

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PANKREAS KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN
KEMOTERAPİ AJANLARININ HÜCRE CANLILIĞI VE COX
AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VITRO* ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA GÖKÇE

BALIKESİR, MAYIS - 2015

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PANKREAS KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN
KEMOTERAPİ AJANLARININ HÜCRE CANLILIĞI VE COX
AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA GÖKÇE

BALIKESİR, MAYIS - 2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tuğba GÖKÇE tarafından hazırlanan “**PANKREAS KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN KEMOTERAPİ AJANLARININ HÜCRE CANLILIĞI VE COX AKTİVİTESİ ÜZERİNE *IN VITRO* ETKİSİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 29.05.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof.Dr. Selma SİNAN

Eş Danışman
Yrd.Doç.Dr.Hatice YILDIRIM

Üye
Doç. Dr. Zeliha ERDOĞAN

Üye
Doç.Dr. Olga SAK

Üye
Yrd.Doç.Dr.Meltem ALPER

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
(BAP) Birimi tarafından 2013/0035 nolu proje ile desteklenmiřtir.**

ÖZET

**PANKREAS KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN KEMOTERAPİ
AJANLARININ HÜCRE CANLILIĞI VE COX AKTİVİTESİ ÜZERİNE
İN VİTRO ETKİSİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUĞBA GÖKÇE
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. SELMA SİNAN)
(EŞ DANIŞMAN: YRD.DOÇ.DR. HATİCE YILDIRIM)
BALIKESİR, MAYIS - 2015**

Tanı koyma aşamasındaki güçlükler ve en etkili sistemik tedavilerin yetersizliği nedeniyle hastaların ancak %5'inde teşhisten sonraki sağ kalım süresi 5 yıl olan pankreas kanseri evrensel olarak ölümcül bir kanser türüdür. Çalışmamızda kanseri durdurmak veya tedavi etmek için kullanılan kemoterapi ajanlarının Panc-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Dosetaksel, paklitaksel, okzaliplatin, epirubisin, gemitabin, irinotekan ve bevasizumab gibi etken maddeli kemoterapi ajanları Panc-1 hücre hattına uygulanarak 24-48-72 saat dilimlerinde hücre canlılığı istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Okzaliplatin ve dosetaksel 100-1000 µg/ml'de 72 saat sonunda, irinotekan 72 saat sonunda 1000 µg/ml'de, gemitabin maksimum 1000 µg/ml'de 24 saat sonunda sitotoksik etki göstermiştir. Paklitaksel 0,1-1-100 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığında inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Bevasizumab 0,01-0,1-1-10-100-1000 µg/ml dozlarında Panc-1 hücre hattında inhibisyon konsantrasyonu %50 değerinin altına düşmemiştir. Epirubisinin ise 10-100-500 µg/ml'de 72 saat sonunda maksimum düzeyde hücre canlılığını inhibe edici etkisi tespit edilmiştir.

Araşidonik asitin prostaglandinlere dönüşmesinde kilit enzim olan siklooksigenaz enzimi pankreas kanserinde hücre apoptozunu engelleyerek kanserli dokunun artmasına neden olmaktadır. Bu amaçla söz konusu kemoterapi ajanlarının koyun pankreası tarafından üretilen siklooksigenaz (COX) enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir. Dosetaksel artan konsantrasyonlarında COX enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ancak irinotekan, paklitaksel ve epirubisin COX enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Okzaliplatin kemoterapi ajanının ise COX enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Kemoterapi ajanları, COX, pankreas kanseri, inhibisyon

ABSTRACT

THE *IN VITRO* EFFECTS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS USED IN TREATMENT OF PANCREATIC CANCER ON CELL PROLIFERATION AND ACTIVITY OF COX ENZYME

MSC THESIS

TUĞBA GÖKÇE

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF.DR. SELMA SİNAN)

(CO-SUPERVISOR: ASSIST.PROF.DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, MAY 2015

Stage of diagnosis in patients with difficulties due to lack of effective systemic therapies, pancreatic cancer is one of the leading causes of cancer related deaths with a 5 years survival being <5%. Pancreatic cancer is one of the most rapidly fatal malignancies. In our study, investigation of cytotoxic effects of chemotherapeutic agents used to treat or to stop the progress of cancer on Panc-1 cell line is aimed. Chemotherapeutic agents such as docetaxel, paclitaxel, oxaliplatin, epirubicin, gemcitabin, irinotecan and bevacizumab were applied to Panc-1 cell line and cell viability at 24, 48 and 72 hours was statistically calculated. Oxaliplatin and docetaxel, irinotecan, gemcitabin showed cytotoxic effect in range of 100-1000 µg/ml concentrations at 72 hours, in 1000 µg/ml at 72 hours and in 1000 µg/ml at 24 hours, respectively. Inhibition effect of paclitaxel on cell viability was determined in range of 0,1-1-100 ve 1000 µg/ml concentrations. Bevacizumab didn't fall below %50 inhibition effect on Panc-1 cell line in range of 0,01-0,1-1-10-100-1000 µg/ml concentrations. Maximum inhibition effect of epirubicin in range of 10-100-500 µg/ml concentrations was determined onto cell viability at 72 hours.

Cyclooxygenases which a key enzyme in the conversion of arachidonic acid to prostaglandins leads to an increase in the cancerous tissue by preventing apoptosis in pancreatic cancer cells. For this purpose, the effects of chemotherapeutic agents on activity of cyclooxygenases produced by sheep pancreas were determined. As result of the study, docetaxel on increasing concentration inhibited COX enzyme. In contrast, irinotecan, paclitaxel and epirubicin was activated COX enzyme. The effect of oxaliplatin on COX enzyme activity was not observed.

KEYWORDS: Chemotherapeutic agents, COX, pancreatic cancer, inhibition

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser.....	1
1.1.1 Kanser Biyolojisi	2
1.2 Pankreas Yapısı	3
1.2.1 Pankreas Kanseri.....	4
1.3 Siklooksijenazlar	5
1.3.1 Prostaglandinlerin Sentezi	5
1.3.2 COX-1 ve COX-2 Yapılarının Genel Özellikleri	7
1.4 COX-2 Proteini ve Yapısı	8
1.4.1 Substratları	9
1.4.1 Hücre İçi Lokalizasyonu	11
1.5 COX-2 Enziminin Anjiyogenezdeki Rolü	12
1.6 COX-2'nin Karsinogeneze Katkısı	12
1.7 Kanser Tedavisinde Kullanılan Kemoterapi Ajanları	12
1.7.1 Okzalipatin.....	13
1.7.2 Paklitaksel ve Doksetaksel.....	14
1.7.3 Epirubisin.....	15
1.7.4 İrinotekan	16
1.7.5 Gemsitabin	17
1.7.6 Bevasizumab	17
1.8 Çalışmanın Amacı	18
2. MATERYAL VE METOD	19
2.1 Materyal.....	19
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Soy Hattı	21
2.1.3 Enzim Aktivite Ölçümünde Gerekli Kimyasallar.....	21
2.2 Metotlar	21
2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu	21
2.2.2 Hücre Kültürü Deneyleri	21
2.2.2.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması.....	21
2.2.2.2 FCS Hazırlanması	22
2.2.2.3 (10X) PBS Tampon Çözeltilisinin Hazırlanması	22
2.2.2.4 Trypsin-EDTA Hazırlanması	22
2.2.2.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması	22
2.2.2.6 Çalışmada Kullanılan Hücre Soy Hattı	22
2.2.2.7 Hücre Soyunun Başlatılması	23
2.2.2.8 Hücrelerin Büyütülmesi	23

2.2.2.9	Hücrelerin Pasajlanması.....	23
2.2.2.10	Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	24
2.2.2.11	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi.....	24
2.2.3	Hücre Sayısının Optimizasyonun Belirlenmesi	25
2.2.4	Hücre Canlılık Testi (MTT) Analizi	25
2.2.5	Koyun Pankreasındaki COX Enzim Aktivite Ölçümü İçin Doku Homojenatının Hazırlanması	26
2.2.5.1	Kemoterapi Ajanlarının Koyun Pankreasına Uygulanması ve COX Enzim Aktivitelerinin Bulunması	26
2.2.5.2	Total COX Aktivitesinin Hesaplanması.....	27
3.	BULGULAR	28
3.1	Hücre Sayısı Optimizasyonunun Tespiti	28
3.2	Panc-1 Hücrelerine Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının 24-48-72 Saat Sonrası Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	28
3.3	Panc-1 Hücre Hattına Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının IC ₅₀ Değerleri	33
3.4	Panc-1 Hücre Hattına Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının İnhibisyon Etkisi.....	34
3.5	Koyun Pankreas Hücreleri Tarafından Üretilen COX Enzimine Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının Total COX Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	38
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	42
5.	KAYNAKLAR.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1 : Pankreasın yapısı	4
Şekil 1. 2 : Pankreas kanseri evreleri	5
Şekil 1. 3 : Prostaglandinlerin sentezi	6
Şekil 1. 4 : COX-2 proteini	8
Şekil 1. 5 : Siklooksijenazların yapısı	8
Şekil 1. 6 : Siklooksijenazların hücre içi lokalizasyonu	11
Şekil 1. 7 : Okzaliptatin yapısı.....	13
Şekil 1. 8 : Paklitaksel yapısı.....	14
Şekil 1. 9 : Dosetaksel yapısı.....	15
Şekil 1. 10: Epirubisin yapısı.....	16
Şekil 1. 11: İrinotekan yapısı.....	17
Şekil 1. 12: Gemsitabin yapısı.....	17
Şekil 2. 1 : Panc-1 hücrelerinin faz-konstrat mikroskobu ile görüntülenmesi.	23
Şekil 2. 2 : Hemositometre.....	24
Şekil 2. 3 : MTT reaksiyonu.....	25
Şekil 2. 4 : Tetrazoliumun hücredeki etkisi.....	26
Şekil 3. 1 : MTT analizi öncesi hücre sayısı optimizasyonunun belirlenmesi.	28
Şekil 3. 2 : Okzaliptatin uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	29
Şekil 3. 3 : Epirubisin uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	29
Şekil 3. 4 : Gemsitabin uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	30
Şekil 3. 5 : İrinotekan uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	31
Şekil 3. 6 : Bevasizumab uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	31
Şekil 3. 7 : Dosetaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	32
Şekil 3. 8 : Paklitaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.....	32
Şekil 3. 9 : Okzaliptatin uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	34
Şekil 3.10: Paklitaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	35
Şekil 3.11: Epirubisin uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	35
Şekil 3.12: İrinotekan uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	36
Şekil 3.13: Dosetaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	36
Şekil 3.14: Bevasizumab uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	37
Şekil 3.15: Gemsitabin uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.....	37
Şekil 3.16: Koyun pankreasına uygulanan dosetakselin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 3.17: Koyun pankreasına uygulanan irinotekanın COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 3.18: Koyun pankreasına uygulanan paklitakselin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 3.19: Koyun pankreasına uygulanan okzaliptatinin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 3.20: Koyun pankreasına uygulanan epirubisinin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	41

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. 1: COX-1 ve COX-2 arasındaki farklılıklar.....	7
Tablo 1. 2: COX-2 substratları.....	11
Tablo 2. 1: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.....	19
Tablo 2. 2: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri.....	20
Tablo 3. 1: Kemoterapi ajanlarının Panc-1 hücre hattında 24-48 ve 72 saat sonundaki IC ₅₀ değerleri.....	33
Tablo 3. 2: Vücut yüzey alanı.....	38

SEMBOL LİSTESİ

COX-1	: Siklooksigenaz-1
COX-2	: Siklooksigenaz-2
PGHs	: Prostaglandinler
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PGG₂	: Prostaglandin G ₂
PBS	: Fosfat tamponlu çözelti
TE	: Tripsin-EDTA
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
FCS	: Fetal Calf Serum
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetikasit
AA	: Araşidonik Asit
KRK	: Kolorektal kanser
HT-29	: İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı
MCF-7	: İnsan meme adenokarsinom hücre hattı

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, deneysel aşamalarda her daim yol göstericim olan, kendisini her yönüyle örnek aldığım, çok kıymetli, vefakar ve samimi hocam Prof.Dr. Selma SİNAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel aşamalarım süresince bilgileriyle ve desteği ile bana öncül olan, tez çalışmalarım da bana fazlasıyla yardımcı olan ve yardımcı oldukça da ne sabrından ne gülüyüzünden eksilme gösteren, samimi ve içten hocam Yrd.Doç.Dr. Hatice YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım da gösterdiği büyük emek ve sabırla, bilgi paylaşımlarıyla ve deneysel çalışmalarım a olan büyük katkısıyla, yüreği güzel değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım da güzel vakit geçirdiğim, deneyimlerini benimle paylaşan gülüyüzlü arkadaşım Merve KARAMAN'a, bu süreçte yardımlarıyla hep yanımda olan Zülfiye arkadaşım a teşekkür ederim.

Desteğini her zaman hissettiğim, çalışmalarım da yardımlarıyla yanımda olan Dr. Aynur AYBEY'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca attığım her adımda bana destek olan, sevgi dolu, fedakar annem Fatma KARATEKE'ye ve canım ablam Leyla YALÇIN'a ve en büyük tebessümlerim olan masum yeğenlerim Ecem ve Eren YALÇIN'a bitmeyen sevgilerini sundukları için teşekkür ederim.

Hayatıma bambaşka anlamlar katan, desteğini hep hissettiğim, attığım her adımda yanımda olacağına inandığım, sevgili eşim Mustafa GÖKÇE'ye manevi desteğinden ve anlayışından dolayı teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser tüm insanları etkileyen ve önemi günden güne artan, ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Ülkemizde ise tespiti yapılan ölümler arasında yer alan kanser, son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucunda kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada yer almaktadır. Özellikle yurdumuzda en sık görülen kanserler erkeklerde prostat, akciğer, rektum, kalın bağırsak, mide ve pankreas; kadınlarda ise meme, akciğer, kalın bağırsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Deri kanseri sıklığı her iki cinste de yüksek olmakla birlikte, malign melanom dışındaki diğer deri kanserleri tedaviye olumlu cevap verdiklerinden dolayı ölüm oranı oldukça düşüktür [1, 2].

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu sürekli ifade edilmesi olarak tanımlanabilir. Başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımlarına, evrelerine ve tedaviye yönelik verdikleri tepkilere göre çeşitlilik gösterir.

‘Kontrolsüz çoğalma’ olarak bilinen kanserin bazı türleri ölüme sebebiyet vermesiyle tedavisi için en çok araştırma yapılan ve çeşitli yöntemler denenilen bir hastalıktır [3]. Kanser hücrelerinin biyolojik özelliklerinin arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için sinyallere gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme yer almaktadır [4].

Özellikle tüm kanser hücrelerinde ortak olan metastaz ve hücre çoğalması gibi işlevler normal hücrelerde uygun bir şekilde zamanında ve yerinde ifade edilen genler tarafından düzenli şekilde kontrol edilmektedir. Fakat bu genler kanser hücrelerinde mutasyona uğrayarak uygun olmayan şekilde ifade edilirler.

Kanser tedavisinde ise özellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri uygulanarak hastalığın gelişim süreciyle mücadelesi söz konusudur. Cerrahi ve

radıyoterapi uygulamaları bölgesel tedavi yöntemidir. Tamamlayıcı ve sistemik olarak kemoterapi veya immünoterapi yöntemleri kullanılır.

1.1.1 Kanser Biyolojisi

Kanser normal hücre büyüme ve çoğalma kontrolünün kaybolmasına bağlı oluyor. Kontrolsüz oluşan ve kitle meydana getiren hücre topluluğu da belli bir süre sonra köken aldığı organın çalışmasını da bozuyor. Ayrıca kanser hücreleri komşu organlar ve dokulara da giderek yayılım gösteriyorlar. Kan ve lenf yolu vasıtasıyla kendilerinden uzak organlarda da lokalize olabiliyorlar.

Kanser aslında birden fazla mekanizmadaki bozukluğa bağlı olarak gelişebiliyor. Bunların başında protoonkogenler yer alıyor. Bir protoonkogen mutasyona uğradığında ya da hatalı ifade edildiğinde ve kanser gelişimine katkıda bulunduğunda onkogen adını alır. Protoonkogenlerin bu şekilde hasara uğraması sonucu oluşan onkogenler; hücrelerde normalde sentezi olmayan proteinlerin sentezlenmesine olanak sağlıyorlar. Bu proteinler de hücre büyümesini ve bölünmesini artırıyor. Normalde hücre bölünmesi ve büyümesini hücrelerde barınan 'büyüme faktörleri' sağlıyor. Büyüme faktörlerinin hücre zarındaki özel reseptörlerle reaksiyonu sonucu çekirdekte bulunan 'transkripsiyon faktörleri' aktif hale geçiyor. Onkogenler; protoonkogenler gibi hücre büyümesi ve bölünmesini etkileyen proteinleri kodlar. Fakat genin yapısındaki bozukluk nedeniyle kodladıkları proteinlerde anormal bir yapıya sahip oluyorlar. Anormal yapıdaki bu proteinler, hücrelerin büyüme ve bölünmesini kontrol edemiyor. Böylece kanser hücre oluşumu sürekli ifadeleniyor.

Kanser oluşum genlerinden diğeri ise tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genler, ürünleri hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptozis sürecini başlatan genlerdir. Tümör baskılayıcı genler genel olarak normal koşullarda hücrelerde kanser oluşumunu engelliyor ve hücre büyümesi ve çoğalmasını yavaşlatan proteinleri kodluyor. Fakat gende beliren mutasyon sonucu ya da eksikliği söz konusu olduğunda hücre kontrolü kayboluyor ve hücre kanser oluşturuyor. Kalıtsal kanser hastalıklarının çoğu tümör baskılayıcı genlerin mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca hücre döngüsü kontrolünde yer alan tümör baskılayıcı genlerden

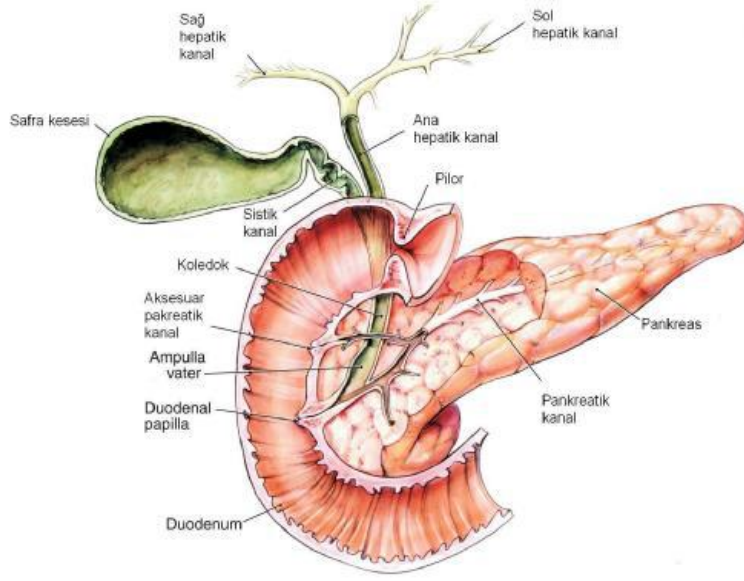
biri olan p53, DNA hasarlarını saptayarak G1 ve G2 fazlarında hücre döngüsünü durdurabilir ve böylece anormal genetik yapılı hücre kümelerinin (tümörlerin) oluşumunu engeller. P53 geni, DNA hasarını düzeltmediği koşullarda hücreyi programlanmış ölüme (apoptoza) yönlendirerek yok olmasını sağlar.

