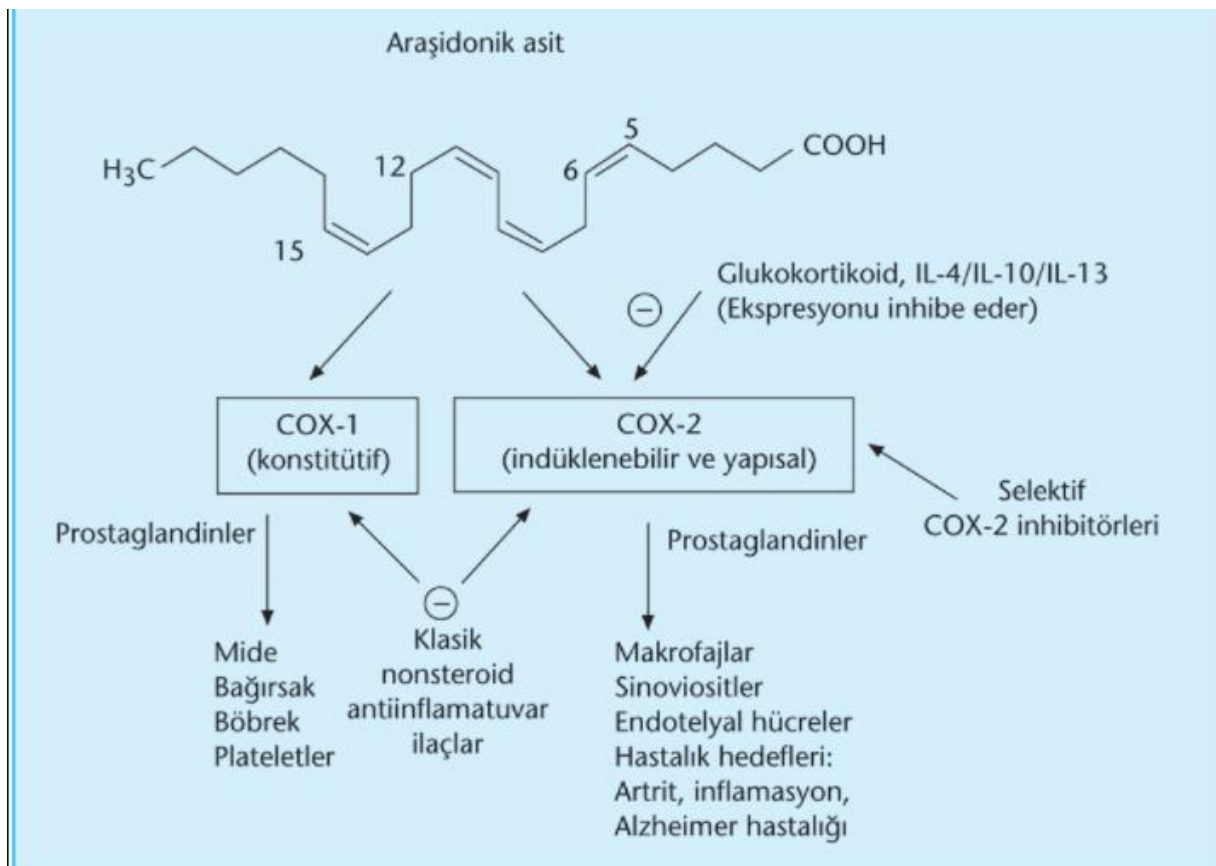
olduğu düşünülmektedir. Birçok kanser iltihaplanma, kronik tahriş ve enfeksiyon bölgelerinden kaynaklanır.

Kansere bağlı enflamasyondan sorumlu hücreler genetik açıdan stabildir ve bu sebeple ilaç direncinin oluşmasına maruz kalmazlar bu sebeple enflamasyonun hedeflenmesi hem kanserin önlenmesi hem de kanser tedavisi için aktif bir stratejiyi yansıtır. Tümör için dışsal enflamasyona bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, obezite, tütün içimi, asbest maruziyeti ve aşırı alkol tüketimi gibi kanser riskini artıran ve malign ilerlemeyi teşvik eden birçok faktör neden olur. Bunun aksine, kansere özgü veya kansere kaynaklı iltihaplanma, kanseri başlatan mutasyonlarca tetiklenebilir ve enflamatuvar hücrelerin toplanması ve aktivasyonu yöntemiyle malign ilerlemeye katkı yapabilir. Hem dışsal hem de içsel enflamasyonlar immünoşüpresyona sebep olabilir ve bu şekilde tümör gelişimi için tercih edilen bir arka plan ortaya çıkmış olur (Singh vd., 2019).

## **2.7. Siklooksigenaz-2 (COX-2)**

Siklooksigenaz (COX), enzimi katalize eden endojen bir enzimdir. Araşidonik asidin prostaglandinlere dönüştürülmesi ile oluşur. Enzim en az iki izoformda bulunur, COX-1 ve COX-2 (Bkz. Şekil 2.8). Her iki izoform da aynı şeyi katalize etse de bu iki izoformun farklı görevleri vardır. COX-1, yapıcı bir enzimdir ve koruyucu prostaglandinlerin üretiminden sorumludur. Trombositleri aktive eden ve mide-bağırsak astarını koruyan prostaglandinleri sağlar, COX-2 ise indüklenebilir bir enzimdir ve sadece enflamatuvar bir uyarıdan sonra eksprese edilir. COX-2'nin işlevi, enflamasyonun indüklenmesi için prostaglandinleri sentezler. Antienflamatuvar aktiviteye ve azaltılmış gastrointestinal yan etkilere sahip bileşikler sınıfı olan COX-2 inhibitörleri; gastrointestinal, cilt, meme ve mesane kanseri riskini azaltmak için etki gösterir. Etki mekanizması tamamen olmasa da tanımlandığında, COX-2'nin aşırı ekspresyonunun inhibe ettiği gösterilmiştir. Apoptoz ve tümörjenik hücre tiplerinin istilasını artırır (D'mello, Gadhwal, Joshı ve Shetgırı, 2011). Prostaglandin sentezini inhibe ederek, steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlar (NSAID) ağrı, iltihaplanma ve ateşi tetikleyen kimyasallar olan prostaglandinlerin üretimini azaltarak çalışır. Gastrointestinal sistem boyunca mukozal hasara, ülserasyona ve ülser komplikasyonuna neden olur. Biri enflamasyon bölgelerinde baskın olan COX-2 ve biri yapısal olarak gastrointestinal kanalda COX-1 eksprese edilen iki siklooksigenaz enziminin olduğunun anlaşılması, COX-2 inhibitörlerinin önemli terapötik gelişimine yol açmıştır.

COX-2 filogenetik olarak COX-1'den daha ilkindir ve çok benzer olmakla birlikte, özellikle aktif enzim bölgelerinde farklılıklar gösterir. NSAID'ler COX enzimlerini engeller ve prostaglandin üretimini azaltır. Bu sebeple, ateş, ağrı ve iltihaplanma, COX inhibitörleri tarafından azaltılır. Mideyi koruyan ve kanın pıhtılaşmasını destekleyen prostaglandinler de azaldığından, NSAID'ler mide ve bağırsaklarda ülsera sebep olabilir ve kanama olasılığını artırabilir. COX-2 inhibitörleri sadece COX-2 enzimlerine etki ederler. COX-1 enzimine etki etmedikleri için kanamaya sebep olmazlar. Bu nedenle NSAID'lerden daha etkindirler (Hawkey, 2001)



Şekil 2.8. Cox enzimlerinin buldukları dokular ve fonksiyonları (Ak ve Gencer, 2013)

## 2.8. İnterlökinler (IL)

İnterlökinler (IL'ler), ilk olarak beyaz kan hücreleri (lökositler) tarafından ifade edildiği görülen bir grup sitokindir. İnsan genomu 50'den fazla interlökin ve ilgili proteini kodlar. Bağışıklık sisteminin işlevi büyük ölçüde interlökinlere bağlıdır ve bunların tümü otoimmün hastalıkları veya bağışıklık yetersizliğini içeren nadir görülen eksiklikleri tanımlanmıştır. İnterlökinler yardımcı T lenfositlerin yanı sıra makrofajlar, monositler ve endotel hücreleri

vasıtasıyla sentezlenir. T ve B lenfositlerin ve hematopoietik hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasına yardımcı olur (Brocker, Thomson, Matsumoto, Nebert ve Vasiliou, 2010). İnterlökin 1 (IL-1), yaralanma, enfeksiyon veya antijenik tehlike teşkil ettikten sonra üretilen bir polipeptittir. Makrofaj, IL-1'in birincil kaynağı olmasına karşın, epitelyal, lenfoid, epidermal ve vasküler dokular IL-1'i sentezler. IL-1 dolaşıma nüfuz ettiğinde, bir hormon gibi davranır ve metabolik olarak geniş bir yelpazede sistemik farklılıkları indükler. IL-1, hem yıkıcı hem de onarım süreçlerine katkıda bulunduğu mezenkimal doku yeniden şekillenmesini etkiler. IL-1, lenfositleri etkinleştirir ve bağışıklık tepkisinin başlatılmasında önemli bir rol üstlenir. IL-1'in en verimli özelliği, hücre metabolizmasının yukarı regülasyonu ve biyolojik olarak etkin molekülleri kodlayan bazı genlerin ekspresyonunun artmasıdır. IL-1 olabildiğince enflamatuvar bir moleküldür ve araşidonik asit metabolitlerinin üretimini uyandırır. Özellikle tümör nekroz etkeni ile sinerjistik olarak hareket eder (Dinarello, 1988).

İnterlökin-2 (IL-2), bağışıklık tepkisinin üretilmesi ve düzenlenmesi için çok önemlidir. Bir T lenfosit ürünü olan IL-2 ayrıca, T hücrelerini, spesifik membran reseptörleri ile sınırlı sayıda etkileşim yoluyla hücre döngüsü ilerlemesinden geçmesi için uyarır. İnterlökin-2 (IL-2) sinyalleri, homeostaz, bağışıklık tepkileri ve farklılaşma süresince çeşitli lenfosit alt kümelerine tesir eder (Smith, 1988). T lenfositleri, salgılanan protein etmenlerinin salınımı ile T hücrelerinin ve bazı B hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını sağlar. İnterlökin 2'yi (IL-2) içeren bu etmenler, lektin veya antijen ile uyarılan T hücreleri tarafından üretilir ve farklı fizyolojik etmenlere sahiptir. IL-2, duyarlı T hücrelerinin proliferasyonunu indükleyen bir lenfokindir. Üstelik bazı B hücreleri üzerinde reseptöre özgü bağlanmasıyla bir büyüme etkeni ve antikor üretim uyarıcısı olarak kullanılır.

İnterlökin 3 (IL-3), granülositlerin ve makrofajların üretimini, farklılaşmasını ve işlevini kontrol ederek hematopoezi düzenleyen bir sitokindir. İn vivo bir monomer olarak var olan protein, etkin T hücreleri ve mast hücrelerinde üretilir ve bir N-terminal sinyal dizisinin bölünmesiyle etkinleştirir (Ymer ve ark.,1985). T hücrelerinden ve diğer kaynaklardan meydana getirilen sitokin IL-3, bağışıklık ve hematopoietik sistemlerle birlikte potansiyel olarak önemli bir etmenddir. IL-3, parazitlere ve alerjik reaksiyonlar gibi diğer immünolojik tepkilere kıyasla bağışıklıkta önemli efektör hücreler olduğu düşünülen doku mast hücrelerinin ve kan bazofillerinin gelişimi, işlevi için özellikle kritik olabilir (Lantz vd., 1998).

Eozinofil farklılaşma faktörü (EDF) olarak da bilinen interlökin 5 (IL-5), eozinofilpoez için soy spesifik bir sitokindir. Eozinofil büyümesini ve aktivasyonunu hazırlar ve böylelikle astım da dahil olmak üzere artmış eozinofil seviyeleri ile ilişkili hastalıklarda mühim bir rol oynar (Milburn vd., 1993).

İnterlökin 6 (IL-6) ailesinin sitokinleri, iki disülfid bağında yer alan dört korunmuş sistein kalıntısı içeren yaklaşık 170 ila 180 amino asit kalıntısından oluşan glikoproteinlerdir (Clongston, Boone, Crandall, Mendiaz ve Lu, 1989). IL-6, çok çeşitli biyolojik fonksiyonlarda yer alan bir sitokindir. B hücrelerinin immünoglobulin salgılayan hücrelerde miyelom büyümesini, sinir hücresi farklılaşmasını ve hepatositlerde akut faz reaktanlarını tetiklemede mühim bir rol oynar (Lüttiken, Krüttgen, Möller, Heinrich ve Rose-John, 1991). IL-6, hedef hücrelere bağlı olarak büyüme indükleyici, büyüme inhibisyon ve farklılaşma indükleyici aktiviteler uygulayabilir. Bu aktiviteler, B hücrelerinde terminal değişkenliği (immünoglobulinlerin salgılanması) ve çeşitli B hücrelerinde büyümenin artırılmasını sağlar. IL-6, multipl miyelom, mesangial proliferatif glomerülonefrit, romatoid artrit ve edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) dahil olmak üzere birçok hastalığın patolojisinde yer almıştır. IL-6'nın sentezinin veya etkisinin seçici inhibisyonu, IL-6 ile ilişkili hastalıklara karşı terapötik fayda sağlayabilir. Öte yandan, IL-6, belirli tümör tiplerine karşı güçlü antitümör aktiviteye sahiptir. IL-6'nın uygulanması, kanser tedavisinde olduğu kadar radyasyon veya kemoterapinin neden olduğu miyelosupresyon tedavisinde de umut vericidir (Akira, Taga ve Kishimoto, 1993).

İnterlökin 10 (IL-10), etkin makrofajlar ve yardımcı T hücreleri tarafınca salgılanan IFN-gamma, IL-2, IL-3, TNF ve GM-CSF içinde olmak üzere bir dizi sitokinin sentezini engelleyen bir proteindir. Yapıda, IL-10, disülfid bağlarında yer alan dört korunmuş sistein içeren yaklaşık 160 amino asitlik bir proteindir (Zdanov,Shalck-Hihi, Gustchina, Tsang, Weatherbe ve Wlodawer, 1995). İnterlökin 10 çoğu hücre popülasyonunca sentezlenen mühim bir immün düzenleyici sitokindir. Başlıca biyolojik görevi, enflamatuvar cevapları sınırlandırılması ve bitirmesi ve T hücreleri, B hücreleri, antijen sunan hücreler, doğal öldürücü hücreler ve granülositler gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinin değişmesini ve artmasının düzenlenmesi gibi görevleri vardır (Asadullah ,Sterry ve Volk, 2003). IL-10'un, çeşitli enfeksiyon, enflamasyon ve hatta kanser modellerinde kesin olarak belirlenmiş olan

güçlü ve geniş spektrumlu anti-enflamatuvar aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Mosser ve Zhang, 2008).

İnterlökin-12 (IL-12), kanser ve bulaşıcı hastalıklarda terapötik potansiyele sahip hücre aracılı bağışıklığın kilit düzenleyicisidir. IL-12, 35 kDa alfa alt birimi ve 40 kDa beta alt biriminden oluşan disülfid bağlı bir heterodimerdir. Özellikleri doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığı köprüleyen, T helper 1 farklılaşmasının indüklenmesi yoluyla hücre aracılı immün yanıtların anahtar düzenleyicisi olarak görev yapan çok işlevli bir sitokindir. Leishmania, Toxoplasma, Kızamık virüsü ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi çeşitli hücre içi patojenlere karşı normal konak savunması dahil olmak üzere Th1 hücreli bağışıklık tepkilerinin uyarılması ve sürdürülmesinde rol oynar. IL-12 üstelik NK hücrelerinin sitotoksik özelliğini arttırmada ve enflamatuvar bağırsak hastalığı ve multipl skleroz gibi patolojik Th1 cevaplarında önemli bir role sahiptir. Bu tür hastalıklarda IL-12 etkisinin baskılanması terapötik yarar sağlayabilir (Zhang vd.,2008). Ek olarak, IL-12, IFN- $\gamma$  ile indüklenebilir genlerin ve lenfosit-endotelial hücre çapraz konuşmasının aracılık ettiği bir antianjiyogenik programı indükler. IL-12'nin immünomodülatör ve antianjiyogenik görevleri, bu sitokinin bir antikanser ajanı olarak kullanılmasının amacını sağlamıştır (Vecchio, Bajetta ve Canova, 2007).

