

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DENOVO SENTEZLENEN ANTRAKİNON TÜREVLERİNİN
PANKREAS KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SAMET DEMİRCİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR. BURHAN KABAY**

DENİZLİ – 2023

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DENOVO SENTEZLENEN ANTRAKİNON TÜREVLERİNİN
PANKREAS KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SAMET DEMİRCİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR. BURHAN KABAY**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 17.09.2021 tarih ve 2021TIPF022 nolu kararı ile desteklenmiştir

DENİZLİ – 2023

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi uzmanlık tezi çalışmamda katkılarından dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Burhan KABAY'a, çalışmaları ile desteğini esirgemeyen Teknoloji Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Nilgün KABAY'a, istatistik ve türlü desteklerinden dolayı Araş. Gör. Dr. Ayşen Buket ER URGANCI'ya, Tıbbi Biyoloji bilim dalındaki çalışmalarımıza desteğinden dolayı Doç. Dr. Selda ŞİMŞEK'e, her zaman bana destek olan Doç. Dr. Sevda YILMAZ' a teşekkür ederim.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık öğrenimim süresince bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum başta Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Uğur SUNGURTEKİN'e, Prof. Dr. Ergün ERDEM'e, Prof. Dr. Akın ÖZDEN'e, Prof. Dr. Murat ÖZBAN'a, Prof. Dr. Onur BİRSEN'e, Doç. Dr Muhammed Raşid AYKOTA'ya, Dr. Öğretim Üyesi Utku ÖZGEN'e teşekkür ediyorum.

Ayrıca Genel Cerrahide 5 yıllık uzmanlık hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen başta Uzm. Dr. Mesut Eker, Araş. Gör. Dr. Ezgi Doğa Yoran, Araş. Gör. Dr. Taha Yasin Baran'a olmak üzere asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca uzmanlık hayatım boyunca yanımda olan her zaman desteğini yanımda hissettiğim eşim, hayat arkadaşım Gülşah Çetindarı Demirci'ye teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Mustafa Demirci, annem Seher Demirci, kız kardeşim Berna Demirci, erkek kardeşim Baran Demirci'ye teşekkür ve minnetlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	3
2.2. PANKREAS EMBRİYOLOJİSİ.....	3
2.3. PANKREAS ANATOMİSİ	3
2.3.1. Pankreasın Vasküler Anatomisi	3
2.3.2. Pankreasın Lenfatikleri	4
2.3.3. Pankreasın Sinirleri ve İnnervasyonu.....	4
2.4 PANKREAS HİSTOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ	4
2.4.1. Ekzokrin Pankreas	5
2.4.2. Endokrin Pankreas.....	5
2.5. KANSER	6
2.5.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	6
2.5.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri	8
2.5.3. Pankreas Kanseri Türleri.....	11
2.5.4. Pankreas Kanseri Patofizyolojisi	12
2.5.5 Pankreas Kanseri ve Genetik.....	15
2.5.8. Pankreas kanseri evreleme.....	21
2.5.9. Pankreas Kanseri Tedavi	22
2.6. TELOMER	24
2.6.1 Telomerazı Hedeflemek İçin Terapötik Stratejiler	26
2.7. ANTRAKİNONLAR.....	30
2.7.1. Ftalosiyaninler.....	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	33

3.2. CCK8 TESTİ	33
3.3. RNA İZOLASYONU.....	34
3.4. CDNA SENTEZİ	34
3.5. EKSPRESYON ANALİZİ	35
4. BULGULAR	37
4.1. HÜCRE CANLILIĞI ANALİZİ SONUÇLARI	37
4.2. HTERT EKSPRESYON SONUÇLARI	39
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ.....	58
7. KAYNAKLAR	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
ALT	: Alternatif Telomer Uzaması
ANS	: Antisense
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli Geni
ASCO	: American Klinik Onkoloji Derneği
ATM	: Ataksi Telenjektazi Mutated
AZT	: Azidotimin
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma Geni-2
Bax	: Bcl-2 ile İlişkili X Proteini
BD-IPMN	: Bir Dal Kanalında İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
BMI	: Body Mass İndeksi
Braz	: Brezilin
BRAF	: Raf Murin Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu B
BRCA 1	: Meme Kanseri 1 (BreastCancer 1)
BRCA 2	: Meme Kanseri 2 (BreastCancer 2)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CA19-9	: Karbonhidrat antijeni 19-9
CDKN2A	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
CD24	: Yüzey Antijeni
CD44	: Yüzey Antijeni
CDX-2	: Transkripsiyon Faktörü
CFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Geçirgenlik Regülatörü
ÇKBT	: Çok Kesitli Bilgisayarlı Tomografi
C-myc	: Protoonkogen
C-kit	: Hücre yüzey antijeni protoonkogen
DDR	: DNA Hasar Yanıtı
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPC4	: Pankreas Kanseri Silinmiş 4. lokus
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
EPCAM	: Epitel Hücre Adezyon Molekülü
ERCP	: Endoskopik Retrograd Kolanjiyopankreatografi

ERK	: Hücre Dışı Sinyalle Düzelen Kinaz
EUS	: Endoskopik Ultrasonografi
EUS-FNA	: Endoskopik Ultrasonografi İnce İğne aspirasyonu
EUS-FNA	: Endoskopik Ultrasonografi İnce İğne Biyopsisi
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FAMMM	: Ailesel Atipik Multipl Mol Melanomu
FDA	: American Gıda ve İlaç Dairesi
FDG	: 18F floro-2-deoksi-D-glukoz
5-FU	: Fluorouracil
GEM	: Gemcitabin
GIP	: Gastrik İnhibitör Peptit
GLP-1	: Glutasyon Benzeri Peptit
GTP	: Guanozin Trifosfat
HBOC	: Kalıtsal Meme-Yumurtalık Kanseri
HGF/SF	: Hepatosit Büyüme Faktörü/Saçılma Faktörü
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
Htert	: Human Telomeraz Ters Transkriptaz Telomeraz
IPMN	: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
İMA	: İnferior Mezenterik Arter
İMV	: İnferior Mezenterik Ven
JNK	: Jun-N-terminal kinaz
Kb	: 1000 tane baz
Kbp	: 1000 tane Baz çifti
KRAS	: Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogen Homolog
LS	: Lynch Sendromu
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MCN	: Müsinoz Kistik Neoplazm
MD-IPMN	: Ana Pankreas Kanalında İntraduktal Papiller Müsinoz Neoplazm
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
Mia-PaCa-2	: Pankreas kanser hücresi
MLH1	: MutL Homolog 1
MMR	: Yanlış Eşleşme Onarımı
MPCS	: Melanom Pankreas Kanseri Sendromu
MR	: Magnetik Rezonans
MRG	: Magnetik Rezonans Görüntüleme

MRCP	: Manyetik Rezonans Kolanjiyopankreatikografi
Mtor	: Memeli Rapamisin Hedefi
MUC	: Müsin Geni
MSH2	: MutS Homolog 2
MSH6	: MutS Homolog 6
NET	: Nöroendokrin Tümör
NSCLC	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
NF-Kb	: Nüklear Faktör Kappa b
OS	: Genel Sağkalım
PANC-1	: Pankreas kanser hücresi
PanIN	: Pankreatik intraepitelyal neoplazi
PARP	: Poli ADP RibozPolimeraz
Pc	: Ftalosiyaminler
PC	: Pankreas Kanseri
PDAK	: Pankreas Duktal Adenokarsinomu
PDA	: Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PFS	: Progresyonsuz sağkalım
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-fosfat
PJS	: Peutz-Jeghers sendromu
PET-BT	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PM	: Primesterin
PMS2	: Protein Mismatch Repair System component homolog 2
PNET	: Pankreas Nöroendokrin Tümörü
PP	: Pankreatik Polipeptid
PRSS1	: Katyonik Tripsinojen Geni
PTEN	: Fosfatidilinositol 3-OH transferaz homologu
POT1	: Telomer 1'in Korunması
p16INK4a	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
p53	: Apoptozun-Tümör-İlişkili Proteini -53
RAF	: Ras aktive edici faktör
RAP1	: Baskılayıcı/Aktivatör Protein 1
Rna	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Ras	: Rat Sarkoma Geni
SC	: Sanguinorine Klorür

SCN	: SerözKistikNeoplazm
SPINK1	: Serin Proteaz İnhibitörü Kazal Tip 1
SMA	: Süperior Mezenterik Arter
SMAD4	: Pankreas Karsinomunda Silinmiş 4. Lokusdaki Tümör Baskılayıcı Gen
SMV	: Süperior Mezenterik Ven
Sp1	: Spesifik β 1 Glikoprotein
STK11/LKB1	: Serin/TreoninKinaz 11/LiverKinaz B1 Tümör Baskılayıcı Gen
S/T	: Serin/ Treonin
TCAB1	: TelomerazCajal Vücut Proteini 1
TERC	: Telomeraz RNA
TERT	: Telomeraz Ters Transkriptaz Telomeraz
TGF- β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TIN2	: TRF1 ve TRF2 Etkileşimli Nükleer Protein 2
TL	: Telomer Uzunluğu
TRF1	: Telomer Tekrar Faktörü 1
TRF2	: Telomerik Tekrar Bağlama Faktörleri 2
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TPP1	: TINT1/PTOP/PIP1 proteini
TRAP	: Telomere Tekrar Amplifikasyon Protokolü
TWI	: Tümör Ağırlık İnhibisyon
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurum
US	: Ultrason
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VİP	: Vazoaktif İntestinal Peptit
VİPOMA	: Vazoaktif İntestinal Peptit Tümör
WTp53	: Vahşi Tip p53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Dünya'da 2020'de pankreas duktaladenokarsinomundan tahmini insidans ve mortalite	7
Şekil 2.2: İnvaziv pankreas karsinomunun üç farklı morfolojik yolu	12
Şekil 2.3: PanIN ilerleme modeli sırasında moleküler değişikliklerin özeti	13
Şekil 2.4: Telomerazı hedeflemek için terapötik stratejiler	25
Şekil 2.5: İnsan genomundaki G-Kuadrupleks yapıların sınıflaması, nükleotid sekansları ve PDB veritabanındaki kristal yapıların kodları	28
Şekil 2.6: Ftalosiyanın bileşiğinin numaralandırılması	31
Şekil 2.7: B7 Bileşiği Moleküler Formülü	32
Şekil 2.8: B9 Bileşiği Moleküler Formülü	32
Şekil 4.1: Panc-1 hücre hattının B7 ve B9 farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonrası yüzde canlı hücre değerleri	37
Şekil 4.2: Mia-Paca hücre hattının B7 ve B9 farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonrası yüzde canlı hücre değerleri	38

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1: TNM evrelemesi-AmericanJointCommittee on Cancer(AJCC) 8.Baskısı.....	21
Tablo 2.2: PrognostikEvreleme-AmericanJointCommittee on Cancer(AJCC) 8.Baskısı.....	22
Tablo 3.1: 20 µl Ters Transkriptaz Reaksiyonu için gerekli miktarlar	35
Tablo 3.2: cDNA Reaksiyonu Basamakları.....	35
Tablo 3.3: Ekspresyon Reaksiyon Karışımı.....	36
Tablo 3.4: Ekspresyon Reaksiyon basamakları.....	36
Tablo 4.1: B7 ve B9 maddeleri muamelesi sonrası Panc-1 ve Mia-Paca hücre hatlarında hTERT kat değişimleri.....	39

ÖZET

Denovo Sentezlenen Antrakinin Türevlerinin Pankreas Kanseri Hücre Kültüründe Etkinliğinin Araştırılması

Dr. Samet DEMİRCİ

Dünya çapında pankreas kanserinin görülme sayısı 459.000'dir. Bunların 432.250'si ölümlerle sonuçlanmaktadır. Kanser mortalite sıralamasında 7. sırada yer almaktadır. Pankreas kanseri nispeten kısa hayatta kalma süresine ve kanser teşhisinin ardından 5 yıllık düşük sağ kalım oranına sahiptir. Ayrıca insidans oranı yılda %1.5 artmaktadır ve pankreas kanseri hastalarının hayatta kalma oranı sabittir. En aktif kemoterapi rejimleriyle tedavi edildiğinde bile sağ kalımları yüz güldürücü değildir. Radyoterapi, lokal olarak ileri hastalığı olanların tedavisine katkısı çok az olduğu görülmektedir. Bu nedenle, bu tümör hücrelerini daha etkili bir şekilde hedefleyebilen ve nüksetme insidansını azaltabilen yeni ilaçlara kritik bir ihtiyaç vardır. Bunlardan, en umut verici yaklaşım olan immünoterapi etkili bir terapötik stratejidir. Son yıllarda pankreas kanseri hastalarında immünoterapi tedavisi için telomeraz inhibitörleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar, telomeraz aktivitesinin pankreas adenokarsinomunun prognozunu iyileştirebileceğini ve terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Antrakinin türevleri, yarım asırdır antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır. Bu moleküller, DNA ile etkileşime girme yetenekleri açısından önemlidir. Yapılan birçok çalışma doğal antrakininlerin antikanser, anti-inflamatuar, immünosupresif, antimikrobiyal, diüretik, katartik, laksatif, damar gevşetici, antioksidan ve fitoöstrojen aktiviteleri gibi çok çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğunu göstermiştir.

Ftalosiyanimler, aromatik yapısı ve π -elektronlarınca zenginliği sayesinde güçlü kimyasal, termal ve foto kararlılığa sahip yoğun renkli sağlam moleküllerdir. Ftalosiyanim bileşiklerinin telomerik G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma özellikleri kanser tedavisinde yeni bir araştırma alanıdır.

Biz bu çalışmada yeni sentezlenen ve moleküler docking analizlerinde G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjileri yüksek olarak belirlenen antrakinin yan zincir taşıyan 2 farklı ftalosiyanim türevleri çinkoftalosiyanim bileşiklerinin (p -ZnPc ve np -ZnPc) pankreas kanseri hücre hatlarında (Mia-PaCa-2 ve PANC-1) telomeraz inhibitörü aktivitelerinin belirlenmesi için; Telomeraz reverse transkriptazın (TERT)

ekspresyon tayini araştırarak olası yeni aday telomeraz inhibitörlerinin gösterilmesi amaçladık.