DNA'da meydana gelebilecek hasarların tamirinde etkili olan 'DNA onarım genleri' kanserle bağlantılı genler arasında yer almaktadır. Hücre bölünmesi sırasında DNA sarmalını oluşturan iki dizi, birbirinden ayrılıyor ve her bir DNA dizisi kendi eşini oluşturuyor. DNA kopyalanması sırasında meydana gelen sentez hatalarını 'DNA onarım genleri' düzenliyor. Ancak DNA onarım genlerinde oluşan mutasyonlar sonucu, hücre çoğalma kontrol mekanizmaları normal görevlerini yapamıyor ve kontrolsüz hücre çoğalması gerçekleşiyor.

1.2 Pankreas Yapısı

Pankreas, fetal hayatın dördüncü haftasında ön barsağın kaudal kısmından arka ve ön pankreas tomurcukları olarak çıkar. Her iki çıkıntı da sağa döner ve ventral pankreasın çıktığı noktanın yanında birbiriyle birleşir. Daha sonra duodenum döndükçe pankreas da sola kayar. Pankreas karın arka duvarında 1. ve 2. lomber vertebra hizasında yerleşimli kirli sarı renkte bir organdır. Erişkin insanda pankreas bezi 80-90 gr ortalama 15-20cm uzunluğunda, 3cm eninde ve 1-1.5cm kalınlığındadır. Pankreas baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 kısma ayrılır [5].

Pankreas 60-160 gr ağırlığında, sindirim enzimleri ve hormonlar üreten bir iç (endokrin) ve dış (ekzokrin) salgı organıdır. Enzimler ekzokrin kısmın hücreleri tarafından depolanır ve salınır. Yaşamın devam etmesi için gerekli olan endokrin salgılar ise Langerhans adacıkları olarak bilinen endokrin dokuda bulunan hücre grupları tarafından sentezlenir. Langerhans adacıkları beta, alfa ve delta hücrelerinden oluşur. Beta hücreleri; adacıkların % 60-80'ini oluşturur ve insülin salgırlar. Alfa hücreleri; adacıkların %10-20'sini oluşturur ve glukagon salgırlar. Delta hücreleri; adacıkların yaklaşık %10'unu oluşturur ve somatostatin salgırlar [6].



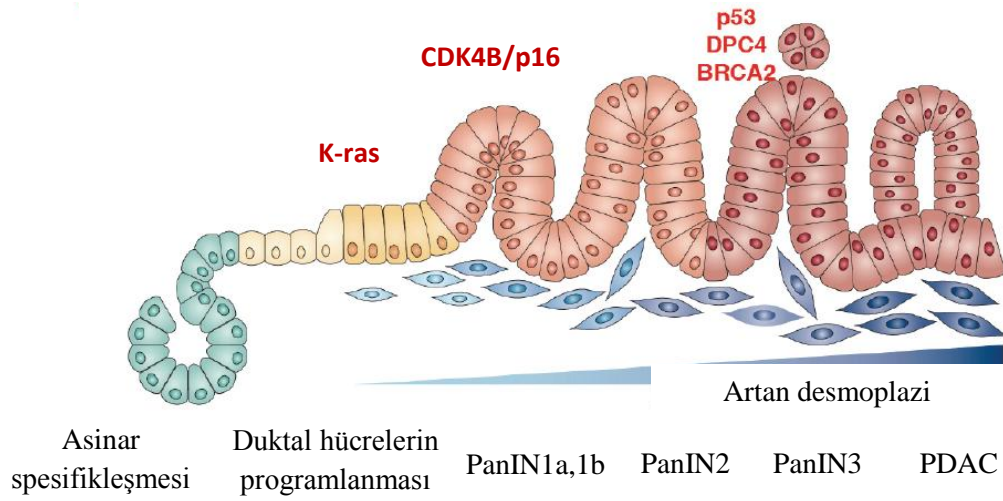
Şekil 1.1: Pankreasın yapısı [72].

1.2.1 Pankreas Kanseri

Pankreas malignansilerinin yaklaşık %95'ini pankreatik duktal adenokarsinoma oluşturmaktadır ve ekzokrin pankreastan köken alır. Histolojik olarak adenokarsinom olarak tanımlanır. Adenokarsinom karakteristik olarak agresif bir lezyondur. Tanı konduğunda hastaların %10'undan daha azında tümör pankreasta sınırlıdır. %40 olguda lokal yayılım, %50'nin üzerinde uzak yayılım vardır. Tanıdan sonra %20'den daha az olgu 1 yıl yaşarken 5 yıllık yaşam ise sadece %3 oranındadır. Pankreatik kanserlerin en yaygın karakteristiği lenf nodlarına çok hızlı metastaz yapmalarıdır. Pankreatik kanserlerin % 65'i pankreasın baş kısmında bulunur. Bu tümörler daha erken zamanda sarılık ve pankreatit ile kendini belli ederler. Pankreasın gövde kısmında olan tümörler %15'ini oluşturur. %10 kuyruk kısmında ya da birden fazla odaklı olan %2'lik bir tümör grubunu oluşturur. Pankreasın vücut kısmında ve kuyruk kısmında çıkan tümörler çok geç evrede çıkıp daha kötü bir gidiş gösterirler. Pankreatik kanserler (PK) ölümcül 4. kanser olarak bilinmekte olup, %95 oranında ölümlle sonuçlanmaktadır. Pankreas kanserinde oluşan mikro çevre, pankreas kanser hücrelerinin çok başarılı şekilde gelişmelerini ve metastaz yapmalarını kolaylaştırmaktadır [7,70]. Teorik olarak zayıf diferansiye olmuş duktal hücrelerden, de-diferansiye olan asinar ya da adacık (islet) hücrelerinden, progenitor hücrelerden ya da kök hücrelerden köken alabilir. Son yıllarda PanIN (Pancreatic

intraepithelial Neoplasia)’lerin pre-kanser lezyonlar oluşturduğu ve bunların da pankreatik adenokarsinomlara sebep olduğu şeklinde bir görüş hâkimdir.

Erken aşama lezyonlar PanIN-1A ve PanIN-1B olarak isimlendirilir ve bu aşamada hücrelerde K-ras mutasyonu vardır. Orta aşama lezyonlar PanIN-2A ve PanIN-2B olarak isimlendirilir ve K-ras mutasyonuna ek olarak siklin bağımlı kinaz 2A (CDK2A ya da p16) kaybı görülmektedir. Pankreatik karsinomlar ise PanIN-3 olarak isimlendirilir ve atipik nükleus, hücrelerin pankreas kanalına tomurcuklanması şeklinde bir görünüm, hücresel proliferasyonun artması ve nadiren de p53 mutasyonlarının varlığı ile karakterize edilmektedir [8,9].



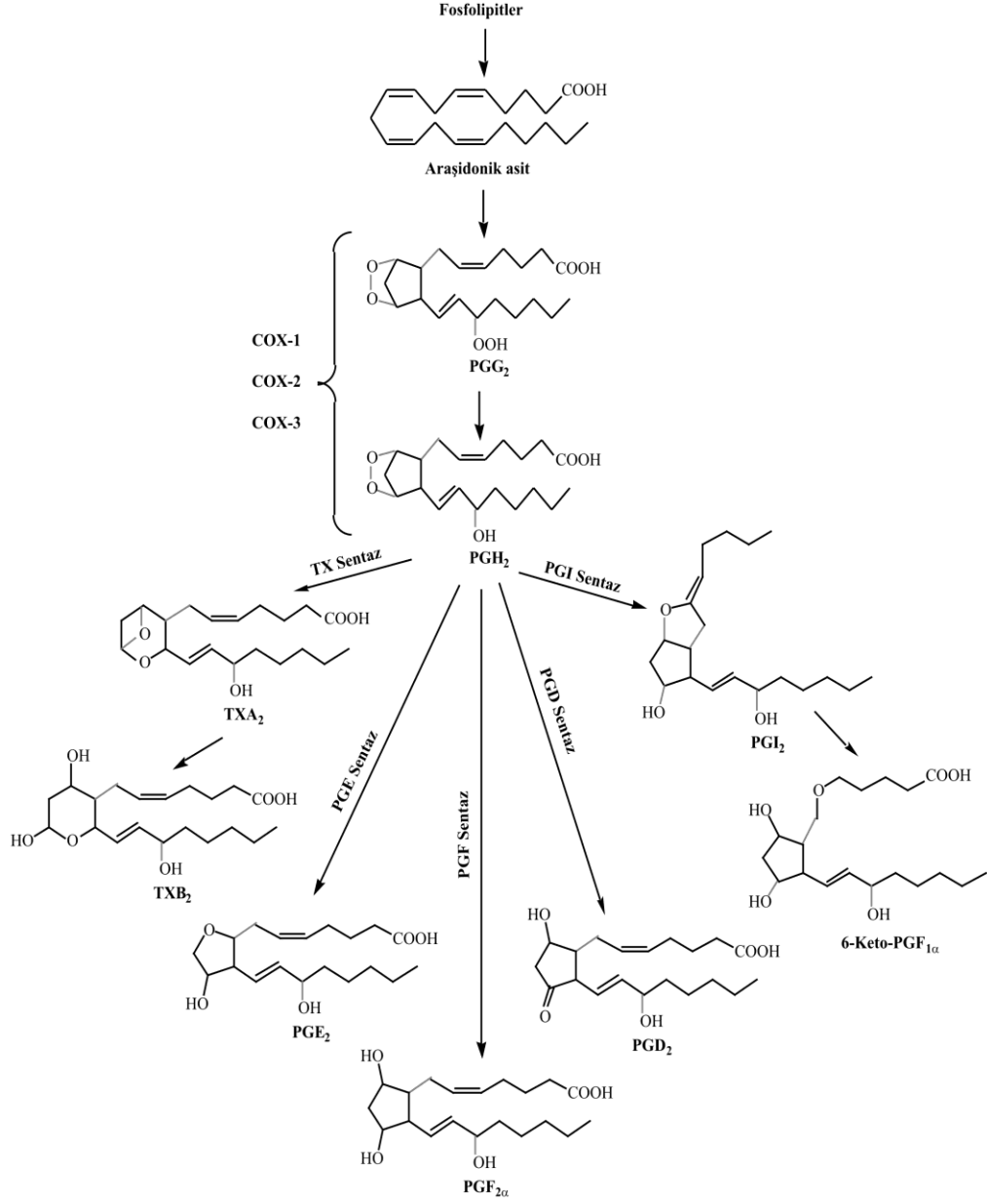
Şekil 1.2: Pankreas kanseri evreleri [8].

1.3 Siklooksigenazlar

1.3.1 Prostaglandinlerin Sentezi

Hücreler farklı uyarılar sonucu ya da hasar görmeleri sebebiyle hücre membranında bulunan lipitleri fosfolipaz A2 ile hidroliz ederek araşidonik asit salınımını gerçekleştirir. Prostaglandinlerin sentezinde prekürsör olan araşidonik asit, 20 karbonlu doymamış bir yağ asitidir. Prostaglandin sentezinde hız sınırlayıcı olarak bilinen COX reaksiyonu ise, moleküler oksijenin araşidonik asite katılması sonucu kararsız ürün olan PGG2 (prostaglandin G2)'yi oluşturmasıdır. PGG2 siklooksigenazın peroksidaz aktivitesi sonucu hızlıca PGH2 (prostaglandin H2)'ye

dönüşür. PGH₂'den derive olan tromboksanlar, lökotrienler, prostosiklinler ve lipoksinler önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bunlara eikosonoidler de denir.



Şekil 1.3: Prostaglandinlerin sentezi [73].

1.3.2 COX-1 ve COX-2 Yapılarının Genel Özellikleri

COX-1 enzimi izoenzimi olan COX-2 ile bazı farklılıklar gösterir. Özellikle COX-1 hemoastatik fonksiyonlarda rol alırken, COX-2 ise patolojik ve doku inflamatuvarlarının işleyişinde rol alan, hızlı indüklenebilen bir yapıya sahiptir. COX-2 hormonlar, büyüme faktörleri, cAMP, inflamatuvar faktörler ve sitokinler tarafından kolaylıkla uyarılabilir. COX-1 hemen hemen her dokuda ekspre olurken, COX-2 çok az ya da saptanamayan düzeydedir.

COX-1 ve COX-2 enzimleri birbirine yapı olarak oldukça benzeyen uzun ince bir kanala sahiptir. Fakat aminoasit dizilerindeki farklılık, COX-2'de ki merkezi kanalın etrafında geniş hacimli 'yan cep' olarak adlandırılan aktif yapı oluşumuna sebep olur. Bu kısım COX-2 için selektif inhibitörlerin bağlanmasını sağlar.

COX-1 72 kDa molekül büyüklüğüne sahipken, COX-2 72 ve 74 kDa büyüklüğündedir.

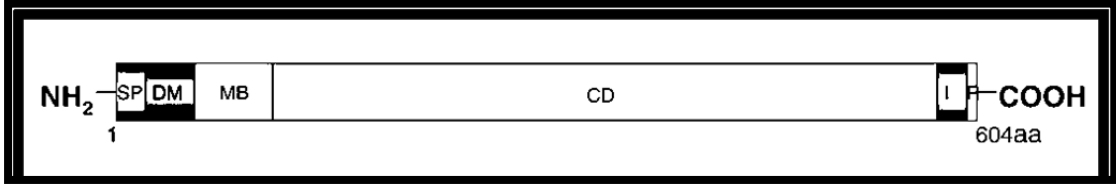
Siklooksigenazların 3. izoformu olan COX-3 hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamasıyla birlikte COX-1 ve COX-2'den farklı olarak inflamasyonda rolünün olmadığı asetoaminofen etkileriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir [10, 11].

Tablo 1.1: COX-1 ve COX-2 arasındaki farklılıklar.

	COX-1	COX-2
Lokus	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
Gen büyüklüğü	22kb	8.3kb
Exon	11	10
mRNA büyüklüğü	2.8kb	4.6kb
Aminoasit sekansı	576 aa	604 aa
Molekül büyüklüğü	72kDa	72kDa-74kDa
Expresyonu	sürekli	indüklenebilir

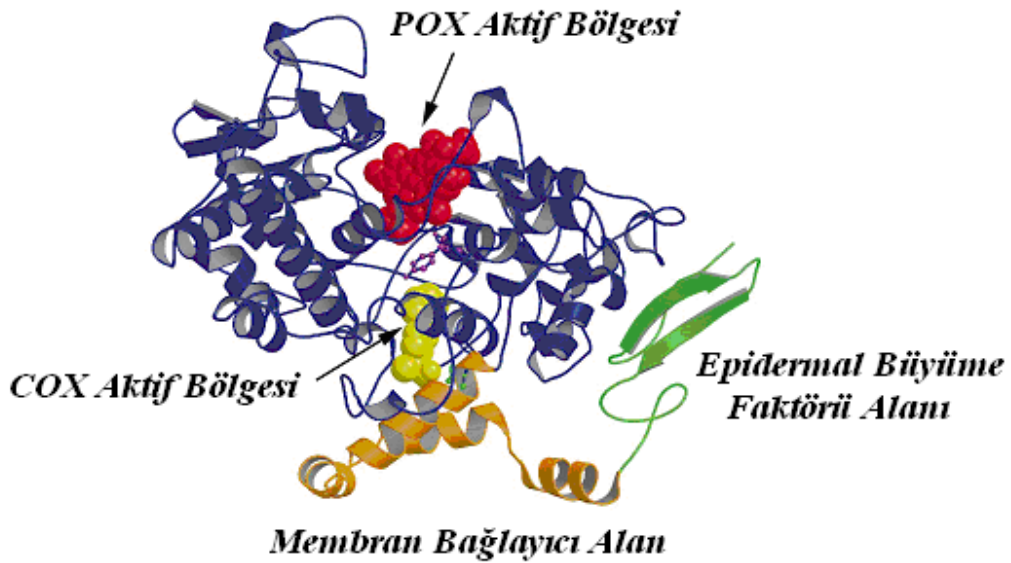
1.4 COX-2 Proteini ve Yapısı

COX-2 geni; 604 aminoasitin bulunduğu bir homodimerik proteini kodlar ayrıca COX-2, COX-1 ile yapısal ve enzimatik aktiviteleriyle benzerlik gösterir [12]. X-ray kristallografi analizleri sonucunda COX-2 monomerlerinin N- terminal ve C-terminalleri içerisinde çoklu fonksiyonel domainlerinin yapısı bulunmaktadır. Bu domainler COX-2'nin hücrel lokalizasyonunu, membrana bağlanmasını ve katalitik aktivitelerini düzenlemektedir [12].



Şekil 1.4: COX-2 proteini [13] .

Özellikle COX-2'nin sinyal peptit domaini COX-1'den 17 aminoasit daha kısadır. Dimerizasyon domain EGF içerir ve COX-2 homodimerlerinin şekillenmesinde önemli role sahiptir. Membran bağlama proteini, 4 kısa amfipatik alfa heliks yapısından oluşur. Globular katalitik domain ise hem prostetik grubunun ayrıldığı COX aktif bölgesi ve hem de peroksidaz aktif bölgesini barındırır [13] (Şekil1.4) .



Şekil 1.5: Siklooksigenazların yapısı [74].

Siklooksigenaz bölgesi uzun, dar ve hidrofobik kanala sahip olup globüler katalitik domaini içerisinde uzamaktadır. Hidrofobik kanalın giriş kısmı membran bağlama domainin 4 amfipatik heliks yapısıyla tamamen çevrilmiştir. COX-2'nin katalitik bölgesi COX-1'inkinden %17 daha geniştir. Çünkü burada COX-1'in 523. pozisyonundaki izölösinin yerini COX-2'nin 509. pozisyonunda valin almıştır [13]. COX-2'nin daha geniş katalitik alana sahip olması selektif inhibitör bağlanmasını kolaylaştırmaktadır [14].