İnterlökin 13 (IL-13), enflamatuvar ve immün cevapların düzenlenmesinde önemli sayılacak bir pleiotropik sitokindir. İnflamatuvar sitokin üretimini yok eder ve interferon-gama sentezini ayarlamada IL-2 ile birliktelik oluşturur. IL-4 ve IL-13 dizileri ile ilişkilidir (Seyfizadeh, Gharabi ve Babaloo, 2015).

İnterlökin 17 (IL-17), 20 kDa'lık bir glikoproteindir. IL-17, aktive edilmiş hafıza T hücreleri tarafından üretilen güçlü bir pro-enflamatuvar sitokindir.IL-17 sinyal sistemi, eklem kıkırdağı, kemik, menisküs, beyin, hematopoietik doku, böbrek, akciğer, deri ve bağırsak gibi farklı dokularda çalışır. Bu sebeple, gelişen IL-17 ligand ve reseptör ailesi, bağışıklık sisteminin ötesinde sağlık ve hastalıkta dokuların homeostazında mühim bir görevi vardır (Moseley, Haudenchild, Rose ve Reddi, 2003). IL-17 aile üyelerinin enflamatuvar hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanserde ayrıca bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı konak savunmasında aktif bir rol oynadığını göstermektedir (Kolls ve Linden, 2004).



### 2.8.1. İnterlökin 8 (IL-8)

İnsanlarda interlökin 8 (IL-8) proteini, CXCL8 geni tarafından kodlanır. IL-8 başlangıçta 99 amino asitlik bir öncü peptit olarak üretilir ve daha sonra birkaç aktif IL-8 izoformu oluşturmak için bölünmeye uğrar. Kültürde, 72 amino asitlik bir peptit, makrofajlar tarafından salgılanan başlıca formdur (Brat, Bellail ve Van Meir, 2005). IL-8 reseptörlerinin artan ekspresyonu, kanser hücrelerinde, endotel hücrelerinde, nötrofillerde ve tümörle ilişkili makrofajlarda karakterize edilmiştir. Bu da IL-8'in tümör çevresinde önemli bir düzenleyici faktör olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. IL-8 sinyali endotel hücrelerinde anjiyojenik tepkileri teşvik eder, endotelyal ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasını artırır (Waugh ve Wilson, 2008). Enflamatuvar bir tepkiye cevap olarak çeşitli hücre tiplerinden üretilir. IL-8, enflamasyon ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar ve nötrofilleri aktive ederek enflamasyon bölgelerine spesifik olmayan enflamatuvar hücrelerin yanı sıra T hücrelerini de dahil etme kapasitesine sahiptir (Schröder, 1992). IL-8, makrofajlar, epiteliyal hücreler ve plateletlerden salgılanır, nötrofilleri hedef alarak onların aktivasyonu ve kemotaksisinde rol oynar. Son zamanlarda, IL-8'in kanser invazyonu, anjiyogenez ve metastazda kritik bir rol oynadığı ve tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olarak kabul edildiği gösterilmiştir (Grivennikov ve Karin, 2010). IL-8, pankreastaki iltihaplanma ve kanser arasındaki boşluğu dolduran önemli bir efektör molekül görevi görür. Enflamatuvar rolüne ek olarak, IL-8'in pankreas adenokarsinom ve pankreatik nöroendokrin tümörlerde bir otokrin büyüme faktörü olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Hussain, Wang ve Ahmed, 2010).

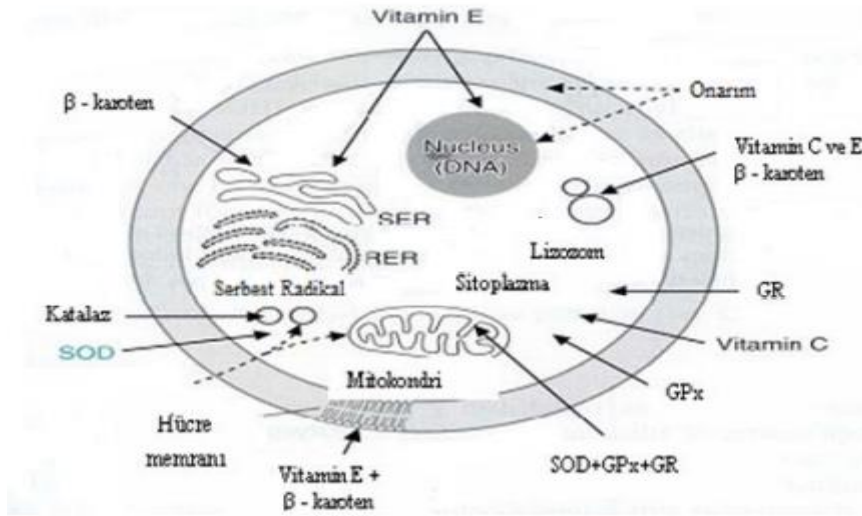
### 2.9. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Reaktif oksijen türleri (ROT), O<sub>2</sub>'nin elektron alıcılığına bağlı olarak oluşan oldukça reaktif kimyasal moleküllerdir. ROT örnekleri arasında hidrojen peroksitler (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), süperoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ve hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) bulunur (Hayyan, Hashim ve Alneshef, 2016). Biyolojik açıdan ROT oksijenin normal aerobik metabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak salgılanır, hücre sinyalleşmesi ve homeostazda mühim rollere sahiptir (Devasagayam vd., 2004). ROT hücresel işleyişe özgüdür ve normal hücrelerde düşük ve sabit seviyelerde mevcuttur. Sebzelede ROT farklı stres türlerine karşın ışıktan korunma ve toleransla ilgili metabolik aşamalarda yer alır (Grant ve Loake, 2000). Bununla birlikte, ROT bazı hücresel bileşenleri oksitleyip değiştirdiklerinde ve orijinal işlevlerini yerine getirmelerini engellediklerinde

DNA'da geri dönüşü olmayan hasara neden olabilir. Bu, ROT 'un ikili bir role sahip olduğunu göstermektedir; zararlı mı, koruyucu mu yoksa sinyal faktörü olarak mı hareket edecekleri, ROT üretimi ile doğru zamanda ve yerde bertaraf edilmesi arasındaki dengeye bağlıdır (Edreva, 2005). ROT, kardiyovasküler hastalık da içinde olmak üzere çeşitli enflamatuvar tepkilere hücrel etkilerde rol oynar. Ayrıca, yüksek ses seviyelerinin neden olduğu koklear hasar yoluyla işitme bozukluğuna, sisplatin gibi ilaçların ototoksitesine ve hem hayvanlarda hem de insanlarda doğuştan sağırlığa dahil olabilirler. ROT ayrıca apoptoz veya programlanmış hücre aracılığı ile de ilgilidir (Curtin, Donovan ve Cotter, 2002).

## 2.10. Antioksidanlar

Antioksidanlar, organizmaların hücrelerine zarar verebilecek serbest radikaller ve zincirleme reaksiyonlar salgılayan kimyasal bir tepkime olan oksidasyona engel olan bileşiklerdir. Tioller veya askorbik asit (C vitamini) gibi antioksidanlar bu tepkimeleri inhibe eder. Oksidatif stresi dengelemek için bitkiler ve hayvanlar glutatyon gibi hücrel antioksidanlardan oluşan kompleks sistemleri devam ettirirler. Oksijenin dünyada canlıların en önemli yaşam kaynağı iken aynı zamanda onlar için çok zararlı ROT oluşturması gerçekten bir karmaşa gibi görünmektedir. Neyse ki, bütün organizmalar hücrelerindeki DNA, proteinler ve lipitler gibi temel yapısal bileşenleri bu ROT 'un zararlı etkilerinden korumak için birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan içerir. Genellikle antioksidan sistemler ya bu reaktif türlerin oluşmasını engel olur ya da hücrenin hayati bileşenlerine zarar vermeden önce onları yok eder (Bkz. Şekil 2.9). Bununla beraber, ROT 'in ayrıca redoks sinyali gibi yararlı hücrel görevleri vardır (Sies, 1997). Bu sebeple, antioksidan sistemlerin görevi oksidanları tamamen engellemek değil bunun yerine onları optimum seviyede tutmaktır (Rhee, 2006).



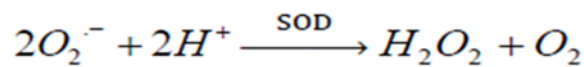
Şekil 2.9. Hücrenin antioksidan mekanizması (Evcimen, 2015)

Antioksidanlar doğal kaynaklı veya yapay kaynaklı olabilirler. Yapay antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere üçe ayrılırlar. Doğal antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

### 2.10.1. Enzim olan doğal antioksidanlar

#### 2.10.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

SOD' lar  $O_2^{\bullet-}$  anyonunun  $O_2$  ve  $H_2O_2$  parçalanmasını katalize eden yakından ilişkili bir enzim sınıfıdır (Zelko, 2002). Bir grup metal içeren enzim olan SOD, reaktif oksijen türlerinden biri olan  $O_2^{\bullet-}$  anyonunu temizleyerek insan sağlığında hayati bir antioksidan role sahiptir. Bu metallerin varlığı ve belirli amino asitlerle koordinasyon, işlev için çok önemlidir. SOD' lar, oksidatif stresten kaynaklanan ürünlerin detoksifikasyonunda ilk savunma hattı arasındadır (Johnson ve Giulivi, 2005).



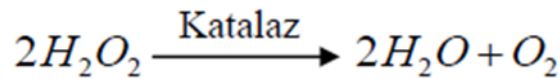
ROT, insanlarda astım, yaşlanma, eklem hastalıkları ve kanseri kapsayan birçok normal ve anormal durumda üretilir.  $O_2^{\bullet-}$  ROT üreten sistemin başlangıç reaksiyonunu oluşturur.

Artan ROT üretimi, iltihaplanma ile ilişkili doku hasarına neden olur. SOD' lar,  $O_2^{\bullet-}$  anyonunu  $H_2O_2$  çevirir ve daha sonra oluşan bu  $H_2O_2$  GPx veya CAT ile uzaklaştırılır. Bu sebeple SOD' lar, peroksinitrit veya  $OH^{\bullet}$  gibi fazlasıyla agresif ROT üretimini engeller (Afonso, Champy, Mitroviç, Collin ve Lomri, 2007).

İnsanlarda SOD' ın üç farklı formu bulunur. Bunlardan Cu ve Zn içeren bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) sitozolde, mangan içeren süperoksit dismutaz (Mn-SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD) hücre dışı sıvılarda bulunmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).

#### 2.10.1.2. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

CAT enzimi kofaktör olarak demir veya mangan içeren ve  $H_2O_2$  'in suya ve oksijene dönüşümünü katalize eden enzimdir (Chelikani, Fita, Lowen, 2014). Bu protein çoğu ökaryotik hücrede peroksizomlarda lokalizedir.  $H_2O_2$  'in uzaklaştırılmasındaki belirgin önemine rağmen, genetik CAT eksikliği olan insanlar "akatalasemi" veya tamamen CAT' dan yoksun olacak şekilde genetik olarak tasarlanmış fareler birçok hastalığa maruz kalırlar (Hiner vd.,2002).



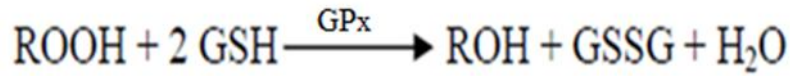
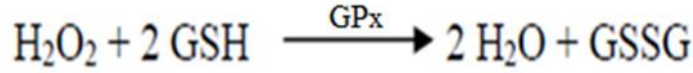
Ayrıca katalaz; alkol gibi farklı substratların,  $H_2O_2$  'in çift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar (Antmen, 2005).



#### 2.10.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9)

GPx, 85 kd moleküler ağırlığındadır,  $H_2O_2$  ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalize eden dört selenyum kofaktör olarak içerir. Hayvanlarda en az dört farklı GPx

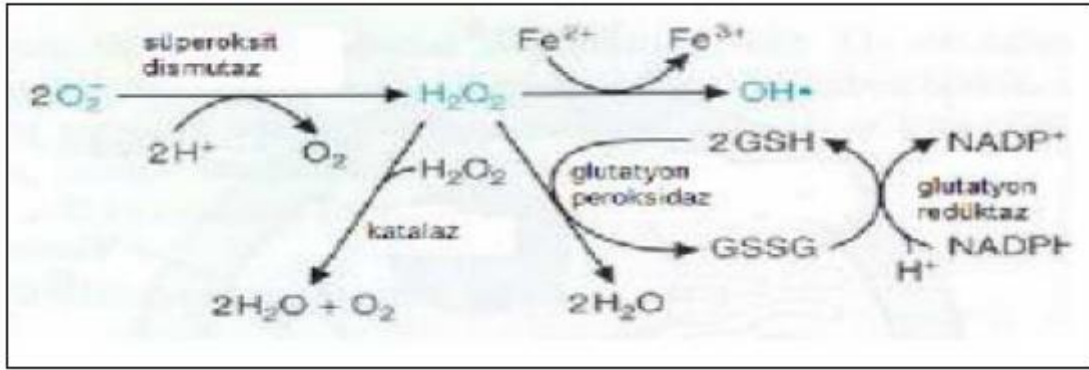
izozimi vardır (Brigelius-Flohé, 1999). GPx 1 en bol bulunan ve çok etkili bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleyicidir; GPx 4 ise en çok lipit hidroperoksitler üzerinde etkilidir. GPx 1 enzimine sahip olmayan farelerin normal ömürlerini tamamlayamadıkları ve oksidatif stres hasarına çok duyarlı oldukları görülmüştür (Ho vd., 1997).



## 2.10.2. Enzimatik olmayan doğal antioksidanlar

### 2.10.2.1. Glutasyon (GSH)

GSH bütün canlılar için çok önemli bir hücrenel antioksidanttır. GSH okside olmak üzere 2 formda bulunur. Şekil 10' da görüldüğü gibi GSH H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'in ortadan kaldırılmasından sorumlu bir enzim olan GPx koenzimidir. GPx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suya dönüştürürken GSH GSSG'ye dönüşür. Bunun tekrar GSA'a dönüşümü çok önemlidir ve bunun içinde GSH ve onun koenzimi olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) gereklidir. Fareler ve kobaylar gibi yeni doğmuş memelilerde farmakolojik olarak indirgenmiş GSH eksikliği, birkaç günde çoklu organ yetmezliğine ve ölüme sebep olur (Noctor vd., 2012). GPx, glutasyon disülfidin (GSSG) glutatyona GSH indirgenmesini bir pentoz fosfat yolu ürünü olan NADPH flavonoidini kullanarak yapar (Bkz. Şekil 2.10). Reaksiyon, GSH seviyelerinin korunması için gereklidir. GSH, oksidasyon-indirgeme süreçlerinde bir indirgeyici olarak önemli bir role sahiptir ve detoksikasyonda ve diğer bazı hücrenel fonksiyonlarda büyük önem taşır (Carlberg ve Mannervik, 1985).



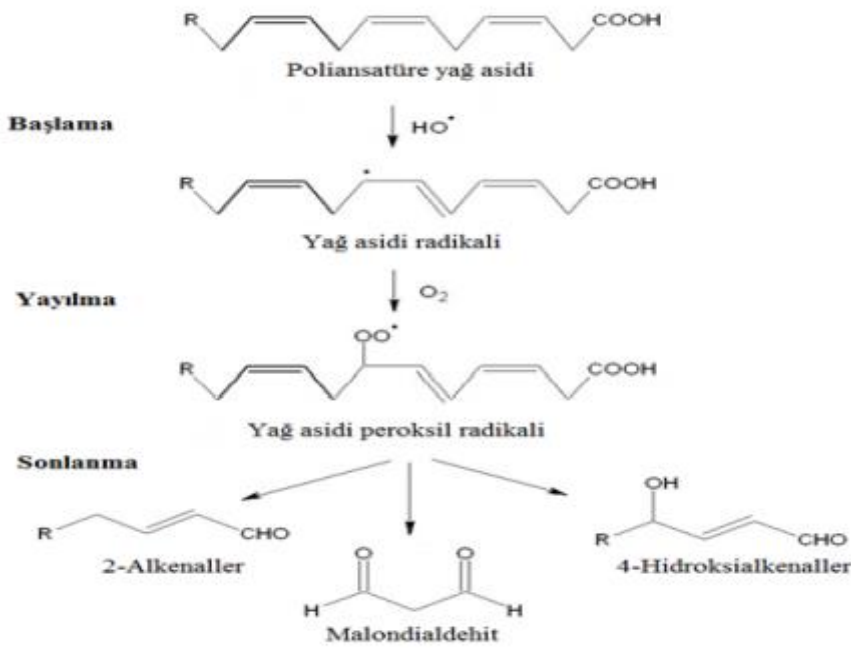
Şekil 2.10. Hidrojen peroksidin, NADPH tarafından glutatyon aracılığıyla indirgenmesi (Başaranoğlu, 2011)

GSH, hemen hemen tüm hücrelerde bulunan bol miktarda doğal bir tripeptiddir. GSH fazlasıyla reaktiftir ve genelde sülfhidril bölümü tarafından diğer moleküllere konjuge olarak bulunur. Antioksidasyon, redoks durumunun sürdürülmesi, bağışıklık tepkisinin modülasyonu ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu dahil olmak üzere bir hücre içinde birçok hayati rol üstlenir. Kanserojenlerin uzaklaştırılması ve detoksifikasyonunda çok önemlidir ve bu yoldaki değişiklikler, hücre sağkalımı üzerinde derin bir etkiye sahip olabilir. Bununla beraber birçok kemoterapötik ilaca direniş göstererek, tümör hücrelerindeki yüksek GSH seviyeleri, bu tür hücreleri kemik iliği, gırtlak, kolon ve akciğer kanserlerinden koruyabilir (Balendiran, Dabur ve Fraser, 2004).