Anahtar kelimeler: Pankreas kanseri, Antrakinin, Ftalosiyenin, Telomer, Telomeraz inhibitörü

SUMMARY

Investigation of the efficacy of Denovo synthesized anthraquinone derivatives in pancreatic cancer cell culture

Dr Samet Demirci

The incidence of pancreatic cancer worldwide is 459,000. Of these, 432,250 result in death. It ranks 7th in cancer mortality. Pancreatic cancer has a relatively short survival time and a low 5-year survival rate after cancer diagnosis. Also, the incidence rate is increasing 1.5% per year and the survival rate of pancreatic cancer patients is stable. Even when treated with the most active chemotherapy regimens, their survival is not promising. Radiotherapy appears to add little to the treatment of those with locally advanced disease that cannot be removed. Therefore, there is a critical need for new drugs that can more effectively target these tumor cells and reduce the incidence of recurrence. Of these, more effective therapeutic strategies are with immunotherapy being the most promising approach. In recent years, telomerase inhibitors have been used for immunotherapy treatment in pancreatic cancer patients. Studies show that telomerase activity can improve the prognosis of pancreatic adenocarcinoma and be a therapeutic target.

Anthraquinone derivatives have been used as anticancer agents for half a century. These molecules are important for their ability to interact with DNA. Many studies have shown that natural anthraquinones have a wide range of bioactivities such as anticancer, anti-inflammatory, immunosuppressive, antimicrobial, diuretic, cathartic, laxative, vasodilator, antioxidant and phytoestrogen activities.

Phthalocyanines are intensely colored solid molecules with strong chemical, thermal and photo stability due to their aromatic structure and richness in π -electrons. The binding properties of phthalocyanine compounds to telomeric G-Quadruplex DNA is a new research area in cancer therapy.

In this study, we demonstrated that two different phthalocyanine derivative Zincphthalocyanine compounds (p-ZnPc and np-ZnPc) containing anthraquinone groups, which were newly synthesized and determined to have high binding energies to G-quadruplex DNA in molecular docking analysis, in pancreatic cancer cell lines (Mia-PaCa-2 and PANC-1) for determination of telomerase inhibitor activities; We

aimed to show possible new candidate telomerase inhibitors by investigating the expression determination of telomerase reverse transcriptase (TERT).

Keywords: Pancreatic cancer, Anthraquinone, Phthalocyanine, Telomer, Telomerase inhibitor

1.GİRİŞ

Dünya çapında pankreas kanserinin insidansı 459.000'dir. Bunların 432.250'si ölümlle sonuçlanmaktadır. Kanser mortalite sıralamasında 7. sırada yer almaktadır. Pankreas kanseri nispeten kısa hayatta kalma süresine ve kanser teşhisinin ardından 5 yıllık düşük sağ kalım oranına sahiptir. En aktif kemoterapi rejimleriyle tedavi edildiğinde bile sağ kalımları yüz güldürücü değildir. Radyoterapi, lokal ileri hastalığı olanların tedavisine katkısı çok az olduğu görünmektedir (1).

Kanser düzensiz hücre büyümesi, invazyon ve hücrelerin orjin noktasından vücudun başka bölgelerine yayılması ile karakterize edilen bir hastalık çeşididir. Kanser vakaları son yıllarda oldukça artış göstermekte ve sayının daha da artacağı düşünülmektedir. Kanser araştırmaları ve potansiyel tedavilerinde, hastalığın klinik özellikleri ile moleküler yapısı arasındaki ilişkilerin açığa çıkması önem taşımaktadır. Ayrıca yüksek ölüm oranları ve her yıl dünya çapında milyonlarca kişinin ölümü nedeniyle kanser bilim dünyasında araştırmaların en çok yapıldığı hastalık grubudur. Birçok çeşidi ve kişiden kişiye farklılık oluşturması nedeniyle de tedavi planlarını zorlaştırmaktadır. Cerrahi tedavi, radyoterapi, kemoterapi haricinde hedefe yönelik tedavi ve gen tedavileri çalışmaları artmaktadır.

Bu nedenle, bu tümör hücrelerini daha etkili bir şekilde hedefleyebilen ve nüksetme insidansını azaltabilen yeni ilaçlara kritik bir ihtiyaç vardır. Bunlardan, en umut verici yaklaşım olan immünoterapi etkili bir terapötik stratejidir. Son yıllarda pankreas kanseri hastalarında immünoterapi tedavisi için telomeraz inhibitörleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar, telomeraz aktivitesinin pankreas adenokarsinomunun prognozunu tahmin edebileceğini ve terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Ftalosiyaninler, aromatik yapısı ve π -elektronlarınca zenginliği sayesinde güçlü kimyasal, termal ve foto kararlılığa sahip yoğun renkli sağlam moleküllerdir. Ftalosiyanin bileşiklerinin telomerik G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma özellikleri kanser tedavisinde yeni bir araştırma alanıdır (2).

Bu çalışmada yeni sentezlenen ve moleküler docking analizlerinde G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjileri yüksek olarak belirlenen, 2 adet antrakınon yan zincir taşıyan, ftalosiyanin bileşiklerinin, pankreas kanseri hücre hatlarında (Mia-PaCa-2 ve PANC-1) sitotoksik etkisini belirlemek ve telomeraz inhibitörü aktivitelerini

human Telomerazreverse transkriptazın (hTERT) ekspresyon tayini ile karşılaştırılarak yeni aday telomeraz inhibitörlerini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Pankreas tarihte ilk defa cerrah ve anatomist olan Yunan Herofilus (MÖ: 335-280) tarafından tanımlanmıştır. Endokrin hücre kümeleri ise bir tıp öğrencisi olan Langerhans tarafından 1869'da tanımlanmış ve Langerhans adacıkları olarak adlandırılmıştır (3).

2.2. PANKREAS EMBRİYOLOJİSİ

Pankreas fetal hayatın dördüncü haftasında gelişmeye başlar. Dorsal tomurcuk pankreas başının üst kısmı, boyun, gövde ve kuyruğa dönüşür. Ventral tomurcuk ise pankreasın geri kalan kısımları olan pankreas başının alt kısmı ve uncinat prosese dönüşür (4). Ventral tomurcuk Wirsung kanalını oluşturur. Dorsal tomurcuk Santorini kanalını oluşturur (5).

2.3. PANKREAS ANATOMİSİ

Pankreas duodenumun C şeklindeki halkasından dalağın hilusuna oblik şekilde uzanır. Pankreasın derin yerleşimli ve retroperitonda her taraftan çevrelenmiş oluşu nedeniyle pankreatik patolojiler zor lokalize olmaktadır (5). Pankreas dört anatomik bölümden oluşur; baş, boyun, gövde ve kuyruk. Pankreas baş kısmı orta hattın hemen sağında, vena kavanın hemen önünde ve transvers kolon mezosunun arkasındadır. Uncinat proces ise pankreas başından çıkıp süperior mezenterik venin (SMV) arkasına uzanır ve süperior mezenterik artere (SMA) bitişik olarak sonlanır (4). Pankreasın boyun kısmı pankreas başı ve gövde kısmının arasında olup nispeten daha kısadır. Pankreasın gövdesi ikinci lumbal vertebranın üzerinden geçer ve splenik arter ve venin hemen önünde yer alır (5). Tamamen periton ile kaplı olan pankreasın kuyruğu sol taraftaki böbreğin önünde ve burada dalak hilusu ve sol kolonun fleksurasıyla yakından ilişkilidir (6).

2.3.1. Pankreasın Vasküler Anatomisi

Pankreas kan akımı çölyak trunkus ve SMA dallarından gelmektedir. Gastroduodenal arter duodenumun inferiorunda anterior ve posterior süperior pankreatikoduodenal arter dallarını verir. SMA, pankreas boynundan geçerken pankreas boynunun inferior kenarında inferior pankreatikoduodenal arterini verir. Bu arter hemen anterior ve posterior inferior pankreatikoduodenal arter dallarına ayrılır.

Ayrıca SMA'nın dalı olan inferior pankreatik arteri pankreas gövde ve kuyruk kesimlerinin uzun aksı boyunca splenik arter ile birleştiren 3 tane damar bulunur. Bunlar lateralden mediale doğru kaudal, büyük ve dorsal pankreatik arterlerdir. Bu arterler pankreas gövde ve kuyruk bölgelerinin içinde oluşturduğu arklar ile organın zengin kan akımından sorumludurlar (5).

Pankreasın venöz dolaşımı ise arteryal dolaşımı takip eder ve arterlere göre daha yüzeyleydir. Pankreas başı anterior ve posteriorunda venöz arklar bulunur. Superiorda venöz drenaj portal venin posterior ve laterale drene olurken, posterior inferior ark ise inferior mezenterik vene (IMV) drene olur. Anterior inferior pankreatikoduodenal ven, sağ gastroepiploik ven ve middle kolik ven ile birleşip ortak venöz trunkus oluşturarak SMV'ye drene olur (4). Geriye kalan pankreas gövde ve kuyruk kesiminin drenajı ise splenik vene olur (4, 5).

2.3.2. Pankreasın Lenfatikleri

Pankreasın lenfatik drenajı oldukça geniş ve yaygındır. Lenf damarları ve lenf nodları arası ilişki zengin olduğundan pankreas tümörleri etrafa hızlıca yayılır. Lenf nodları distal safra yolunda, pankreas başı arkasında mezenterik venin pankreas altından geçtiği bölgede çıkan hepatik arter çevresinde, splenik arter ve splenik ven çevresinde palpe edilir. Pankreasın bu kadar yaygın bir şekilde lenfatik dolaşımının olması, kanserlerinin kötü prognoza sahip olması ile ilişkilidir (4, 5).

2.3.3. Pankreasın Sinirleri ve İnnervasyonu

Pankreas çölyak pleksustan ayrılan sempatik ve parasempatik sinirlerce innerve edilir (6). Pankreas aynı zamanda somatostatin vazoaktif intestinal peptid kalsitonin gen ilişkili peptid ve galanin gibi salgılanan çeşitli amin ve peptitlerce uyarılan nöronlar tarafından da inerve edilir. Pankreasta ayrıca ağrılardan sorumlu afferent sinir lifleri açısından da zengindir. Bu somatik lifler süperiorda çölyak gangliyona doğru ilerler (5).

2.4 PANKREAS HİSTOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

İnsan pankreası, endokrin ve ekzokrin fonksiyonu olan karmaşık bir salgı bezidir. Pankreas kütlesinin yaklaşık %85'ini ekzokrin pankreas, %10'unu ekstrasellüler matriks, %4'ünü damar ve major kanallar ve %1-2'sini ise endokrin doku oluşturur (4).

2.4.1. Ekzokrin Pankreas

Pankreastan günde yaklaşık 500-800 ml renksiz, kokusuz, alkali ve izoosmotik sıvı salgılanır. Bu sıvı asiner hücre ve kanal hücrelerinden salınan sekresyonların karışımıdır. Asiner hücrelerden 3 tip besinin sindirimi için gerekli olan amilaz, lipaz ve proteaz salgırlar (7). Tripsin diğer proteolitik enzimleri aktive ettiğinden asiner hücre içinde salgılanan inhibitörlerin varlığı ile baskılanır. Bu tripsinojenin erken aktivasyonuna karşı koyarak asiner hücreleri oto sindirimden korur. Pankreas sekreatuar tripsin inhibitörü, serin proteaz inhibitörü Kazal tip 1 (spink1) geni tarafından kodlanır. Bu gen mutasyonları özellikle çocukluk çağı kronik pankreatit gelişimi ile ilişkilidir (5).

2.4.2. Endokrin Pankreas

Endokrin pankreasın ana fonksiyonu glukoz metabolizmasını düzenlemektir. Bunu sağlayan endokrin salgılar langerhans adacıklarında bulunan hücrelerden salgılanır (5). Langerhans adacıklarında 5 tip ana hücre bulunmaktadır. Bunlar glukagon salgılayan alfa hücreleri, insülin salgılayan beta hücreleri, somatostatin salgılayan delta hücreleri, ghrelin salgılayan epsilon hücreleri ve pankreatik polipeptid salgılayan PP hücreleridir (4, 5, 8).

Hipoglisemi, arginin ve alanin aminoasitleri glukagon salınımını artırırken hiperglisemi, insülin, somatostatin, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) glukagon salınımını inhibe eder (4, 9). Glukagon, GLP-1, gastrik inhibitör peptit (GIP), kolesistokinin (CCK) insülin salınımını artırırken somatostatin, amilin, pankreastatin insülin salınımını inhibe eder. Kolinerjik ve beta sempatikler insülin salınımını uyarırken alfa sempatikler inhibe eder (4, 10). Somatostatin, gastrointestinal sekresyonların inhibisyonuna neden olur. Bu yönüyle sentetik analogların pankreas fistül ve enterik fistüllerin kapanmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (5, 11).

Toplam adacık kütesinin %1'ini oluşturan epsilon hücreleri ghrelin üretirler (8). Ghrelin aynı zamanda mide fundusunda da bulunan iştah açıcı bir hormondur. Ghrelinin glukoz ve inkretin hormonlarının beta hücre yanıtını azaltarak karaciğerde insülin etkisini bloke ettiği gösterilmiştir (12).

Pankreastan salgılanan 5 ana peptide ek olarak adacıklardan salgılanan amilin pankreastatin gibi bir takım peptidler ile vazoaktif intestinal peptid (VIP), galanin, serotonin gibi nöropeptitler de vardır. VIP, insülin salınımını uyararak mide salgısını

fizyolojik seviyelerde inhibe eden 28 aminoasitlik bir peptittir. 37 aminoasitlik bir peptit olan amilin beta hücrelerinden salgılanır ve insülin sekresyonunu inhibe eder. Pankreastatin ise insülin salınımını inhibe eden, glukagon salınımını artıran adacık hücrelerinden sentezlenen bir peptiddir (13).