Katalitik domain çok fonksiyonlu aminoasitler içermekle birlikte katalizden sorumlu olan Tyr-371 rezidüsünü korumaktadır. Peroksidaz aktif bölgesi, ER lümeninin yarık oluşturmasıyla şekillenir [12].

C-terminalin bitiminde COX-2, 27 aminoasitlik kararsız motif içerir. Bu motif COX-2 degradasyonun düzenlenmesini sağlarken, ER (endoplazmik retikulum) muhafaza sinyalinin oluşturduğu 4 aminoasit sekansı içerir [15]. COX-1'e benzer şekilde COX-2 aspargin rezidüleriyle N-glikolizasyona maruz kalır [16]. Burada en az 4 potansiyel N-glikolizasyon bölgesi (asp 53, 130, 396, 580) COX-2'nin katalitik bölgesine dağılır [13]. ASP 53, 130, 396'daki N-glikolizasyon COX-2'nin 72 kDa aktif konformasyonu içerisinde katlanmasını düzenler [16]. ASP 580'deki N glikolizasyon ise 74kDa COX-2 proteinin oluşumunu sağlamasına rağmen 580'deki N-glikolizasyonun önemi halen iyi bilinmiyor [16]. Bununla birlikte COX-2 enziminin katalitik aktivitesini değiştiren asıl ASP580'deki N-glikolizasyonudur [17]. N-glikolizasyonuna ek olarak COX-2 nitrik oksit ve nitrik oksit sentaz tarafından S-nitrilizasyonuna maruz kalmaktadır [13]. İndüklenebilir nitrit oksit sentaz ile sistein 256'daki S-nitrilizasyonla aralarında fiziksel bağlantı saptanmıştır. Önemli olan ise bu modifikasyonun COX-2 katalitik aktivitesini artırıyor olmasıdır [18].

1.4.1 Substratları

Araşidonik asit (AA), 20 karbonlu polidoymamış bir yağ asitidir. Yapısında 4 cis çift bağlı 5, 8, 11, 14 pozisyonu içerir ve COX-2 enziminin esas substratıdır [19].

Serbest AA , selüler fosfolipazların aktivasyonu ile membran fosfolipidlerinin sn-2 pozisyonundan salınır [19]. İlk salınımında COX-2'nin katalitik halkasındaki ser-

516 bölgesine AA bağlanır [12]. Sonraki siklooksigenaz reaksiyonunda Tyr-371 rezidüsünde korunan siklooksigenazın hem bağlı oksidasyonu başlar ve 2 mol oksijenin eklenmesiyle 1 mol AA, siklopentan hidroperoksi endoperoksit, PGG2 oluşur. Oluşan PGG2, COX-2'nin peroksidaz bölgesiyle birleşerek kararsız ürün PGH2'yi oluşturur [12-19]. Buradan PGH2 sitozol içindeki ER'ye difüze olur. Dokuya özgü selektif PG sentaz substrat gibi hizmet vererek PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2 (prostosiklin) ve TXA2 (tromboksanlar) oluşumunu gerçekleştirir [19]. Ayrıca PGH2 mutajenik bir metabolit olan malondialdehite transforme olabilir [20].

Diğer polidoymamış yağ asiti türevleri COX-2 substraları gibi cis çift bağlarıyla 8,11,14 pozisyonuna bağlanır [13]. Endokannabinoidler, 2 araşidonil gliserol ve anandiaminde (araşidonil etanolamid) içerir. Bunlar COX-1'e bağlanmazlar, COX-2 için selektiftirler. Bunun sebebi COX-2'nin aktif bölgesinin geniş ceplere sahip olmasıdır [21]. Endokannabinoidler COX-2 tarafından oksitlenir ve PGH2'ye analog olan hidroksil endoperoksitler oluşturur. PGH2 analogları TXA2 sentaz haricinde tüm prostoglandin sentazlar için uygun substratlardır. Endokannabinoidlerin COX-2 bağlı oksidasyonu, prostoglandin türevlerini oluşturur [21].

Ek olarak COX-2 selektif substratı olan 5S-HETE, 5-lipoksigenaz tarafından AA'in okside olmasıyla üretilir ve lökotrienlerin oluşumu için gereklidir [22].

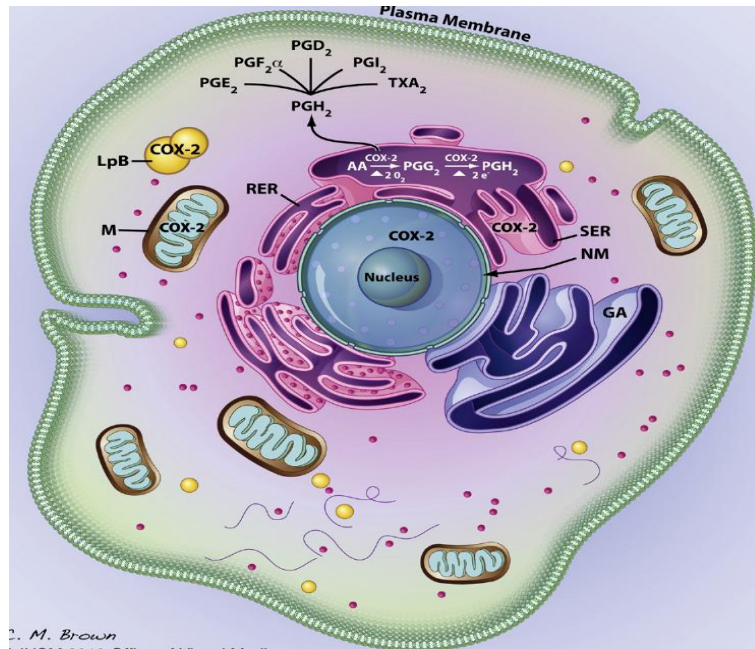
Ayrıca lipit yapısında olmayan ksenobiyotikler, COX-2 tarafından katalizlenir. Bu bileşikler COX-2'nin peroksidaz aktivitesini yüksek reaktif moleküllere dönüştürür [23]. Böylece reaktif bileşikler onkogen aktivasyonunu ya da tümör baskılayıcıların inhibisyonunu gerçekleştirir [23]. Ksenobiyotiklerin COX-2 bağlı metabolik transformasyonu kolon kanseri ve mesane kanseri gibi belli neoplastik bozuklukların ortaya çıkmasında rol oynar [13].

Tablo 1.2: COX-2 substratları.

Lipidler	Lipid yapısında olmayan
Araşidonik Asit	Ksenobiyotikler [19, 23]
2-Araşidonoil gliserol	[21]
Araşidonil etanolamid	[21]
5S-HETE	[24]

1.4.1 Hücre İçi Lokalizasyonu

COX-2 esas olarak ER lümeninde ve çekirdek zarında yer alır [25]. COX-2'nin nükleus lokalizasyonu düzenleyici roldeki mitojenlerle oluşmaktadır [13]. Tümör hücrelerindeki COX-2 lokalizasyonu mitokondri ve lipid cisimciklerinde meydana gelmektedir [26, 27]. Mitokondrideki COX-2'nin hücre içi lokalizasyonu oksidatif strese ve uyarılmış apoptoza karşı korumada etkili iken lipid cisimciklerindeki COX-2, tümör büyümelerini önemli derecede etkiler [26].



Şekil 1.6: Siklooksigenazların hücre içi lokalizasyonu [13].

1.5 COX-2 Enziminin Anjiyogenezdeki Rolü

Solid tümörlerde anjiyogenezin başlaması için tümör çapının 2-3 mm olması gerekir. Anjiyogenezle doğrudan ilişkili olan metastaz vasıtasıyla, tümör kan damarlarının destabilizasyonu, vasküler endotel hücre proliferasyonu, endotelial hücre invazyonu ve migrasyonu ile sonuçlanır [28].

Tümör hücrelerinde COX-2 aşırı ekspresyonu doğrudan bu hücrelerden anjiyogenik faktörlerin yapımını stimüle eder [29]. Çeşitli çalışmalarda COX-2'nin VEGF, PDGF, bFGF ve TGF-beta gibi anjiyogenez faktörleriyle ilişkili olduğu, değişik tip kanser hücrelerinde tespit edilmiştir [30].

COX-2 tümör anjiyogenezindeki en önemli etmen VEGF'yi doğrudan arttırmasıdır. VEGF endotel mitozunu arttırarak damar ağı oluşumunu sağlar ve vasküler permeabiliteyi arttırır. Artan damarlanma sonucu tümör büyümesi hızlanır. Yapılan bazı çalışmalarda COX-2'deki artışın tümör etrafındaki damarlanmaların yoğunluğundan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda COX-2'nin VEGF, PDGF, bFGF ve TGF-beta gibi angiogenez faktörleriyle ilişkili olduğu, değişik kanser hücre tiplerinde belirlenmiştir [30].

1.6 COX-2'nin Karsinogeneze Katkısı

COX-2 özellikle tümör hücrelerinde anjiyogenezi arttıran ve apoptozu azaltan bir mekanizmaya sahiptir. Bunların yanında kronik inflamasyon ve immünoşüpresyon, tümör hücrelerinde apoptozun azalması ve proliferasyonun artması, invazyon ve metastaz yeteneğinin artması ve mutajenez olayları COX-2'nin önemli mekanizmalarıdır.

1.7 Kanser Tedavisinde Kullanılan Kemoterapi Ajanları

Kanser tedavisinde yararlanılan ilaçlar daha farklı mekanizmalarla da etki göstermektedirler. Bu ilaçların başlıcaları şöyle sıralanabilir [31, 32].

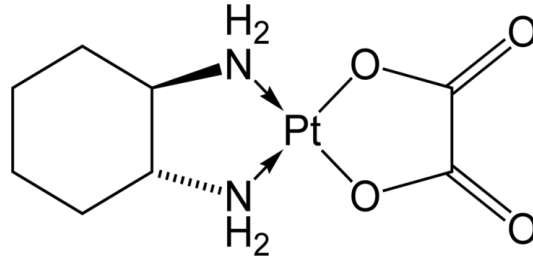
- Pürin ve pirimidin nükleotid prekürsörlerinin sentezini engelleyerek ya da DNA ve RNA sentezinde bunların yerlerini alarak etki gösteren ilaçlar
- DNA fonksiyonlarını bozarak etki gösteren ilaçlar
- Hücre yapısındaki nükleofilik gruplara kovalent bağlarla bağlanarak etki gösteren ilaçlar
- Mikrotübüllerin polimerize ve depolimerize şekilleri arasındaki dengeyi bozarak etki gösteren ilaçlar
- Hormon uyarısı ile sitoplazmik reseptörlere bağlanıp gelişme ve büyüme hızını yavaşlatarak etki gösteren ilaçlar

Genel olarak bütün bu ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak pratikte ilaçlar kanser hücrelerine seçici etki göstermemekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri ise etkilemektedir [31].

1.7.1 Okzaliplatin

Cisplatinle moleküler yapı olarak karşılaştırıldığında amin gruplarının yerine siklohegzildiamin yapısı yer almıştır. Bu yapı okzaliplatinin antitümör etkisini artırmaktadır. Klor grupları ise okzalik asit benzeri bir yapı ile değiştirilmiştir, bu da bileşiğin suda çözünmesini kolaylaştırmaktadır.

Okzaliplatin; DNA molekülü içinde ve DNA molekülleri arasında çapraz bağlar oluşturarak DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu inhibe eden, sonuçta hücre siklusuna spesifik olmayan hücre ölümüne neden olan bir ajandır [33].



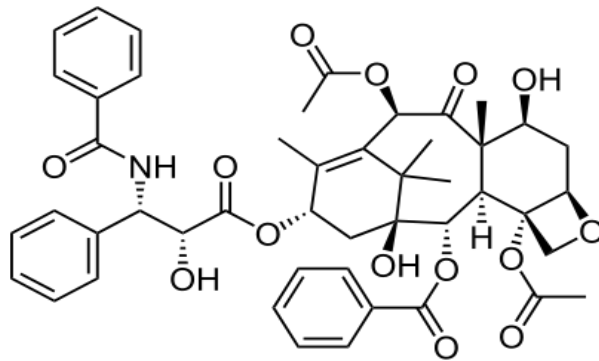
Şekil 1.7: Okzaliplatin yapısı.

1.7.2 Paklitaksel ve Doksetaksel

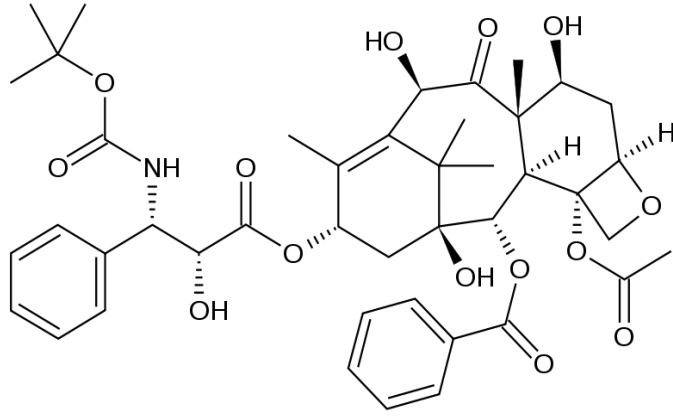
Paklitaksel (PAK), porsuk ağacı Latincesi *Taxus brevifolia* kabuğundan elde edilen kansere karşı oldukça etkili olan bir moleküldür. 1992 yılında ilaç olarak kullanımı onaylandıktan sonra, 1996 yılında sentetik olarak elde edilmeye başlanmıştır. 1971’de yapısı açıklanmış ve 1981’de başlatılan ilk klinik deneylerde göğüs, akciğer, over, gırtlak kanserlerine karşı etkin olduğu saptanmıştır. Günümüzde paklitaksel ilacının sentezi için sentetik yollar uzun ve masraflı olduğundan Avrupa porsuk ağacının (*Taxus baccata*) yapraklarında bulunan 10-deacetylbaaccatin III maddesinin birkaç işlemde geçirilmesiyle elde edilmektedir. Paklitaksel uygulaması, Bcl-2 fosforilasyonunu artırır, Bcl XL proteininin ifadesinin azalmasını düzenler, p53 ve antianjiogenik faktörlerini başlatır ve böylece apoptozla sonuçlanır.

Son verilere göre, özellikle etkili bir antikanser ajan olan paklitakselin tek hedefi tubulin yapısı değildir. Aynı zamanda, apoptoz işlemini bloke eden bcl-2 proteine de bağlanmaktadır. Bu nedenle paklitaksel, bölünen hücrelerin ortadan kaldırılması üzerine çift yönlü bir rol üstlenmektedir.

Taksol grubu bileşiklerinden olan paklitaksel ve dosetaksel, intraselüler mikrotübüllerin oluşumunu engelleyerek M-fazında hücre ölümüne sebep olan ajanlardandır.



Şekil 1.8: Paklitaksel yapısı.



Şekil 1.9: Dose-taxel yapısı.

Dose-taxel'in (ortalama 13.4 tubulin subünitesi) oluşturduğu mikrotübül, paklitakselin meydana getirdiğinden (ortalama 12 tubulin subüniti) daha büyüktür.

Dose-taxel hücre içine daha hızlı alınmakla birlikte hücre içinde daha uzun süre kalır. Paklitakसेle göre antitümör aktivitede daha fazla kuvvetli olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda uzun süre paklitakसेle maruz kalmanın antitümör aktivitede artışa neden olduğu belirlenmiştir [34,35].

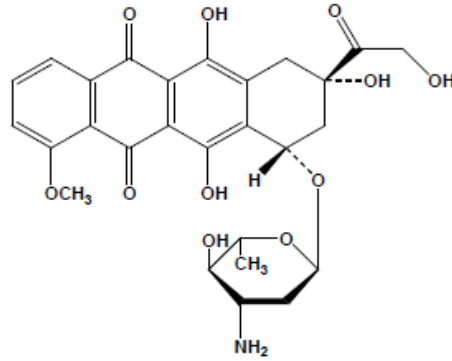
Taksanlarla ilgili sorunlardan birisi sudaki çözünürlüğünün az olmasıdır. Her iki bileşikte suda çözünmediğinden paklitaksel %50 alkol ve %50 cremophor EL (polioksietilli hint yağı) içinde, dose-taxel ise Tween 80 içinde kullanıma uygun hale getirilmiştir [36].

1.7.3 Epirubisin

Epirubisin (4-epiadriamisin) *Streptomyces peacetius*'tan elde edilen antrasiklin türevi bir antibiyotik olan doksorubisinin (adriamisin) 4-hidroksi epimeridir. Etkilerini sadece hücre membranında değil, hücre içinde de göstererek hücre büyümesini inhibe eder ve hücre ölümüne yol açar. Ayrıca nükleotid ve proteinler arasındaki bağlantıyı kırdığı gibi, DNA sarmalının bağlarının açılmasına da neden olur. Kanser hücreleri, muhtelif ajanlar tarafından hücre ölümüne neden olabilecek, intrasellüler enzimlerin inhibisyonuna rağmen büyümeye devam ederler. Antrasiklinler bu direnci topoizomerazları inhibe ederek kırarlar [37]. Antrasiklinlerin etkisi; hücre membranında deformasyon, DNA interkalasyonu, DNA-protein ilişkisinin kırılması ve topoizomeraz inhibisyonu mekanizmaları ile

olmaktadır. Mide kanserinde 5-FU ve sisplatin ile 5-FU ve sisplatin kombinasyonuna epirubisin eklenmesiyle sitotoksik etkisi artmasına rağmen yan etkileri de fazlalaşmıştır.

Epirubisin daha çok meme, mide, akciğer, lenfoma, ovaryum ve mesane kanserlerinde kullanılmaktadır. Epirubisinin endometrium kanserinde ve korneal neovaskularizasyonunun inhibisyonunda etkisi görülmüştür.



Şekil 1. 10: Epirubisin yapısı.