## 2.11. Lipit Peroksidasyonu (LP)

LP, lipitlerin zincirsel olarak oksidatif hasara uğradıklarını ifade eden bir terimdir. Serbest radikallerin hücre zarlarındaki lipitlerden elektronları "çalıp" hücre hasarına sebep olduğu aşamadır. Bu aşama, bir serbest radikal zincir reaksiyonu mekanizması ile ilerler. Sık olarak çoklu doymamış yağ asitlerini etki eder çünkü aralarında özellikle reaktif hidrojen atomlarına sahip olan metilen köprülerinin (-CH<sub>2</sub>-) bulunduğu çoklu çift bağları bulunur. Bazı radikal reaksiyonda olduğu gibi reaksiyon üç ana kısımdan meydana gelir: başlatma, ilerleme ve sonlandırma (Bkz. Şekil 2.11). Başlatma, bir yağ asidi radikalinin üretildiği kısımdır. Canlı hücrelerdeki en önemli başlatıcılar su ve bir yağ asidi radikali oluşturmak için bir hidrojen atomuyla birleşen OH• ve HOO• gibi reaktif oksijen türleridir. ROT, Yağ asidi kökü çok kararlı bir molekül değildir, bu sebeple moleküler oksijenle kolayca

tepkimeye girerek bir peroksil-yağ asidi kökü üretir. Bu radikal aynı zamanda başka bir serbest yağ asidi ile reaksiyona girerek farklı bir yağ asidi radikali ve bir lipit peroksit veya kendisiyle reaksiyona girmişse peroksit üreten kararsız bir tür oluşturur. Yeni yağ asidi radikali de aynı şekilde tepkimeye girdiğinde bu döngü devam eder. Bir radikal, radikal olmayanla reaksiyona girdiğinde, her zaman başka bir radikal üretir, bu sebeple sürece "zincirleme reaksiyon mekanizması" denir. Radikal reaksiyon, iki radikal reaksiyona girip radikal olmayan bir tür ürettiğinde durur. Bu, yalnızca radikal türlerin konsantrasyonu, iki radikalın yüksek bir çarpışma ihtimali olacak kadar yüksek olduğunda gerçekleşir. Canlı organizmalar, serbest radikalleri nötralize ederek sonlandırmayı hızlandıran ve bu yüzden hücre zarını koruyan çeşitli moleküllere sahiptir. C vitamini ve E vitamini gibi antioksidanlar LP' nu engelleyebilir (Huang vd., 2002).



Şekil 2.11. Lipit peroksidasyon mekanizması (Dağlı, 2014)

Birçok yağ içeren gıdalar, doymamış yağ asidi sentezlerinin düşük olduğu durumlarda bile LP uğrama ihtimaline sahiptir. Bu nedenle, lipit oksidasyon ürünlerinin tüketimi, yüksek miktarda doymamış gıdalarda (örneğin omega-3 yağ asitleri içeren gıdalar), yoğun ısıtma işlemine tabi tutulmuş gıdalarda (örneğin kızarmış gıdalar) veya gıdalarda artan lipit oksidasyon ürünlerini tüketme riski ile potansiyel olarak yaygındır. Lipit oksidasyonu, kanser, ateroskleroz, yaşlanma vb. ile birlikte enflamatuvar hastalıklarla korelasyon gösteren potansiyel olarak toksik ürünler üretir (Vieira, Zhang ve Decker, 2017). LP' nun son

ürünleri, malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE) gibi reaktif aldehitlerdir (Bkz. Şekil 2.11).

MDA, çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun önemli ve en çok çalışılan ürünüdür. Bu aldehit fazlasıyla toksik bir moleküldür ve LP' nun bir belirleyiciden daha fazlası olarak düşünülmektedir. DNA ve proteinlerle ilişkisi genelde potansiyel olarak mutajenik ve aterosjenik olarak isimlendirilir (Del Rio, Stewart ve Pellegrini, 2005). LP' nun oranı, dokulardaki MDA miktarı ile öngörülür. ROT, çoklu doymamış lipitleri bozarak MDA üretir. Bu bileşik reaktif bir aldehittir ve hücrelerde toksik strese sebep olan ve gelişmiş glikasyon son ürünlerine benzer şekilde gelişmiş lipoksidasyon son ürünleri olarak adlandırılan kovalent protein eklentileri oluşturan birçok reaktif elektrofil türünden biridir. Bu aldehitin üretimi, bir organizmadaki oksidatif stres seviyesini ölçmek için bir biyobelirteç olarak kullanılır (Moore ve Roberts, 1998). Malondialdehit reaktiftir ve mutajenik olma olasılığı yüksektir. Ayçiçeği ve palmye yağlarının yüksek ısılarda ısıtılması sonucu oluşabilir. MDA düzeyi, kanserli hastalarda oksidatif stresin ve antioksidan durumun bir belirteci olarak bilinir.

## 2.12. Oksidatif Stres

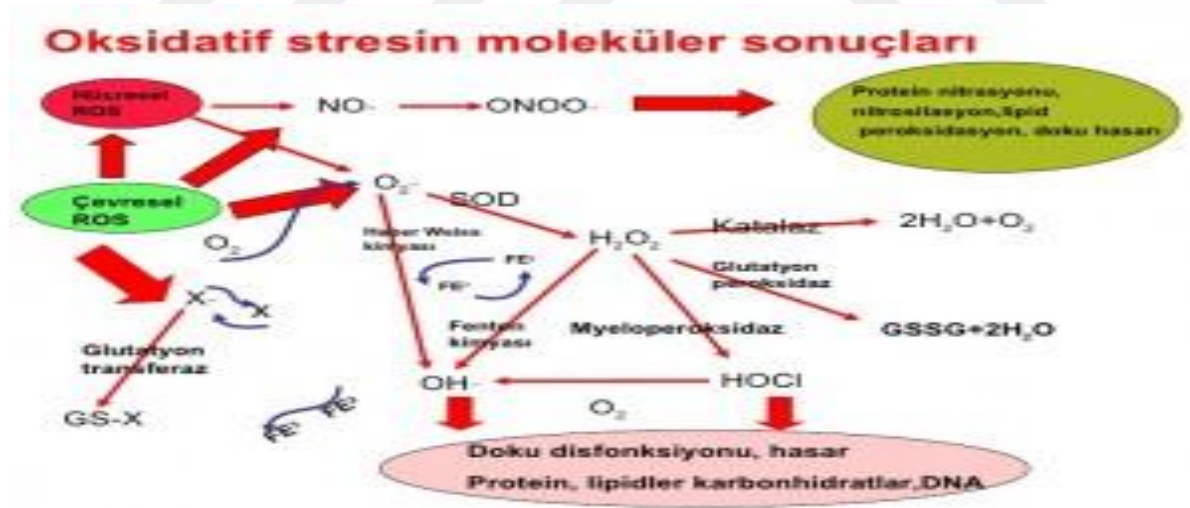
Normal metabolizma sırasında üretilen serbest radikaller hücrel antioksidan sistemler tarafından kompanse edilirler. Oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması, oksidatif stres olarak adlandırılır (Dağlı, 2014). Hücrelerin normal redoks durumundaki bozukluklar; proteinler, lipitler ve DNA'yı kapsayan hücrenin tüm bileşenlerine zarar veren peroksitlerin ve serbest radikallerin salınımı yoluyla toksik etkilere sebep olabilir. Oksidatif metabolizmanın sebep olduğu oksidatif stres, baz hasarına ve ayrıca DNA'da iplik kopmalarına sebep olur. Baz hasarı genellikle dolaylıdır ve üretilen ROT' den, örneğin;  $O_2^-$  radikali, OH radikali ve  $H_2O_2$  radikali'ne sebep olur (Birnboim, 1986).

Oksidatif stres, hücrel sinyalleşmenin normal mekanizmalarında bozulmalara sebep olabilir. İnsanlarda oksidatif stresin; kanser, Parkinson hastalığı, Lafora hastalığı, Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, kalp yetmezliği gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Miyokardiyal enfarktüs, frajil X sendromu, orak hücre hastalığı, liken planus, vitiligo, otizm, enfeksiyon, kronik yorgunluk sendromu ve depresyon gibi rahatsızlıkları olan bireylerde



görülür (Segal, 2005). Kimyasal olarak oksidatif stres oksitleyici türlerin artan üretimi veya glutasyon gibi hücrel antioksidanların azalması ile ilişkilidir. Oksidatif stresin etkileri, bu değişikliklerin boyutuna bağlıdır; bir hücre küçük ROT' nin üstesinden gelebilir ve orijinal durumuna geri dönebilir, orta derecede oksidatif stres apoptoze neden olurken ağır oksidatif stres nekroza neden olabilir. Hücrelere verilen bir hasar sürekli olarak onarılır. Bununla beraber, nekroza sebep olan kuvvetli oksidatif stres seviyeleri altında, hasar ATP'nin bitmesine sebep olarak kontrollü apoptotik ölümü engeller ve hücrenin basitçe parçalanmasına sebep olur (Lelli ve ark.,1998). Hücreler ROT' u ortadan kaldırmak ve etkilerini minimize etmek için non-enzimatik antioksidanlar GSH, Vitamin A, E ve flavonoidler yanında SOD, CAT ve GPx gibi enzimatik antioksidanlarda bulundurulur (Bkz. Şekil 2.12). Maalesef bazen bu antioksidan mekanizma ROT' u ortadan kaldırmak için yeterli gelmez ve bu durumda oksidatif stres meydana gelir (Martindale ve Holbrook, 2002).

LP ürünü olarak MDA' deki artış, antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx ve çok önemli hücrel antioksidan olan GSH' daki azalma oksidatif stresin en önemli belirteçleridir (Sohretoglu, Yüzbaşıoğlu ve Randolph, 2018).



Şekil 2.12. Oksidatif stres sonuçları (Çerkeş, 2021)

### 2.12.1. Oksidatif stres ve kanser ilişkisi

İnsan vücudu devamlı eksojen kökenlerden kaynaklanan oksidatif stres etkisindedir (örneğin, ultraviyole ışınları). Bu tür oksidatif stres, oksidasyon-redüksiyon sisteminin kapasitesini aştığında vücudun, gen mutasyonları veya hücre içi sinyal iletimi ile

sonuçlanabilir ve transkripsiyon faktörleri doğrudan veya antioksidanlar yoluyla etkilenecek şekilde kanser oluşumuna neden olabilir. Tümör taşıyan durumun, tümör hücreleri tarafından aktif oksijen üretimi ve anormal oksidasyon-redüksiyonu ile ilişkili oksidatif stres altında olduğu da söylenir. Antikanser ajanların ve radyasyon tedavisinin kullandığı mekanizmalardan biri etkilerini kanser hücrelerinin apoptozisi yoluyla gösterirler (Noda ve Wakasugi, 2001). ROT, oksijen metabolizmasının doğal yan ürünleri olarak ortaya çıkar ve önemli hücre fonksiyonlarına sahiptir. Normalde hücre ya antioksidanlar yoluyla ya da spesifik enzimatik yollar kullanarak ROT'un oluşumu ve uzaklaştırılması arasında yeterli bir dengeyi koruyabilir. Ancak bu denge bozulursa hücrede kanser dahil birçok hastalığın patogeneziyle ilgili bir durum olan oksidatif stres oluşabilir (Lawless, O'Brain ve Gray, 2010). ROT kanser evrimini görünüşte çelişkili şekillerde etkiler, ya tümörjenezini başlatır ve kanser hücrelerinin transformasyonunu destekler ya da hücre ölümüne neden olur. Yüksek ROT seviyelerine uyum sağlamak için, tümör hücreleri kükürt bazlı metabolizmayı, NADPH oluşumunu ve antioksidan transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini değiştirir. Başlatma sırasında, genetik değişiklikler, antioksidan transkripsiyon faktörlerini aktive ederek veya pentoz fosfat yolu (PPP) yoluyla NADPH'yi artırarak yüksek ROT seviyeleri altında hücrenin hayatta kalmasını sağlar. Progresyon ve metastaz sırasında, tümör hücreleri, PPP aktivasyonu ve indirgeyici glutamin ve folat metabolizması dahil olmak üzere çeşitli şekillerde NADPH'yi artırarak oksidatif strese uyum sağlar (Hayes, Dinkova ve Tew, 2020). Artan oksidatif stres, birçok farklı kanser türünde gözlenen ortak bir özelliktir. Oluşan radikale, konsantrasyonuna ve oluşumunun gerçekleştiği hücresel lokasyona bağlı olarak, ROT tümör hücreleri içinde birden fazla fonksiyona sahiptir. ROT kaynaklı makromolekül hasarı, tümör başlangıcına katkıda bulunabilir. Düşük ROT seviyeleri, tümör hücresi çoğalmasına, hayatta kalmasına ve metastatik bir fenotipe tümörün ilerlemesine aracılık eden hücresel sinyal yollarını başlatabilir. Yüksek ROT kademeleri, tümör hücresi ölümüne dolayım eden sinyal yollarını başlatır, fakat aynı zamanda tümör tekrarını indirgeyen kanser kök hücrelerinin oluşumuna da yardım eder. Kanser hücrelerinde ROT tarafından koordine edilen yolların fazlalığı ve karmaşıklığını, tümör ilerlemesinin farklı kısımlarında antioksidanlar veya kemoterapi kullanılarak hücre içi ROT kademelerinin amaçlanan modülasyonunu anlamak, kombinasyon tedavisi için etkin bir strateji olabilir (Storz, 2013).

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada kanser hücrelerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan gempitabin ile kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösteren polidatinin pankreas karsinoma hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve antiinflamatuar etkileri in-vitro olarak araştırılmıştır.

#### 3.1. Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal madde ve cihazların marka ve modelleri aşağıda belirtilmiştir.

##### 3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler

Spektrofotometre (Shimadzu UV-VIS 1240), Hassas terazi (MettlerToledo MS 2045/01), Santrifüj (Sigma 3-30K), Homojenizatör (IKA digital T25), -20°C derin dondurucu (Vestel), Etüv (UN160, Memmert), -80°C derin dondurucu (ThermoScientific), Ultra saf su cihazı (Direct-Q 8UV, Merck), Vorteks (Vortex 4, IKA), Otomatik pipetler (ThermoScientific), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (C-MAG HS7, IKA), pH metre (Radiometer Analytical PHM 210), Su banyosu, Sonikatör (Jeiotech 3T-13AB-239), makas, neşter, jilet, whatman süzgeç kağıdı. Biyogüvenlik kabini (Sınıf II kabin, Thermo, Herasafe KS 12), CO<sub>2</sub> inkübatör (Mempert, UN160), ters faz mikroskobu (Leica DM IL LED), otoklav (Nüve, OT, 90L), mikrolaka okuyucu (Multiscan GO, Thermo Scientific), gerçek zamanlı PCR (Piko Real 96 (Thermo Scientific) ve sıvı azot tank sistemi marka ve modelindeki cihazlar kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Dulbecco's modified eagle's medium L-glutamin ve yüksek glukoz içeren (DMEM, D5648), penisilin-streptomisin (P4458), tripsin-EDTA (T4049), fetal sığır serumu (FBS, F7524), polidatin (54837), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, M2128), dimetil sülfoksit (DMSO, 472301), tripan mavisi (T8154) Sigma'dan; RNA izolasyon kiti Macherey-Nagel'den; RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (K1621), Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (K0221), Mem-PER<sup>TM</sup> Plus protein izolasyon

kiti (89842), Pierce™ BCA protein assay kiti (23225) Thermo Scientific'den alınmıştır. Gemcitabin (Gemko, 1400 Mg Lıyofilize Toz İceren Flakon) Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş., (TÜRKİYE)'den satın alındı. Beta nikotinamid adenindinukleotit fosfat (NADPH), tiyobarbitürik asit (TBA), 1.1.3.3.tetraethoksipropen (MDA), 5-5'-Ditiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), tris (Hidroksimetil aminometan hidrojen), triklor asetik asit (TCA), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), bovin serum albümin), redükte glutatyon (GSH), potasyum siyanür (KCN), Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Test Maddelerinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

PD, çalışmaya başlamadan önce 150 µM konsantrasyonda olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek 0,2 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Stok çözelti küçük hacimlere bölünerek ışık görmeyecek şekilde – 20 °C'de bekletilmiştir. Çalışma sırasında farklı derişimlerde (12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 150 µM) hazırlanarak kullanılmıştır. Hücre canlılık testlerinde PD' nin tüm konsantrasyonlarında DMSO oranı %0,1'in altında olmasına dikkat edilmiştir.