2.5. KANSER

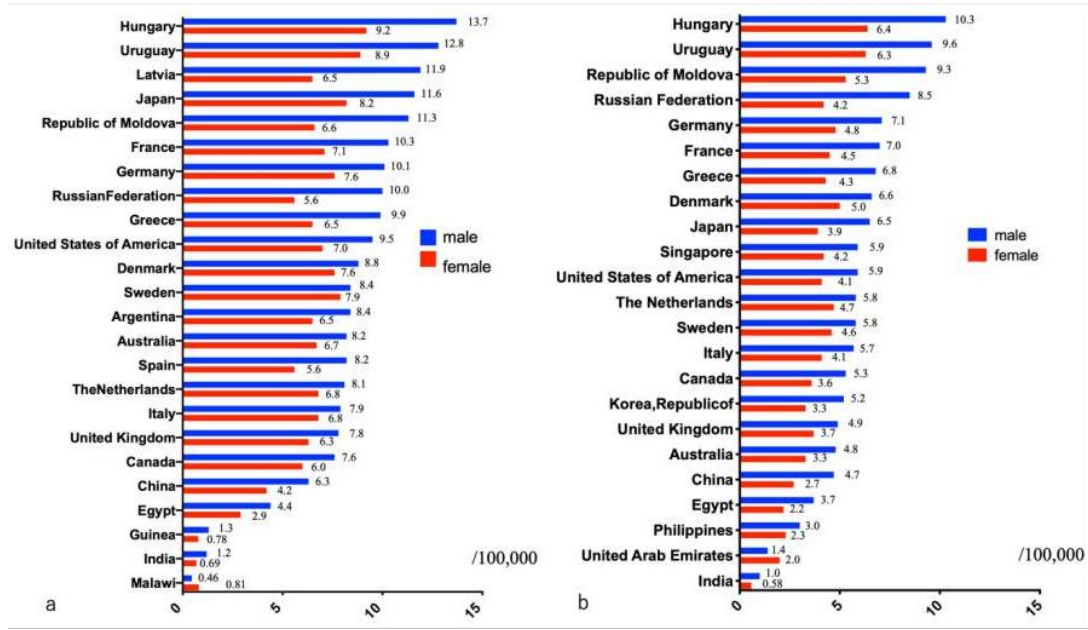
Kanser, sağlıklı hücrelerin kontrolsüz çoğalan apoptoza karşı direnç göstermeleri sonucu moleküler düzeydeki farklılıklarla beraber hücre motilite ve invazivitede değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreçtir. Kanser ölümlerinin ana nedeni metastazdır. Metastaz, mikroçevre desteği sayesinde kanser hücrelerinin dolaşım sistemi aracılığıyla uzak organlara kolonizasyonu ve gelişimini içerir. Kanserin, kontrolsüz proliferasyon ve metastatik yayılımındaki en önemli nedeni genomik değişikliklerdir. Kanser araştırmaları ve gelecekteki potansiyel tedavilerinde, hastalığın klinik özellikleri ile moleküler yapısı arasındaki ilişkilerin açığa çıkması önem taşımaktadır. Ayrıca yüksek ölüm oranları ve her yıl dünya çapında milyonlarca kişinin ölümü nedeniyle kanser bilim dünyasında araştırmanın en çok yapıldığı hastalık grubu olmuştur. Birçok çeşidi ve kişiden kişiye farklılık oluşturması nedeniyle de tedavi planlarını zorlaştırmaktadır.

2.5.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri insidansı bölgelere ve popülasyona göre değişkenlik göstermekle birlikte kanser ölümlerinin giderek yaygınlaşan bir nedeni haline gelmektedir (14). Yapılan çalışmaların doğrultusunda, pankreas kanserinin 2030 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin dördüncü en önemli nedenlerinden ikincisine yükseleceğini tahmin etmektedir (15, 16).

GLOBOCAN tarafından 2020 yılında yapılan bir ankete göre, yeni Pankreatik Duktal Adenokarsinom (PDAK) vakalarının sayısı 495.773 olup, en yaygın kanserler listesinde on dördüncü sırada yer almaktadır. Bununla birlikte, PDAK'a bağlı ölümlerin sayısı yılda 466.003'tür. Bu onu kanser ölümlerinin yedinci önde gelen nedeni yapmaktadır (16, 17). PDAK ile ilişkili ölüm oranı ülkeler arasında da farklılık gösterir. Avrupa, en yüksek PDAK ölüm oranına (100.000 kişi başına 7,2 ölüm) sahiptir ve onu Kuzey Amerika (100.000 kişi başına 6,5) izlemektedir. Doğu Afrika en düşük PDAK ölüm oranına sahiptir (100.000 kişi başına 1.2). PDAK insidansı erkeklerde (100.000'de 5.7, 262.865 vaka ile) kadınlara göre (100.000'de 4.1, 232.908 vaka ile) biraz daha yüksektir. Ülkelere göre PDAK mortalitesi karşılaştırıldığında, erkeklerde

ve kadınlarda ölüm oranları en yüksek Macaristan'da (erkeklerde 10,3, kadınlarda 6,4) ve Uruguay'da (erkeklerde 9,6, kadınlarda 6,3) bulunmuştur (Şekil 2. 1) (16).



Şekil 2.1 :Dünyada 2020'de pankreas duktaladenokarsinomundan tahmini insidans ve mortalite GLOBOCAN 2020 a) pankreas duktal adenokarsinomu insidansı; b) pankreas duktal adenokarsinomlu hastaların ölüm oranı (16)

En agresif kanser türlerinden biri olan pankreas kanseri düşük insidansa sahip olmasına rağmen yüksek mortalite oranına sahiptir. Kanser tedavilerinde ilerlemeye rağmen, sağkalım oranı son on yılda değişmeden kalmıştır (18). Bir yıllık sağkalım oranı % 20 olan pankreas kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı ortalama %7'dir. Dünyada yaygın kanser çeşitleri arasında 14. sırada, kansere bağlı ölümlerin 7. önde gelen nedenidir (19). Kötü prognozun asıl nedeni; yeri nedeniyle sinsi büyüme, spesifik olmayan semptomlar ve erken tanı için hassas ve spesifik yöntemlerin bulunmamasıdır. Bilim insanları ilerleyen zamanlarda pankreas kanserinde ölüm sayısının artacağını düşünmektedir. ABD'de kanserden ölüm sebepleri arasında üçüncü sırada olan hastalıktan her yıl dünyada aşağı yukarı 227.000 kişi ölmektedir. 2030 yılına gelindiğinde kanser ölüm nedenleri arasında ikinci sırada olması beklenmektedir (19).

Türkiye'de erkeklerde görülme insidansı 2002 yılında yüz binde 3,1 iken, 2016 yılında 5,7'ye yükselmiştir. Kadınlar da ise bu oran 2016 yılı için 3,6'dır. Türkiye'de erkeklerde en sık görülen 10 kanserden biri olup bu cinsiyette tüm kanserler içindeki oranı %2,2'dir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK), 2021 yılı ölüm sebebi istatistik verilerine göre 2021 yılında pankreas malign tümörü sebebiyle 4920 tane ölüm vakası

görülmüş, bu malign tümörler sebebiyle gerçekleşen ölümler içinde % 6'lık bir orana sahiptir (20). Pankreas tümörleri için morfolojik ve patolojik yönden %95 ten fazlası ekzokrin kaynaklı %5 den azı endokrin kaynaklıdır (21).

2.5.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Sigara

Pankreas adenokarsinomu için en yaygın risk faktörlerinden biri sigaradır (22). Yapılan çalışmalar, sigara içenlerin içmeyenlere göre 2.2 kat pankreas kanseri riskinde artışa sahip olduğunu göstermiştir (23).

Alkol

Pankreas kanseri ile alkol arasındaki ilişki yapılan çalışmalarda tüketilen alkol miktarı ile ilişkili bulunmuştur. Günde 30 gram veya daha fazla alkol tüketimi ile orta düzeyde bir pankreas kanseri riskinde artış bulmuştur (24).

Obezite

Obezite artmış pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu çalışmalarda görülmüştür. Fiziksel hareketsizlik de pankreas kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (25). Genellikle orta veya geç yetişkinlikte ölçülen vücut kitle indeksi (BMI), çoğu çalışmada pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir (26).

Cinsiyet

Dünya genelinde pankreas kanseri erkeklerde kadınlardan daha fazla görülür. Erkek kadın mortalite ve morbidite oranlarının 1'i geçtiği göz önüne alındığında, hamilelik, adet döngüsü, oral kontrasepsiyon ve hormon replasman tedavisi ile ilişkili kadın hormonlarının rol oynadığı düşünülmüş fakat çalışmalar sonucunda bu hipotezler desteklenemediğinden pankreas kanseri gelişiminin üreme faktörleri ile ilişkili olmadığı kanısına varılmıştır (27).

Yaş

İlk otuz yılda pankreas kanseri nadirdir, ancak 30 yaşından itibaren insidansı önemli ölçüde artar ve adenokarsinomların %80'inin teşhis edildiği yedinci ila sekizinci dekatta zirveye ulaşır. Ortalama tanı yaşı 65'tir (28).

Etnik Köken

İrk farklılıkları ile ilgili olarak, pankreas kanseri Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Afrikalı Amerikalılarda, Kuzey Avrupa sakinlerinde, Hawaii'de Polinezyalılarda ve Yeni Zelanda'da Maorilerde en yüksek insidansı göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Afrikalı Amerikan nüfusunun ölüm oranı, Kafkas nüfusundan 1,4 kat daha fazladır (28). Afrikalı Amerikalılar için pankreas kanseri insidans oranları Kafkasyalılardan daha yüksekken, Asyalı Amerikalılar ve Pasifik Adalılarında en düşüktür. Genel olarak, siyah insanlarda pankreas kanseri oranı riski, diğer ırk gruplarına göre yüksektir (29).

Kan Grubu

ABO kan grubu ABO sisteminin antijenleri, kırmızı kan hücresi zarlarının yanı sıra birkaç diğer normal ve patolojik hücre ve dokuların yüzeyinde ifade edilir. Dünyanın farklı yerlerinde yapılan çalışmalar sonucunda A, B ve AB kan grubuna sahip bireyler 0 grubuna kıyasla karşılaştırıldığında artmış pankreas kanseri riski bulunmuştur (29).

Diabetes Mellitus

Tip 2 diabetes mellitus, bir dizi epidemiyolojik çalışmada pankreas kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda yeni başlayan diyabet de potansiyel bir hastalık belirtisidir. Bununla birlikte, 10 yıl veya daha uzun süredir diyabeti olan bireylerde pankreas kanseri için bazı artmış riskler bildirilmiştir (30). Uzun süredir diyabeti olan hastalarda pankreas kanseri riskinde yaklaşık 2 kat artış olduğu bildirilmiştir (31).

Kronik Pankreatit

Kronik pankreatit, PDAK dahil olmak üzere pankreas malignitesi için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Yapılan geriye dönük çalışmalarda, kronik pankreatitli hastalarda pankreas kanseri riskinin 14 kat arttığını bulunmuştur (32).

Aile Öyküsü

Epidemiyologlar, aile öyküsünün genetik yatkınlıkların, paylaşılan çevrenin ve ortak davranışların sonuçlarını yansıttığını bilerek, genellikle birinci derece akrabaların aile öyküsünü genetik risk için bir belirteç olarak kullanmışlardır (33).

Pankreas kanserinde hastaların %10 kadarında ailesel bir temele sahiptir. Bir dizi klinik ortamda pankreas kanserine kalıtsal bir yatkınlık görülür. Peutz-Jeghers sendromu (PJS), melanom pankreas kanseri sendromu (MPCS) veya ailesel atipik multipl mol melanomu sendromu (FAMMM), kalıtsal meme ve over kanseri (HBOC) gibi birçok kalıtsal kanser sendromunun artan pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunlarla beraber daha az ölçüde olmak üzere Lynch sendromu (LS) ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP) de artmış pankreas kanseri riski mevcuttur. Ek olarak, kalıtsal pankreatit veya kistik fibrozlu hastalarda artmış pankreas kanseri riski mevcuttur.

PJS, gastrointestinal sistemin karakteristik hamartom polipleri ve mukokutanöz melanin pigmentasyonu ile otozomal dominant kalıtsal bir hastalıktır. Tüm PJS hastalarının neredeyse yarısında serin/treoninkinaz 11/liverkinaz B1 (STK11/LKB1) tümör baskılayıcı gen mutasyonlarını barındırır. Bu gen hücre polaritesini ve metabolizmasını düzenleyen bir serin/treonin (S/T) kinazı kodlar. Etkilenen bireylerin yaşam boyu kümülatif olarak pankreas kanseri (PK) geliştirme riski %36'dır (34).

FAMMM, iki veya daha fazla birinci veya ikinci derece akrabada atipik nevus ve malign melanom oluşumu ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Melanomların yaklaşık %10'u ailesel bir kümelenme paternine sahiptir ve CDKN2A tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlar bu ailelerin kabaca %40'ında tanımlanmıştır. PK, CDKN2A mutasyonlarına sahip akrabaların önemli bir kısmında gözlenmiştir ve yaşam boyu PK geliştirme riskinin %17 olduğu bulunmuştur.

HBOC, başka bir otozomal dominant kalıtsal kanser sendromudur ve BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ hattı mutasyonlarından kaynaklanır. BRCA2 mutasyon taşıyıcıları meme, over ve prostat kanseri riskinin yanı sıra 3.5-10 kat artmış PK riskine sahiptir. BRCA1 mutasyon taşıyıcıları için bildirilen pankreas kanseri riski ise normal popülasyonun 2,5 katıdır (34).

Hereditör nonpolipozis kolorektal karsinom sendromu olarak adlandırılan Lynch sendromuna, MSH2 (MutS homolog 2), MLH1 (MutL homolog 1), MSH6 ve PMS2 (Protein Mismatch repair System component homolog 2) yanlış eşleşme onarım (MMR) genlerindeki mutasyonlar neden olur. MMR genlerinde mutasyon olan bireylerde %5 ile %10 arasında değişen bir PK geliştirme riski vardır. Ayrıca hem MLH1 hem de MSH2 taşıyıcılarında PK riski yedi kat artmaktadır (28, 34).

FAP, yüzlerce ile binlerce kolorektal adenomatöz polipin erken gelişimi ile karakterize edilir; bu poliplerin bazıları kaçınılmaz olarak maligniteye ilerler ve 40 yaşına kadar neredeyse %100 kolorektal kanser riski vardır. Desmoid, duodenum, tiroid, beyin, ampullar, pankreas ve hepatoblastom tümörleri dahil olmak üzere ekstrakolonik kanser riski de yüksektir. FAP'a, bir tümör baskılayıcı gen olan APC (adenomatöz polipozis koli) genindeki mutasyon neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, FAP'da göreceli PDAK riskinin 4,5 ile 6 kat olduğu rapor edilmiştir (22).

Kalıtsal pankreatit, hastaların çocuklukta başlayan ve tipik olarak erken erişkinlik döneminde pankreas yetmezliği ile sonuçlanan tekrarlayan akut pankreatit ataklarından muzdarip olduğu, nadir görülen kalıtsal bir pankreatit formudur. Katyonik tripsinojen genindeki (PRSS1) mutasyonlar, otozomal dominant bir forma neden olurken, SPINK1 mutasyonlar ise otozomal resesif bir kalıtsal pankreatit formuna neden olur. Herediter pankreatitli hastaların normal popülasyona göre pankreas kanseri gelişme riski 58 kat daha fazladır (23).

Kistik fibroz, Kistik Fibrozis Transmembran Geçirgenlik Regülatörü (CFTR) genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif geçişli bir hastalıktır ve viskoz mukus üretimi ile karakterizedir. Bu da solunum yollarını bloke etmenin yanı sıra pankreas kanalının tıkanmasına da yol açarak iltihaplanma riskini artırır. Bu hastalar artmış kronik pankreatit ve pankreas kanseri riski altındadır (28).