1.7.4 İrinotekan

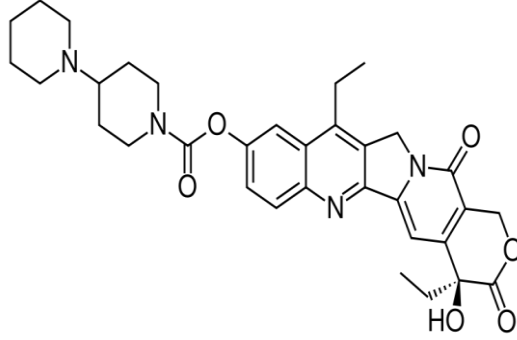
Topoizomeraz I inhibitörleri arasında öncelikle kamptotesinler gelmektedir. İrinotekan 1966 yılında Çin’de yetişen *Camptothecia acuminata* adlı ağaçtan elde edilmiştir. İrinotekan, suda çözünebilen, semisentetik türevi olan bir topoizomeraz I inhibitörüdür. Topoizomeraz I tüm hücre tiplerinde, hücre siklusunun tüm evrelerinde ortaya çıkan bir enzimdir. Hücre replikasyonu sırasında topoizomeraz I; çift sarmal DNA’ya sıkıca tutunur ve bir zincirin ayrılmasına izin verir. İrinotekan ise topoizomeraz I’in güçlü bir inhibitörüdür. Topoizomeraz I ile bağlanır ve onarım esnasında zincirin ve topoizomeraz I’in ayrılmasını engeller. Replikasyon süresince gerekli kırılmayı önler ve hücre bölünemez.

İrinotekan S fazına spesifik bir ajandır. Malign hücreler normal hücrelerden daha fazla topoizomeraz I düzeyine sahiptir. Bu nedenle malign hücreler topoizomeraz I inhibisyonuna daha hassastır [38].

İrinotekan bir proilaçtır, karboksilesteraz irinotekanı SN-38’e dönüştürür, bu aktif metabolit ökaryotik DNA topoizomeraz I enzimini inhibe ederek etki gösterir

[39, 40]. SN-38 ise en potent kamptotekan ürünüdür ve irinotekandan 250-1000 kat daha güçlüdür, ancak irinotekanın plazma konsantrasyonu daha yüksektir.

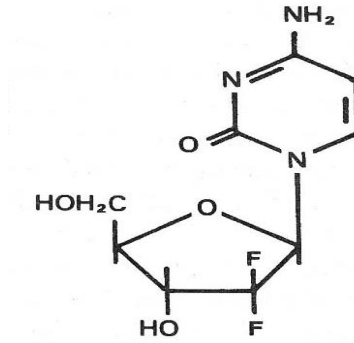
Aktif metabolit SN38, UGT1A1 enzimi ile degrades olur. Bu enzimin varyantını taşıyan kişilerde SN38 yıkımı daha yavaş olur ve toksik etkiler daha güçlü gözükür.



Şekil 1. 11: İrinotekan yapısı.

1.7.5 Gemsitabin

299,66 kDa ağırlığında bir pirimidin analogu olan gemsitabin; apoptozu tetikleyerek ve hücre büyümesini önleyerek antitümör etkisi olan bir ajandır. Sistemik kullanımlarda kemoterapi cevap aralığı %27-38 arasındadır [71].



Şekil 1. 12: Gemsitabin yapısı.

1.7.6 Bevasizumab

Rekombinant monoklonal antikor olan bevasizumab, VEGF'ye bağlanarak reseptörle etkileşime girmesini engeller ve reseptör aktivasyonunu engellemiş olur

[41]. 214 aminoasitten oluşur, molekül ağırlığı 149 kDa'dur. VEGF, anjiyogenezi uyarıp tümör yayılmasını ve büyümesini indüklemektedir. Anjiyogenezin uyarılması sonucu tümör damarlanması artar ve VEGF hücre membranındaki reseptörlere bağlanarak reseptörün aktivasyonunu sağlar. Bevasizumab'ın VEGF yolağını inhibe ettiği pek çok *in vivo* ve *in vitro* modellerde gösterilmiştir [42]. İlacın direkt etkileri damar endotel hücrelerinde ve mevcut tümörlerdeki damarların regresyonunda, tümörün damarsal yapısının normalizasyonunda ve yeni damar oluşumunun engellenmesinde etkilidir [43]. Yapılan çalışmaların çoğunda bevasizumab, diğer kemoterapik ajanlarla kombine halinde klinik aktivitesini ortaya koymuştur.

1.8 Çalışmanın Amacı

Ölümcül bir kanser türü olarak bilinen pankreas kanserini durdurmak veya tedavi etmek amaçlı kullanılan kemoterapi ajanlarının, insan pankreas hücre hattı olan Panc-1 üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla deneysel çalışmalarımızda dosetaksel, paklitaksel, irinotekan, epirubisin, bevasizumab, okzaliptatin ve gemitabin etken maddeli kemoterapi ajanlarının Panc-1 hücre hattına, farklı dozlarda ve 24-48-72 saat dilimlerinde uygulanması sonucu söz konusu ajanların hücre canlılığı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak belirlenmesidir.

Araştırmamızın diğer bir boyutu olarak kemoterapi ajanlarının koyun pankreası tarafından üretilen COX enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel aşamalarda kullanılan kimyasallar bütünüyle çalışma için gerekli saflığı sağlamaktadır. Enzim aktivite ölçümünde kullanılan COX Activity Assay Kit, Cayman Chemical Company tarafından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.

Kimyasallar	Üreticiler
Tris Base	Sigma
EDTA (Etilendiamintetra asetikasit)	Sigma
DMSO (Dimetilsülfoksit)	Merck
Tripsin	Sigma
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco
NaCl ₂	Sigma
KCl	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Sigma
KH ₂ PO ₄	Sigma
KOH	Sigma
DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium)	Gibco

Tablo 2.1 : (devamı).

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide)	Sigma
İzopropanol	Sigma
Trypan blue	Sigma
Kristal viyole	Sigma

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Otoklav	Hırayama, Japonya
Ph metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen,Almanya
Buzdolabı	Arçelik,Türkiye
-80 ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
UV visible spektrofotometre	Thermo Scientific™ Multiskan GO
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo, ABD
İnverted mikroskop	Nikon, Japonya
Buz makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya

2.1.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Soy Hattı

İnsan pankreas kanser hücre hatlarından birisi olan Panc-1, Ege Üniversitesi'nden temin edildi.

2.1.3 Enzim Aktivite Ölçümünde Gerekli Kimyasallar

COX Activity Assay Kit içeriğinde 10X Assay buffer, Hem, COX Standart enzimi, araşidonik asit , KOH , kolorimetrik substrat bulunmaktadır.

2.2 Metotlar

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar 121°C'de 20 dakikada (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu gerçekleştirildi. Çalışma öncesi en az yarım saat boyunca laminar flow açılarak çalışma ortamı sterilizasyonu sağlandı.

2.2.2 Hücre Kültürü Deneyleri

2.2.2.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumu olan DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FCS ilave edildi. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.2.2 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) -20°C’de saklandı ve taşıma işlemi soğuk zincirde gerçekleştirildi. Kullanımı gerçekleştirilmeden önce 56°C’de 30 dakika boyunca ısı ile inaktive edildi. İnaktivasyon sonrası FCS filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi ve kullanım sonrası tekrar -20°C’de saklandı.

2.2.2.3 (10X) PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14,4 gr Na₂HPO₄, 2,4 gr KH₂PO₄ tartılarak 800 ml saf su içerisinde çözüldü ve pH:7.4’e ayarlandı, son hacim 1000 ml’ye tamamlandı. Kullanım için 1X’e dilüe edildi. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edildi. 2-8°C’de saklandı.

2.2.2.4 Tripsin-EDTA Hazırlanması

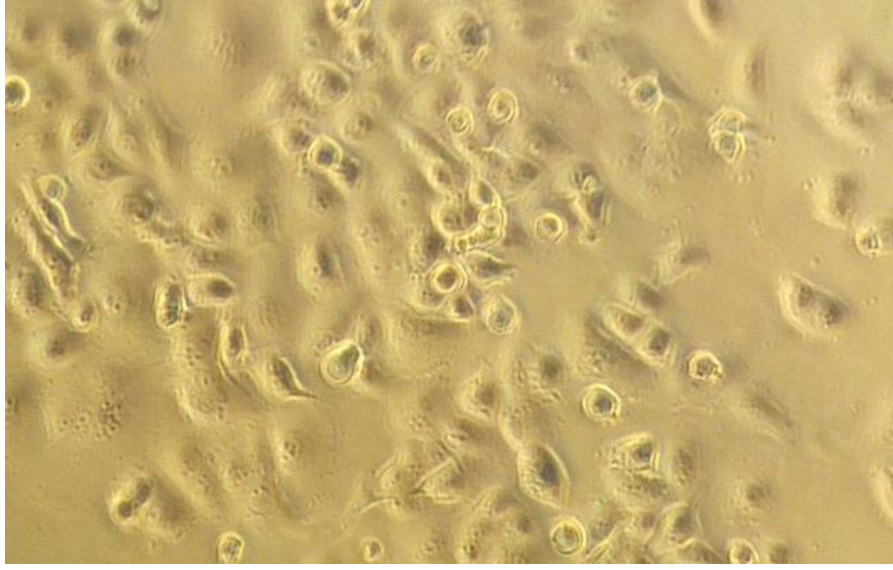
0,25 gr Tripsin, 0,2 gr EDTA tartılarak 100 ml PBS tamponunun içerisinde çözüldü ve 4°C de saklandı.

2.2.2.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

0,25 gr MTT tartılarak 50 ml PBS tamponu içerisinde çözüldü ve 0,22 µm steril filtreden geçirildi ve 4°C’de saklandı.

2.2.2.6 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyusu Hattı

Çalışmada insan pankreas kanser hücre hattı Panc-1 kullanıldı.



Şekil 2.1: Panc-1 hücrelerinin faz-kontrat mikroskobu ile görüntülenmesi.

2.2.2.7 Hücre Soyunun Başlatılması

-80°C’de saklanan Panc-1 hücre hattı, 37°C sıcaklığına getirilen sıcak su banyosuna alındı ve hücrelerin çözünmeleri sağlandı. Çözünen hücreler %10’luk FCS içeren medyum içerisine alındı ve 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklara etiketleme yapıldıktan sonra 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

2.2.2.8 Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler 15 ml medyumda 75 cm² flasklarda %10’luk FCS ihtiva eden DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

2.2.2.9 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları alanı % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS tamponuyla yıkandı ve 75cm²’lik flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden

ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

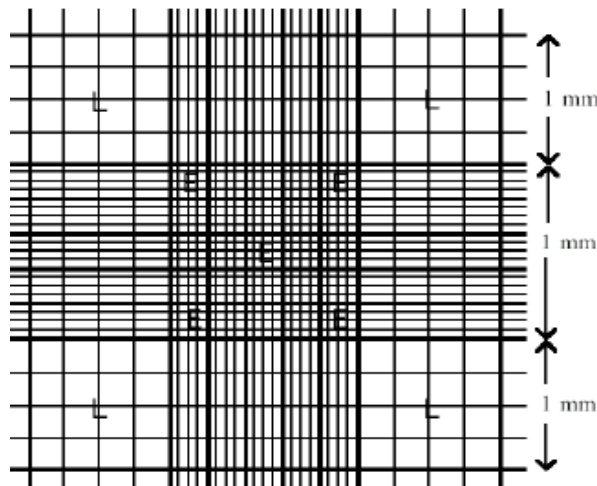
2.2.2.10 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Flasklarda yetiştirilen hücrelerin üzerindeki medyum boşaltıldı. 2 kez soğuk PBS tamponuyla yıkandı. 75 cm²'lik flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA eklendi. Hücreler yüzeyden ayrılınca üzerine medyum eklenerek falkona alındı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan pellet 100 µl DMSO ve 900 µl FCS ile çözüldü. Hücreler 1 ml'lik kriyoviallere alınarak etiketlemesi yapıldı ve -80°C' de saklandı.

2.2.2.11 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0,1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanıldı (Şekil.2.2). Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmadı ve sayımı yapıldı.

Toplam canlı hücre sayısı/mL= hemositometre sayım sonucu x 2 x 10⁴ formülüyle süspansiyonunun mililitresindeki toplam hücre sayısı bulundu.



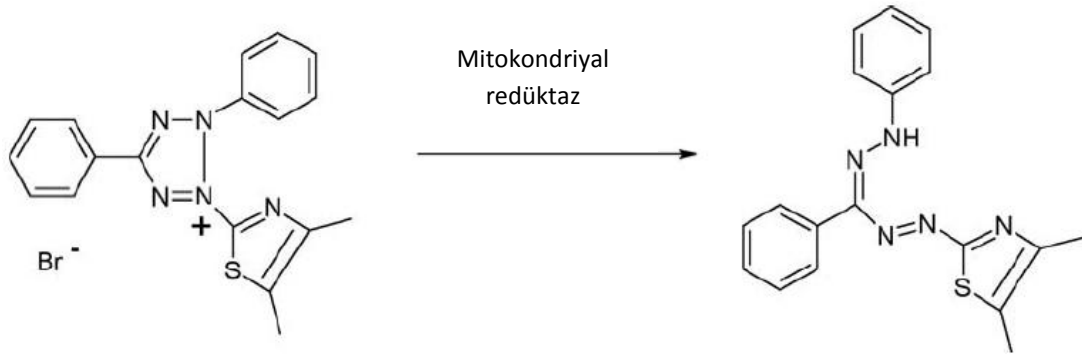
Şekil 2.2: Hemositometre.

2.2.3 Hücre Sayısının Optimizasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara 1000-2000-3000-4000-5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonrasında hücelere 20 µl MTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübasyonu sağlandı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 0,004 M HCl içeren izopropanolden 200 µl eklendi. 590 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak absorbans değerleriyle hücre optimizasyonu belirlendi.

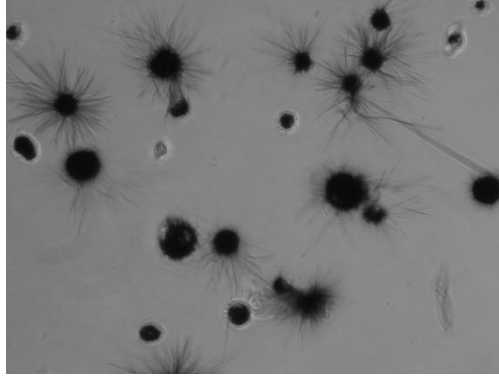
2.2.4 Hücre Canlılık Testi (MTT) Analizi

MTT yöntemi hücre canlılığı testi için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Sarı renkli olup hücelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal redüktaz enzimi ile suda çözünmeyen mor renkli formazana indirgenir. Oluşan formazan kristalleri 500-600 nm dalga boylarında ölçümü yapılarak hücre canlılığı tespit edilir.



Şekil 2.3: MTT reaksiyonu.

Bu metotta hücre optimizasyonu 5000 hücre olarak belirlenen hücreler, her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldı. 24 saat sonra hücelere belirlenen konsantrasyonlarda kemoterapi ajanları uygulandı. 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuğa MTT solüsyonu eklenerek 590 nm dalga boyunda absorbans sonuçları değerlendirildi. Bu çalışmalar 8 ve 12 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 2.4: Tetrazoliumun hücredeki etkisi.

2.2.5 Koyun Pankreasındaki COX Enzim Aktivite Ölçümü İçin Doku Homojenatının Hazırlanması

Koyun pankreasından alınan dokudaki kırmızı kan hücrelerini uzaklaştırmak için hazırlanan p.H: 7.4 olan Tris tamponu ile dokular yıkandı. 1 gr doku örneği için 5-10 ml 1 mM EDTA içeren 0.1 M Tris-HCl, p.H:7,8 olan soğuk tampon eklendi. Homojenizatörde birkaç dakika homojenize edildi ve hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücreler 10,000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Enzim aktivite tayini için gerekli olan süpernatant ayrı bir ependorfa alındı ve enzim aktivite tayini için uygulanması gereken prosedür gerçekleştirildi.

2.2.5.1 Kemoterapi Ajanlarının Koyun Pankreasına Uygulanması ve COX Enzim Aktivitelerinin Bulunması

Doku homojenatı hazırlanan koyun pankreasında bulunan total COX aktivitesinin tayini için 'COX Activity Assay Kit' prosedürü uygulandı. Koyun pankreas homojenatından elde ettiğimiz COX enziminin aktivite ölçümü için; 120 µl Assay Buffer, 10 µl hem, 40 µl örneğimizden alarak 25°C'de 5 dakika inkübasyonu sağlandı. 20 µl araşidonik asit ve 20 µl kolorimetrik substrat eklenerek 25°C'de 5 dakika inkübasyonu gerçekleştirildi ve 590 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Belirlenen dozlarda kemoterapi ajanları uygulanarak COX enzimi aktivitesi üzerinde etkileri tespit edildi.

2.2.5.2 Total COX Aktivitesinin Hesaplanması

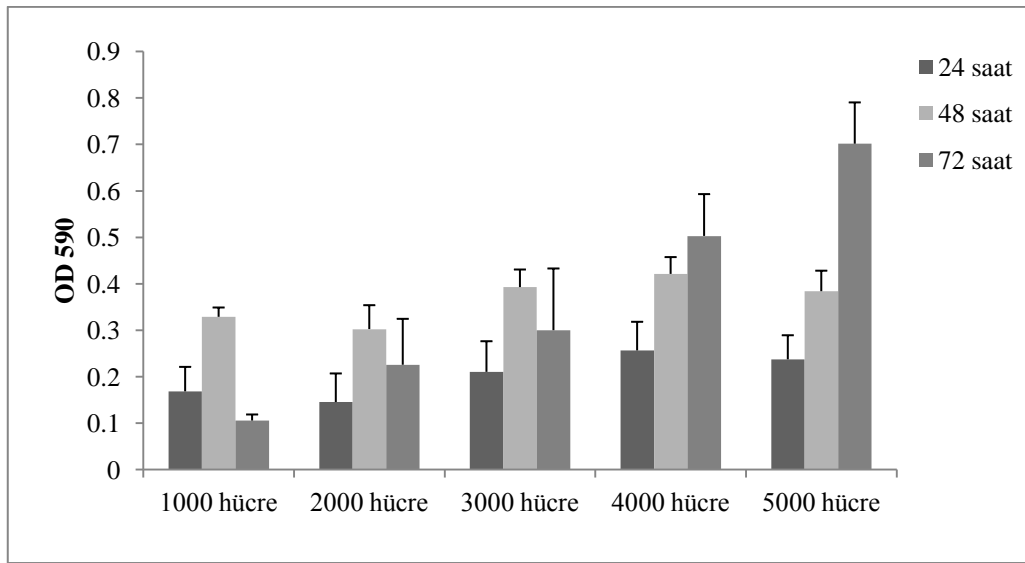
COX enzim aktivite tayini için 'COX Activity Assay Kit' kullanıldı. Total COX aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Total COX Activity} = \frac{\Delta A_{520}/5 \text{ min.}}{0.00826 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.21 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \div 2^* = \text{nmol/min/ml (U/ml)}$$

3. BULGULAR

3.1 Hücre Sayısı Optimizasyonunun Tespiti

MTT analizi öncesi yapılan bu çalışmanın amacı hücre sayısının optimum koşulunun belirlenmesidir. Deneysel çalışmamız 96 kuyucuklu plakalarda 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.