GEM, çalışmaya başlamadan önce taze olarak hazırlanmıştır. Öncelikle 16680 µM konsantrasyonunda olacak şekilde dH<sub>2</sub>O' içerisinde çözülerek 0,2 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilerek ana stok hazırlanmıştır. Çalışma sırasında 1 µM, 5 µM, 31,25 µM, 62,5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM ve 1000 konsantrasyonlarına seyreltilerek kullanılmıştır.

#### 3.2.2. Hücre Kültürü Analizleri

Bu çalışmada, insan epitelyal pankreas karsinom hücresi [PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)] kullanılmıştır. Hücreler Ordu Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde bulunan hücre stoğundan, temin edilmiştir. Hücre hatları %10 (v/v) Fetal Bovin Serum (FBS), 4mM L- Glutamin, 1mM Sodyum piruvat, 4.5 g/L glukoz ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medyum) besiyeri

içerisinde T-75 flasklara ekilerek %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> atmosfer ortamında, 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılarak hücreler çoğaltılmıştır.

### 3.2.3. Hücre *In-vitro* Sitotoksisite Testi (MTT)

Süksinattan fumaratın oluşması sırasında görev alan süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesine dayalı bir yöntem olan MTT testi için Mosmann'ın (1983) önerdiği yöntem uygulanmıştır. Hücrelerin yoğunluğu flask yüzeyinde yaklaşık olarak %80 doluluk oranına ulaştığında tripsin-EDTA ile muamele edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Daha sonra tripan mavisi boyası ile boyanan hücreler Thoma lamında sayılmıştır. MTT testi için optimizasyon çalışması sonucunda  $1 \times 10^4$  cell/100  $\mu$ L olarak belirlenen PANC-1 hücresi 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekilmiştir. Hücrelerin adaptasyonu amacıyla 48 saat %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> atmosfer ortamında, 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonrasında besiyeri aspre edilerek hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve sitotoksik etkileri belirlenecek olan GEM ve PD'in istenen konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ilave edilip 24, 48 ve 72 saat 37 °C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> atmosfer ortamında inkübe edilmiştir.

### 3.2.4. Total RNA İzolasyonu ve Analizi

RNA izolasyonu, üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. MTT testi sonucu belirlenen konsantrasyonlara maruz bırakılan  $3 \times 10^6$  hücre üzerine 350  $\mu$ L RA 1 tamponu ve 3,5  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptöetanol ile homojen hale getirilmiş ve kromozomal DNA'nın uzaklaştırılması için homojenizasyon kolona dökülerek 11.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süre sonunda lizat 350  $\mu$ L etanol (%70) ile homojen hale getirilerek nükleospin RNA kolonu üzerine ilave edilmiş ve 11000 g'de 30 sn santrifüj sonrası altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolon üzerine MBD tamponu eklenmiş tekrar aynı süre ve hızda santrifüj edilmiştir. Ardından kolon üzerine 95  $\mu$ L DNaz eklenmiş ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işlem sonrası RNA kolonu yıkama solüsyonları ile temizlenmiştir. Son olarak kolon DNAaz RNAaz bir toplama tüpü takılarak kolon üzerine RNA az su ilave edilerek santrifüj edilmiş ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Spektroskopik ölçüm sonucu  $A_{260}/A_{280} \cong 2.0$  RNA miktarına sahip olan örnekler gen anlatımı analizlerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere cDNA'ya çevrilmiştir.

### 3.2.5. c DNA Sentezi

cDNA sentezi, kit üretici firmasının önerilerine göre gerçekleştirilmiştir. Kalıp RNA son konsantrasyon 20 ng/ $\mu$ L, Oligo (dT)<sub>18</sub> primer son konsantrasyonu 4  $\mu$ M olacak şekilde toplam hacim 12  $\mu$ L hacimde ayarlandıktan sonra 65 °C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen sürenin sonunda son konsantrasyonları 5X reaksiyon tamponu 2,5X/ $\mu$ L, Ribolock RNaz inhibitör (20 U/ $\mu$ L) 2,5 U/ $\mu$ L 10 mM dNTP karışımı 2,5 mM, RevertAid M- MuLV RT (200 U/  $\mu$ L) 20 U/ $\mu$ L olacak şekilde toplam hacim 8  $\mu$ L hacimde ayarlanarak üretici firmanın belirttiği gibi 42 °C'de 60 dk, sonra 70 °C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar gen anlatım analizinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR

Hücrelerin enflamasyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla Cox-2 ve IL-8 genlerinin anlatımları gerçek zamanlı PZR yöntemiyle Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanı kullanılarak belirlenmiş Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://eu.idtdna.com/site2>) programı ile Tablo 3.1'de belirtilen amplicon uzunluğuna sahip primerler tasarlanmıştır. Bu çalışmada normalizasyona amacıyla housekeeping gen olarak  $\beta$ -aktin geni kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	Sekans (5' → 3')	Amplikon uzunluğu (bp)	Aksesyon numarası
<i><math>\beta</math>-aktin F</i>	CACTCTTCCAGCCTTCCTTC	104	NM_001101.3
<i><math>\beta</math>-aktin F</i>	GTACAGGTCTTTGCGGATGT		
<i>Cox-2 F</i>	TGTACCCGGACAGGATTCTA	119	AY462100.1
<i>Cox-2 R</i>	CCCTTGAAGTGGGTAAGTATGT		
<i>IL-8 F</i>	CTTGGCAGCCTTCCTGATTT	111	NM_000584.3
<i>IL-8 R</i>	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG		

Tablo 3.2'de belirtildiği toplam hacim 10  $\mu$ L olacak şekilde hazırlandı ve Tablo 3.3'de belirtilen PZR koşulları sağlanarak gen anlatımı analizleri gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. Gerçek zamanlı PZR karışım oranları

Karışım bileşenlerinin adı	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
SYBR Green qPZR Master Mix	5	1X
Forward Primer	1	1 mM
Reverse Primer	1	1 mM
cDNA	1	1 ng
dH <sub>2</sub> O	2	-
Toplam hacim	10	

Tablo 3.3. PZR amplifikasyon koşulları

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	15 saniye	40
Primer Bağlanması	60 °C	30 saniye	
Primer Uzaması	72 °C	30 saniye	

PZR sonrasında her amplikonun erime eğrisi belirlenerek primerlerin saflığı analiz edilmiştir. Veriler Livak metodu ile test edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu methoda göre;

- Öncelikle referans gene göre normalizasyon için  $\Delta CT$  değeri hesaplanmıştır.

$\Delta CT = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$ .

- Her primer grubu için aynı verimliliği kabul etmek amacıyla  $\Delta\Delta CT$  değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{referans gen})$$

- İfade edilen genlerin up regüle ya da down regüle olup olmadığını  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerinin belirlenmesi ile analiz edilmiştir.

### 3.2.7. PANC-1 Hücrelerinde Oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi

#### 3.2.7.1. Hücre Lizatının Hazırlanması

Hücreler 24, 48, 72 saat GEM, PD ve kombinasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra buzda soğutulmuş fosfat tamponu kullanılarak flasklardan kazındı. Kazınan hücreler +4 °C de fosfat tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı.

Hücre pelletinin üzerine liziz tamponu (150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1% Triton, 2.5 mM sodyum pirofosfat içeren 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) ilave edildi. 15000 g'de 10 dk +4°C de santrüfuj edildikten sonra süpernatant (hücre lizatı) LP' u ve GSH tayini için buzda bekletildi.

### 3.2.7.2. Lipit peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi

PANC-1 hücrelerindeki LP seviyesi Esterbauer ve Chessman [1990]'a göre yapıldı. Uygun miktarda hücre lizatı 1 hacim %20 TCA ve 2 hacim TBA (%0,67) ile karıştırılarak 45 dk 80 °C'lik su banyosunda bekletildi. Buzda soğutulan örnekler oda ısısında 10 dk 3,000 g de santrifuj edildi. Temiz supernatantlar 535 nm 'de spektrofotometrede köre karşı okundu. LP ürünlerinin %99'unu MDA oluşturmaktadır ve MDA için molar absorblama katsayısı  $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmolmalondialdehit/mg protein olarak ifade edildi (Esterbauer ve Chessman, 1990).

### 3.2.7.3. Redükte glutatyon düzeyinin belirlenmesi

PANC-1 hücrelerindeki GSH düzeyi Moron ve diğerleri [1979]'ne göre yapıldı. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,15 M, pH 7), 5mM EDTA, DTNB ve uygun miktarda hücre lizatından oluşmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan sarı renkli bileşik 5-thio-2-nitrobenzoik asit 412 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmektedir. 5-thio-2-nitrobenzoik asit için molarabsorblama katsayısı  $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplama yapıldı ve nmol/mg protein olarak ifade edildi (Moron, Depierre ve Mannervik, 1979).

### 3.2.7.4. Glutatyon peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

GPx aktivitesi Flohé ve Gunzler (1984)'e göre yapıldı. Reaksiyon karışımı uygun miktarda hücre lizatı, fosfat tamponu (0,05 M, pH 7), 1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 1 mM NaN<sub>3</sub>, GSH, 1U/ml GR ve substrat olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içermektedir. 340 nm'de NADPH'daki azalma izlenmektedir. Enzim aktivitesi NADPH için molar absorblama katsayısı  $\epsilon=6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol okside NADPH/dk/mg olarak ifade edildi (Flohe ve Gunzler, 1984).



### 3.2.8. Protein Tayini

Hücre lizatlarının protein tayinleri sığır serum albümini standart olarak kullanılarak Lowry ve ark. (1951)'e göre yapıldı (Lowry, Rosebrough, Farr ve Randall, 1951).

### 3.2.9. İstatiksel Analiz

Çalışmamız sonucu deney gruplarından elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 20,0 for Windows” paket programı ile “OneWay Annova-Tukey” testi kullanılmıştır. Bütün uygulanan testlerde güven aralığı %95 olup,  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



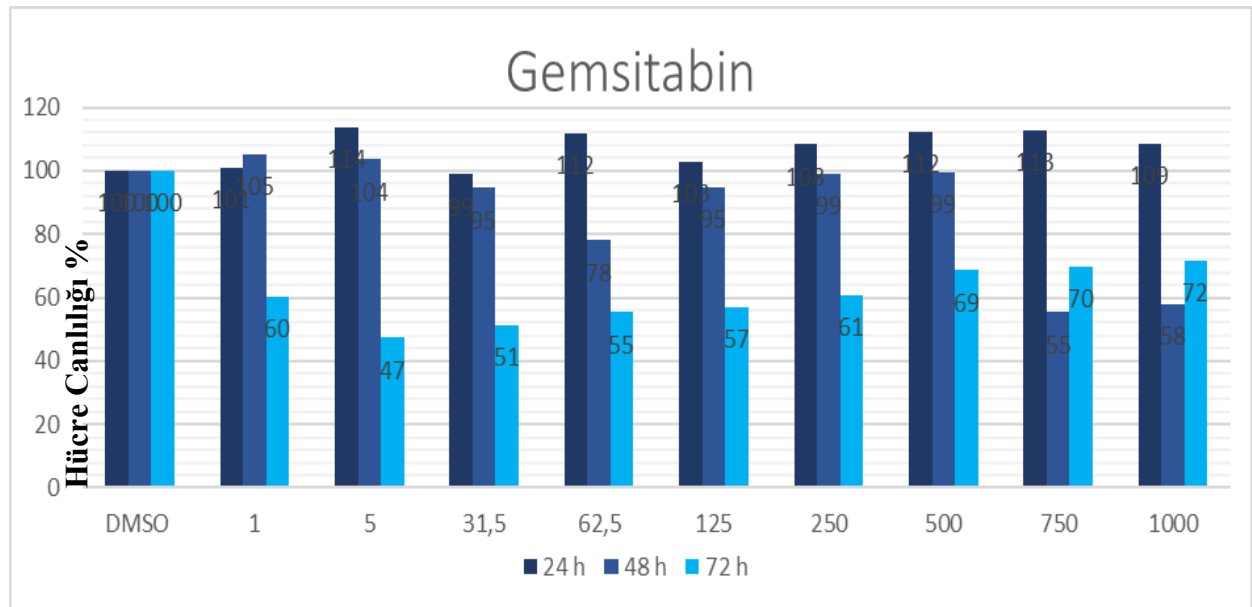
## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre canlılığı ve Sitotoksite Testleri

GEM ve PD' in PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle belirlenmiştir. MTT testi mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin belirlenmesine dayalı olan, hızlı, kantitatif, tekrarlanabilir ve kolorometrik bir yöntemdir (Doyle ve Griffiths, 1998; Çetin ve Bullerman, 2005).

Hücreler PD ve GEM' in farklı konsantrasyonlarına 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılmış ve sonuçlar Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2 incelendiğinde hem GEM hem de PD 72 saatlik inkübasyon sonunda sitotoksiste üzerine daha etkili olduğu görülmüştür.

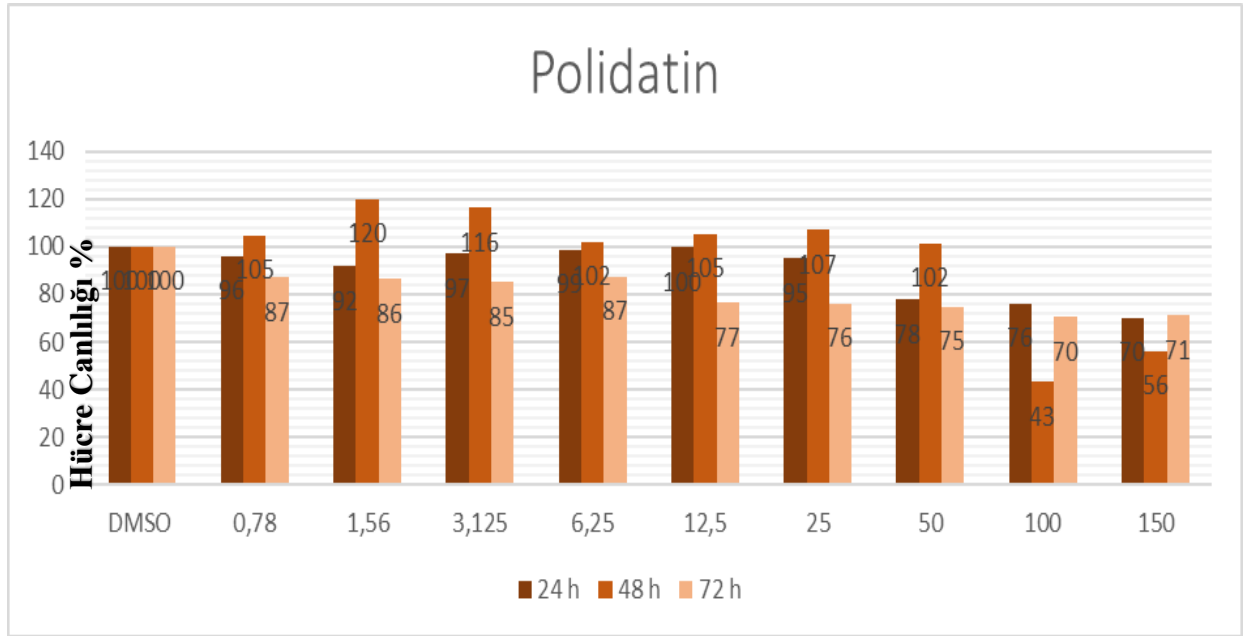
24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayılarında düzensiz bir artış ve azalış söz konusu olduğu için çalışmaya bu saatler dahil edilmemiştir.