2.5.3. Pankreas Kanseri Türleri

Endokrin Pankreas Neoplazileri

Pankreasın endokrin dokusunda oluşan ve malignite yapan pankreasın nöroendokrin tümörleri (NET), adacık hücresi tümörleri olarak da bilinir (35). Ender olarak görülen bu tümörlerin prevalansı yaklaşık 100.000 kişiden birdir (36, 37).

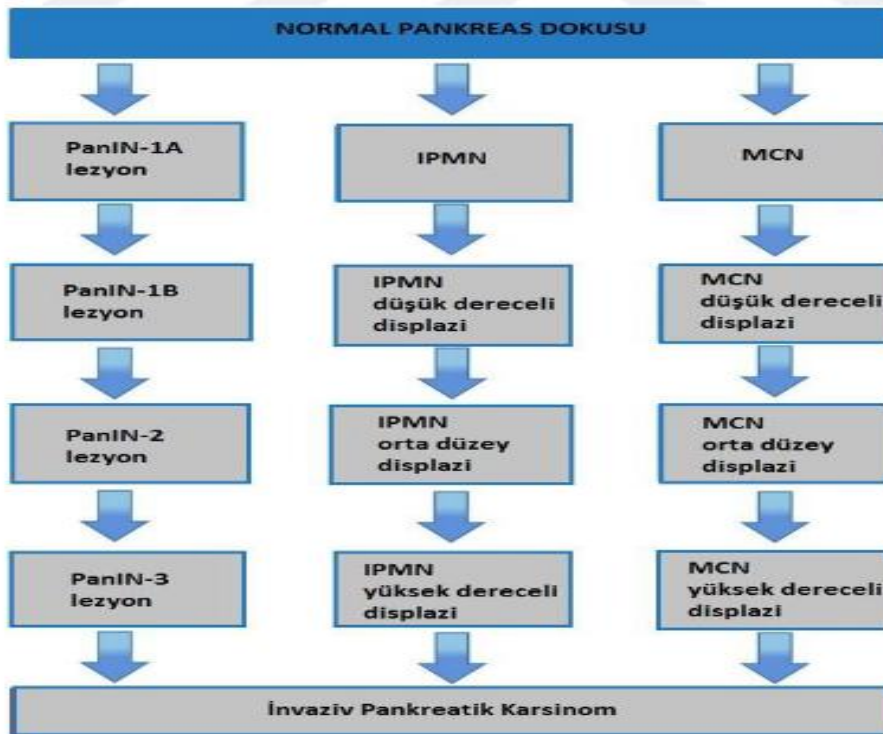
Bu tümörler, β hücreleri ve α hücreleri de dahil olmak üzere pankreas adacık hücrelerinden kaynaklanır. Pankreasta, bu tümörler sıklıkla yüksek seviyelerde insülin, gastrin, glukagon ve VIP olmak üzere pankreas hormonlarını üretirler. Bunun sonucunda da sendromlar ortaya çıkabilir (36, 38). Fonksiyonel NET'ler içinde, insülinomalar %42, gastrinomalar %24, glukagonomalar %14, VIPomalar %10, somatostatinomalar %6 oranında görülürken geri kalan ektopik ve çoklu hormon üreten neoplazmalar daha nadirdir (37).

Ekzokrin pankreas neoplazileri

Pankreas kanserinde meydana gelen en yaygın malignite çoğu pankreas başında olmakla birlikte duktal adenokarsinomdur. Pankreas adenokarsinomlarının yaklaşık %60-70'i pankreasın başında ortaya çıkar, geri kalanı gövdede (%15) ve kuyrukta (%15) bulunur (39).

2.5.4. Pankreas Kanseri Patofizyolojisi

Pankreatik duktal adeno karsinom (PDAK) olarak adlandırdığımız pankreas adenokarsinomunu daha iyi tanımlamak için moleküler patogenezinin ve karsinogenezin iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir. Bu patogeneze ve karsinogenezde, neoplastik invaziv olmayan lezyonlar bir dizi aşama ile invaziv lezyonlara dönüşür. Bu gelişimde pankreatik intra epitelyal neoplaziler (PanIN), intra duktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN) ve müsinöz kistik neoplaziler (MCN) olmak üzere 3 adet öncü lezyon mevcuttur. Bu lezyonların kendilerine özgü patolojik, klinik ve moleküler özellikleri vardır (40). Burada bahsedilen öncü lezyonların erken tespiti ve tedavisi muhtemelen hastaları invaziv pankreas kanserine ilerlemekten kurtarabilir. İnvaziv pankreas karsinomunun üç farklı morfolojik yolunun modeli şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.2) (41). PanIN'ler bu lezyonların en yaygın olanlarıdır (42).

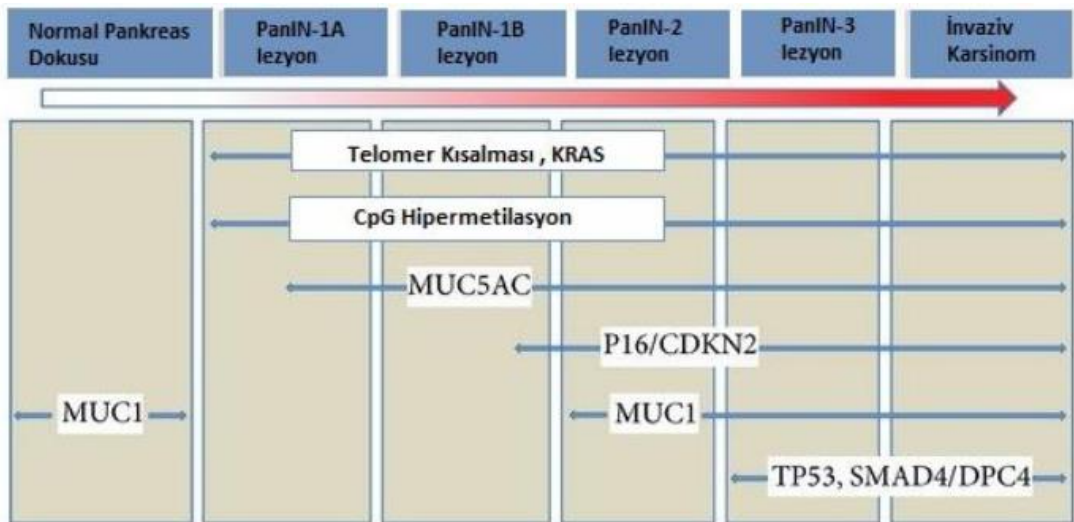


Şekil 2.2:İnvaziv pankreas karsinomunun üç farklı morfolojik yolu (41)

Pankreas İntreepitelyal Neoplazi (PanIN)

Bir PDAK'nun en önemli ve iyi bilinen öncüsü pankreas intra epitelyal neoplazisidir (PanIN). PanIN histolojisinde, küçük intralobüler pankreas kanallarından kaynaklanan mikroskopik genellikle 5 mm den küçük düz veya papiller bir lezyonlardan bahsedilir. PanIN'ler, sitonükleer ve mimari atipinin derecesine göre üç dereceye ayrılırlar. Minimal sitolojik ve mimari atipi olan düşük dereceli lezyon olan PanIN-1 kendi içinde ikiye ayrılır. PanIN-1A lezyonları bazal olarak yuvarlak ile oval üniform çekirdeklere sahip kolumnar müsinöz hücrelerden oluşan düz bir epitele sahiptir. PanIN-1B ise papiller mimariye sahiptir. PanIN-2 lezyonları, erken nükleer polarite kaybı, psödostratifikasyon ve hiperkromazi dahil olmak üzere daha fazla mimari karmaşıklığa sahiptir ve tümü orta dereceli displazi ile uyumludur. Yüksek dereceli PanIN'ler (PanIN-3) şiddetli sitolojik ve mimari atipi ile karakterizedir. Lezyonlarındaki mimari değişiklikler, düz epitelden ziyade papiller, bazen lümen nekrozu ve kümeler arasında kribriform mimariyi içerir. PanIN-3 lezyonlarının hala bazal membran içinde sınırlı olduğunu ve neoplastik epitel hücrelerinde invaziv bir büyüme olmadığını belirtmek gerekir (43).

Şekilde görüldüğü gibi PanIN'lerde erken genetik değişikliklerden telomeraz kısalması, KRAS aktivasyonu sonucunda üç tümör baskılayıcı genin [p16/CDKN2A, tümör proteini 53 (TP53) ve SMAD aile üyesi 4 (SMAD4/DPC4)] inaktivasyonu pankreas kanseri oluşumu ile ilgilidir (Şekil 2.3). p16/CDKN2A'nın inaktivasyonu, erken PanIN aşamalarında saptanabilirken, TP53 ve SMAD4/DPC4'ün inaktivasyonu, tümör ilerleme modelindeki daha sonraki değişikliklerle ilişkilidir (21, 44, 45).



Şekil 2.3: PanIN ilerleme modeli sırasında moleküler değişikliklerin özeti (41)

Intraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm (IPMN)

IPMN'ler, büyük pankreas kanallarında ortaya çıkan epitelyal müsin üreten tümörlerdir. IPMN'ler tanım gereği 5 mm den büyük çaptadırlar ve tipik olarak mevcut kanal altyapısını genişleten papiller proliferasyonlarla karakterize edilirler. IPMN'ler genellikle pankreasın başında bulunur, ancak pankreasın herhangi bir bölümünü tutabilir ve bazıları bezin tüm uzunluğunu içerebilir.

IPMN'ler makroskopik olarak üç gruba ayrılabilir: %10-35'i ana pankreas kanalında (MD), %40-65'i bir dal kanalında (BD) ortaya çıkar ve %15-40'ı hem ana hem de BD'leri (karma tip) içerir. IPMN'nin histolojik ve immünohistokimyasal özelliklerine göre intestinal, pankreatobiliyer, onkositik ve gastrik alt tipleri ayırt edilir. Histopatolojik alt tiplerin ayırıcı tanısı, transmembran proteinlerinden MUC (müsin) ekspresyonunun (MUC1, MUC2, MUC5AC ve MUC6) ve bağırsak belirteci olan homeobox transkripsiyon faktörü CDX-2'nin histomorfolojik ve immünohistokimyasal analizi ile gerçekleştirilir (41).

BD-IPMN'lerin çoğunda gastrik-foveolar histoloji bulunurken, intestinal, pankreatobiliyer ve onkositik histolojiler daha çok ana kanal tipi IPMN'lerde görülür. Çoğu bağırsak tipi olan MD-IPMN tipinde yalancı çok katlı sütunlarla kaplı papillalar, puro şekilli çekirdekleri ve müsin gibi apikal kadehi olan hücreler mevcuttur (46).

İnvaziv olmayan IPMN'ler, mimari ve sitolojik tipinin derecesine göre histolojik olarak, hafif displazili IPMN (IPMN adenomu), orta derecede displazili IPMN ve belirgin displazili IPMN (karsinoma in situ) olarak derecelendirilir. Ana kanal IPMN'leri daha yüksek derecelerde displaziye sahip olma eğilimindedir ve dal kanalı tipine kıyasla daha sık invazivkarsinom ile ilişkilidir (47).

Artan displazi dereceleri ile Kirsten Rat Sarkoma (KRAS) gen mutasyonlarının sıklığı doğru orantılıdır. TP53 ve p16/CDKN2A gen inaktivasyonunun rapor edilen sıklığı değişkendir. Ancak, SMAD4 gen mutasyonları nispeten daha nadirdir (48).

Gastrik-foveolar IPMN'ler, mide mukozasının foveolar epiteline benzeyen epitel ile döşelidir. Neoplastik epitel hücreleri, küçük bazal yönelimli çekirdeklere sahip apikal müsin içerir. Epitel genellikle düzdür ve tek bir hücre katmanından oluşur, ancak neoplastik epitel papilla oluşturabilir. Mitozlar nadirdir ve çoğu lezyonda düşük dereceli displazi vardır, ancak %10'unda orta ya da yüksek dereceli displazi mevcuttur. İmmünohistokimyasal olarak neoplastik epitel, MUC5AC ve MUC6'yı

eksprese eder, ancak MUC1 ve MUC2'yi eksprese etmez. MUC4, daha yüksek dereceli displazili lezyonlarda eksprese edilir (49).

Müsinöz Kistik Neoplazm (MCN)

MCN'ler, pankreasın müsin üreten ve septalı kist oluşturan epitelyal neoplazisi olarak tanımlanır ve belirgin bir yumurtalık tipi stromaya sahiptir. Genellikle soliterdirler ve boyları 5 ile 35 cm arasında değişir, kalın bir fibrotik duvara sahiptir ve duktal sistemle iletişimi yoktur. MCN'ler diğer öncü lezyonlara göre daha nadirdir. Kadın erkek oranı 20:1'dir. Ortalama tanı yaşı 40 ila 50 arasındadır. Vakaların %95-98'inde neoplazmin yeri pankreasın gövdesi ve kuyruğundadır (50, 51).

Makroskopik bakıda periferik kalsifikasyon ve papiller proliferasyon ile kalınlaşmış bir duvar, vasküler tutulum ve hipervasküler patern, malign değişiklikleri olan MCN'yi düşündürür. MCN'deki displazinin derecesi minimalden şiddetliye ve hatta fokal invaziv büyümeye kadar değişebilir (49).

Hücre atipi derecesi ile birlikte p53 ekspresyonu ve KRAS mutasyonu artar. MCN'lerin büyük çoğunluğu (%70-80) düşük derecelidir. Cerrahi olarak rezekte edilen noninvaziv MCN'si olan hastalar rezeksiyondan sonra tam anlamıyla iyileşir. MCN ile ilişkili invaziv karsinomu olan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı, invazyon derecesine bağlı olarak yaklaşık %50-60'tır (50).

2.5.5 Pankreas Kanseri ve Genetik

Tüm gen dizi çalışmalarında, PDAK'ın dört yaygın genetik değişikliklerle karakterize moleküler olarak heterojen bir hastalık olduğunu ortaya koyulmuştur. Bunlar onkogenik KRAS mutasyonu ve tümör baskılayıcı Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (CDKN2A), pankreas karsinomunda silinmiş 4. Lokus geni (SMAD4) ve TP53'ün inaktivasyonudur. Bununla birlikte, sayısız ek gen, tümör alt kümelerinde, tipik olarak çok düşük bir frekansta (<%10) mutasyona uğrar. Bu seyrek değişikliklerin daha fazla analizi, bunların KRAS, Transform edici büyüme faktörü- β (TGF- β) yanı sıra S-faz girişi, aksonal rehberlik, kromatin yeniden şekillenmesi, DNA ve RNA onarımı dahil olmak gibi az sayıdaki yolak ve hücresel süreçte birleştiklerini ortaya çıkarmıştır. Genetik olarak değiştirilmiş bu yollar arasındaki etkileşimlerin PDAK ilerlemesine nasıl katkıda bulunduğunu anlamak, hastalığı tedavi etmek için daha seçici ve etkili terapötik yöntemlerin geliştirilmesinde kilit bir hedeftir (44).