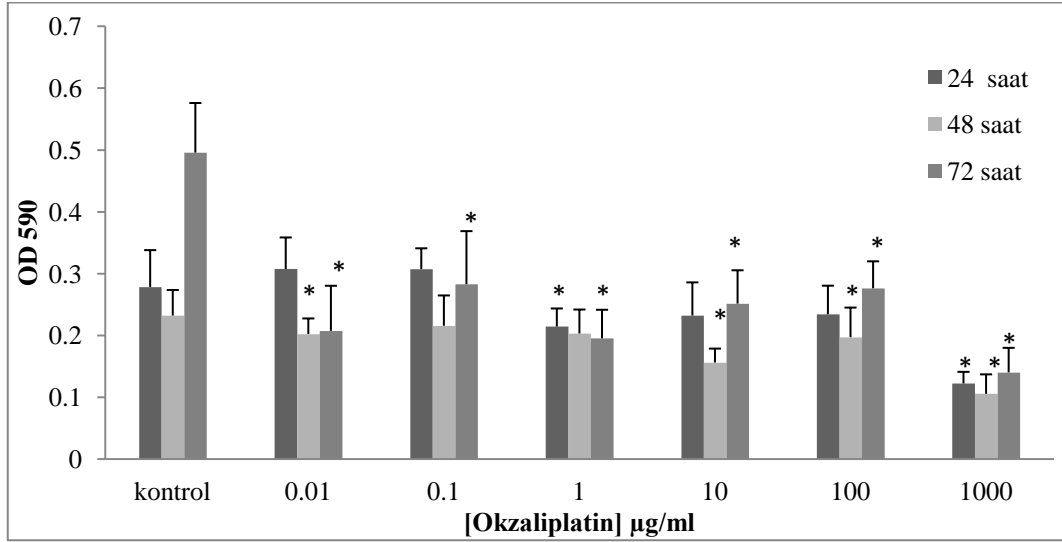
Şekil 3.1: MTT analizi öncesi hücre sayısı optimizasyonunun belirlenmesi.

Çalışma sonucunda 24-48 ve 72 saat sonrası 5000 hücrenin deneysel aşamada uygunluğu kabul edilmiştir. 5000 hücrenin uygunluğunun tespitinden sonra deneysel aşamalarımız MTT analiziyle devam etmiştir.

3.2 Panc-1 Hücrelerine Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının 24-48-72 Saat Sonrası Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

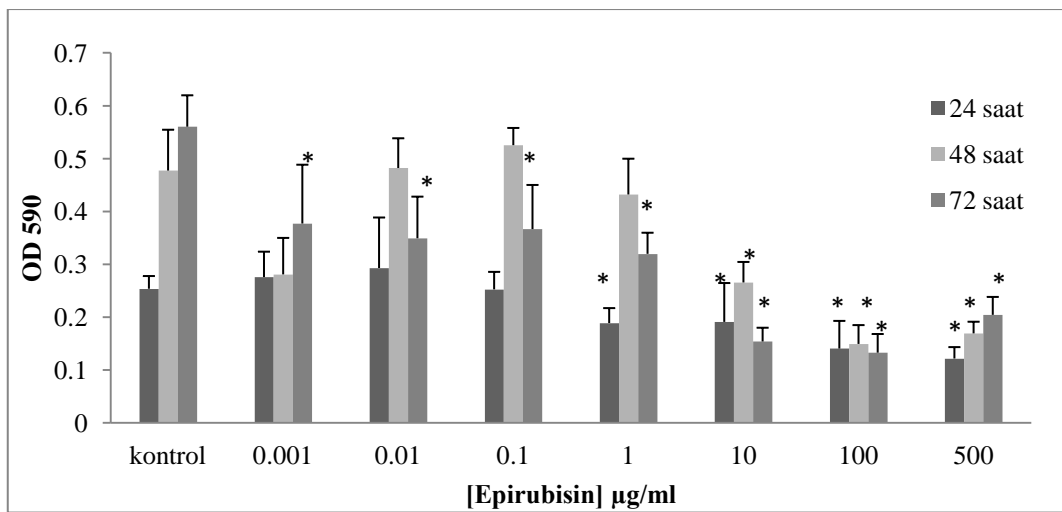
Hücre sayısı optimizasyonu belirlenen Panc-1 hücre hattına kemoterapi ajanlarından okzaliptatin, paklitaksel, dosetaksel, epirubisin, gemitabin, irinotekan ve bevasizumab ilaçları uygulanmıştır. Uygulama saatleri 24-48-72 saat olarak belirlenmiş olup, MTT solüsyonu eklenen Panc-1 hücrelerinin üzerindeki sitotoksik

etkisi araştırılmıştır. Sonuçların Minitab14 programı kullanılarak Anova One way testi ile istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlıdır.



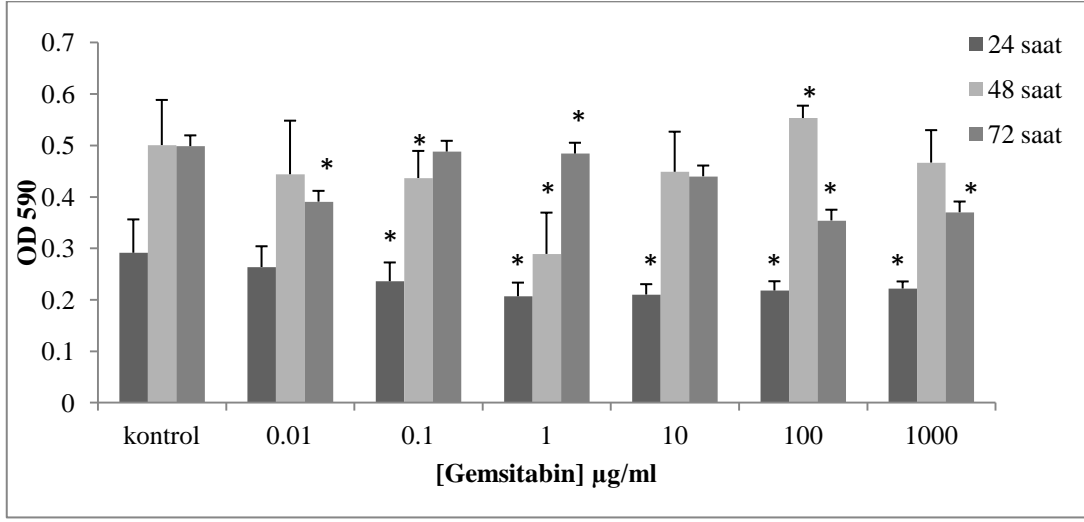
Şekil 3.2: Okzaliplatin uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

Okzaliplatin; 1000-100-10-1-0,1-0,01 µg/ml konsantrasyonlarında Panc-1 hücrelerine uygulanmıştır. 24-48-72 saat zaman aralıklarında MTT testi uygulanarak Panc-1 hücre hattında sitotoksik etkisi belirlendi. Sonuçlar Minitab14 programı kullanılarak Anova one way testi ile analiz edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında okzaliplatin, istatistiksel olarak 24-48-72 saat diliminde ve en yüksek 1000 µg/ml'lik dozda anlamlılığı görülmektedir. (*) Çalışılan diğer doz ve zaman aralıklarında anlamlılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



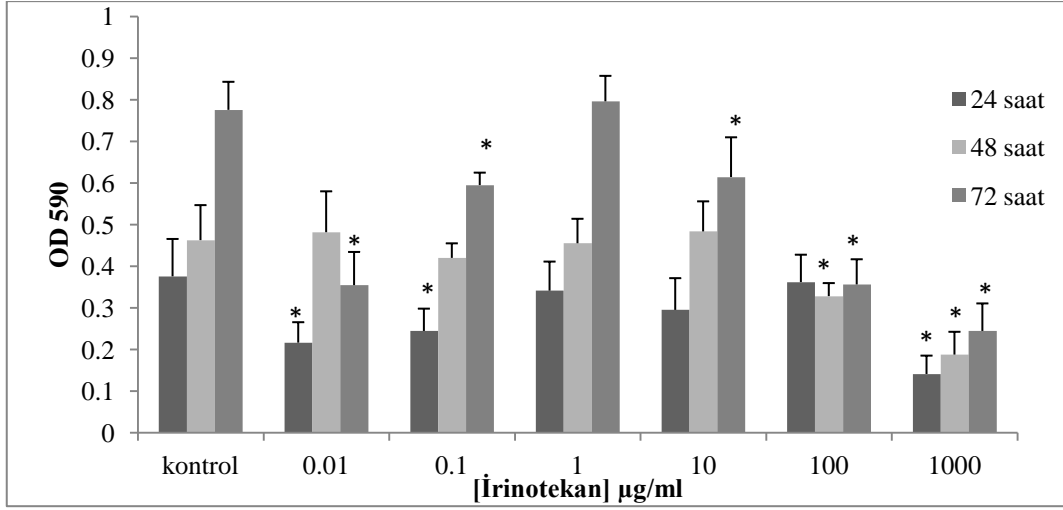
Şekil 3.3: Epirubisin uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

Epirubisin uygulanan Panc-1 hücre hattına dozları 500-100-10-1-0,1-0,01-0,001 µg/ml olacak şekilde kemoterapi ajanı uygulanmıştır. 72 saatte özellikle 100 µg/ml ve 10 µg/ml’de sitotoksitesi artmıştır. Fakat 48 saat sonunda 500 µg/ml ve 100 µg/ml’de etkili olduğu belirlenmiştir. Tüm bu çalışma saatlerinin sonucunda epirubisinin, en çok 500-100-10 µg/ml’de sitotoksik etkisi gözlenmiştir. (*) Kontrol gruplarıyla değerlendirilen analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir (p<0,05).



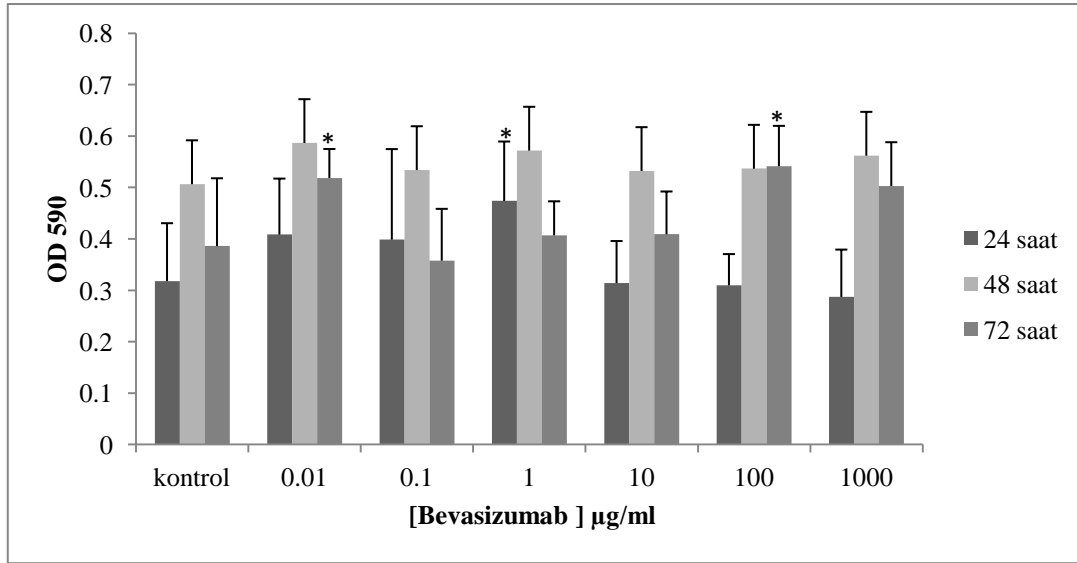
Şekil 3.4: Gemcitabin uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

Gemcitabin ile yapılan deneysel çalışmalarda 1000-100-10-1-0,1-0,01 µg/ml dozları Panc-1 hücre hattına uygulanmıştır. MTT testi sonrasında Panc-1 hücre hattında (*) ifadelerinde sitotoksik etkisi istatistiksel olarak belirlenmiş olup anlamlı kabul edilmiştir (p<0,05).



Şekil 3.5: İrinotekan uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

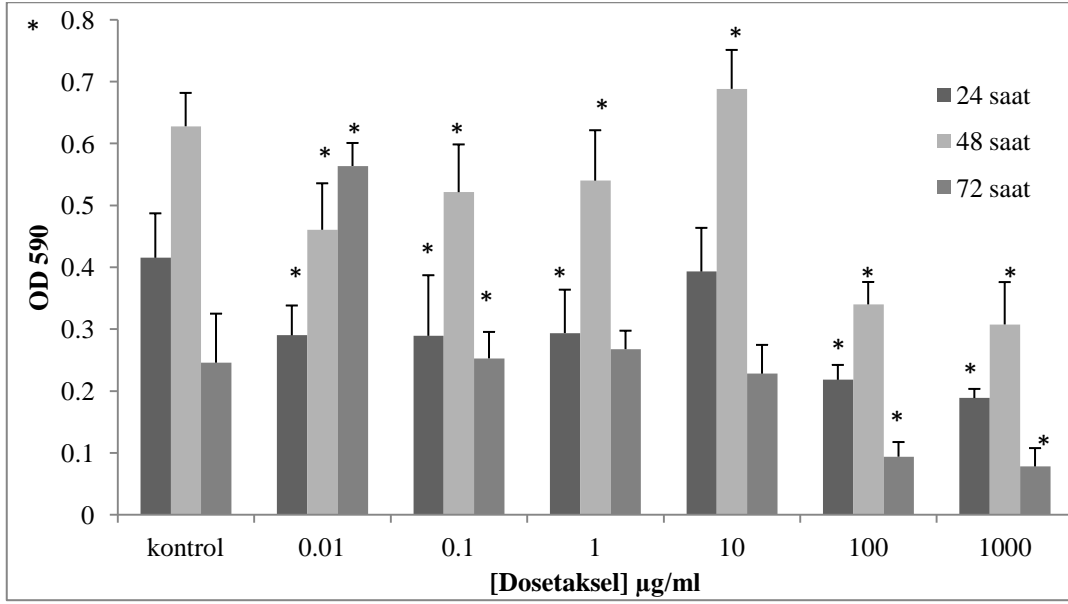
Panc-1 hücre hattına uygulanan bir diğer kemoterapi ajanı olan irinotekan ise 1000-100-10-1-0,1-0,01 µg/ml dozlarında 24-48-72 saat süreyle uygulanmıştır. Uygulama sonuçlarında en yüksek doz olan 1000 µg/ml'de irinotekanın hücre canlılığı üzerindeki inhibisyon etkisi en fazladır. Minitab14 programı kullanılarak istatistiksel hesaplaması yapılan irinotekanın anlamlılığı tespit edilmiştir((*) p<0,05).



Şekil 3.6: Bevasizumab uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

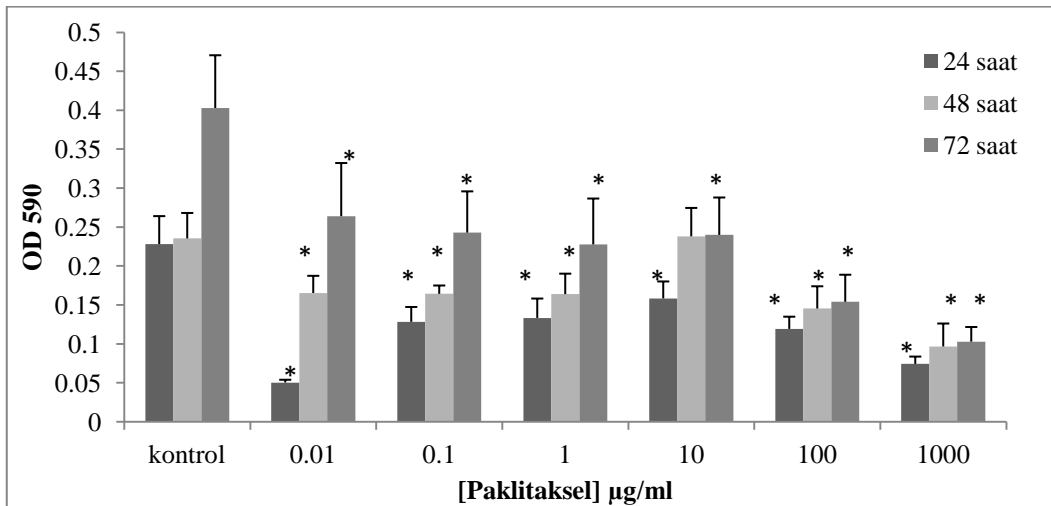
Bevasizumab uygulanan Panc-1 hücre hattında kontrol gruplarıyla yapılan çalışma sonunda 1000-100-10-1-0,1-0,01 µg/ml dozlarında hücre proliferasyonunu arttırıcı etkisi gözlenmiştir. En yüksek dozu olan 1000 µg/ml Panc-1 hücrelerinin canlılığının devam ettiği belirlenmiştir. Kontrol gruplarıyla yapılan karşılaştırma

sonucunda 0,01-1 ve 100 µg/ml’de istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşumu gözlenmiştir (p<0,05).



Şekil 3.7: Doksetaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

Doksetaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinde konsantrasyon aralığı 1000-100-10-1-0,1-0,01µg/ml olarak belirlenmiş olup, taksan bileşiklerinden olan doksetakselin 100 ve 1000 µg/ml’de sitotoksitesi maksimum düzeydedir. Düşük konsantrasyonları olan 0,01 ve 0,1 µg/ml’inde de hücre proliferasyonu üzerine etkisi belirlenmiştir (p<0,05).



Şekil 3.8: Paklitaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinin sitotoksik analizi.

Taksan bileşiklerinden olan paklitaksel ise Panc-1 hücre hattına 1000-100-10-1-0,1-0,01 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanmıştır. 24-48-72 saat sonuna doğru en düşük dozu olan 0,01 µg/ml’de de sitotoksik etkisinde artış belirlenmiştir. Değerlendirmeler Minitab14 programı kullanılarak Anova one way testi ile gerçekleştirilmiştir. (*) ifadelerinde p<0,05 olarak hesaplanmış olup anlamlı kabul edilmiştir.

3.3 Panc-1 Hücre Hattına Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının IC₅₀ Değerleri

Tablo 3.1: Kemoterapi ajanlarının Panc-1 hücre hattında 24-48 ve 72 saat sonundaki IC₅₀ değerleri.