Şekil 4.1. Gemsitabinin PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi 72. saatte sitotoksiste üzerine en etkili GEM konsantrasyonunun 5 µM olduğu görülmüş ve IC<sub>50</sub> değeri olarak belirlenmiştir. 5 µM GEM konsantrasyonuna

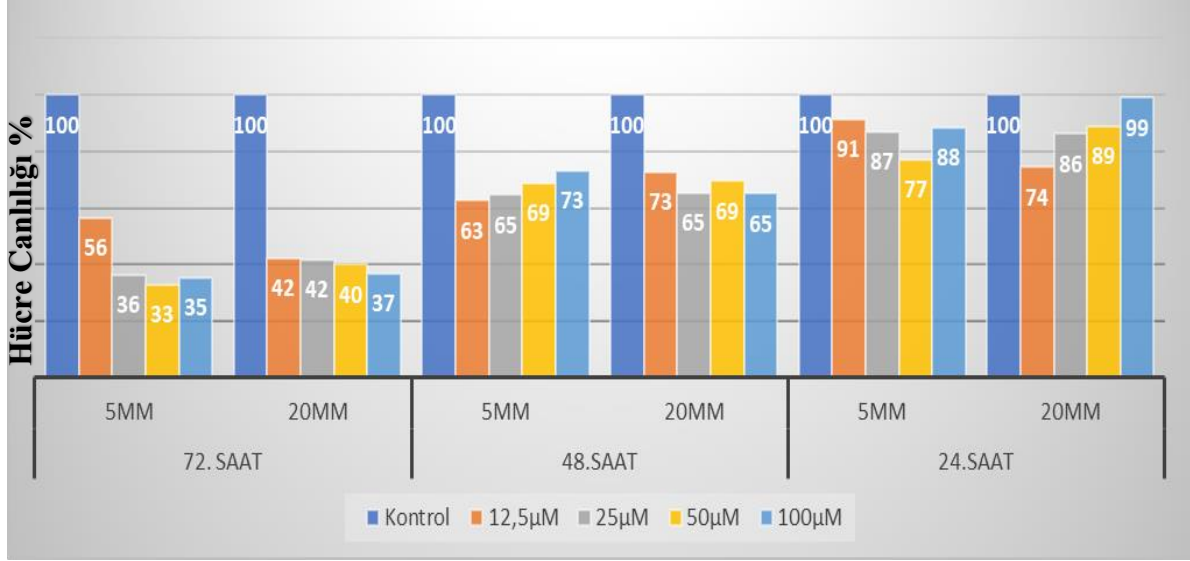
maruz bırakılan hücrelerin canlılığı çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO'ya göre %53 oranında azaldığı belirlenmiştir. Kombinasyon dozları olarak GEM' in IC<sub>50</sub> değeri 5 µM ve bir yüksek konsantrasyonu olan 20 µM kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Polidatinin PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

GEM' de olduğu gibi PD' de de en belirgin sitotoksosite 72. Saatte görülmüştür. PD 72. saatte 12,5 µM konsantrasyondan başlayarak sitotoksosite de artış görülmüş, IC<sub>50</sub> değerine ulaşamamış olsalar da 12,5-100 µM'lık konsantrasyonlarda yaklaşık %23 ila %30 arasında değişen sitotoksosite görülmüştür (Bkz. Şekil 4.2). PD için kombinasyon dozları olarak 12,5, 25, 50,100 µM'lık konsantrasyonlar seçilmiştir.

GEM (5 ve 20 µM'lık) ve PD' in (12,5, 25, 50,100 µM'lık) konsantrasyonları ile oluşturulmuş kombinasyonlar PANC-1 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre maruz bırakılarak sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2).



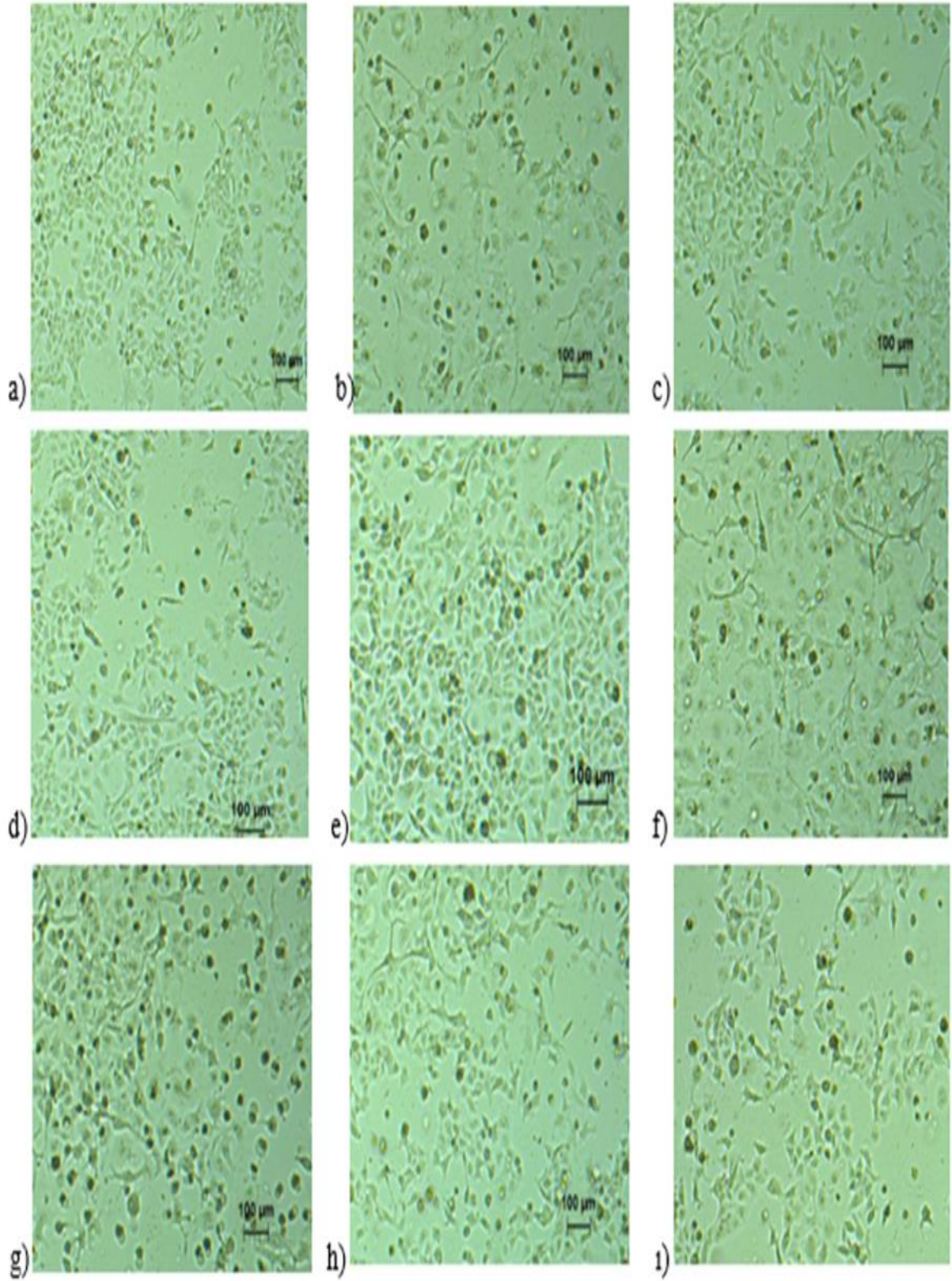
Şekil 4.3. Gempitabin ve polidatin kombinasyonların PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

Kombinasyonlarda en fazla sitotoksosite 72. Saatte ve 5  $\mu$ M GEM' de görülmüştür. 5  $\mu$ M GEM ile 25 ve 50  $\mu$ M PD kombinasyonlarında sırası ile %64 ve %67 sitotoksosite görülmüştür. GEM pankreas kanserlerinin tedavisinde kullanılan ve kanser hücrelerinin oldukça fazla direnç göstermesi nedeni ile düşük sitotoksositeye neden olan kemoteropötik bir ilaçtır. Tek başına 5  $\mu$ M GEM 72. Saatte %53 sitotoksosite göstermiştir (Bkz. Şekil 4.3). Oysa 72. Saatte 5  $\mu$ M GEM 50  $\mu$ M PD ile birlikte verildiğinde IC<sub>50</sub>'nin üstünde %67 sitotoksosite göstermiştir (Bkz. Şekil 4.3). PD, GEM ile birlikte verildiğinde GEM sitotoksitesini (67-53=14) %14 oranında artırmıştır.

Tablo 4.1. Gempitabin, polidatin ve kombinasyonlarından oluşan gruplar (72. saat)

Gempitabin	Polidatin	Gempitabin + Polidatin	Gempitabin + Polidatin
5 $\mu$ M	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M + 25 $\mu$ M	20 $\mu$ M + 25 $\mu$ M
20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M + 50 $\mu$ M	50 $\mu$ M + 50 $\mu$ M

PANC-1 hücreleri 72 saat süre ile Tablo 4.1'de belirtilen PD, GEM ve bunların kombinasyonlarına maruz bırakılmış ve hücrelerin morfolojisi ters faz mikroskobu (Leica DM IL LED) ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.4. Gemsitabin ve polidatine 72 saat süre ile maruz bırakılan PANC-1 hücrelerinin mikroskobisi (X 4)

a) Hücre kontrol, b) 5  $\mu$ M gemsitabin, c) 20  $\mu$ M gemsitabin, d) 25  $\mu$ M polidatin, e) 50  $\mu$ M polidatin, f) 5  $\mu$ M gemsitabin + 25  $\mu$ M polidatin g) 5  $\mu$ M gemsitabin + 50  $\mu$ M polidatin h) 20  $\mu$ M gemsitabin + 25  $\mu$ M polidatin ı) 20  $\mu$ M gemsitabin + 50  $\mu$ M polidatin

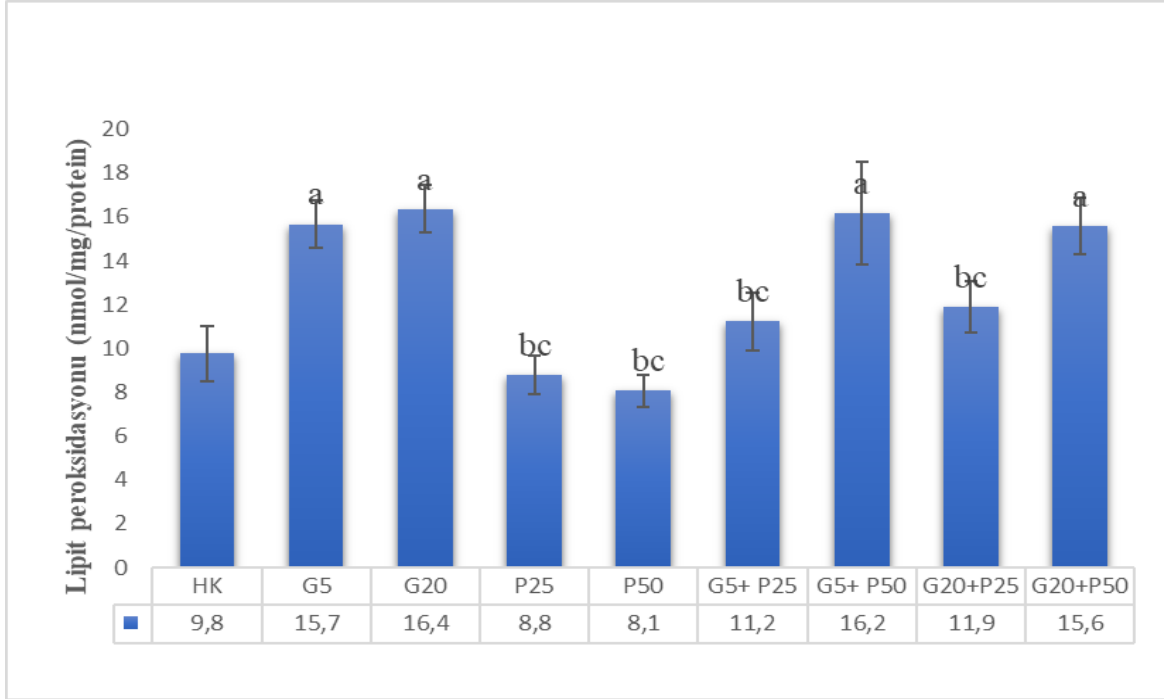
Şekil 4.4 de PANC-1 hücreleri GEM, PD ve kombinasyonlarına maruz bırakıldıktan sonraki 72. Saatteki fotoğrafları görülmektedir. Fotoğraflar incelendiğinde belirtilen konsantrasyonlarda hem GEM hem de PD' e maruz bırakılan hücrelerde hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre morfolojilerinde belirgin değişiklikler görülmektedir(a-f). Özellikle 5  $\mu$ M GEM + 50  $\mu$ M PD verilen grupta hem kontrol hem de diğer gruplara göre çok daha belirgin olarak PANC-1 hücrelerinin morfolojilerini ve aderans özelliklerini kaybederek sayılarının azaldığı görülmektedir (g).

## **4.2. Gemsitabin ve Polidatinin PANC-1 hücrelerinde Oksidatif Stres Parametrelerine Etkileri**

### **4.2.1. Lipit Peroksidasyon Seviyesi**

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GEM verilen gruplarda LP düzeyi G5 ve G20 gruplarında sırası ile %60,28 ve %67,45 anlamlı düzeyde artmıştır ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubu ile polidatin uygulanan gruplar (P25 ve P50) karşılaştırıldıklarında LP düzeyi bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). PD' in yüksek olduğu kombinasyonlar (G5+P50 ve G20+P50) ile kontrol grubu arasında anlamlı fark görülürken ( $p < 0,05$ ), PD' in düşük olduğu kombinasyonlarda (G5+P25 ve G20+P25) anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Düşük PD kombinasyonlarının (G5+P25 ve G20+P25) GEM gruplarındaki (Hem G5 hem de G20) yüksek LP seviyelerini anlamlı derecede ( $p < 0,05$ ) azalttığı görülmüştür. Oysaki, yüksek PD kombinasyonlarının (G5+P50 ve G20+P50) GEM ile artan LP' na etkileri olmamıştır( $p > 0,05$ ).



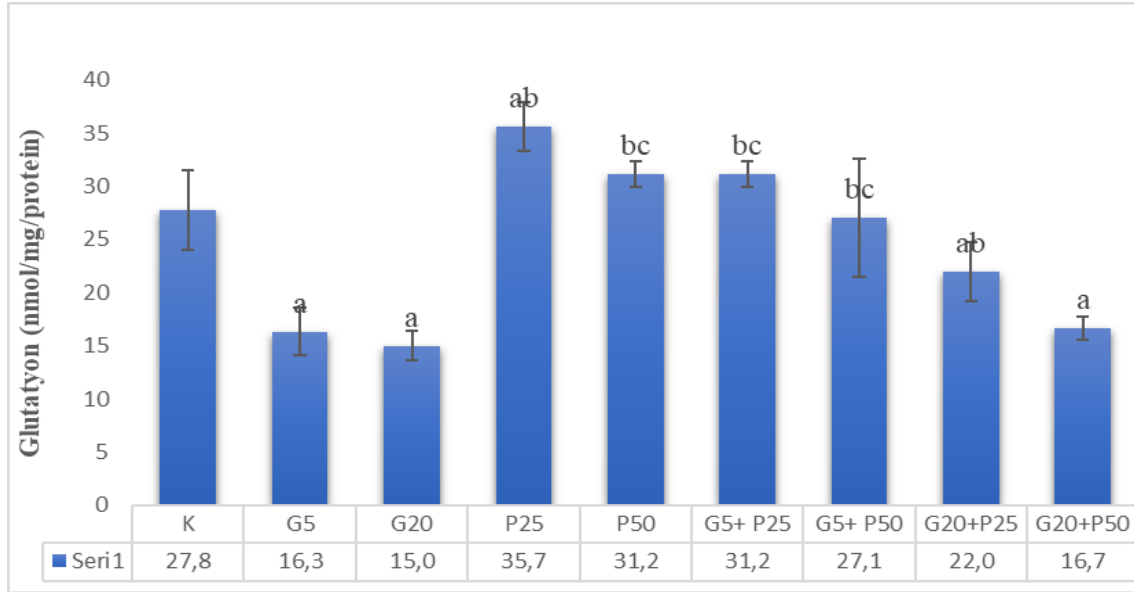


Şekil 4.5. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeyine etkisi

(<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> G5 grubundan farklı, <sup>c</sup> G20 grubundan farklı (p < 0,05)).