Onkogenler

KRAS, %95'ten fazla pankreas kanserinde mutasyona uğrar ve çoğunlukla kodondaki nokta mutasyonları tarafından aktive edilir. KRAS geni 12p3 kromozomunda yer alır ve membrana bağlı bir guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteini kodlar. KRAS geni, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, hareketlilik ve çoğalma dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel aktiviteler sergileyen GTP bağlayıcı proteinlerin RAS ailesinin bir üyesini kodlar. KRAS'ın aktive edilmiş mutasyonları, KRAS proteininin düzenlenmiş GTPaz aktivitesini ortadan kaldırır. Bu da Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyalleme kaskadının yapısal aktivasyonu ile sonuçlanır. MAPK kaskadında KRAS'tan aşağı akışta, RAF (Ras aktive edici faktör), özellikle V-Raf murin sarkomu viral onkogen homoloğu B (BRAF), V600E'nin yanlış anlamlı mutasyonu ile aktive edilir. KRAS mutasyonları pankreas karsinogenezinde erken bir genetik olaydır ve pankreas kanseri için imza olarak kabul edilir (52, 53).

Tümör Baskılayıcı Genler

Kromozom 9p üzerindeki bir tümör baskılayıcı gen olan p16/CDKN2A geni P16INK4A ve P14ARF'yi kodlar ve pankreas kanserlerinin yaklaşık %95'inde inaktive edilir. p16/CDKN2A geninin protein ürünü olan p16, hücre döngüsü ve kaybının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. P16INK4A proteini, sırayla retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu engelleyen siklin bağımlı kinaz kompleksini inhibe ederek G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünü düzenler (52).

Kromozom 17p üzerindeki TP53 tümör baskılayıcı gen, pankreas kanserlerinin %75'inde inaktive edilmiştir. TP53, p53 proteinini kodlar ve p53, hücresel stres yanıtlarında, özellikle DNA onarımını aktive ederek, büyümenin durdurulmasını indükleyerek ve hücre ölümünü tetikleyerek apoptozda önemli bir rol oynar (54). TP53 geninin mutasyonu yoluyla p53 fonksiyonunun kaybı, bu nedenle bir dizi kritik hücre fonksiyonunun kaybı yoluyla pankreas neoplazisini teşvik eder (52).

SMAD4

Pankreas kanserinde somatik olarak hedeflenen dördüncü ana gen, kromozom 18q.84 üzerindeki SMAD4 tümör baskılayıcı gendir. SMAD4 geninin protein ürünü Smad4, Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β) hücre sinyal yolunda işlev görür. SMAD4 fonksiyonunun kaybı, SMAD4'e bağımlı TGF- β yolunu ortadan kaldırır ve düzensiz hücresel proliferasyona yol açar (54, 55).

Pankreas kanserindeki SMAD4 mutasyonları, kötü prognoz ve daha yaygın olarak metastatik hastalıkla ilişkilidir. Bu dört ana gene ek olarak birkaç gen, pankreas kanserinde daha düşük frekanslarda somatik olarak mutasyona uğrar. Bunlardan genetik olarak inaktive edilmiş Ataksi Telenjektazi Mutated (ATM) genine sahip kanserler radyasyon hasarına ve poli ADP ribozpolimeraza (PARP) inhibitörüne karşı özellikle duyarlı olabileceğinden dolayı ilginç bir terapötik hedefdir (23).

PDAK'lar çeşitli büyüme faktörlerini ve reseptörlerini aşırı ifade ederler. Büyüme faktörü ligand-reseptör etkileşimlerinin aracılık ettiği akış sinyalinin anjiyogenez dahil olmak üzere PDAK'ların fenotipik özelliğinde önemli roller oynadığı düşünülmektedir.

Epidermal Büyüme Faktörü

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), hücre sel proliferasyon ve hayatta kalma sinyallerine aracılık eden membran reseptör tirozin kinazlardır. EGFR, PDAK'da aşırı eksprese edilir. EGFR'nin bir veya daha fazla ligandının aşırı ekspresyonu, hastalarda kötü prognozun bir belirteci gibi görünmektedir. PDAK EGFR'ye yönelik antikolar (örn; setuksimab) ve bunun tirozinkinaz aktivitesinin inhibitörleri (örn; erlotinib) PDAK tedavisinde değerlendirilmektedir (56).

Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

TGF- β protein ailesi, özellikle hücre sel proliferasyonun inhibisyonu olmak üzere karmaşık bir dizi fonksiyonla ilişkilidir. Pankreas kanseri hücrelerinde DPC4/SMAD4'ün inaktivasyonu, onların TGF- β 'nin büyüme önleyici etkilerinden kaçmalarına izin verebilir. TGF- β sinyalinin varsayılan promalign etkileri, invazyon ve anjiyogenezin teşvik edilmesini içerir (56).

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotelial hücre proliferasyonunu dolayısıyla anjiyogenez destekler. VEGF, pankreas kanseri hücreleri tarafından ve pankreas kanseri dokularında aşırı eksprese edilir (56).

2.5.6. Pankreas Kanserinde Sinyal Yolakları

Raf/Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) Kaskad

Hem aktive edici KRAS mutasyonları hem de büyüme faktörü reseptörü ligand etkileşimleri, pankreas kanserinde bu kademelerin aktivasyonu ile alakalıdır. Aktive

Ras, serin/treonin kinazların Raf ailesini aktive eder, sonra bir dizi fosforilasyon olayı yoluyla MAPK'yı ve onun akış aşağı efektör hücre dışı sinyalle ilgili kinazı (ERK) aktive eder. Substratlarının ERK aracılı fosforilasyonu hücre proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını destekler. Bu yolun yapısal aktivasyonu pankreas kanseri hücrelerinin büyümesine, hayatta kalmasına yol açar. Ras'in kendisini hedef almak zor olsa da, tedavileri yönlendirilmiş bu yolun aşağı akış efektörleri daha fazla araştırmayı hak ediyor (56, 57).

C-Met / Hgf Sinyal Yolakları

Protoonkogen c-met, bir transmembran olan reseptör tirozinkinaz ailesinin bir üyesini kodlar. Met reseptörü, hepatosit büyüme faktörü/saçılma faktörüne (HGF/SF) bağlanır ve bu faktör tarafından aktive edilir. Bu da proliferasyonun artmasına, motilitenin değişmesine ve invazyonun artmasına neden olur (58).

PTEN / PI3K / AKT Yolu

Kromozom 10'da silinen fosfataz ve tensin homoloğu PTEN, onkojenik PI3-K/Akt sinyal yolunun negatif düzenleyicisidir. Pten fosfatazın tümör baskılayıcı işlevi, PI3-K/Akt sinyal yolunun antagonizması ile ilgilidir (59).

Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyali, diğer büyüme faktörü ile aktive olan tirozinkinaz yollarının yanı sıra Ras tarafından da aktive edilebilir. Bu yolun efektörleri, PDAK'larda aktive edilir. Bu, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve kemorezistans sinyallerine aracılık eder. Rapamisinin memeli hedefinin (mTOR) inhibitörleri bu yolun aşağı akış bileşenlerini hedeflemek için etkili bir strateji olabilir (58, 59).

2.5.7. Pankreas Kanseri Tanısı

Klinik Bulgu ve Semptomlar

Sinsi olarak ilerleyen pankreas kanserinde ilk başvuru belirtileri tümörün lokalizasyonuna göre değişebilir. Bu kanserlerin %90'ından fazlası duktal adenokarsinomlardır ve üçte ikisinden fazlası pankreasın başında meydana gelir. Karın ağrısı, sarılık, kaşıntı, koyu renkli idrar ve akolik dışkı, karın içindeki biliyeragacın tıkanıklığının bir sonucu olarak belirtiler gösterebilir. Pankreatik gövde veya kuyruk kanserlerinin spesifik olmayan bulguları arasında açıklanamayan kilo kaybı, anoreksiya, erken doyma, hazımsızlık, bulantı ve depresyon yer alır (60). Pankreas kanseri için fizik muayene bulguları da değişkendir. Hastalar erken

dönemde normal muayene bulguları ile veya ileri evrelerde karında hassasiyet, sarılık, kaşeksi gibi karaciğer tutulumu bulguları ile başvurabilirler (60).

Tanı Testleri

Mortalitesi yüksek kanser türlerinden biri olan pankreas kanseri için tanı aşamasında basit, ucuz, kolay ulaşılabilir, invaziv olmayan, hastaya zarar verme olasılığı en düşük tetkiklerden başlanır. Pankreatik duktal adenokarsinomlar için en yaygın serum tümör belirteci, pankreas ve hepatobiliyer hastalıkta eksprese edilen karbonhidrat (CA19-9) antijenidir. Bununla birlikte, CA 19-9 tümöre özgü değildir; bu nedenle asemptomatik hastalar için yeterli bir bireysel tarama aracı değildir. CA 19-9, %50 ila %75 arasında sınırlı bir duyarlılığa ve %80 ila %85 özgüllüğe sahiptir kanser ve kronik pankreatit ve muhtemelen kronik inflamasyonlu diğer hastalık durumları arasında ayırım yapamaz (60).

Ultrasonografi (US)

Abdominal ultrason (US), genellikle sarılık ve karın ağrısı ile başvuran hastalarda koledokolitiazis ekarte etmek ve safra dilatasyonu aramak için yapılır. Pankreas tümörlerini teşhis etmek için geleneksel US'nin gerçek dünyadaki doğruluğu %50 ila %70'dir. US'nin sonuçları büyük ölçüde operatöre bağlıdır. Pankreatik etiyojolojiyi düşündüren belirti ve semptomları olan bir hastada ilk US, koledokolitiazisi dışlarsa, daha ileri değerlendirme için yaygın olarak BT veya MRG kullanılır (61).

Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Çok kesitli bilgisayarlı tomografi (ÇKBT), birçok tıbbi kurumda pankreas kanseri şüphesi olan hastalarda en önemli görüntüleme yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır. Özellikle kesitsel görüntüleme modalitelerinden ÇKBT, tümör rezektabilitesini öngörmeye en önemli faktör olan vasküler tutulumun değerlendirilmesinde en iyi performansı göstermiştir. Pankreas kanserinin rezektabilitesini öngörmek için bildirilen pozitif prediktif değer, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %89, %100 ve %72'dir (62).

Pankreas protokollü BT (BT anjiyografi) ise ameliyat öncesi evreleme ve rezektabilite değerlendirmesi pankreas protokollü BT veya BT anjiyografi kullanılarak yapılabilir. Pankreas protokol BT'nin rezektabiliteyi belirlemede pankreas dışı protokol kontrastlı ÇKBT'den üstün olduğu yaygın olarak kabul edilse de, bunu destekleyecek yeterli doğrudan kanıt yoktur (61).

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), Manyetik Rezonans Kolanjiyopankreatikografi (MRCP)

Son yıllarda, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) tarayıcıları ve görüntüleme teknikleri daha gelişmiş hale gelmesi, görüntüleme kalitesinde ve tanısal doğrulukta gelişmelere yol açmıştır. MRG'nin daha yüksek yumuşak doku kontrastlanması, küçük tümörlerin tespit ettiğinden BT'ye kıyasla bu durumlarda daha üstündür. MRCP aynı zamanda pankreatik duktal sistemin invaziv olmayan bir şekilde tanımlanması için çok başarılı ve klasik bir MR tekniğidir ve ERCP'ye değerli bir alternatiftir. MRCP, küçük bir kitlenin varlığını düşündürebilecek ince duktal daralmayı tespit etmek için de kullanışlıdır (62).

Endoskopik Retrograd Kolanjiyopankreatografi (ERCP)

Endoskopik Retrograd Kolanjiyopankreatografi (ERCP), pankreatobiliyer maligniteleri bilinen veya şüphelenilen hastalarda tanı ve palyasyon amacıyla kullanılır. İğne aspirasyonu, fırça sitolojisi ve forseps biyopsisi kullanılarak doku teşhisi yapılabilir. Pankreas ve biliyer kanserli hastalarda safra yolu tıkanıklığının palyasyonu, ERCP ile biliyer stent yerleştirilmesi de sağlanabilir (61).

Endoskopik Ultrasonografi (EUS)

Endoskopik ultrasonografi (EUS), endoskopun ucunun yüksek frekanslı bir dönüştürücü ile donatıldığı bir US tekniğidir. Yapılan çalışmalarda, EUS ve kontrastlı EUS ve EUS kılavuzluğunda ince iğne aspirasyonu (EUS-FNA) küçük kanserlerin tespiti, pankreas solid veya kistik lezyonlarının ayırıcı tanısı, evrelemesi ve klinik değerlendirmesinde önemli bir rol oynamaktadır (63).

Pankreas lezyonlarının saptanması açısından BT ve EUS karşılaştırıldığında, EUS ve CT'nin duyarlılıkları sırasıyla %94 ve %74 olarak belirlenmiştir. Vasküler invazyon açısından yapılan değerlendirmede ise EUS'un duyarlılığı ve özgüllüğü % 88 ve % 93 iken BT'nin sırasıyla % 58 ve % 95 olarak saptanmıştır (64).

Pozitron Emisyon Tomografisi

Pozitron emisyon tomografisi (PET-BT) PDAK için çoğunlukla malign hücrelerin artan glikoz metabolizması ilkesine dayanan radyo izleyici ¹⁸F flor-2-deoksi-D-glukoz (FDG) ile gerçekleştirilir. Görüntülemenin ilk tanıdaki rolü, sadece iyi huylu ve kötü huylu tümörleri ayırt etmek değil, aynı zamanda, rezektabilitenin doğru bir şekilde

değerlendirilmesini sağlamaktır. PET-BT nin de kullanım zorlukları mevcuttur. Yanlış negatif ve yanlış pozitif bulgular bulunabilmekle birlikte küçük tümörler gözden kaçabilir (65).