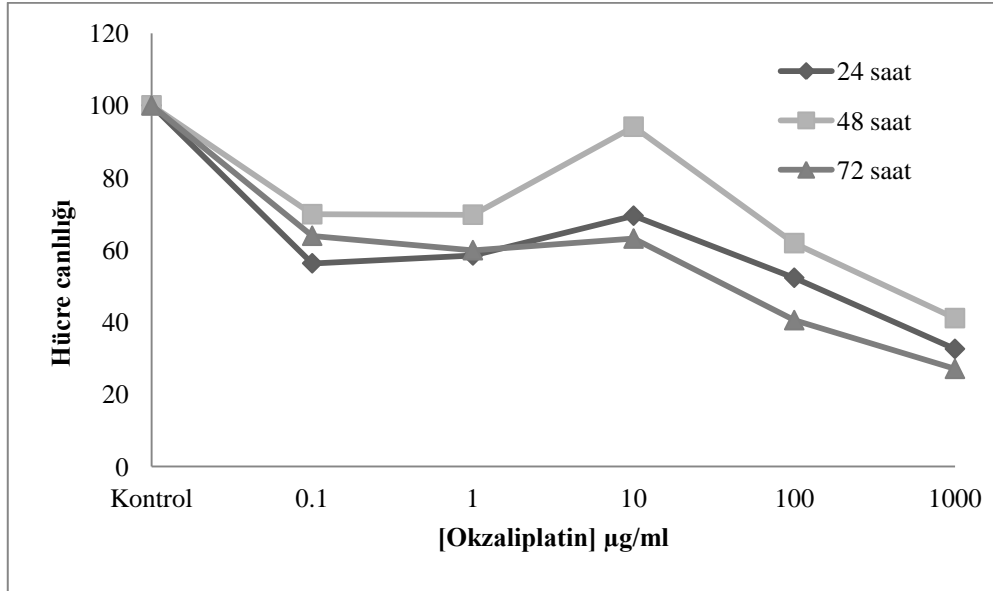
Panc-1 Hücre Hattı		IC₅₀ (µg/ml)				
Kemoterapi Ajanları	Paklitaksel	Okzaliptatin	Epirubisin	İrinotekan	Dosetaksel	
24 saat	109,75	447	115,35	1075	109,62	
48 Saat	157,5	256	32,03	1013	118,9	
72 Saat	70,6	98,5	1,19	1089,25	83,625	

Panc-1 hücre hattına uygulanan kemoterapi ajanlarından paklitaksel, dosetaksel, epirubisin, irinotekan ve dosetakselin hücre canlılığı üzerindeki inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu uygulama 24-48-72 saat süreleri baz alınarak hesaplanmıştır. İnhibisyon konsantrasyonları; paklitaksel için 24 saat sonunda 109,75 µg/ml, 48 saat sonunda 157,5 µg/ml 72 saat sonunda ise 70,6 µg/ml olarak belirlenmiştir. Okzaliptatin ise 24 saat sonunda 447 µg/ml, 48 saat sonunda 256 µg/ml, 72 saat sonunda ise 98,5 µg/ml değerleri elde edilmiş olup Panc-1 hücre hattındaki inhibisyon etkisinde artışı tespit edilmiştir. Kemoterapi ajanlarının içerisinde en etkili olan ilaç epirubisindir. 72 saat sonunda inhibisyon değeri 1,19 µg/ml olan epirubisinin, Panc-1 hücre hattında kanser hücrelerinin proliferasyonunu en aza indirdiği tespit edilmiştir. İrinotekanın Panc-1 hücre hattında inhibisyon etkisi

72 saat sonunda 1089,25 $\mu\text{g/ml}$ 'de minimum değerdedir. Dosetakselin Panc-1 hücre hattı üzerindeki inhibisyonu 72 saat sonunda 83,625 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.

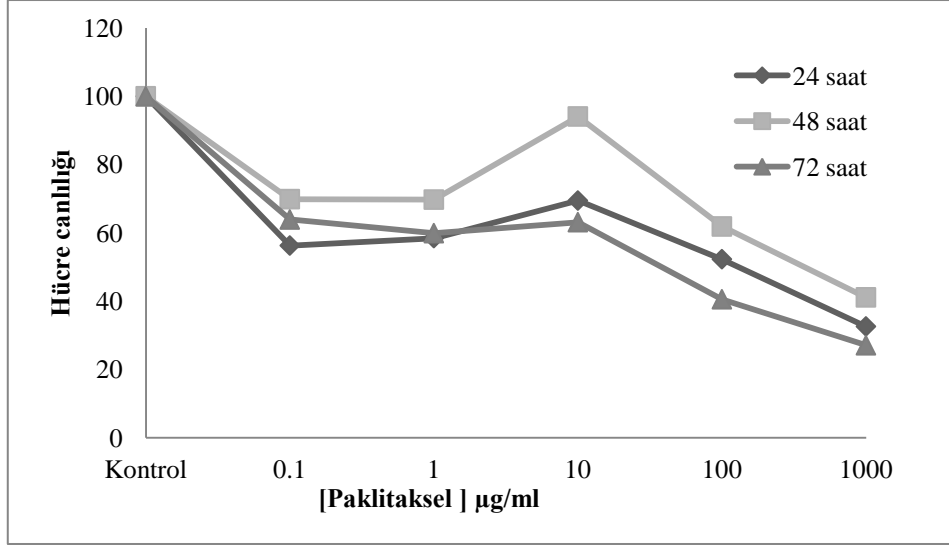
3.4 Panc-1 Hücre Hattına Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının İnhibisyon Etkisi

Panc-1 hücre hattına uyguladığımız kemoterapi ajanlarının sitotoksik etkisini daha net gözlemlene adına oluşturulan grafikte, 24-48-72 saat sonunda elde edilen değerlerin karşılaştırılması daha uygun ve daha anlamsal sonuç vermektedir. Belirlenen kemoterapi ajanları Panc-1 hücre hattına uygulandıktan sonra inhibisyon konsantrasyonu analizi gerçekleştirilmiştir.



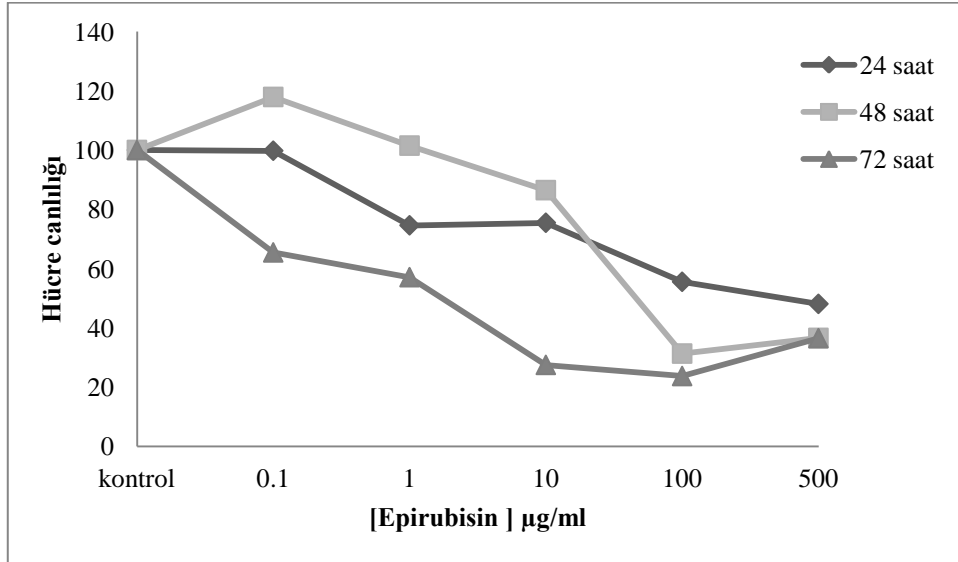
Şekil 3.9: Okzaliplatin uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC_{50} değerleri.

Platin içerikli kemoterapi ajanı olan okzaliplatinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 72 saat sonunda en etkili dozun 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'de olduğu belirlenmiştir. 1000-100 $\mu\text{g/ml}$ ve 1 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında, 72 saat sonunda %60'ın altında inhibisyonu tespit edilmiştir.



Şekil 3.10: Paklitaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC₅₀ değerleri.

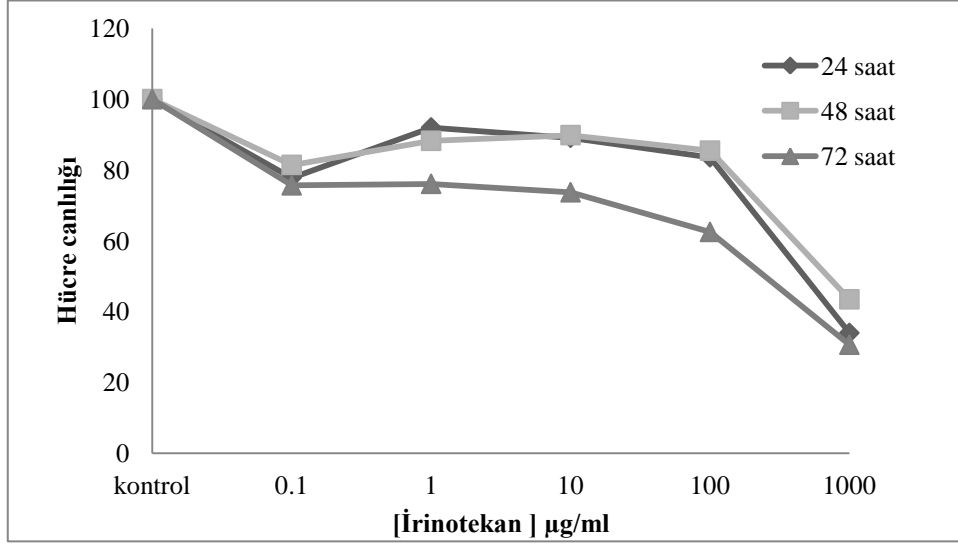
Kemoterapi ajanlarının içerisinde etkisi en fazla olan taksan grubu bileşiği paklitaksel, 100 ve 1000 µg/ml'de ve 72 saat sonunda hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Düşük dozlarda uygulanan kemoterapi ajanlarının artan konsantrasyonla beraber Panc-1 hücre hattı üzerinde inhibisyon etkisinde artış belirlenmiştir.



Şekil 3.11: Epirubisin uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC₅₀ değerleri.

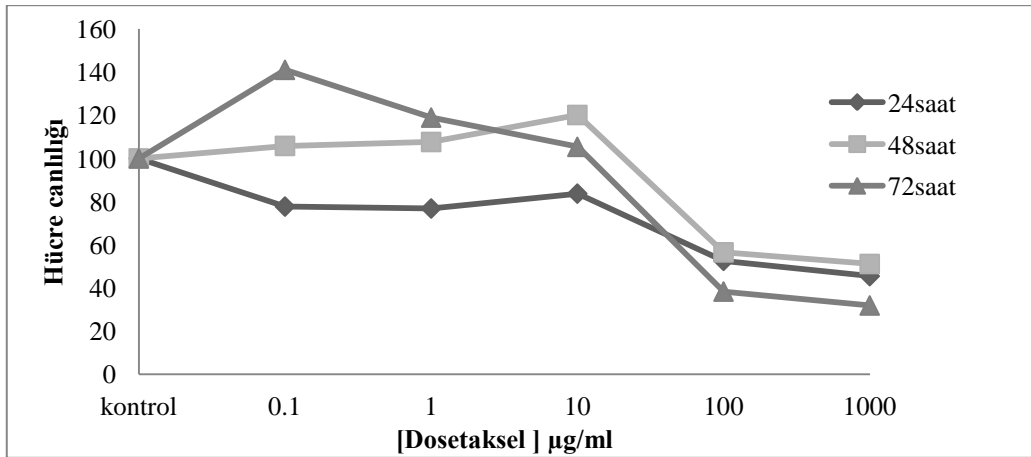
Kemoterapi ajanları içerisinde sitotoksik etkisi en fazla olan epirubisin, Panc-1 hücre hattına 500-100-10-1-0,1 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanmıştır.

Epirubisinin 48 ve 72 saat sonunda 500 µg/ml dozunda hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkisi en fazladır. 72 saat sonunda ise 10 ve 100 µg/ml'de Panc-1 hücre hattı üzerinde inhibisyon etkisi belirlenmiştir.



Şekil 3.12: İrinotekan uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC₅₀ değerleri.

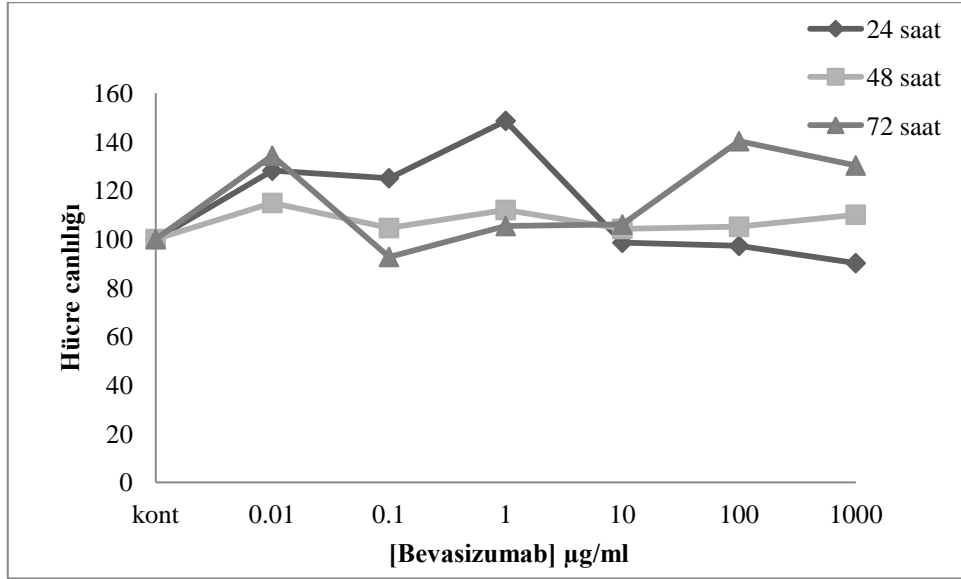
Topoizomeraz inhibitörü olan irinotekan, Panc-1 hücre hattına 1000-100-10-1-0,1 µg/ml dozlarında uygulanmıştır. Panc-1 hücre hattındaki sitotoksitenin 24-48-72 saat sonunda ve 1000 µg/ml'de maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir. Grafikte görülen düşük dozlardaki (0,1-1-10 µg/ml) irinotekanın hücre canlılığını yaklaşık olarak %70 seviyesinde koruduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.13: Dosetaksel uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC₅₀ değerleri.

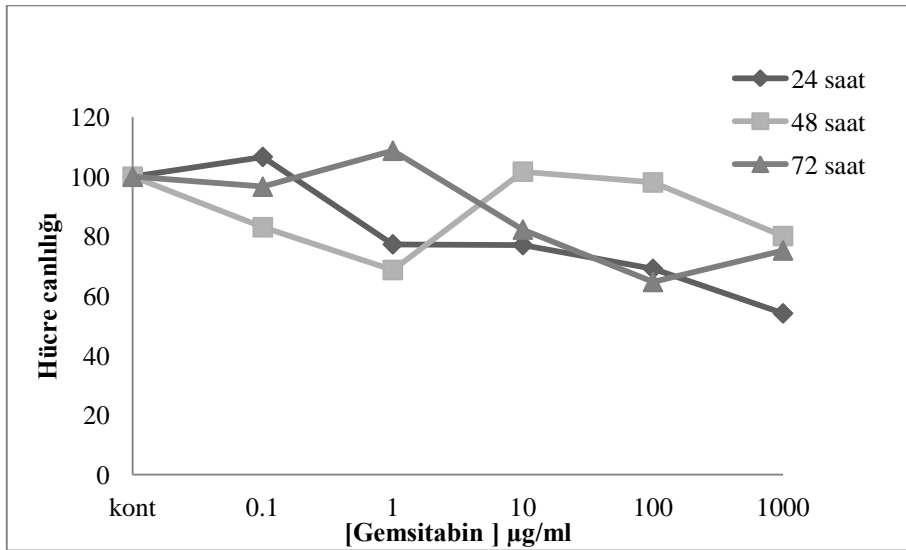
Taksan grubu bileşiklerinden olan dosetaksel, Panc-1 hücre hattına 0,1-1-10-100-1000 µg/ml dozlarında 24-48-72 saat süreyle uygulanmıştır. 100 µg/ml ve 1000

$\mu\text{g/ml}$ 'de sitotoksitesi belirlenen dozetaksel, hücre canlılığı üzerinde maksimum düzeyde inhibisyon göstermiştir.



Şekil 3.14: Bevasizumab uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC_{50} değerleri.

Monoklonal antikor olan bevasizumab, Panc-1 hücre hattına minimum doz olan 0,01 $\mu\text{g/ml}$ ile başlanarak 0,1-1-10-100-1000 $\mu\text{g/ml}$ düzeylerinde uygulanmıştır. Panc-1 hücre hattının canlılığını hiçbir dozda etkilemeyen bevasizumab, 24-48-72 saat sonunda sitotoksik etki göstermemiştir. Bevasizumab uygulanan Panc-1 hücrelerinde inhibisyon %50 altına düşmemiştir.



Şekil 3.15: Gemcitabin uygulanan Panc-1 hücrelerinde IC_{50} değerleri.

Primidin analogu olan gempitabin, Panc-1 hücre hattına 0,1-1-10-100-1000 µg/ml dozlarında uygulanmıştır. 1000 µg/ml'de 24 saat sonunda Panc-1 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi en fazladır.