#### 4.2.2. Redükte Glutasyon Seviyesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GEM verilen gruplarda GSH düzeyi G5 ve G20 gruplarında sırası ile %41,36 ve %46,03 anlamlı düzeyde azalmıştır (p < 0,05). PD uygulanan gruplardan (P25) grubunda GSH seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artarken, P50 grubunda anlamlı bir değişim görülmemiştir (p > 0,05). Yüksek GEM kombinasyonlarında yani G20+P25 ve G20+P50 gruplarında GSH seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür (p < 0,05). Bu durum bize PD uygulamalarının yüksek GEM dozunun neden olduğu azalan GSH seviyesini düzeltmediğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde redükte glutasyon seviyesine etkileri

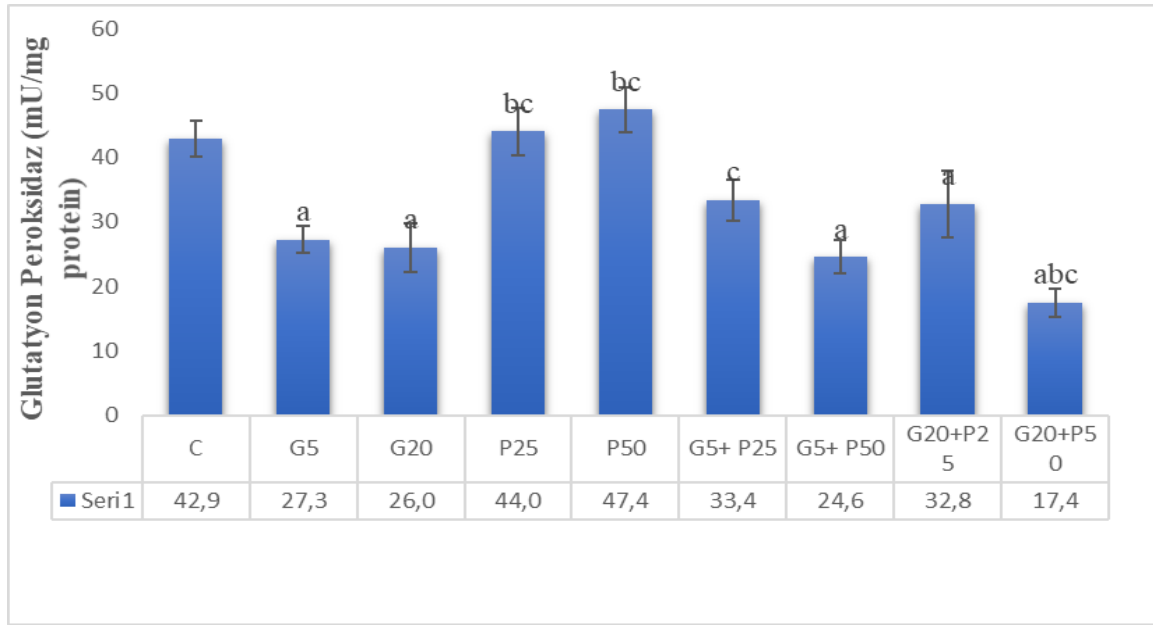
(<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> G5 grubundan farklı, <sup>c</sup> G20 grubundan farklı (p < 0,05))

#### 4.2.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GEM verilen gruplarda GPx aktivitesi G5 grubunda %36,4 ve G20 grubunda %39,4 oranında istatikselsel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (p < 0,05). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında polidatin uygulanan gruplarda (P25 ve P50) GPx aktivitesi arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p > 0,05). G5+P25 grubu hariç diğer kombinasyonlarda GPx aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma görülmüştür (p < 0,05). Hem kontrol hem de GEM gruplarına göre GPx aktivitesinde en belirgin baskılanmanın G20+P50 grubunda gözlemlenmiştir (p < 0,05).

Oksidatif stres parametreleri genel olarak değerlendirildiğinde, PD' in düşük doz kombinasyonlarında (G5+P25 ve G20+P25) tüm oksidatif stres parametrelerinde yüksek doz PD kombinasyonlarına göre daha fazla iyileşme olduğu görülmektedir. Buradan PD' in düşük dozlarının yüksek dozlarına göre daha fazla antioksidan etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.





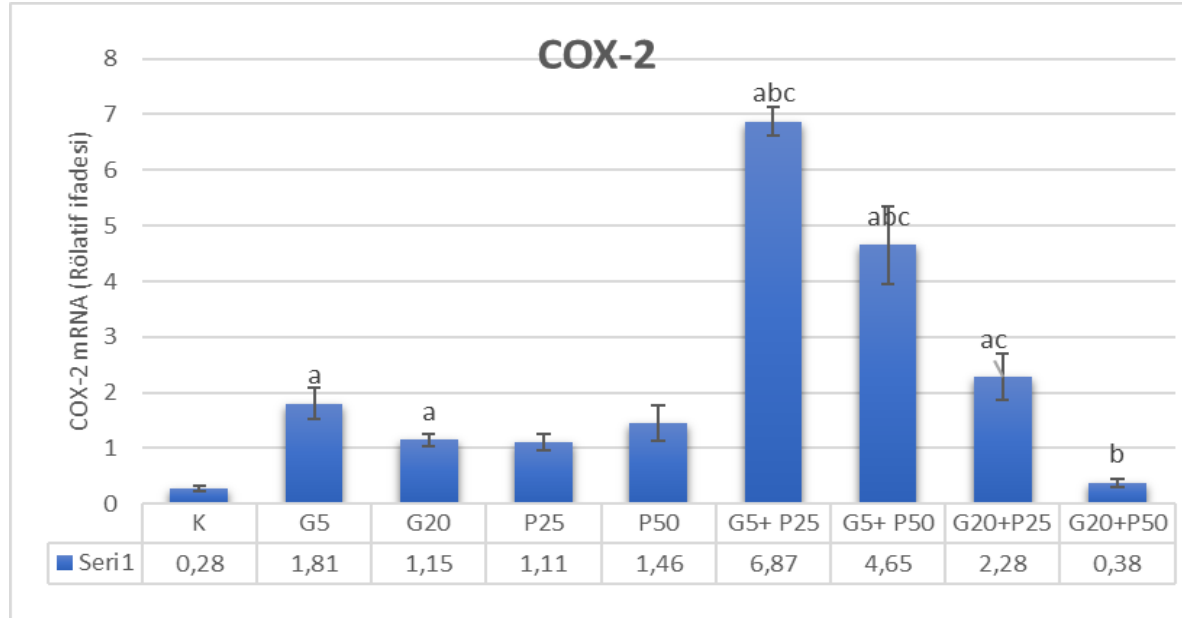
Şekil 4.7. Gemsitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde glutatyon redüktaz aktivitesine etkisi

(<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> G5 grubundan farklı, <sup>c</sup> G20 grubundan farklı (p < 0,05).

Sonuç olarak, farklı dozlarda GEM (aralarında anlamlı fark olmaksızın) LP seviyesini artırarak, GSH seviyesini ve GPx aktivitesini baskılayarak PANC-1 hücrelerinde oksidatif stresi artırmıştır. Farklı dozdaki PD' ler tek başlarına verildiklerinde genel anlamda oksidatif stres parametrelerini etki etmemişlerdir. Genel olarak, düşük PD dozu içeren kombinasyonların (G5+P25 ve G20+P25) yüksek PD dozu (G5+P50 G20+P50) içerenlere göre GEM' lerin indüklediği oksidatif stresi ortadan kaldırmada daha etkili oldukları görülmüştür. Diğer bir ifade ile kombinasyonlardaki yüksek doz PD, düşük doz PD' in aksine GEM' in neden olduğu oksidatif stresin daha da artmasına neden olmuştur.

### 4.3. Gemisitabin ve Polidatinin PANC-1 hücrelerinde *Cox-2* ve *IL-8* Gen İfadesi Üzerine Etkileri

#### *Cox-2* İfadesi

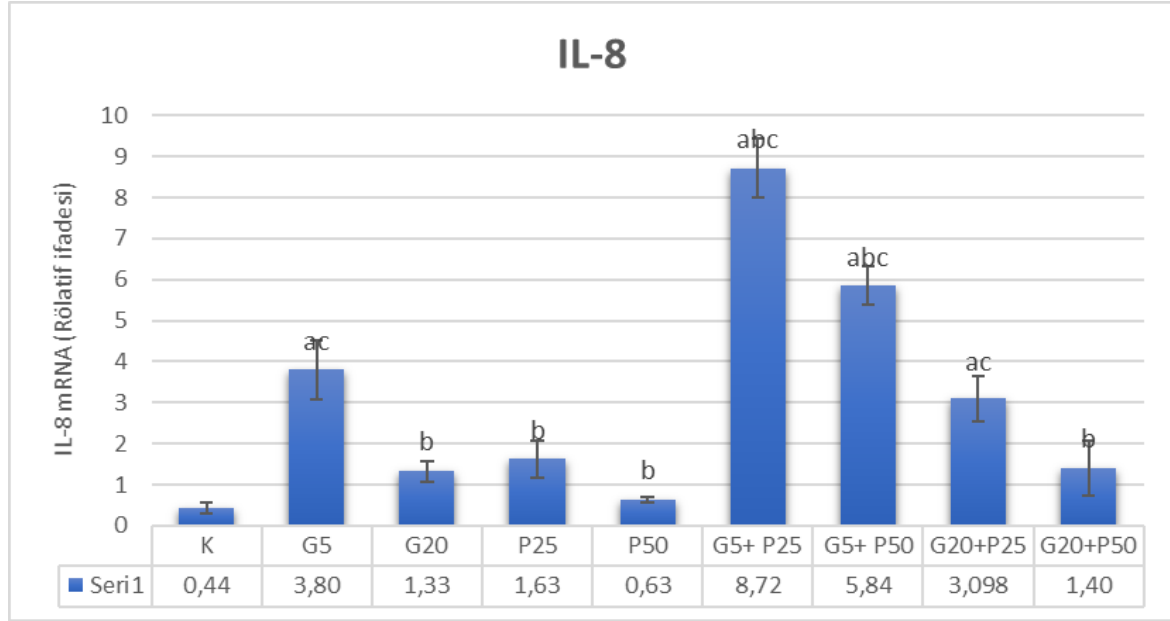


Şekil 4.8. Gemisitabin ve polidatinin PANC-1 hücrelerinde COX-2 mRNA ekspresyon düzeyine etkisi

(<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> G20 grubundan farklı, (p <0,05).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GEM verilen gruplarda COX-2 mRNA ekspresyon düzeyi G5 grubunda 6,4 kat ve G20 grubunda 4,1 kat istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (p <0,05). PD grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında COX-2 mRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p>0,05). Kombinasyonlarda en fazla COX-2 ekspresyonu G5+P25 grubunda görülmüş (24 kat) ve genel olarak dozlar arttıkça COX-2 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Kombinasyonlar arasında COX-2 ifadesindeki en belirgin azalmanın G20+P50 grubunda olduğu ve bu grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür (p>0,05).

#### 4.4. Gemsitabin ve Polidatinin Pankreas Kanseri Hücreleri (PANC-1) IL-8 mRNA Ekspresyon Düzeyine Etkisi



Şekil 4.9. Gemsitabin ve Polidatinin PANC-1 hücrelerinde IL-8 mRNA ekspresyon düzeyine etkisi

(<sup>a</sup> Kontrol grubundan farklı, <sup>b</sup> G20 grubundan farklı, (p < 0,05)).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GEM verilen gruplarda IL-8 mRNA ekspresyon düzeyi G5 grubunda 8,6 kat istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artarken (p < 0,05), G20 grubunda 3 kat (p > 0,05) artmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında polidatin uygulanan gruplarda IL-8 mRNA ekspresyon düzeyi P25 grubunda 3,7 kat ve P50 grubunda 1,4 kat artmıştır (p > 0,05). PD grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, P50'de P25'e göre IL-8 mRNA ekspresyon düzeyinde 2,6 kat fakat anlamlı olmayan (p > 0,05) azalma görülmüştür.

Genel olarak bakıldığında COX-2 de olduğu gibi burada da düşük doz GEM diğer gruplara göre çok belirgin bir şekilde IL-8 mRNA ekspresyon düzeyini artırmıştır (p < 0,05). Yine COX-2'ye benzer şekilde yüksek PD kombinasyonlarında (G5+P50 ve G20+P50) düşük polidatin kombinasyonlarına göre IL-8 daha fazla baskılanma görülmüştür (p < 0,05). Kombinasyonlar arasında IL-8 ifadesindeki en belirgin azalmanın COX-2 ifadesinde olduğu gibi G20+P50 grubunda olduğu ve bu grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür (p > 0,05).

## 5. TARTIŞMA

Pankreas adenokarsinomu en ölümcül kanserdir ve kötü prognoza sahiptir. Bir sitotoksik nükleozid analogu olan gemitabin pankreas kanseri için kullanılan klinik standart kemoterapi ilacıdır. Ancak kanser hücrelerinde birçok nedenle GEM' e karşı direnç gelişir ve bunun sonucu olarak kemoterapiye düşük yanıt verir. Bu nedenle, pankreas kanserinde GEM direncini azaltan ve kemosenitivitesini artıran biyoaktif antikanser ajanların etkisi son yıllarda yaygın olarak araştırılmaktadır (Yu, Drisko ve Chen, 2013). Çalışmamızda GEM, PD ve kombinasyonlarının sitotoksitesini belirlemek için 24,48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zaman dilimi seçtik. GEM' in PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin zamana bağlı olarak arttığı ve 72. Saatte en fazla sitotoksite olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 14). GEM' in sitotoksitesinin hücre içerisinde birikme süresi ile orantısal olduğu başka araştırmacılar tarafından da ortaya konmuştur (Heinemann, Hertel, Grindey ve Plunkett, 1987).

Çalışmamızda GEM sitotoksitesinin dozla paralel olarak artmadığını en fazla ( $IC_{50}$ 'nin altında) sitotoksitenin 5 mikromolarda olduğunu gözlemledik Imafuji ve ark., (2019). AsPC-1, MIA PaCa-2, BxPC-3, ve Panc-1 gibi farklı kanser hücre hatlarında 72. saatte GEM sitotoksitesi çalışmışlar ve  $IC_{50}$  değerlerinin sırasıyla 0.010, 0.12, 0,17 ve 0,71 olarak bulmuştur. Elde edilen veriler PANC-1 hücrelerinin diğer pankreas kanser hücrelerine göre gemstabile karşı daha dirençli olduğu ortaya koymuştur.

PD' de sitotoksitesi de GEM gibi doza bağımlı olmadığı  $IC_{50}$  değerine en yakın değerlerin daha düşük PD konsantrasyonları olduğunu gördük. Dahası PD de GEM gibi en fazla sitotoksik etkisini 72. Saatte göstermektedir. PD' in ve GEM' in PANC-1 hücreleri üzerinde aynı zaman süreçlerinde sitotoksite göstermeleri bu maddelerin sinerjik etkisini açısından değerli olduğunu düşünüyoruz. Bu çalışmada amaçlarımızdan biri de sınırlı sayıda hücre hattı üzerinde sitotoksik özelliği olduğunu bildiğimiz polidatinin daha önce denenmemiş PANC-1 üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığını gözlemlemektir. Polidatin 72. Saatte 25 ve 50 mikromolar konsantrasyonlarda yaklaşık %25'lik bir sitotoksite göstermiştir. Bir antikanser ilaç olan GEM' in gösterdiği sitotoksitenin %53 olduğu göz önüne alındığında bir flavonoid olan PD' in tek başına gösterdiği %25 'lik sitotoksitenin önemli bir bulgu olduğunu düşünüyoruz. Çalışmadaki diğer bir amacımız da GEM' in PD ile birlikte verildiğinde PANC-1 hücrelerinde nasıl bir sitotoksik etkinin ortaya çıkacağını belirlemektir.