Patolojik değerlendirme

Pankreas kanseri tanısında patoloji, tanı koymada altın standarttır. Pankreastan nasıl örnek alındığına bağlı olarak, elde edilen materyaller sitolojik veya histolojik değerlendirilebilir (66). Sonuç olarak; PDAK pankreas kitlesinin ana nedeni olarak kabul edilir, ancak pankreasta diğer birçok neoplazma ve iyi huylu durum tespit edilebilir. Farklı tipte pankreas kitlelerini ayırt etmek önemlidir. Çünkü patolojik tanı doğrulaması en iyi tedaviyi oluşturmak için oldukça önemlidir (66).

2.5.8. Pankreas kanseri evreleme

Pankreas kanserlerinin evrelendirilmesinde, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) evrelendirilme sistemi kullanılmaktadır. Tablo 2.1 ve Tablo 2.2 'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1:TNM evrelemesi-AmericanJointCommittee on Cancer (AJCC) 8. Baskı (67)

Primer Tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ (PanIN-III sınıflandırmasını da içerir)
T1	En büyük boyutu 2 cm veya daha küçük olan tümör
T1a	Tümör en büyük boyutu 0,5 cm veya daha az
T1b	Tümör 0,5 cm'den büyük ve en büyük boyutu 1 cm'den küçük
T1c	Tümör 1 cm'den büyük ancak en büyük boyutu 2 cm'den fazla değil
T2	Tümör 2 cm'den büyük ama en büyük boyutu 4 cm'den fazla değil
T3	Tümör ve en büyük boyutu 4 cm'den fazla
T4	Tümör çölyak eksenini, superiormezenenterik arter ve/veya ortak hepatik arteri içerir
Bölgesel Lenf Düğümleri	
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1 ila 3 bölgesel lenf düğümünde metastazlar
N2	4 veya daha fazla bölgesel lenf düğümünde metastaz
Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Tablo 2.2:Prognostik Evreleme-AmericanJointCommittee on Cancer (AJCC) 8. Baskı(67)

EVRE	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1, T2, or T3	N1	M0
III	T1, T2, or T3	N2	M0
III	T4	Herhangi bir N	M0
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.5.9. Pankreas Kanseri Tedavi

Pankreas kanseri tedavi seçenekleri arasında cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olup, malignite aşamalarına bağlı olarak bu yöntemler tek başlarına ya da birlikte kullanılmaktadır. Pankreas kanserinde tedavi, hastalığın evresi, hastanın performans durumu, hasta ve ailesinin tedavi hedeflerine göre yapılır. Pankreatik adenokarsinom için tek potansiyel küratif tedavi cerrahidir, ancak hastaların sadece %10-20'sinde tedavi öncesi evrelemeden sonra açıkça rezektabl hastalık ile başvururken yaklaşık %50'si metastatik hastalık (evre 4) ile karşımıza çıkar (68).

Bununla birlikte, küratif cerrahiden sonra bile, lokal ve uzak relapsların yüksek sıklığı nedeniyle ortanca sağkalım 15-20 ay ve 5 yıllık sağkalım %8 ile 15 arasındadır. Bu nedenle cerrahi tedavi, multimodal tedavi olarak da bilinen tam bir tedavi dizisine entegre edilmelidir (69).

Cerrahi Tedavi

Cerrahi olarak pankreatikoduodenektomi (Whipple prosedürü), distal pankreatektomi ve total pankreatektomi olmak üzere 3 ana rezeksiyon tipi vardır. Bu prosedürler rezeksiyonun kapsamı ve alınan lenf nodları açısından standardize edilmiştir (68).

Pankreas baş ve unsinat proseteki pankreas kanserleri için standart cerrahi yöntemi Whipple prosedürüdür (70). Pankreasın gövdesi ve kuyruğundaki lezyonlar için distal pankreatektomi endikedir. Pankreasın gövde ve kuyruğundaki rezektabl tümörler genellikle olumlu bir prognoz taşıdığından, rezeksiyon mümkünse distal pankreatektomi yapılmalıdır. Splenik ven veya arter tutulumu rezeksiyon için bir kontrendikasyon değildir (71).

Pankreas kanserinde genişletilmiş lenfadenektominin faydalı olduğuna dair bir kanıt yoktur. Standart lenfadenektomi, hepatoduodenal ligaman, ana hepatik arter, portal ven, sağ taraflı çölyak arter lenf düğümü ve SMA'in sağ yarısındaki lenf düğümlerinin diseksiyonunu içerir. LNR \geq 0.2 negatif bir prognostik faktör olduğundan, lenf nodu oranı (LNR, tutulan LN sayısı/incelenen LN sayısı) belirtilmelidir (72).

Kemoterapi ve Radyoterapi

Bu tedavide kanser hücrelerinin yok edilebilmesi için çeşitli ilaçlar kullanılır. Evre 0 (in situ karsinoma), 1A, 1B ve 2A pankreas kanseri tedavisinde cerrahi rezeksiyon ilk ve en iyi seçenektir. Ameliyattan sonra, kalan kanser hücrelerini yok etmeye ve nüksü önlemeye yardımcı olmak için adjuvan kemoterapi veya radyasyon tedavisi verilebilir.

Evre 2A, Evre 2B ve Evre 3 pankreas kanserlerinin konumuna bağlı olarak, tedavi genellikle ameliyattan önce tümörü küçültmek için neoadjuvan tedavi ile birlikte rezeksiyon içerir. Sınırdaki rezektabl pankreas kanseri yakındaki dokulara, organlara veya büyük bir kan damarına büyümüştür. Tümörü çıkarmak mümkün olsa da, cerrahlar tümörü ameliyatla tamamen çıkaramayabilirler. Ameliyattan sonra kalan kanser hücrelerini yok etmeye yardımcı olmak için kemoterapi veya radyasyon yoluyla adjuvan tedavi uygulanabilir (73).

Evre 4 metastatik kanser için en yaygın tedavi kemoterapidir, ancak klinik araştırmalar ek seçenekler sunabilir. Ameliyat, diğer organlara yayıldığı için bu tip pankreas kanserini tamamen ortadan kaldırmaz. American Klinik Onkoloji Derneğine (ASCO) göre, pankreas kanseri hastalarının yaklaşık yüzde 45 ila 55'i bu aşamada teşhis edilir (73).

Neoadjuvan tedavi ise rezeke edilemeyen tümörleri rezektabl tümörlere dönüştürmeyi ve mikroskobik tam tümör rezeksiyon oranlarını artırmayı amaçlayan herhangi bir preoperatif tedavi olarak tanımlanır (74).

Mayo Clinic bolus 5-FU programını kullanan Gemsitabin(GEM) veya 5-Flourourasil (5-FU) ile adjuvan kemoterapi R0/R1 rezeke edilen hastalarda 5 yıllık sağkalım oranını %9'dan %20'ye yükseltir. Bununla birlikte, GEM tedavisi, bolus 5-FU'ya kıyasla daha az toksikdir. Hastalar ayrıca R1 rezeksiyonundan sonra adjuvan kemoterapiden de yarar görmüştür (72).

Pankreas kanserinin tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve yaşam süresinin kısa oluşu nedeniyle yeni terapötik stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Tümör hücrelerini daha etkili bir şekilde hedefleyebilen ve nüksetme insidansını azaltabilen yeni ilaçlara kritik bir ihtiyaç vardır. Telomeraz inhibitörleri, kanser hücrelerinin yeniden büyümesini durdurması nedeniyle özellikle çok uygun olduğu öne sürülmüştür.

2.6. TELOMER

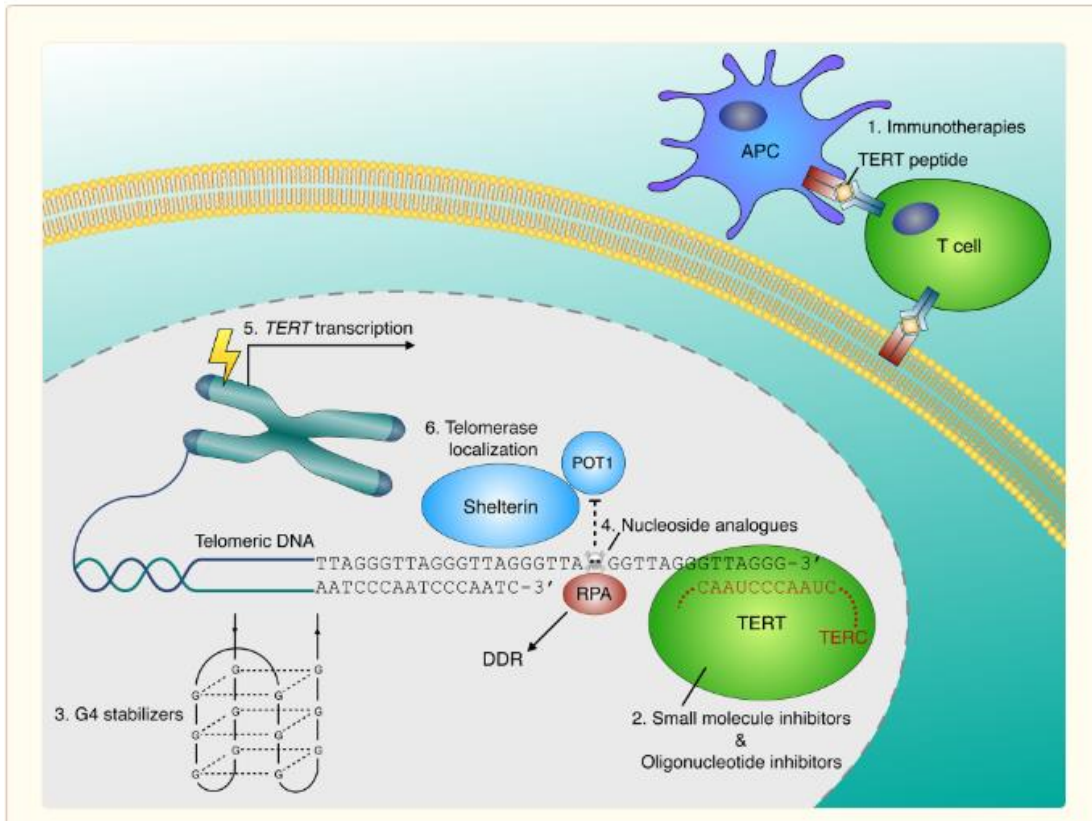
Telomerler 25 kb'ye kadar diziler halinde tekrarlayan (TTAGGG) nükleotid dizileridir. Her hücre bölünmesi döngüsünden sonra yaklaşık 30–200 bp kısalırlar (1, 75). Doğrusal DNA moleküllerinin yarı-koruyucu replikasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan son replikasyon kayıplarını önlemede anahtar rol oynarlar. Ayrıca kodlama dizisi erozyonuna ve sonuçta DNA hasarı onarımına karşı koruma sağlarlar. Bu da genom kararsızlığı, kromozomal füzyonlar ve yeniden düzenlemelerle sonuçlanır. Anormal telomer uzunluğu birçok kanserde tanımlanmıştır. Bu nedenle telomeraz ve telomer uzunluğunun kontrolü, insanlarda tümör oluşumu süreciyle yakından bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

İnsan telomeraz kompleksi, telomeraz ters transkriptaz (hTERT), telomeraz RNA, telomeraz ile ilişkili protein-1 ana bileşenlerinden oluşur. Telomer uzunluğu, her hücre bölünmesi sırasında kademeli olarak telomerik DNA sekansı (TTAGGG) kaybı nedeniyle giderek kısalır ve telomerlerin kritik bir eşiğin ötesinde kısalması, replikatif yaşlanmaya veya apoptoza yol açar. hTERT, tek zincirli TTAGGG tekrarlarını sentezlemek için bir RNA şablonu (TERC) kullanır. Sonuç olarak telomeraz, heksametik DNA tekrarlarını (TTAGGG) telomerlerdeki DNA zincirlerinin 3'yan ucuna ekleyerek telomer uzunluğunu korur (76, 77).

Telomeraz tarafından eklenen TTAGGG tekrar dizileri, insan kromozomlarının uçlarını belirtir. Altı telomere özgü proteinden oluşan bir kompleks, bu diziyi birleştirir ve kromozom uçlarını korur. Üç kompleks alt birimi, telomer tekrar faktörü 1 (TRF1), telomer tekrar faktörü 2 (TRF2), telomer 1'in korunması (POT1), TTAGGG tekrarlarını doğrudan tanıyarak bunlara ek olarak 3 barınak proteini, baskılayıcı/aktivatör protein 1 (RAP1), TRF1 ve TRF2-etkileşimli nükleer protein 2 (TIN2) ve TINT1/PTOP/PIP1 proteini (TPP1) ile birbirine bağlanır. Bunlar hücrelerin telomerleri DNA hasarı bölgelerinden ayırt etmesine izin veren bir kompleks oluştururlar. Barınağın koruyucu

aktivitesi olmazsa, telomerler artık DNA hasarı gözetiminden gizlenemez ve kromozom uçları DNA onarım yolları tarafından uygunsuz bir şekilde işlenir (78, 79).

Telomerazı hedeflemeye yönelik çeşitli yaklaşımlar olmuştur. Bunlar; TERT tümörle ilişkili antijenleri tanıyan immünoterapilerden, doğrudan telomerazı bağlayan, telomer uzantısını baskılayan küçük molekülü inhibitörlere, oligonükleotidlere, nükleosid analoglarının yeni uzatılmış telomere dahil edilmesi yoluyla telomer disfonksiyonunun indüklenmesine, TERT gen ekspresyonunu hedefleyen G-Kuadrupleks stabilizasyon gibi telomeraz regülasyonunu veya işlevini bozan dolaylı yöntemlerden oluşur (Şekil 2.4) (80).



Şekil 2.4: Telomerazı hedeflemek için terapötik stratejiler: Telomerazı hedeflemeye yönelik yaklaşımlar şunları içerir: **1.** İmmünoterapiler - Peptid veya DNA aşılıları, telomeraz eksprese eden kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkilerini uyaran immünojenik TERT epitoplari sağlar. Adapte olan hücre transfer terapileri, telomeraza özgü sitotoksik T-hücrelerinin infüzyonunu gerektirir. **2.** Direkt telomeraz inhibitörleri – küçük moleküller TERT'ye bağlanabilir ve bunun katalitik aktivitesini inhibe ederek kademeli telomer aşınmasına neden olabilir. Alternatif olarak, TERC şablon bölgesini tamamlayan oligonükleotidler, rekabetçi telomeraz inhibitörleri olarak hareket edebilir. **3.** G-dörtlü (G4) stabilizatörleri, telomerik G-dörtlü DNA'nın çözünürlüğünü bloke ederek telomeraz fonksiyonunu bozar. **4.** Nükleosid analoglarının yeni sentezlenmiş telomere dahil edilmesi, POT1 bağlanmasını bozarak, bir DNA hasar yanıtı (DDR) ve hücre ölümü ortaya çıkaran telomer işlev bozukluğuna neden olur. **5.** TERT gen ekspresyonunu hedefleme - TERT promotör mutasyonları (TPM'ler), kanserde TERT ekspresyonunu yeniden aktive eden ETS transkripsiyon faktörleri için yeni bağlanma bölgeleri oluşturur Mutant TERT promotörünün hedefleme düzenlemesi, ortaya çıkan bir yaklaşımı temsil eder. **6.** Telomeraz lokalizasyonunun bozulması – TCAB1 ve barınak alt birimlerinin aracılık ettiği telomeraz alımına müdahale, telomer işlev bozukluğuna neden olur (80).