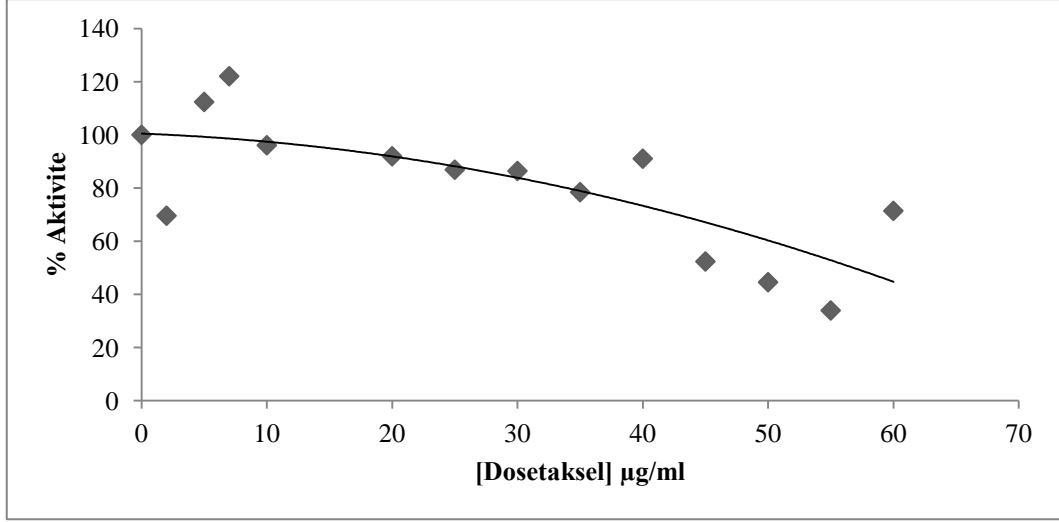
3.5 Koyun Pankreas Hücreleri Tarafından Üretilen COX Enzime Uygulanan Kemoterapi Ajanlarının Total COX Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Koyun pankreas dokusunun homojenizasyonundan sonra ortaya çıkan COX enzime belirli konsantrasyonlarda kemoterapi ajanları uygulandı. Vücut yüzey alan hesaplaması yapılarak, belirlenen konsantrasyon aralıklarında kemoterapi ajanları uygulanması sonucunda %total COX aktivitesi tespit edildi.

Normal pankreas ağırlığı yaklaşık olarak 80 gr olan insan pankreasına oranla koyun pankreası 2 gr alınarak homojenize edilmiştir. Vücut yüzey alanına göre belirlenen ilaç konsantrasyonları koyun pankreasından elde edilecek maksimum 8 ml COX enzime uygulanmış ve kemoterapi ajanlarının total COX enzimi üzerine etkisinin tespiti edilmiştir.

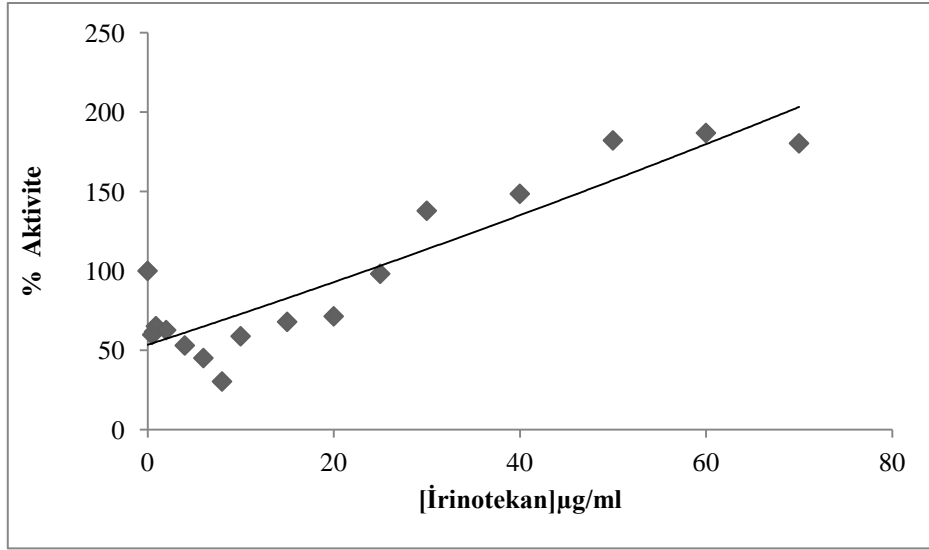
Tablo 3.2: Vücut yüzey alanı

Boy(cm)	Kilo(kg)	Vücut yüzey alanı
1.55	60	1.61
1.6	70	1.76
1.6	55	1.56
1.75	65	1.78
1.7	60	1.68
1.8	80	2
1.85	85	2.09
1.9	90	2.18
1.75	70	1.84
1.8	90	2.12



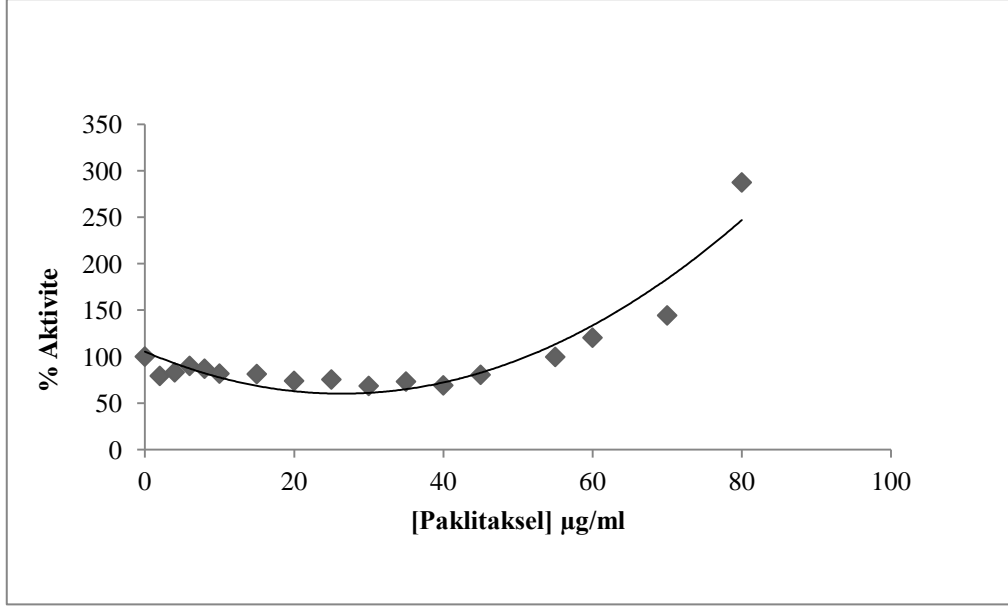
Şekil 3.16: Koyun pankreasına uygulanan dosetakselin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

Vücut yüzey alanına göre konsantrasyon değerleri 2-5-7- 10- 20-25-30-35-40-45-50-55-60 µg/ml olarak belirlenen dosetaksel, 8 ml'lik COX enzimine uygulanmıştır. Artan konsantrasyon değerlerine göre total COX enziminde inhibisyon gözlenmiştir.



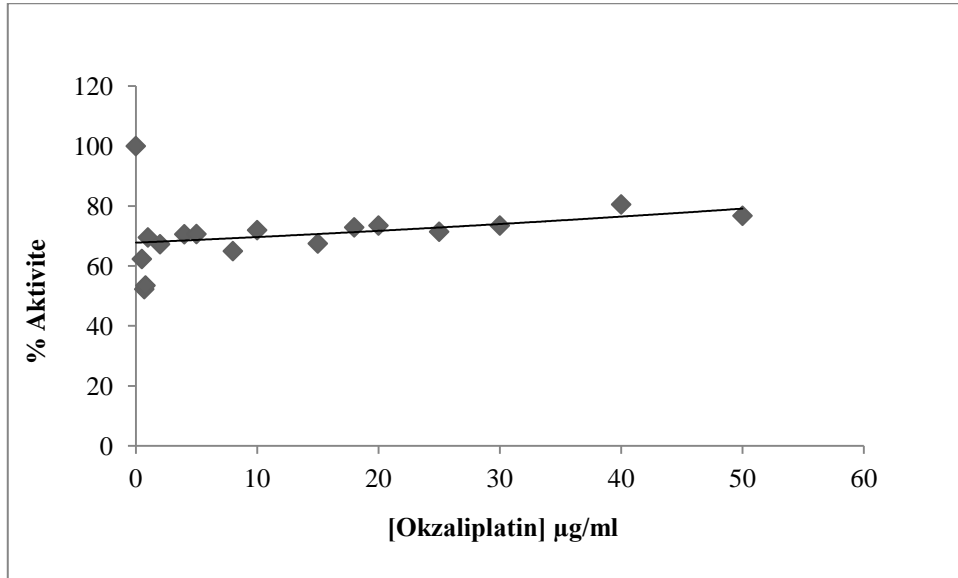
Şekil 3.17: Koyun pankreasına uygulanan irinotekanın COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

İrinotekanın 0,5-10 µg/ml konsantrasyon aralıklarında COX enzimi üzerinde inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Konsantrasyon gradiyenti olarak belirlenen 0,5-0,7-0,9-2-4-6-8-10-15-20-25-30-40-50-60-70 µg/ml dozlarındaki irinotekanın, artan konsantrasyon gradiyetinde enzim aktivitesini de arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.18: Koyun pankreasına uygulanan paklitakselin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

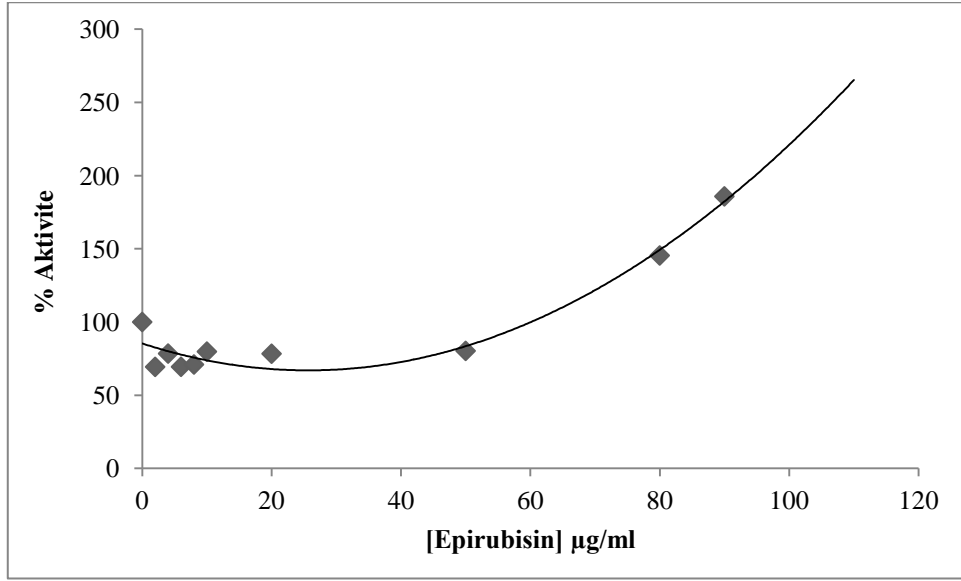
Paklitaksel 2-4-6-8-10-15-20-25-30-35-40-45-55-60-70-80 µg/ml konsantrasyonlarında koyun pankreası tarafından üretilen COX enzimi üzerine uygulanmıştır. Kemoterapik ajan olan paklitakselin 0-40 µg/ml aralığında COX enzim aktivitesinde sabit etki ettiği, 40-80 µg/ml aralığında ise konsantrasyon miktarının artmasıyla enzim aktivitesinde artışı tespit edilmiştir.



Şekil 3.19: Koyun pankreasına uygulanan okzaliplatinin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

Okzaliplatin 0,5-0,7-0,8-1-2-4-5-8-10-15-18-20-25-30-40-50 µg/ml konsantrasyonlarında pankreas dokusuna uygulanmış olup, artan konsantrasyon

değerlerinde COX enziminin aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.20: Koyun pankreasına uygulanan epirubisinin COX enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

Kemoterapik ajan olan epirubisin 2-4-6-8-10-20-30-40-50-60-70-80-90-100-110 µg/ml konsantrasyonlarında koyun pankreasından elde edilen COX enzimine uygulanmıştır. Azalan konsantrasyonlarda COX aktivitesinde düşüş meydana gelirken, artan konsantrasyon (60-110 µg/ml) aralıklarında enzim aktivitesi üzerinde artış belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser hücreleri kontrolsüz büyüme ve metastaz yapabilme yeteneğiyle kolaylıkla hücre ve dokularda gelişebilir. Ülkemizde yaygın olan kanser tipleri oldukça fazla çeşitlilik göstermektedir. Değişen ve gelişen yaşam koşulları, çevresel faktörler, stres ve kalıtsal faktörlerle birlikte nükseden kanser hücrelerinde sağ kalım oranları oldukça düşüktür.

Kanserli hücrelere uygulanan tedavi yöntemleri arasında cerrahi operasyon, kemoterapi, radyoterapi, adjuvant (hormon) terapi ve biyoterapi uygulamaları vardır.

Kanser tedavi sürecinde uygulanan kemoterapi ajanlarının kanserli hücrelerde tek bir ilaç olarak kullanılabilmesi gibi birçok kez daha yüksek etki sağlamak için birkaç ilaç birlikte kullanılabilir. Kemoterapi ilaçları hangi yol ile kullanılırsa kullanılırsa kan ile tüm vücuda dağılarak etki ederler. Böylece tümörlü hücrelerin bölünüp çoğalmalarını engellerken, vücudun normal hücrelerini de etkileyebilirler. Yapılan çalışmaların çoğunda kemoterapi ajanlarının kombine halde kullanılması kanserli hücrelerin çoğalmalarını engellerken, bazı kombine ilaç yöntemleri sinerjistik etki etmektedir.

Pankreas kanseri tüm gastrointestinal kanserler arasında son yıllarda artış gösteren ölümcül hastalıktır. Çevresel ve genetik faktörlerin etkiliği olduğu bu hastalık toplumsal sağlık sorunu haline gelmiştir. Geç bulgu veren hastalık olması sebebiyle çoğu kez lokal ileri ve metastatik hastalık evrelerinde teşhisi gerçekleştirilmektedir. Cerrahi uygulama yapılan hastalarda 5 yıllık sağ kalım %5 düzeyinde kalmaktadır. Pankreatik kanserler ölümcül 4. kanser olarak bilinmekte olup, hastaların %95'inde ölüme neden olmaktadır. Tedavisindeki güçlükler, erken teşhis edilememesi ve kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesi gibi nedenler, pankreas kanser çalışmalarına olan ilgiyi artırmaktadır. Kanser tedavilerinde özellikle kemoterapi ilaçları olarak alkilleyici ajanlar, platin içerikli okzaliptatin, antimetabolitlerden 5-FU, topoizomeras etkileşimli ilaçlardan irinotekan, antimikrotübül ajanlardan dosetaksel ve paklitaksel yanısıra gemsitabin, bevasizumab, antrasiklin türevi epirubisin gibi çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Söz konusu kanser tedavi sürecinde kemoterapi ajanları genellikle kombine halde

uygulanmaktadır. Araştırmamızda ise pankreas kanser hücre hattı (Panc-1) üzerine tekli kemoterapi ajanları uygulanarak, hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde oluşturduğu etkiler tespit edilmiştir. Ayrıca kemoterapi ilaçları, homojenizasyonu gerçekleştirilen sağlıklı koyun pankreas dokusuna uygulanmış olup, pankreas tarafından üretilen COX enzimi aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

Yapılan çoğu çalışmalarda gemitabin diğer kemoterapi ajanlarıyla kombine şekilde uygulanmıştır. Gemitabin ile en uygun kombine ajan platin içerikli ya da kapesitabin etken maddeli ilaçlardır [44]. Pacagnella ve arkadaşlarının KHDAK (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) tedavisinde yaptıkları çalışmada paklitaksel ve karboplatin kombine tedavisi ile paklitaksel, karboplatin ve gemitabin kemoterapi ajanları karşılaştırılmış olup yanıt oranlarına bakıldığında paklitaksel ve karboplatin kombinasyonunun tedaviye yanıtı %20,2 iken, paklitaksel, karboplatin ve gemitabin kombinasyonunun yanıtı %46 olarak belirlenmiştir [59]. Ancak paklitaksel ve gemitabin kombinasyonu ile paklitaksel, karboplatin uygulamalarında hem toksisite hemde yanıt oranları ile maliyet birlikte değerlendirildiğinde paklitaksel ve karboplatin tedavisinin daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir [60]. Diğer bir çalışmada ise anti-VEGF faktörü olan monoklonal antikor bevasizumab, gemitabin ile kombine edilmiş olup pankreatik kanserin faz II evresinde uygulanmıştır [47]. Fakat gemitabinin bevasizumab ile kombine halde ve tek başına uygulaması yapılmış olup, kanser hücrelerinin proliferasyonunda düşüş gözlenmemiştir [53].

Gemitabin ve 5-FU ajanları uygulanan hastalarda tedaviye cevap arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiş olup, gemitabin için %5,4 iken 5-FU için %0 olarak tespit edilmiştir [54]. Timidilat sentazın inhibitörü olan 5-FU, ilerlemiş pankreatik kanserli hücrelerde oldukça fazla kullanılmaktadır. Destekleyici bakımla birlikte sağ kalım süresinde etkin sonuç vermektedir [44-45,57-58]. Fakat 1997'de yapılan araştırma sonucunda 5-FU yerini, nükleozit analogu olan gemitabine bırakmıştır [46]. Çalışmamızda gemitabinin Panc-1 hücre hattında sitotoksik etkisi MTT testi ile araştırılmıştır. Gemitabin, Panc-1 hücrelerine 1000-100-10-1-0,1-0,01 µg/ml dozlarında ve 24-48-72 saat dilimlerinde uygulanmıştır. Zamana ve doza bağlı olarak hücredeki sitotoksik etkinin istatistiksel analizi Minitab14 Anova oneway programı ile hesaplanmıştır. Pankreas kanser hücre hattına uygulanan gemitabin; maksimum doz olan 1000 µg/ml'de 24 saat sonunda hücre canlılığı üzerinde inhibisyonu belirlenmiştir.

Bevasizumab, ilerlemiş KRK olgularında tek başına yeterli aktivitesi olan bir kemoterapi ajanı değildir, fakat 5-FU, lökovorin ve irinotekan ile yapılan ilk aşama tedavisinin ve 5-FU, lökovorin ile okzaliptatin birlikte kullanılarak yapılan ikinci aşama tedavinin etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir [61,62,63]. Pankreatik kanserin faz III evresinde monoklonal antikör olan bevasizumab'ın sitotoksik etkisi araştırılmıştır [52,53]. Araştırmamızda Panc-1 hücre hattına uygulanan bevasizumab'ın hücre proliferasyonu üzerinde inhibisyonu %50'nin altına düşmemiştir. İstatistiksel olarak analizi yapılan kemoterapi ajanının Panc-1 hücre hattında inhibisyon etkisi (*) ($p < 0,05$) ifadelerinde anlamlı kabul edilmiştir.