GEM pankreas kanserlerinin tedavisinde kullanılan ve kanser hücrelerinin direnç göstermesi nedeni ile düşük sitotoksositeye neden olan kemoteropötik bir ilaçtır. Tek başına 5 mikromolar gemsitabin 72. Saatte %53 sitotoksosite göstermiştir (bkz. Şekil 15). Oysa 72. Saatte 5  $\mu$ M GEM 50  $\mu$ M PD ile birlikte verildiğinde IC<sub>50</sub>'nin üstünde %67 sitotoksosite göstermiştir. Kısaca, PD, GEM ile birlikte verildiğinde GEM sitotoksitesini (67-53=14) %14 oranında artırmıştır. PD anti-enflamatuvar, anti-oksidan, anti-kanser, nöroprotektif, hepatoprotektif, nefroprotektif ve immün sistemi uyarıcı etkilerin de olduğu geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir (Sohretoglu, Yüzbaşıoğlu ve Randolph, 2018). Çalışmamızda PD' in PANC-1 hücrelerinde GEM' in sitotoksitesini artırması şaşırtıcı değildir. Çünkü PD'in farklı hücre tiplerinde farklı yollarla anti-kanser etki gösterdiğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Multiple myeloma hücrelerinde mTOR/p70s6k yolağı (Yang vd.,2017) ve insan nazofaranjial karsinoma hücrelerinde reaktif oksijen radikali kaynaklı endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri hasarına (Liu, Zhao ve Zhang, 2011) bağlı olarak anti-kanser aktivite göstermiştir. PD yumurtalık kanser hücrelerinin çoğalmasını doza bağlı olarak azaltmıştır. Bu etkiyi Her-2 ve EGF-R'nin fosforilasyonunu, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazların (ERK) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'in ekspresyonunu azaltarak gerçekleştirdiği görülmüştür (Hogg vd., 2015).

Pankreas kanser hücreleri üzerinde PD' in anti prolatif ve anti kanser etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Fakat GEM, PD' in ana kaynağı olan resveratrol (10  $\mu$ M) ile birlikte PANC-1 hücrelerine uygulandığında, resveratrolün GEM 'in sitotoksitesini 10 kat artırdığı görülmüştür (Harikumar, Kunnammakara ve Sethi, 2010).

ROT' nin kanser hücreleri üzerindeki etkisi iki ucu keskin bıçak gibidir. ROT' nin kanser hücreleri üzerine sitotoksik mi yoksa çoğalmayı artırıcı olarak mı etki yapacağı hücre tipi uyarılara, zaman dilimine, gösterdiği spesifiteye ve ROT'nin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Değişen ROT seviyeleri her zaman hücre proliferasyonu üzerinde farklı etkilere neden olur. Genel anlamda, akut yüksek seviyelerde ROT, hücre apoptozunu indükleyen güçlü sitotoksik moleküller olarak hareket edebilir veya kronik düşük ROT genom stabilitesini etkileyebilir ve tümörjenez neden olabilir. Düşük miktarda ROT'nin pankreas kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını indüklediği ve malignant pankreas tümörlerinin gelişimine neden görülmüştür (Ling vd., 2014).

Bunu aksine, reaktif oksijen radikalleri mitojenle aktive edilmiş protein kinaz, PI3K / Akt NF- $\kappa$ B sinyal yolağı, protein kinaz C ve p53 gibi hücreleri ölüme götüren yolları

tetikleyebilir (Martindale ve Holbrook, 2002; Ling vd., 2014). Hücreler ROT' ini ortadan kaldırmak ve etkilerini minimize etmek için non-enzimatik antioksidanlar GSH, Vitamin A, E ve flavonoidler yanında SOD, CAT ve GPx gibi enzimatik antioksidanlarda bulundurlar. Maalesef bazen bu antioksidan mekanizma ROT' ini ortadan kaldırmak için yeterli gelmez ve bu durumda oksidatif stres meydana gelir (Martindale ve Holbrook, 2002).

LP ürünü olarak MDA' deki artış, antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx ve çok önemli hücrel antioksidan olan GSH' daki azalma oksidatif stresin en önemli belirteçleridir (Sohretoglu, Yüzbaşıoğlu ve Randolph, 2018). Çalışmamızda hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda GEM' in PANC-1 hücrelerinde kontrol grubuna göre LP seviyesini artırarak, GSH ve GPx seviyesini azaltarak anlamlı derecede oksidatif strese neden olduğunu gözlemledik.

Son zamanlarda ROT üreten ilaçların antikanser ilaç olarak kullanılabilmesine ilişkin umut veren çalışmalar bulunmaktadır. Gerçekten de kanser hücrelerinin bu sürekli olarak artan prooksidan ilaçlara karşı hassasiyetleri vardır. Donadelli vd., (2007) ROT' in indüklenmesinin GEM' in etki mekanizmalarından biri olduğunu ve düşük bazal seviyede ROT içeren pankreas kanser hücrelerinin daha yüksek seviyede ROT içeren hücelere göre GEM' e daha dirençli olduğunu göstermişlerdir. Diğer birçok antikanser ilaç gibi GEM' nin de antikanser mekanizmalarına ilave olarak sitotoksitesini artırmak için ROT' ni indüklediği bilinmektedir (Donadelli vd., 2007; Ju, Goccho ve Aguilar, 2015).

Maehara vd., (2004) GEM' in pankreas kanser hücrelerinde ROT' ni 3 kat artırdığını göstermişlerdir. Dahası, aynı araştırmacılar ROT süpürücü özelliği olan selenoprotein P olarak adlandırılan bir molekülün GEM sitotoksitesini azalttığını, hatta pankreas kanser hücrelerinde gelişen GEM direncinden bu molekülün sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Diğer polifenoller gibi PD de ROT' ni ortadan kaldırma ve endojen antioksidan savunma sistemini geliştirme yeteneği sayesinde antioksidan özellik gösterir (Sohretoglu, Yüzbaşıoğlu ve Randolph, 2018). PD' in (75 µM) insan umbilikal ven endotel hücrelerinde genel anlamda ROT oluşumunu önlediği ayrıca GPx ve SOD aktivitesinde sırasıyla %33 ve %60 oranında azalmaya neden olduğu görüldü. Aynı zamanda bu konsantrasyondaki PD' in bu hücrelerde kaspas -3 ve proapoptotik Bax seviyesini downregüle ve anti-apoptotik Bax seviyesini

upregüle ederek apoptosizi baskıladığı görülmüştür (Qiao, 2016). PD tek başına (240 µM) veya 100 µM resveratrolle kombine olarak verildiğinde mitokondriyal süperoksit anyonlarını, ekstrasellüler NO üretimini ve antioksidan enzimleri etkileyerek kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 hücrelerinde oksidatif stresi baskıladığı görülmüştür. (De Maria, 2013). PD' in fare karaciğer dokusunda karbon tetraklorür (CCl4) ile azalan SOD, GSH, GPx, GST ve CAT mRNA ekspresyon seviyesinin artırarak antioksidan etki gösterdiği görülmüştür (Zhang vd., 2012).

Tek başlarına verildiklerinde düşük ve yüksek doz PD' lerin PANC-1 hücreleri üzerindeki oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri farklılık göstermezken kombinasyonlarda farklılıkların ortaya çıktığı görülmektedir.

Çalışmamızda kombinasyon halinde iken PD' in genel olarak düşük dozlarda (G5+P25 ve G20+P25) farklı dozlardaki GEM' lerin indüklediği oksidatif stresi azaltarak antioksidan gibi, buna karşın yüksek dozlarda (G5+P50 ve G20+P50) oksidatif stresi azaltmayıp (hatta artırarak) pro-oksidan gibi etki ettiğini gözlemledik.

PD' in bu doza bağlı davranışı PD öncülü olan resveratrol çalışmalarında da gözlemlenmiştir. Yani resveratrolün düşük konsantrasyonlarda antioksidan olarak etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda oksidatif stresi artırabilmektedir (Shaito, vd., 2020). Bulgularımız özellikle yüksek doz PD kombinasyonunda (G25+P50) görülen belirgin sitotoksitenin buradaki artan oksidatif stres (GSH ve GPx seviyesinde azalma, LP artış) ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalar enflamasyon ile pankreas kanser arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinin mikroçevresinden salınan enflamasyon moleküllerinin enflamasyon yanıtı oluşturarak pankreas kanser hücrelerinin çoğalmasını indüklediği, pankreas kanserinin başlangıç ve ilerleme aşamalarında önemli role sahip olduğunu göstermektedir (Ling, Feng ve Jia, 2014).

COX-2, prostaglanin endoperoksit sentaz olarak da bilinen, araşidonik asiti prostaglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar gibi pro-inflammatuar sitokinlere dönüştüren enzimdir. COX-2'nin enflamasyonda rol oynayan diğer birçok enflamasyon faktörü gibi pankreas kanserinin başlangıç ve ilerleme aşamalarında önemli rol oynadığına ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Ling, Feng ve Jia, 2014). Pankreatik duktal adenokarsinomlarının %57-

80'inde COX-2'nin artmış ekspresyonu bildirilmektedir (Molina vd., 1999). COX-2' nin hücre çoğalmasını artırdığını ve apoptozisi inhibe ettiği (Ding, 2000) ve bununla birlikte vasküler endotelial büyüme faktörünü artırarak angiogenesi artırdığını görülmüştür (Eibl, Brummer ve Okada, 2003; Ling, Feng ve Jia, 2014).

Benzer şekilde yapılan son çalışmalarda, COX-2'nin tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığını ve bunun altında yatan mekanizmaların proliferasyon, apoptozis, anjiyogenez ve metastaz ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Xie vd., 2018).

Pankreas kanserlerinin erken döneminde artan COX-2 aktivitesinin COX-2 inhibitörleri tarafından inhibe edilmesinin hastalığın ilerlemesini durdurabileceği birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Xu vd., (2008) COX-2 ekspresyonu daha fazla olan pankreas kanserli hastaların daha kötü prognoza sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı araştırmacılar in vitro da NS-398 ve selekoksib gibi COX-2 inhibitörlerinin doza bağlı olarak PANC-1 hücrelerinin çoğalmasını azalttığını göstermişlerdir. Farklı pankreas kanser hücrelerinde COX-2 ifadesi çalışılmış ve COX-2 ifadesinin gemsitabin direnci ile bağlantılı olduğu görülmüştür; COX-2 ifadesinin düşük olduğu (PANC-1) hücrelerinde COX-2 ifadesinin yüksek olduğu p34 hücrelerine göre gemsitabin sitotoksitesinin çok daha düşük olduğunu gösterilmiştir (Lev-Ari vd., 2007).

Interleukin-8 (IL-8), CXC kemokin ailesine ait kanser hücrelerinin çevresinde oluşturulan pro -enflamasyonel sitokinlerden biridir. IL-8, makrofajlar, epitelial hücreler ve plateletlerden salgılanır, nötrofilleri hedef alarak onların aktivasyonu ve kemotaksisinde rol oynar. Son zamanlarda, IL-8'in kanser invazyonu, anjiyogenez ve metastazda kritik bir rol oynadığı ve tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olarak kabul edildiği gösterilmiştir (Grivennikov ve Krain, 2010). IL-8, pankreastaki iltihaplanma ve kanser arasındaki boşluğu dolduran önemli bir efektör molekül görevi görür. Enflamatuvar rolüne ek olarak, IL-8'in pankreas adenokarsinom ve pankreatik nöroendokrin tümörlerde bir otokrin büyüme faktörü olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Hussain, Wang ve Ahmed, 2010). Pankreas kanser hastalarında serum IL-8 seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür (Wigmore et al., 2002). Çalışmamızda IL-8 seviyesini değerlendirmemizin sebeplerinden biri de Imafujii ve arkadaşları (2019)' nın yaptığı pankreas kanserlerinde IL-8 artışı ile birlikte GEM direncinin ve angiogenesinin artırdığına ilişkin çalışma olmuştur. GEM dirençli AsPC-1 ve MIA PaCa-2 pankreas kanser hücrelerinde dirençli olmayanlara göre IL-8 seviyesinin 2 kat



arttığı görülmüştür. Bunlar gibi TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, PDGF, TGF-alfa gibi birçok sitokinlerin pankreas karsinogenesinde önemli rol oynadıklarına ilişkin literatürde çok daha fazla çalışma bulunmaktadır (Farrow ve Evers, 2002).

Çalışmamızda COX-2 ve IL-8 ifadelerinin GEM ve PD' e verdikleri yanıtlar bakımından önemli benzerlikler gösterdiğini gözlemledik. Her iki enflamasyonel yanıtın da özellikle G5+P25 grubunda çok belirgin olarak arttığı ve kombinasyon dozlarındaki artışa bağlı olarak normalize olduğu görülmektedir. Özellikle her iki enflamasyonel yanıtın da en düşük olduğu grubun gemsitabin ve polidatin konsantrasyonlarının en fazla olduğu G20+P50 grubunda görülmüştür ( $p>0,05$ ). PD' in enflamasyonel sitokin ve hücre adesyon moleküllerinin ifadesini modüle ettiğini gösteren çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma bulunmaktadır (Du, Peng ve Zhang, 2013). PD' in aktive olmuş insan periferik mononükleer lökositlerinde IL-17 mRNA ifadesini azalttığı (Lanzilli vd., 2012), sıçan eklem kondrosit hücrelerinde IL-beta ile indüklenen laktat dehidrogenaz, süperoksit dismutaz ve NO seviyesini azalttığı ayrıca TNF-a, IL-1b, IL-8 ve COX-2'nin baskılanmasına neden olduğu (Yang vd., 2017) gözlemlenmiştir. PD' in NF-kB p65 aktivitesini baskılayarak, TNF-a, IL-6 ve IL-1 beta sitokinlerinin ekspresyonlarını bloke ederek ve myeloperoksidaz enzimini azaltarak ülseratif kolit fare modelinde kolitisin neden olduğu enflamasyonu iyileştirdiği görülmüştür (Yao vd., 2011).

Her ne kadar yapılan çalışmaların birçoğunda PD' in IL-8'i baskıladığı görülse de insan keratinositlerinde bitki polifenollerinin değişik çeşitli uyarılara karşı proinflamasyonel sitokin davranışlarının çalışıldığı bir çalışmada bunun aksi görülmüştür. Potapovich ve ark (2011) tarafından yapılan bu çalışmada genel olarak bitki polifenollerinin proinflamasyonel sitokinleri down-regule ettiğini, buna karşın 50 mikromolar PD ve resveratrolün IL-8'i belirgin şekilde upregüle ettiğini görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser tedavisi alan hastaların büyük bir kısmının doğal kaynaklardan antioksidan bakımından zenginleştirilmiş bileşikler kullanmaktadırlar. Bu tür polifenollerin, terapötik rejimlerle kombinasyon halinde alırken kanserin yönetimi için optimum dozlarının ve zamanlamalarının belirlenmesi gerekir. Aksi halde kemoterapinin başarısızlığına neden olmakla kalmayıp bu doğal bileşikler kanserin ilerlemesine neden olabilirler. Pankreas kanserinin çoğunlukla klinikte kullanılan ilacı GEM' dir. Ancak kanser hücrelerinin zamanla GEM'e karşı dirençli hale gelmesi ile birlikte GEM' in tedavideki etkinliği de yetersiz kılmaktadır. Çalışmamızda GEM' in etkinliğini arttırmak amacıyla sitotoksik özelliği olan PD ile birlikte PANC-1 hücrelerine uyguladık. Tek başına 5 mikromolar GEM 72. Saatte %53 sitotoksosite gösterirken 50 mikromolar PD ile birlikte verildiğinde IC<sub>50</sub>'nin üstünde %67 sitotoksosite göstermiştir. PD GEM ile birlikte verildiğinde GEM sitotoksitesini (67-53=14) %14 oranında artırmıştır. Pankreas kanserlerindeki tedavi başarısı göz önüne alındığında in vitro da elde edilen bu sitotoksosite değerinin oldukça önemli olduğunu düşünüyoruz. Düşük doz GEM ve PD kombinasyonları COX-2 ve IL-8 ekspresyon düzeylerini belirgin bir şekilde artırırken, yüksek doz GEM ve PD kombinasyonlarının enflamasyonel parametrelerdeki bu artışı ortadan kaldırmıştır. PD' in doza bağlı davranışı sadece enflamasyonel parametrelerde değil aynı zamanda oksidatif stres parametreleri üzerinde de görülmüştür. Nitekim, PD düşük doz kombinasyonlarında GEM' lerin indüklediği oksidatif stresi azaltarak antioksidan gibi, buna karşın yüksek dozlarda oksidatif stresi azaltmayıp (hatta artırarak) pro-oksidan gibi etki etmiştir. Yapılan bu prelinik çalışmalar doğrultusunda ortaya çıkan sonuçlar göz önüne alındığında PD' in, oksidatif stres ve enflamasyonu modüle ederek insan pankreas kanseri PANC - 1 hücrelerinde GEM sitotoksitesini artırdığı söylenebilir. Elde ettiğimiz verilerin ileride PD ile yapılacak olan kanser çalışmalarına ışık tutacağına inanıyoruz.