2.6.1 Telomerazı Hedeflemek İçin Terapötik Stratejiler

İmmünoterapiler

Kanser hücreleri tarafından üretilen endojen TERT peptitleri, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I veya II molekülleri tarafından tanınabilir ve adaptif immün yanıtları tetikleyebilir. TERT peptit aşılı, klonal genişleme sırasında telomerazı eksprese eden hematopoietik hücrelere karşı potansiyel otoimmün tepki oluşması endişelerine neden olmuştur. Ancak, erken aşama klinik denemelere ilerlemiştir. Örneğin, TERT peptit aşılı UV1, metastatik hormon kullanmamış prostat kanserli hastaların %86'sında bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmıştır (81).

Bununla birlikte, TERT aşılına verilen bağışıklık yanıtlarının, hastalığın ilerlemesini kontrol etmede yetersiz olduğu kanıtlanmıştır. Dört aşı, faz II denemelerine ilerlemiştir, bunlardan bir TERT aşısı (GV1001) faz III'e ilerlemiştir. Yapılan çalışmalarda ilerlemiş pankreas kanseri olan hastalarda GV1001'in faz III çalışması, kemoterapiye göre herhangi bir sağkalım avantajı gösterememiştir (69, 80).

Oligonükleotid İnhibitörleri

Oligonükleotid inhibitörleri, arasında doğrudan bir telomeraz inhibitörü olan imetelstat klinik deneylere ilerlemiştir. Imetelstat, telomeraz aktivitesini rekabetçi bir şekilde inhibe eden, kanser hücresi canlılığını ve tümör büyümesini baskılayan TERC şablon bölgesini tamamlayan lipitlenmiş bir 13-mer tiyofosforamidatoligonükleotittir. Imetelstat'ın etki mekanizması antisens temelli bir yaklaşımdır. Aksine, yüksek afinite ile bağlanarak insan telomeraz enzimatik aktivitesinin rekabetçi bir inhibitörü olarak etki eder (82).

Ayrıca imetelstat, uzun bir gecikme süresinin ardından bir DNA hasar yanıtının aktivasyonu ve hücre ölümü ile sonuçlanan kademeli telomer aşınmasını uyarmaktadır (76, 80).

Yapılan çalışmada ilerlemiş küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan hastalarda imetelstat faz II çalışmasında progresyonsuz sağkalımda (PFS) veya genel sağkalımda (OS) herhangi bir iyileşme göstermezken, kısa telomere sahip hastalarda sağkalımda iyileşme eğilimi gözlenmiştir (80).

Küçük Moleküllü İnhibitörler

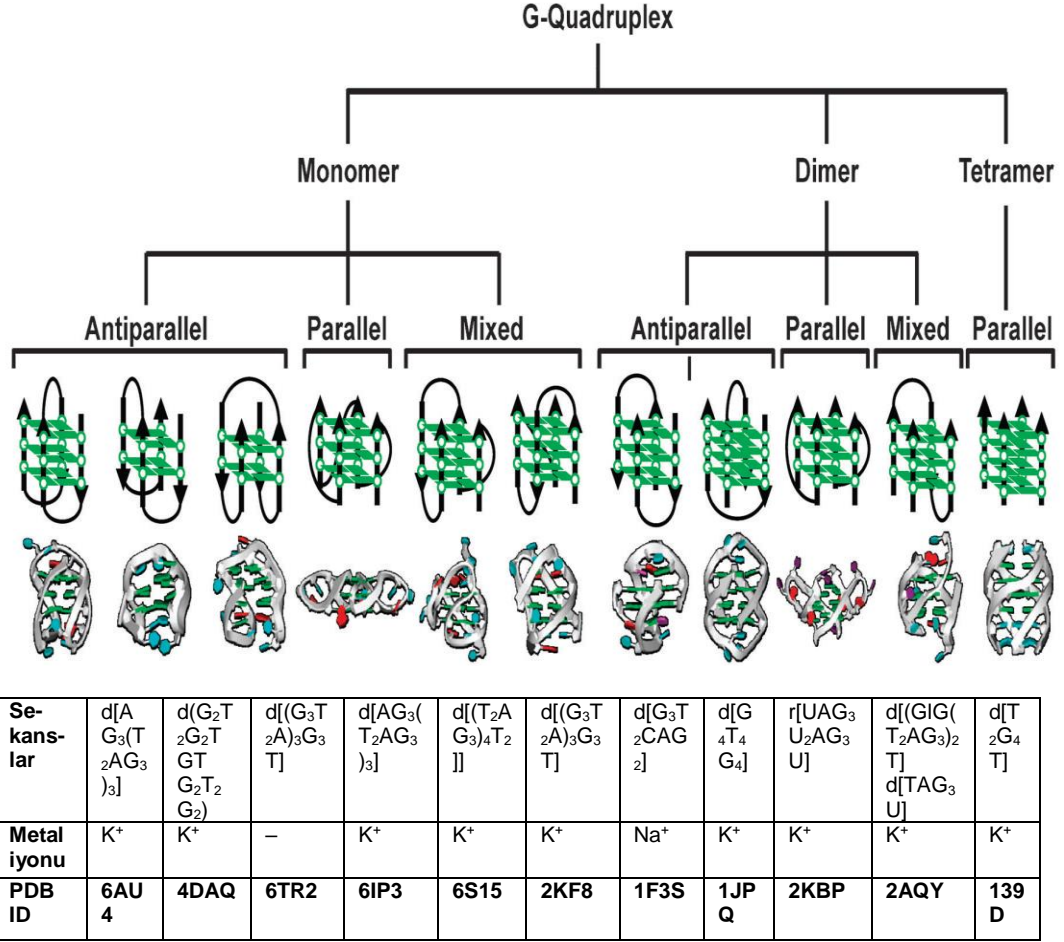
Telomerazı hedeflemeye yönelik oligonükleotid ve immünoterapötik yaklaşımlar klinik gelişimde en fazla ilerleme kaydetmiştir. BIBR1532 (2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoicacid) gibi küçük moleküllü inhibitörler umut verici prelinik sonuçlar üretmiştir. TERT'nin korunmuş bir hidrofobik cebine bağlanarak ve TERC'nin aktivasyon alanı ile etkileşimleri bozarak telomeraz düzenliğini bozduğu ortaya konmuştur (80, 83). BIBR1532, kanser hücrelerinde progresif telomer kısalmasına ve uzun süreli tedaviyi takiben replikatif yaşlanmaya aracılık eden rekabetçi olmayan küçük moleküllü bir telomeraz inhibitörüdür (83).

G-Kuadrupleks Gruplar

G-Kuadrupleks yapılar, guanin bazlarının hidrojen bağı ve kation koordinasyonu ile stabilize edilmiş istiflenmiş düzlemsel tetradlar oluşturduğu dört sarmallı ikincil nükleik asit yapılarıdır. G-Kuadrupleks sekonder yapılar, telomerler dahil guanin açısından zengin DNA veya RNA dizilerinde oluşabilir. Bu yapılar, kare bir düzlemsel düzenlemede dört guanin bazı arasında hidrojen bağıyla oluşturulan guanin tetrad yığınlarını içerir. Telomerik G-Kuadrupleks gruplar, telomer uzamasından önce DNA helikazları tarafından çözülür (84).

G-Kuadrupleks DNA, ağırlıklı olarak onkogen bcl-2, VEGF, c-myc, c-kit gibi genlerin kromozomal telomerik dizilerinde ve promotör bölgelerinde bulunur. Normal somatik hücrelerde insan telomerik DNA'sı, hücre bölünme döngüsü başına 50–200 bp oranında kısalır ve sonuçta birikmiş telomer kısalır hücre yaşlanması ve apoptoz ile sonuçlanır. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde telomer kısalması yerine telomer bakımı ve uzaması hakimdir. Bu, kanser hücresi çoğalması ve ölümsüzleşmesinin temelidir. Bu hücre çoğalmaları normal hücrelerde sessiz olan ancak kanser hücrelerinin %85-90'ında görülen yüksek telomeraz aktivitesine bağlanmaktadır. Aktif telomeraz, telomeri uzatmak için telomerik DNA'nın 3'-çıkıntısı ile hibritlenir, böylece kanser hücrelerinde telomerik DNA bütünlüğünü korur. Telomerik DNA'nın 3'-çıkıntısı içinde G-Kuadrupleks yapılarının oluşumu, telomeraz hibridizasyonunu bloke ederek telomeraz aktivitesinin inhibisyonuna neden olur (85).

G-Kuadrupleks yapıların sınıflaması, sekans yapıları ve örnek PDB kodları şekil 2.5'de verilmiştir. Bu çalışmada kullandığımız fitalosyanin molekülleri telomerik G-Kuadrupleks 4DAQ yapısına in-slico yüksek enerji ile bağlanmaktadır (86).



Şekil 2.5:İnsan genomundaki G-Kuadrupleks yapıların sınıflaması, nükleotid sekansları ve PDB veri tabanındaki kristal yapıların kodları (86)

G-Kuadrupleks stabilizörler, klinik öncesi çalışmalarda antikanser etkiler ortaya çıkarmıştır, ancak sınırlı klinik geliştirme geçirmiştir. Örneğin, G-Kuadrupleks stabilizatör telomestatin, lösemi ksenogreft modellerinde telomeraz aktivitesini ve tümör büyümesini baskılamıştır. Bu tür bileşikler sınırlı absorpsiyon sergilerler. Gelecek vaat eden bir başka örnek olan G-Kuadrupleks stabilizatör (BRACO-19), bir rahim kanseri hücre dizisinde (UXF1138L) telomerlerin önemli ölçüde kısalduğunu göstermiştir (87). Bu bileşik, bir G-Kuadrupleks yapıya in-silico olarak yerleştirilip daha sonra potansiyel bir antikanser ilacı olarak patentlenmiştir (88).

Bununla birlikte, telomerik olmayan G-Kuadrupleks gruplar için afinite, kabul edilemez toksisiteye yol açabilir. G-Kuadrupleks motifleri en çok telomerlerde aşırı temsil edilse de, hesaplamalı analiz, insan genomundaki 300.000'den fazla bölgede potansiyel G-Kuadrupleks grup oluşumu olduğu öngörülmüştür. Bu nedenle, daha fazla telomer spesifik G-Kuadrupleks ligandları tanımlamak için, in vivo telomerlerde hangi G-Kuadrupleks yapılarının kararlı bir şekilde oluştuğunu belirlemek esastır.

Genomdaki çok sayıdaki G-Kuadrupleks ve telomerlerdeki G-Kuadrupleks gruplar arasındaki yapısal benzerliğin, G-Kuadrupleks ligandların seçiciliğini engelleyip engellemeyeceği henüz görülmemiştir (80).

Kanser hücrelerindeki G-Kuadrupleks mRNA'lar kanserle ilişkili genleri açık tutar ve böylece hücre bölünmesinin yeniden başlatılmasını sağlar. Kanser hücrelerinde G-Kuadrupleks yapıları stabilize eden ligandlar, telomerazın telomere bağlanmasını engelleyerek telomerlerin sürekli uzamasını ve hücre bölünmesini kesintiye uğratar. Bu nedenle, ümit verici antikanser ilaçlar olarak kabul edilmektedir (89, 90).

Tek sarmallı telomerik DNA'nın dörtlü bir yapıya katlanması, telomeraz enzimini inhibe ederek apoptoz yolları ile hücre ölümünü etkiler. Telomeraz ekspresyon seviyeleri, kanser ilerlemesi ve metastatik durum ile ilişkilidir ve kanser hücresi büyümesine yönelik düzenleyici potansiyeli kanıtlanmıştır. Literatürde G-Kuadrupleksleri stabilize eden küçük moleküller için alkaloidler, flavonoidler, porfirinler, antrakinonlar, antrasiklinler gibi bileşikler değerlendirilmektedir (91).

Nükleosid Analogları

Nükleosid analogları telomeraz katalitik aktivite inhibitörleri, kritik telomer erozyonu, replikatif yaşlanma ve hücre ölümü aracılı bir DNA hasar tepkisini tetikleyene kadar, birbirini izleyen DNA replikasyon turları ile tedrici telomer yıpranmasına dayanır (80).

Yapılan çalışmalarda telomer DNA dizisine ikame edilmiş 5-floro-2'-deoksiüridin (5-FdU) içeren nükleotitlerin, temel telomer uç bağlama komplekslerinin bağlanmasını engellediğini gösterilmiştir. Hücre hatlarında, 5-FdU'nun uygulanması, aktif telomerazın varlığına bağlı bir şekilde telomerik DNA hasarı tepkilerini ve müteakip hücre ölümünü indüklemiştir. Bu bulgular, kanser karşıtı ajan 5-FdU için alışılmadık bir etki mekanizmasını ortaya koymuştur (92).

TERT Gen İfadesini Hedefleme

Telomer uzunluğu kritik derecede kısaldığında, replikatif yaşlanmayı veya apoptozu tetikler. Hekzamerik DNA tekrarlarını (TTAGGG) DNA sarmallarının 3' yan ucuna dahil ederek telomer uzunluğunu korumak, bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomerazın işlevidir. İnsan telomerazı, RNA şablonunu (TERC) ve RNA'ya bağımlı DNA polimeraz insan telomerazı ters transkriptazı (hTERT) içerir. TERC,

hTERT aracılı telomer uzantısı için bir şablon görevi görür. Ek olarak, hTERT, düzgün çalışması için barınak olarak bilinen altı proteinli bir kompleks dahil olmak üzere birkaç proteinle birleşir. Pankreas kanserlerinde de TERT ekspresyonu ve telomeraz aktivitesi önemli ölçüde daha yüksektir. PDAK'da yüksek aktif telomeraz insidansı, telomerazı hedeflemenin bu hastalığın tedavisi için umut verici bir strateji olduğunu düşündürmektedir (93).