Okzaliptatin iki komşu guanin rezidüleri ya da DNA'daki bir adenin ya da bir guanin arasındaki çapraz bağları kırarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu engellemektedir [51]. Platin içerikli bileşik olan antikanser ilaçlardan okzaliptatinin, sisplatinle farklı spektrumlarda aktivitesi belirlenmiştir. Bazı sisplatin dirençli tümörler (kolon kanseri gibi) okzaliptatine yanıt vermektedir [48-50]. KRK tedavisinde 5-FU ve lökovorin tedavisine okzaliptatin eklendiğinde 4 yıllık hastalıksız sağ kalım süresi % 76,4 iken, okzaliptatin eklenmediğinde %69,8 olarak bulunmuştur [64]. Bazı *in vitro* uygulamalarda, HT-29 ve MCF-7 hücrelerinde çalışılan okzaliptatinin IC_{50} değerleri 2,99 ve 2,91 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir [65]. Araştırmamızda ise Panc-1 hücre hattında IC_{50} değeri 98,5 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Okzaliptatinin diğer hücrelere oranla Panc-1 hücrelerinde inhibisyonu daha az gözlenmiştir. Koyun pankreası tarafından üretilen COX enzim aktivitesi üzerinde okzaliptatinin; artan konsantrasyona rağmen herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Taksan grubu bileşiklerinden olan dosetaksel, paklitaksel'e göre hücre içine daha hızlı alınır ve hücre içinde daha uzun süre kalabilmektedir. Bu nedenle *in vivo* ve *in vitro* antitümör aktivite çalışmalarında dosetaksel paklitakसे göre 2-4 kat daha kuvvetli etki göstermektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda paklitaksel'e uzun süre maruz kalmanın antitümör aktivitede artışa neden olduğu gösterilmiştir [34,55,56].

In vitro çalışmalardan HT-29 ve MCF-7 hücrelerine uygulanan dosetakselin IC_{50} değerleri sırasıyla 3,084 ve 103,01 $\mu\text{g/ml}$ belirlenmiştir [65]. Çalışmamızda ise Panc-1 hücre hattında 72 saat sonunda IC_{50} değeri 83,62 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Dosetakselin koyun pankreası tarafından üretilen COX enzimi üzerine ise

inhibisyonu belirlenmiştir. Paklitaksel uygulanan HT-29 ve MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,21 ve 0,23 µg/ml belirlenmiştir [65]. Bu çalışmada ise Panc-1 hücre hattındaki IC₅₀ değeri 72 saat sonunda 70,6 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Paklitakselin MTT analizi sonucu Panc-1 hücre hattında artan konsantrasyonla beraber inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Paklitakselin doz miktarının artmasıyla koyun pankreası tarafından üretilen COX enzimi üzerinde aktive edici etkisi belirlenmiştir.

İrinotekanın adjuvan tedavide bir yararı saptanmamıştır. Bu nedenle irinotekan, lenf nodu pozitif olan kolon kanserlerinin adjuvan tedavisinde herhangi bir role sahip değildir [66]. Okzaliptatin ve irinotekan, daha çok metastatik rektum kanserinde etkilidir. Bu iki kemoterapi ajanının, neoadjuvan tedavi olarak, radyoterapi ve 5-FU infüzyonu ile birlikte kullanılabilirliğine ilişkin birçok faz I ve faz II evrelerinde çalışmalar yapılmıştır ve bu ajanların iyi tolere edildiği ve patolojik tam yanıt oranında yüksek olduğu tespit edilmiştir [67, 68].

Bazı *in vitro* çalışmalarda irinotekan uygulanan HT-29 ve MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ değerleri 8,58 ve 0,31 µg/ml olarak belirlenmiştir [65]. Bu çalışmada ise Panc-1 hücre hattında IC₅₀ değeri 1089,25 µg/ml olarak hesaplanmıştır. İrinotekanın Panc-1 hücre hattında inhibisyon etkisinin en fazla 1000 µg/ml'de 72 saat sonunda olduğu belirlenmiştir. İrinotekanın koyun pankreası tarafından üretilen COX enzimi aktivitesi üzerinde artışı belirlenmiştir.

Yapılan çoğu çalışmalarda meme kanseri tedavisinde uygulanan epirubisin ile dosetaksel kombine kullanıldığında doz artışının cevap oranını etkilemediği belirlenmiştir. Meme kanserli hastalarda hem antrasiklin hemde taksanlara karşı direnç gelişebilir. Direnç gelişmesi farklı mekanizmalarla olmakla birlikte son yıllarda üzerinde sıkça çalışılan bir mekanizmada çoklu ilaç dirençliliğidir [69]. Araştırmamızda epirubisin Panc-1 hücre hattında sitotoksik etkisi en fazla olan kemoterapi ajanı olarak tespit edilmiştir. Panc-1 hücre hattının epirubisine karşı bir dirençliliği söz konusu değildir. Koyun pankreasında üretilen COX enzimi üzerinde ise artan konsantrasyonla beraber aktive edici etkisi belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Bozkurt, B., Selçuk, Z.T., Fırat, P., Kalyoncu, A.F., Artvinli, M., “1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi”, *Toraks Dergisi*, 5, 148, (2004).
- [2] Özensoy, Ö., “Kanser İlişkili Karbonik anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CAIX,CA-XII) Ekspresyonu, Saflastırılması ve Bazı Bilesiklere Karşı İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”,Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [3] Kayaalp, S.O., “Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar”, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, cilt 1, 8.basım, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1007-1072, (1998).
- [4] Weaver, R.F., Hedrick, P.W; eds. *Genetics*. Wm. Dubuque C: Brown Publishers, 482-503, (1997).
- [5] Sevinç, M.M., “Akut pankreatit tanısında üriner tripsinojen-2 kalitatif ölçümünün değeri”, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, *İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Birinci Genel Cerrahi Kliniği*, İstanbul, (2006).
- [6] McHenry, C.R., Strain, J.W., “Anatomy and Embryology of the pancreas” In:Clark O. H, editor. *Textbook of endocrine Surgery*. Philedelphia: Saunders; p. 549-555,(1997).
- [7] Sangai, T., Ishii, G., Kodama, K., et al., “Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma”. *Int J Cancer*;115,885–892, (2005)
- [8] Korc, M., “Pancreatic cancer associated stroma production” . *Am J Surg*. October , 194(4 Supplement 1, s84–s86, (2007).
- [9] Kang, R., Tang D., “Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment”. *Am J Cancer Res*,2(4),383-396, (2012).
- [10] Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Lamar Turepu Roos, K., Evanson, N. K.,Tomsik, J., Elton, S. T., and Simmons,D.L., “COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression”. *Proc Natl Acad Sci* , 99(21),13926-31,(2002).

- [11] Kis, B., Snipes, J.A., Busija, D.W., “Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties”. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(1), 1-7, (2005).
- [12] Garavito, R.M., Malkowski, M.G., DeWitt, D.L., “The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2”. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68–69, 129–52, (2002).
- [13] Rizzo, M.T., “Cyclooxygenase-2 in oncogenesis”, Signal Transduction Laboratory, Methodist Research Institute, Clarian Health and Department of Pharmacology, *Indiana University School of Medicine*, Indianapolis, IN, United States (2010).
- [14] Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., Browner, M.F., “Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2”. *Nat Struct Biol*, 3, 927–33, (1996).
- [15] Mbonye, U.R., Wada, M., Rieke, C.J., Tang, H.Y., Dewitt, D.L., Smith, W.L., “The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system”. *J Biol Chem*, 281, 35770–8, (2006).
- [16] Otto, J.C., DeWitt, D.L., Smith, W.L., “N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum”. *J Biol Chem*, 268, 18234–42, (1993).
- [17] Sevigny, M.B., Li, C.F., Alas, M., Hughes-Fulford, M., “Glycosylation regulates turnover of cyclooxygenase-2”. *FEBS Lett*, 580, 6533–6, (2006).
- [18] Kim, S.F., Huri, D.A., Snyder, S.H., “Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2”. *Science*, 310, 1966–70, (2005).
- [19] Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B., “Arachidonic acid metabolism”. *Annu Rev Biochem*, 55, 69–102, (1986).
- [20] Marnett L.J., “Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde”. *Mutat Res*, 424, 83–95, (1999).
- [21] Rouzer, C.A., Marnett, L.J., “Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids”. *J Biol Chem*, 283, 8065–9, (2008).

- [22] Lecomte, M., Laneuville, O., Ji, C., DeWitt, D.L., Smith, W.L., “Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin”. *J Biol Chem*,269,13207–15 ,(1994).
- [23] Wiese, F.W., Thompson, P.A., Kadlubar, F.F., “Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2”. *Carcinogenesis*,22,5–10, (2001).
- [24] Schneider, C., Boeglin, W.E., Yin, H., Stec, D.F, Voehler, M., “Convergent oxygenation of arachidonic acid by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2”. *J Am Chem Soc*,128,720–1, (2006).
- [25] Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K. et al., “Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2”. *J Biol Chem*, 270,10902–8, (1995).
- [26] Liou, J.Y., Aleksic, N., Chen, S.F., Han, T.J., Shyue, S.K., Wu, K.K., “Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance”. *Exp Cell Res*, 306,75–84, (2005).
- [27] Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., et al., “Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells”.*Cancer Res*,68,1732–40, (2008).
- [28] Akın, İ., “Meme Kanserli Hastalarda Cox-2 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak araştırılması, klinik ve histopatolojik değerlerinin karşılaştırılması”, Uzmanlık Tezi, *Okmeydanı Eğitim ve araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü*, İstanbul, (2008).
- [29] Daniel, T.O., Liu H., Morrow, J.D., Crews, B.C., Marnett, L.J., “Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis”, *Cancer Res*, 59,4574-4577, (1999).
- [30] Hockel, S., Schlenger,K., Vaupel, P., Hockel, M., “Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer”, *Int. J. Oncol*, 19,827-832, (2001).
- [31] Hitchings, G.H., “Rational design of anticancer drugs: here, imminent or illusive. In Development of Target-Oriented Anticancer Drugs”, *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol. 28, Raven Press, New York, 227-238 (1983).
- [32] Randolph, V.L., Vallejo, A., Spiro, R.H., Shah, J., Strong, E.W., Huvos, A.G., Wittes,R.E., “Combination Therapy of Advanced Head and Neck Cancer”, *Cancer*, 41, 460-467,(1978).

- [33] Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J.M., et al., "Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity". *Semin Oncol*,25(Suppl 5),4-12, (1998).
- [34] Eisenhauer, E.A., Vermorken, J.B., "The Taxoids" *Drugs*, 55(1), 5-30, (1998).
- [35] Rose, W.C., "Taxol: A review of its preclinical in vivo antitumor activity" *Anti-Cancer Drugs*, 3, 311-21, (1992)
- [36] Arbuck, S.G., Blaylock, B.A., "Taxol: Clinical results and current issues" in Suffness M (ed.), *Taxol: Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 379-415 ,(1995).
- [37] Roth, A.D, Maibach, R., Fazio, N., "5Fluorouracil protracted continuous intravenous infusion can be added to full-dose docetaxel (Taxotere)-cisplatin in advanced gastric carcinoma: a phase I-II trial". *Ann Oncol*,15,759-764, (2004).
- [38] Conti, J.A., Kemeny, N.E., Saltz, L.B., et al., "Irinotecan is an active agent in untreated patients with metastatic colorectal cancer". *J Clin Oncol*,14, 709-15, (1996).
- [39] Bleiberg, H., "CPT-11 in gastrointestinal cancer". *Eur J Cancer*, 35,371-379,(1999).
- [40] Waters, J.S., Ross, P.J., Popescu, R.A., et al., "New approaches to the treatment of gastro-intestinal cancer". *Digestion*, 58, 508-19 ,(1997).
- [41] Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber H.P., Novotny W., "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibodyfor treating cancer".*Nat Rev Drug Discov*,3,391, (2004).
- [42] Gerber, H.P., Ferrara, N., "Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies".*Cancer Res*,65(3),671–80119,Jain RK. Normalization. (2005).
- [43] Jain, R.K., "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy". *Science*, 307(5706),58–62, (2005).
- [44] Sultana, A., Tudur-Smith, C., Cunningham, D., et al., "Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer". *J Clin oncol* (in pres) (2007).

- [45] Shore, S., Raraty, M.G., Ghaneh, P., et al., “Chemotherapy for pancreatic cancer”. *Aliment Pharmacol Ther*,18,1049-69,(2003).
- [46] Burris, H.A., Moore M.J., Andersen, J., et al., “Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first line therapy for patients with advanced pancreas cancer : a randomized trial”. *J Clin Oncol*,15,2403-13, (1997).
- [47] Kindler, H.L., Friberg, G., Singh, D.A., et al., “Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer”. *J clin oncol* , 23,8033-40, (2005).
- [48] Sandor, V., “Chronotherapy with 5-fluorouracil, oxaliplatin, and folinic acid in colorectal cancer”. *Lancet*, 350,1325–6 ,(1997).
- [49] Hochster, H., Chachoua, A., Speyer, J., Escalon, J., Zeleniuch-Jacquotte, A., Muggia, F., “Oxaliplatin with weekly bolus fluorouracil and low-dose leucovorin as first-line therapy for patients with colorectal cancer” *J Clin Oncol*,21,2703–7 , (2003).
- [50] Ramanathan, R.K., Clark, J.W., Kemeny, N.E., Lenz, H.J., Gococo, K.O., Haller, D.G., et al., “Safety and toxicity analysis of oxaliplatin combined with fluorouracil or as a single agent in patients with previously treated advanced colorectal cancer”. *J Clin Oncol*,21,2904–11, (2003).
- [51] Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P.S., Aebi, S., Lin, T.P., et al., “In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair”. *Cancer Res*,57,1841–5 ,(1997).
- [52] Van Cutsem, E.,Vervenne, W.L., Bennouna, J., Humblet,Y., Gill, S., Van Laethem, J.L., Verslype, C.,Scheithauter, W., Shang, A., Cosaert, J., and Moore, M.J., “Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabineand erlotinibin patients with metastatic pancreatic cancer”.*J.Clin. Oncol*, 27,2231-2237, (2009).
- [53] Kindler, H.L.Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F.,Mulcahy, M. F.,O’Reilly, E., Wozniak, T.F., Picus, J., Bhargava, P., Mayer, R. J., Schilsky, R. L., and Goldberg, R.M., “Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer :phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B” (CALGB 80303. *J.Clin.Oncol*,28,3617-3622 , (2000).
- [54] Iovanna, J., Mallmann, M.C., Gonçalves, A., Turrini, O., Dagorn, J.C., “Current knowledge on pancreatic cancer” *Front. Oncol*, 2,6,(2012)

- [55] Lavelle, F., Bissery, M.C., Combeau, C., “Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere)” *Semin. Oncol.*, 22, Suppl. 4, 3-16, (1995).
- [56] Rose, W.C., “Taxol: A review of its preclinical *in vivo* antitumor activity” *Anti-Cancer Drugs*, 3, 311-21 (1992).
- [57] Neoptolemos, J.P., Cunningham, D., Friess, H., et al., “Adjuvant therapy in pancreatic cancer: historical and current perspectives”. *Ann Oncol*, 14,675-92, (2003).
- [58] Sultana, A., Tudur Smith, C., Cunningham, D., et al., “Meta-analyses on the management of locally advanced pancreatis cancer using radiation/combined modality therapy”. *Br J Cancer*, 96,1183-90, (2007).
- [59] Paccagnella, A., Oniga, F., Bearz, A., Favaretto, A., Clerici, M., Barbieri F.,et al., “Adding gemcitabine to paclitaxel/carboplatin combination increases survival in advanced non-small-cell lung cancer: results of a phase II-III study”. *J Clin Oncol*, 24(4), 681-68,(2006).
- [60] Chen, Y.M, Perng, RP, Lee, YC, Shih, J.F, Lee, C.S, Tsai, C.M, et al., “Paclitaxel plus carboplatin, compared with paclitaxel plus gemcitabine, shows similar efficacy while more cost-effective: a randomized phase II study of combination chemotherapy against inoperable non-small-cell lung cancer previously untreated”. *Ann Oncol*, 13(1), 108-115, (2002).
- [61] Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., et al., “Bevacizumab plus irinotekan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer”. *N Engl J med*, 350,2335-2342 ,(2004).
- [62] Kabbinavar, F.F., Schulz, J., McCleod, M., et al., “Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first line metastatic colorectal cancer. Results of a randomized phase II trial”. *J Clin oncol*,23,3697-3705 ,(2005).
- [63] Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., et al., “High-dose bevacizumab in combination with FOLFOX4 improves survival in patients with previously treated advanced colorectal cancer”: results from the Eastern Cooperative Group (ECOG) study E2300 (abstr). *ASCO GI Cancers Symposium a*,169a ,(2005).
- [64] Gramont, A., Boni, C., Navarro, M., et al., “Oxaliplatin/5-FU/LV in the adjuvant treatment of stage II and stage III colon cancer: efficacy results with a median follow-up of 4 years”.Program and abstracts of the 41st Annual Meeting of the ASCO,May 13-17, Orlando,Florida. *Eur J Cancer* ,3(Suppl),3501, (2005).

- [65] Aktaş, S.H., “Kemoterapinin kolan kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde VEGF düzeylerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı ,Ankara (2010).
- [66] Ychou, M., Raoul, J.L., Douillard, J.Y., et al., “A phase III randomized trial of LV5FU2 + CPT-11 vs LV5FU2 alone in adjuvant high risk colon cancer” (FNCLCC Accord02/FFCD9802) (abstr). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005. *J Clin Oncol*, 23,3502 ,(2005).
- [67] Mitchell, E.P., Anne, P.R., Fry, R., et al., “Chemoradiation with CPT-11, 5-FU in neoadjuvant treatment of locally advanced or recurrent adenocarcinoma of the rectum”: a phase I/II study update (abstr1052). *Proc Am Soc Clin Oncol*,22,262,(2003).
- [68] Ryan, D.P., Niedzwicki, D., Hollis, D., et al., “A phase I/II study of preoperative oxaliplatin, 5-fluorouracil, and external beam radiation in locally advanced rectal cancer” (abstr 3560). *J Clin Oncol*,22(Suppl),260, (2004).
- [69] Atalay, C., Deliloglu G, I., Irkkan, C., Gunduz, U., “ Multidrug resistance in locally advanced breast cancer”. *Tumour Biol*,27,309-318, (2006).
- [70] Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., et al., “Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells”. *Mol Carcinog*,35,138–147,(2002).
- [71] Gemalmaz, H., “İntrakaviter tedavide ümit veren yeni ajanlar ve kullanım prensipleri” *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı*, Aydın,(2010) .
- [72] Aksoy B., “Pankreas kanserlerinde CDC25A gen polimorfizmi ve ekspresyonu” *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilimdalı*, Gaziantep , (2011).
- [73] Claria, J., “Cyclooxygenase-2 Biology”, *Current Pharmaceutical Design*, 9,2177-2190 (2003).
- [74] Garavito, R.M., DeWitt, D.L. “The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins”. *Biochim Biophys Acta*, 1441:,278-287, (1999).