## KAYNAKLAR

- Aggarwal, B., Shishodia, S., Sandur, S., Pandey, M. and Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1605-1621
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. and Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324-329
- Ak, Ö. ve Gencer, S. (2013). Enfeksiyon Hastalıklarında Antipiretik Kullanımı. *İç Hastalıkları Dergisi*, 20, 1-11
- Akira, S., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in Biology and Medicine. *Advances in Immunology*, 54, 1-78
- Antmen, Ş. E. (2005). *Beta Talasemide Oksidatif Stres*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana
- Arı, M. (2017). Kanserin Önlenmesinde Antioksidanların Rolü. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1(2), 67-74
- Asadullah, K., Sterry, W. and Volk, H. D. (2003). Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach. *Pharmacological Reviews*, 55(2), 241-269
- Atmaca, L. (2020). *Antineoplastik İlaçların Dna ile Etkileşmelerinin Uv-Görünür Bölge Spektroskopisi ile İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Ankara
- Balendiran, G., Dabur, R. and Fraser D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry&Function*, 22(6), 343-352

- Başaranoğlu, S. (2011). *Yaygın Değişken İmmün Yetmezlikte Oksidatif Stres*. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-164
- Birnboim, H. C. (1986). DNA strand breaks in human leukocytes induced by super-oxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation. *Carcinogenesis*, 7 (9), 1511–1517
- Bond-Smith, G., Banga, N., Hammond, T. M. and Imber, C. J. (2012). *Pancreatic adenocarcinoma*, 16, 344-350
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M. and Ji, B. T. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of Oncology*, 23 (7), 1880–1888
- Brat, DJ., Bellail, A. C. and Van Meir, E. G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*, 7 (2), 122–133
- Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, 27 (9–10), 951–965
- Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A., Nebert, D. W. and Vasiliou, V. (2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human Genomics*, 5 (1), 30–55
- Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490

- Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61 (2), 192–208
- Clogston, C. L., Boone, T. C., Crandall, B. C., Mendiaz, E. A. and Lu, H. S. (1989). Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 272 (1), 144–51
- Çerkeş, N., İleri Antiaging Uygulamalarında Oksidatif Stres Testinin Önemi. URL: [Oksidatif Stres ölçülebilir ve tedavi edilebilir bir durumdur. \(cosmed-clinic.com\)](http://cosmed-clinic.com).  
Son Erişim Tarihi: 10.06.2021
- Çetin, Ş. ve Dede, İ. (2019). Pankreas Kanserinde Prognostik Faktörler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(1), 30-34
- Çetin, Y. and Bullerman, L. B. (2005). Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 755-764
- Dağlı, F. (2014). *Deneyisel Hipertiroidi Oluşturulan Ratlarda Karnozinin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi*, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri
- D'mello, P., Kumar, M., Joshi, U. and Shetgiri, P. (2011). Modeling of Cox-2 Inhibitory Activity of Flavonoids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 33-40
- De La Cruz, M. S., Young, A. P. and Ruffin, M. T. (2014). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *American Family Physician*, 89 (8), 626–632
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P. and Corpas, F. J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology & Medicine*, 13 (5), 557–580

- Del Rio, D., Stewart, A.J. and Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition Metabolism Cardiovascular Diseases*, 15 (4), 316–328
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. and Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 52, 794–804
- Dinarello, C.A., (1988). Biology of interleukin 1. *The FASEB Journal*. 2(2), 108-115
- Doll, F. R. S. and Peto, R. (1981). The Cases of Cancer. *New York: Oxford University Press*, 66(6), 1191-1308
- Donadelli, M., Costanzo, C., Beghelli, S., Scupoli, M. T., Dandrea, M. and Bonora, A. (2007). Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochimica Biophysica Acta*, 1773, 1095–106.
- Doyle, A. and Griffiths, J. B. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. United Kingdom: John Wiley&Sons
- Du, Q., Peng, C. and Zhang, H. (2013). Polydatin: A review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical Biology*, 51(11), 1347-1354
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(2), 119–133
- Eibl, G., Bruemmer, D. and Okada, Y. (2003). PGE (2) is generated by specific COX 2 activity and increases VEGF production in COX 2 expressing human pancreatic cancer cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 306(4), 887-897
- Ermaya, M. ve Demir, H. (2019). *Pankreas Kanserinin Beslenme ile İlişkisi*, Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırmaları Kongresi Bildiri Tam Metin Kitabı, Bandırma, 45-54

- Esterbauer, H. and Chessman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-421
- Evcimen, M. (2015). *Kadmiyum Toksikasyonuna Maruz Bırakılan Ratlarda Polydatin ve Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Kan, Karaciğer, Böbrek, Beyin ve Testis Dokularına Etkilerinin Histopatolojik ve Oksidan \_Antioksidan Göstergelerle Araştırılması*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Afyon
- Farrow, B. and Evers, B. M. (2002). Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Journal Surgical Oncology*, 10(4), 153–169
- Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol*. 114–121
- Grivennikov, S. and Karin, M. (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(1), 65-71
- Göktürk, F. (2017). *Panc-1 ve Bxpc-3 Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Juglon Uygulamasının Wnt Sinyal Yolu Aktivesi ile Metastaz ve Anjiyogenez Üzerine Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile Analizi*, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya
- Grant, J. J. and Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, 124 (1), 21–9
- Hao, J., Chen, C., Huang, K., Huang, J., Li, J. and Liu, P. (2014). Polydatin improves glucose and lipid metabolism in experimental diabetes through activating the Akt signaling pathway. *European Journal Pharmacology*, 745, 152–65
- Harikumar, K. B., Kunnumakkara, A. B. and Sethi, G. (2010). Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *International Journal Of Cancer*, 127(2), 257-268

- Hawkey, C. J. (2001). COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15(5), 801-820
- Hayes, J. D., Dinkova, A. T. and Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167-197
- Hayyan, M., Hashim, M. A. and AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*, 116 (5), 3029–3085
- Heinemann, V., Hertel, L. W., Grindey, G. B. and Plunkett, W. (1987). Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (dFdC) and Arabinosylcytosine (Ara-C). *Proceedings of the American Association Cancer Research*, 28, 324
- Hertel, L., Boder, G. and Kroin, J. (1990). Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine 2'2' difluorodeoxycytidine. *Cancer Research*, 50(14), 4417-4422
- Hiner, A. N., Raven, E. L., Thorneley, R. N., García-Cánovas, F. and Rodríguez-López, J. N. (2002). Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 27–34
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M. and Funk, C.D. (1997). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 644–651
- Hogg, S. J., Chitcholtan, K., Hassan, W., Sykes, P. H. and Garrill, A. (2015). Resveratrol, acetyl-resveratrol, and polydatin exhibit antigrowth activity against 3D cell aggregates of the SKOV-3 and OVCAR-8 ovarian cancer cell lines. *Obstetrics Gynecol International*, 2015, 1-15



- Huang, H. Y., Appel, L. J., Croft, K. D., Miller, E. R., Mori, T. A. and Puddey, I. B. (2002). Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 549–555
- Hussain, F., Wang, J. and Ahmed, R. (2010). The expression of IL 8 and IL 8 receptors in pancreatic adenocarcinomas and pancreatic neuroendocrine tumours. *Cytokine*, 49, 134-140
- İnce, S., Arslan, A. and Neuwirth, D. (2014). Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats. *Food Chemistry Toxicol*, 72, 147–153
- İnternet: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. (Temmuz 2017). URL: [Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi \(ksu.edu.tr\)](http://KahramanmaraşSütçüİmamÜniversitesi(ksu.edu.tr)) Son Erişim Tarihi: 10.06.2021
- İnternet: Sindirim Sistemi Anatomisi. (Nisan 2021). URL: [Sindirim Sistemi Anatomisi ve Özellikleri](http://SindirimSistemiAnatomisiveÖzellikleri) Son Erişim Tarihi: 10.06.2021
- Johnson, F. and Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (4–5), 340–52
- Ju, H. O., Gocho, T. and Aguilar, M. (2015). Mechanisms of Overcoming Intrinsic Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through the Redox Modulation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(3), 788-798
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76
- Kılıç, M. (1999). *Gemcitabinin ve İnterferon-Alpha'nın İnsan Eritrolösemi Hücre Dizisi K562 ve Varyantı P-GP (+) K562-Dox Üzerinde Antitümoral ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya

- Kolls, J. K. and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*, 21(4), 467-476
- Lantz, C. S., Boesiger, J., Song, C. H., Mach, N. and Kobayashi, T. (1998). Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*, 392, 90-93
- Lanzilli, G., Cottarelli, A. and Nicotera, G., vd. (2012). Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. *Inflammation*, 35, 240–248
- Larsson, S. C. and Wolk, A. (2012). Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Cancer*, 106(3), 603–607
- Lawless, M. W., O’Byrne, K. J. and Gray, S. G. (2010). Targeting oxidative stress in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(5), 1225-1245
- Lelli, J. L., Becks, L. L., Dabrowska, M. I. and Hinshaw, D. B. (1998). ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radical Biology Medicine*, 25(6), 694–702
- Lev-Ari, S., Vexler, A. and Starr, A., vd. (2007). Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Investigation*, 25(6), 411-418
- Li, Y., Go, V. L., and Sarkar, F. H. (2015). The Role of Nutraceuticals in Pancreatic Cancer Prevention and Therapy: Targeting Cellular Signaling MicroRNAs and Epigenome. *Pancreas*, 44(1), 1-10
- Ling, S., Feng, T. and Jia, K., vd. (2014). Inflammation to cancer: The molecular biology in the pancreas (Review). *Oncology Letters*, 7(6), 1747-1754

- Liu, H., Zhao, S. and Zhang, Y., vd. (2011). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to polydatin-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE cells. *Journal Cell Biochemistry*, 112, 3695-3703
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25, 402-408
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, 193, 165-175
- Lütticken, C., Krüttgen, A., Möller, C., Heinrich, P. C. and Rose-John, S. (1991). Evidence for the importance of a positive charge and an alpha-helical structure of the C-terminus for biological activity of human IL-6. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 282 (2), 265-7
- Maehara, S., Tanaka, S. and Shimada, M., vd. (2004). Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. *International Journal Of Cancer*, 112(2) ,184-189
- Martindale, J. L., Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival, *Journal Cellular Physiology*, 192, 1-15
- McHenry, C. R. and Strain, J. W. (1997). Anatomy and Embryology of the pancreas. *Textbook of endocrine Surgery. Philedelphia: Saunders*, 73(4), 549-555
- Mikulski, D., Górnjak, R. and Molski, M. (2010). A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. *Europen Journal Medicine Chemistry*, 45(3), 1015-1022
- Milburn, M. V., Hassell, A. M., Lambert, M. H., Jordan, S. R., Proudfoot, A. E., Graber, P. and Wells, T. N. (1993). A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5. *Nature*, 363(6425), 172-176

- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini I. and Mazzei T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 17(5), 5-12
- Molina, M. A., Sitja-Arnau, M. and Lemoine, M. G., vd. (1999). Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Research*, 59(17), 4356-4362
- Moore, K. and Roberts, L. J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 28(6), 659–671
- Moron, M. S., Depierre, J. W. and Mannervik, B. (1979). Levels of glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica Biophysica Acta Journal*, 582, 67–70
- Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L. and Reddi A. H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(2), 155-174
- Mosser, D. M. and Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226, 205-218
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han Y., Neukermans, J. and Marquez-Garcia, B., vd. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, 35, 454–484
- Noda, N. and Wakasugi, H. (2001). Cancer and Oxidative Stress. *Japan Medical Association Journal*, 44(12), 535–539
- Peters, M. L., Tseng, J. F. and Miksad, R. A. (2016). Genetic Testing in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Implications for Prevention and Treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1622–1635

- Potapovich, A. I., Lulli, D. and Fidanza, P., vd. (2011). Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NF kappa B and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 255(2), 138-149
- Plunkett, W., Huang, P., Searchy, E. and Gandhi, W. (1996). Gemcitabine preclinical pharmacology and mechanism of action. *Seminars in Oncology*, 23(5), 3-5
- Rhee, S.G. (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882–1883
- Ryan, D.P., Hong, T.S. and Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039–1049
- Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology Medicine*, 30(11), 1191–1212
- Schröder, J. M. (1992). Interleukin 8. *Advances in Neuroimmunology*, 2(2), 109-124
- Seyfizadeh, N., Gharibi, T. and Babaloo, Z. (2015). Interleukin-13 as an important cytokine: A review on its roles in some human diseases. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62(4), 341–378
- Shaito, A., Posadino, A.M. and Younes, N., vd. (2020). Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(6), 2-26
- Slack, J. M. W. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121, 1569-1580
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295

- Signore, A. (2013). About inflammation and infection. *European Journal of Nuclear Medicine And Molecular Imaging*, 3(8), 8-10
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S. and Pujari, V. B. (2019). Inflammation and Cancer. *The Annals Africian Medicine*, 18(3), 121–126
- Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science*, 240, 1169-1176
- Sohretoglu, D., Yuzbasioglu, B. M. ve Randolph, A., vd. (2018). Recent advances in chemistry, therapeutic properties and sources of polydatin. *Phytochemistry Reviews*, 2018, 973-1005
- Standring, S. (2016). Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. *Philadelphia*, 29(2), 1179–1189
- Storz, P. (2013). Oxidative Stress in Cancer. *Oxidative Stress and Redox Regulation*, 427-447
- Şekerci, B. (2002). *Pankreas adeno kanseri, nöroendokrin tümörü ve kronik pankreatitli hastalarda prognostik önemi olan patolojik ve histokimyasal parametreleri ilişkisi ve diyabetin rolü*. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi.
- Tang, K. S. and Tana, J. S. (2019). The protective mechanisms of polydatin in cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology*, 842, 133-138
- Tobias, J. S. and Hochhauser, D. (2014). *Cancer and its Management (7th ed.)*, 6(4), 1-26
- Valko, M., Morris, H. and Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208
- Vecchio, M.D., Bajetta, E. and Canova, S., vd. (2007). Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. *Clinical Cancer Research*, 13(16), 4677-4685

- Vieira, S.A., Zhang, G. and Decker, E. A. (2017). Biological Implications of Lipid Oxidation Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(3), 339–351
- Waugh, D. and Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6735-6741
- Wigmore, S. J., Fearon, K. C. H. and Sangster, K., vd. (2002). Cytokine regulation of constitutive production of interleukin-8 and-6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer. *International Journal Of Oncology*, 21(4), 881-886
- Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K. and Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(5), 318–348
- World Cancer Report, *World Health Organization*. (2014). 5(7)
- Xie, C., Xu, X. and Wang, X., vd. (2018). Cyclooxygenase-2 induces angiogenesis in pancreatic cancer mediated by prostaglandin E-2. *Oncology Letters*, 16(1), 940-948
- Xu, X. F., Xie, C. G. and Wang, X. P., vd. (2008). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Tohoku Journal Of Experimental Medicine*, 215(2), 149-157
- Yaman, H., Dördüncü Evre Pankreas Kanseri. URL: [4 Evre Pankreas Kanseri Belirtileri ve Tedavisi](#). Son Erişim Tarihi: 10.06.2021
- Yang, G., Fan, L. and Tian S. J., vd. (2017). Polydatin reduces il-1b-induced chondrocytes apoptosis and inflammatory response via p38 mapk signaling pathway in a rat model of osteoarthritis. *International Journal Clinical Experimental Medicine*, 10(2), 2263–2273

- Yao, J., Wang, J. Y. and Liu, L., vd. (2011). Polydatin ameliorates DSS-induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Planta Medica*, 77, 421–427
- Ymer, S., Tucker, W. Q., Sanderson, C. J., Hapel, A. J., Campbell, H. D. and Young, I. G. (1985). Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene. *Nature*, 317(6034), 255–8
- Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2), 7-18
- Yu, J., Drisko, J. and Chen, Q. (2013). Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. *Oncology Reports*, 30, 149-156
- Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Gustchina, A., Tsang, M., Weatherbee, J. and Wlodawer, A. (1995). Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure*, 3(6), 591–601
- Zhang, H., Yu, C. H. and Jiang, Y. P., vd. (2012). Protective Effects of Polydatin from *Polygonum cuspidatum* against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice. *Public Library Of Science One*, 7(9), 1-10
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhou, Z., Zhang, J. and Tian, Z. (2008). Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology*, 69(8), 490–500



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı-Soyadı**

**Uyruğu**

**Doğum tarihi ve yeri**

**Medeni hali**

**e-posta**

**Eğitim Derecesi**

**Okul/Program**

**Mezuniyet**

**Yılı**

Lisans

Amasya Üniversitesi

2017

Yüksek Lisans

Amasya Üniversitesi

-

**İş Deneyimi**

**Çalıştığı yer**

**Görevi**

2019- 2020

Özel Limit Etüt Merkezi

Fen Bilimleri Öğretmeni

2020-2021

Özel Ada Çocuk Kulübü

Fen Bilimleri Öğretmeni

**Yabancı Dili**

İngilizce