Kusumoto ve meslektaşları, adenovirüs aracılı p53 gen transferinin insan pankreas kanseri hücrelerinde telomeraz aktivitesini inhibe ettiğini gösterdiler (94). Daha sonra Xu ve arkadaşları, vahşi tip p53'ün bir p53-Sp1 kompleksi oluşturarak Htert proksimal promotörüne Sp1 bağlanmasını inhibe ettiğini ve böylece telomerazın inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (95).

Telomeraz Lokalizasyonu ve Katalizinin Düzenlenmesi

Telomeraz holoenzim kompleksi, telomerazı kontrol eden ve TERC CR4/5 RNA alanının konformasyonunu düzenleyerek telomeraz katalizini uyaran bir RNA iskele proteini olan Telomeraz Cajal Body Protein 1'i (TCAB1) içerir. Bunun kaybı telomeraz lokalizasyonunu bozar ve telomer uzantısını bozar. TCAB1 tükenmesi, ksenograft tümörlerin büyümesini baskılar. Bu, TCAB1'in potansiyel bir antikanser hedef olabileceğini gösterir (80). Barınak kompleksi, telomeraz aktivitesini düzenleyen ve 3' telomerik çıkıntıyı ayırarak ve kromatini sıkıştırarak kromozom uçlarının yanlışlıkla bir DDR'ye bağlanmasını önleyen altı alt birimden (TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 ve TPP1) oluşur. Barınma kompleksi bileşenlerinin genetik ablasyonu, telomer kapağının açılması yoluyla telomer disfonksiyonuna neden olur. Yapılan bir çalışmada bir p53-null KrasG12V akciğer adenokarsinomu fare modelinde telomer uzantısı TRF1'in negatif düzenleyicisinin sistemik tükenmesi, kontrol farelerinin canlılığını açıkça tehlikeye atmadan telomer disfonksiyonuna ve bozulmuş tümör gelişimine neden olmuştur (96).

2.7. ANTRAKİNONLAR

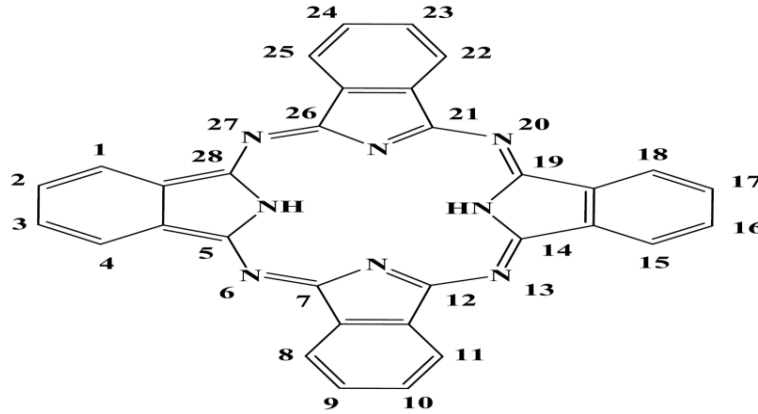
Antrakınonlar, benzokınonlar ve naftakınonlarla birlikte kinon ailesinin bir sınıfıdır. Bu sınıfın en temel yapısı, üçbenzen halkası ve merkezi halkada iki keton grubu içermesidir. Antrakınonlar 9,10-antrakınon,9,10-diksoantrasen ve de 9,10-antrasendion olarak da isimlendirilir. Doksorubisin klinik kullanımı olan prototip moleküldür. Yapılan çalışmalarda doğal antrakınonların antikanser, anti-inflamatuar,

immünoşpresif, antimikrobiyal, diüretik, damar gevşetici, antioksidan ve fitoöstrojen aktiviteleri gibi çok farklı biyoaktivitelere sahip olduğunu gösterilmiştir (97).

Sitotoksik antikanser ajanların en yaygın olarak reçete edilen antikanser ilaç sınıfı, bir antrokinon parçası içeren antrasiklinlerdir. Bu ilaç sınıfının öncüsü *Streptomyces peucetius* bakteri türünden elde edilen daunorubisin ya da daunomisin (98).

2.7.1. Ftalosiyanimler

Ftalosiyanimler dört izoindolinin azot atomları ile bağlanmış, 16 üyeli, delokalize 18 π elektron sistemine sahip, 2 boyutlu, makrosiklik bileşiklerdir. Sayısız metal atomları ve yarı metallerin ve bazı ametallerin merkezdeki hidrojen atomları ile yer değiştirerek oluşturulan ftalosiyanimler "metallo-ftalosiyanimler" olarak adlandırılmakta ve "MPc" ile sembolize edilmektedirler. M harfi yerine hangi metali içeriyorsa onun sembolü de yazılabilmektedir. Örneğin çinko ftalosiyanim bileşiği "ZnPc" şeklinde ifade edilir. Ayrıca 16 adet süstitüsyona uygun konuma sahip olan ftalosiyanimlerin halkasındaki 2, 3, 9, 10, 16, 17, 23 ve 24 numaralı konumlar çevresel yani "periferal" 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 ve 25 numaralı konumlar çevresel olmayan "nonperiferal" konumlar olarak isimlendirilir (Şekil 2.6) (99).

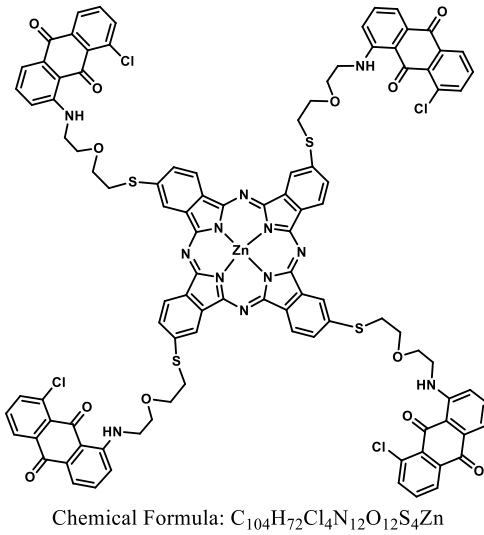


Şekil 2.6:Ftalosiyanim bileşiğinin numaralandırılması

Antrakininon türevleri, yarım asırdır antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır (100). Bu moleküller, DNA ile etkileşime girme yetenekleri açısından önemlidir. Doksorubisin, bu antikanser ajan grubunun prototip ilacı olarak bilinir. Daha sonraki araştırmalar ile 2000'den fazla doksorubisin analogu sentezlenmiştir. Doksorubisin analogları, G-Kuadrupleks DNA segmentlerine bağlanabilmekte ve interkalasyon yapmaktadır (101).

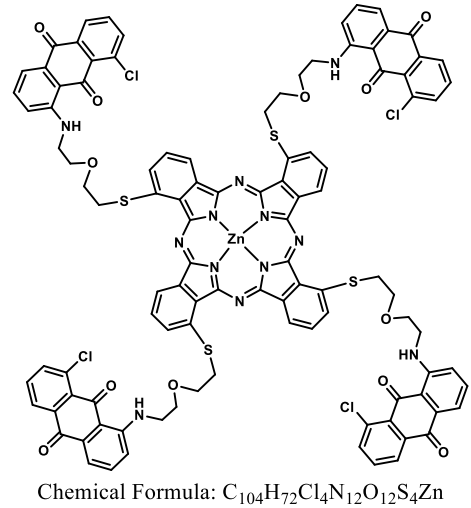
Üniversitemiz Biyomedikal Mühendisliği ve Teknoloji Fakültesinde sentezlenen, ve moleküler docking analizlerinde G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjileri yüksek olarak belirlenen periferal (p) ve non-periferal (np) 2 farklı ftalosiyenin türevinin etkinliği bu çalışmada araştırıldı. Bu moleküller, B7 (Şekil 2.7) ve B9 (Şekil 2.8) olarak adlandırılmıştır.

Sentezlenen yeni bileşiklere üç farklı DNA fragmanı kullanarak in-slico moleküler kenetlenme çalışmaları uygulandı. Avrupa'daki Protein Veri Bankası'ndan indirilen 4DAQ kodlu telomerik G-Kuadrupleks DNA ve telomerik G-Kuadrupleks mRNA segmenti (2KBP) kullanıldı. Doksorubisin referans ajan olarak kullanıldı. Bağlanma enerjileri karşılaştırıldığında B7 ve B9 bileşiklerinin DNA'ya doksorubisine göre daha iyi bağlandığı tespit edilmiştir. B7 bileşiğinin ayrıca telomerik G-Kuadrupleks DNA ve RNA yapılar ile etkileşimi de benzer özellikte bulunmuştur (102).



B7

Şekil 2.7: B7 Bileşiği Moleküler Formülü



B9

Şekil 2.8: B9 Bileşiği Moleküler Formülü

Seçici olarak DNA veya RNA G-Kuadruplekslerini hedefleyen onaylanmış bir antrakınon türevi yoktur. Bu nedenle yeni sentezlenen ve Moleküler Docking analizlerinde G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjileri yüksek olarak belirlenen iki adet ftalosiyenin bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatlarında (Mia-PaCa-2 ve PANC-1) telomeraz inhibitörü aktivitelerinin belirlenmesi için telomeraz ilişkili genlerin ekspresyonlarının tayini gerçekleştirildi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Projede gerçekleştirilen bütün aşamalar Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirildi ve 26.07.2022 tarihli 11 sayılı etik kurul kararı ile çalışmamızın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına karar verilmiştir.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Mia-PaCa-2 ve PANC-1 hücre kültürü için DMEM- yüksek glikoz (Gibco) besiyeri, %10 FBS (Gibco) ve %1 penisilin-streptomisin (Gibco) ile hazırladı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren ortamda kültüre edildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2. CCK8 TESTİ

Yeni sentezlenen maddeler B7 ve B9 ana stok 50mM konsantrasyonda DMSO ile çözüldü ve farklı konsantrasyonlarda hücrelerin muamelesi sonrası 24-48 ve/veya 72 saat noktalarında hücre canlılığı açısından 3 tekrarlı olarak analizi gerçekleştirildi.

96-kuyucuklu platelere her kuyuda 5000 hücre ekildikten 24 saat sonra seri dilüsyon şeklinde 5-1000µM doz aralığında reaktiflere maruz kalan hücre hatlarının hücre canlılığına olan etkileri CCK8 testi ile incelendi. Etkilerin kantitatif hesaplamaları reaktiflere maruz kalmış kuyucuklardaki hücrelerin negatif kontrole göre canlılığını oranlayarak, in vitro doz titrasyon eğrisinden nonlineer regresyon yöntemi ile IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanarak değerlendirildi.

Hücrelerin işaretlenmesi için;

* Besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl taze besiyeri ile değiştirildi,

* 10 µL CCK8 stok solüsyonunu her kuyuya eklenecek. Negatif kontrol olarak sadece 100 µLmedium içeren kuyuya 10 µL CCK8 stok solüsyonu eklendi,

* 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı,

* 450nm de absorbans ölçümü gerçekleştirildi.

3.3. RNA İZOLASYONU

Total RNA izolasyonu için her iki hücre hattı da 2 madde uygulaması ve 1 adet kontrol grubu olmak üzere 3 farklı grup olarak kültüre edildi. Her hücre hattı için T25 flasklara 500.000 hücre ekildi ve 24 saat sonrasında hücreler B7 için 200µM, B9 için 375µM muameleleri ve kontrol grubu için standard besiyeri muamelesi ile gerçekleştirildi.

Uygun besiyerleri ile Panc-1 hücre hattı için 24 saat ve Mia-Paca hücre hattı için 48 saat süreli inkübasyon sonrası flasklardan ticari kit (GeneALL – Hybrid-R Mini Kit) yardımı ile RNA izolasyonlar gerçekleştirildi.

Hücreler 1 ml RiboEx™ ile kaldırılıp 1,5 ml'lik eppendorflara aktarıldı. Oda sıcaklığında (15-25° C'de) 5 dakika bekletildikten sonra 12000 g 4°C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant 1,5 ml yeni eppendorfa aktarıldı. 1 ml RiboEx™ için 200 µl kloroform eklenip 15 saniye karıştırılıp 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12000 g 4°C de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni eppendorfa alındı. 1 ml Buffer RB1 eklenerek iyice karıştırıldı. Karışımdan 700 µl alınıp Hybrid-R spin kolonlarına aktarıldı. Oda sıcaklığında 10000 g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve Hybrid-R mini spin kolonu yeni tüpe aktarıldı. 500 µl Buffer SW1 eklendi. Oda sıcaklığında 10000 g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve Hybrid-R mini spin kolonu yeni tüpe aktarıldı. 500 µl Buffer RNW eklendi. Oda sıcaklığında 10000 g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve Hybrid-R mini spin kolonu yeni tüpe aktarıldı. Oda sıcaklığında 10000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve 1,5 ml'lik yeni eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplerin merkezine 50-100 µl Nuclease-free water eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Oda sıcaklığında 10000 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonda bulunan total RNA 1,5 ml'lik yeni eppendorfa toplandı. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi.

3.4. CDNA SENTEZİ

hTERT ekspresyon analizi için cDNA dönüşümü gerçekleştirildi (A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit). 20 µl Ters Transkriptaz Reaksiyonu için gerekli miktarlar Tablo 3. 1 ' de verilmiştir. Tablo 3. 2 'de DNA Reaksiyonu Basamakları verilmiştir.

Tablo 3. 1. 20 µl Ters Transkriptaz Reaksiyonu için gerekli miktarlar

20 µl cDNA Reaksiyonu	Miktar
10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mMeach)	1 µl
Random Hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase FreeWater	3.5 µl
RNA Template	10 µl

Tablo 3. 2. cDNA Reaksiyonu Basamakları

cDNA Reaksiyonu Basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1.Basamak	25	10 Dakika	1
2.Basamak	37	120 Dakika	1
3.Basamak	85	5 Dakika	1
4.Basamak	4	∞	1

3.5. EKSPRESYON ANALİZİ

hTERT ekspresyonu özgün primer ve A.B.T.™ 2X PCR MasterMix ile Real-Time PCR gerçekleştirildi. Ekspresyon Reaksiyon Karışımı Tablo 3. 3 'de verilmiştir.

Tablo 3. 3.Ekspresyon Reaksiyon Karışımı

20 µl PCR Reaksiyonu	Miktar
A.B.T.™ 2X PCR MasterMix	10 µl
Forward Primer (10 µM)*	0.2 - 2 µl
Reverse Primer (10 µM)*	0.2 - 2 µl
Template	1 - 5 µl
RNase-Free Distilled Water	20 µl tamamlanır

*hTERTprimer dizileri

Forward Primer: GCCGATTGTGAACATGGACTACG

Reverse Primer: GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAA

Ekspresyon Reaksiyon basamakları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3. 4. Ekspresyon Reaksiyon basamakları

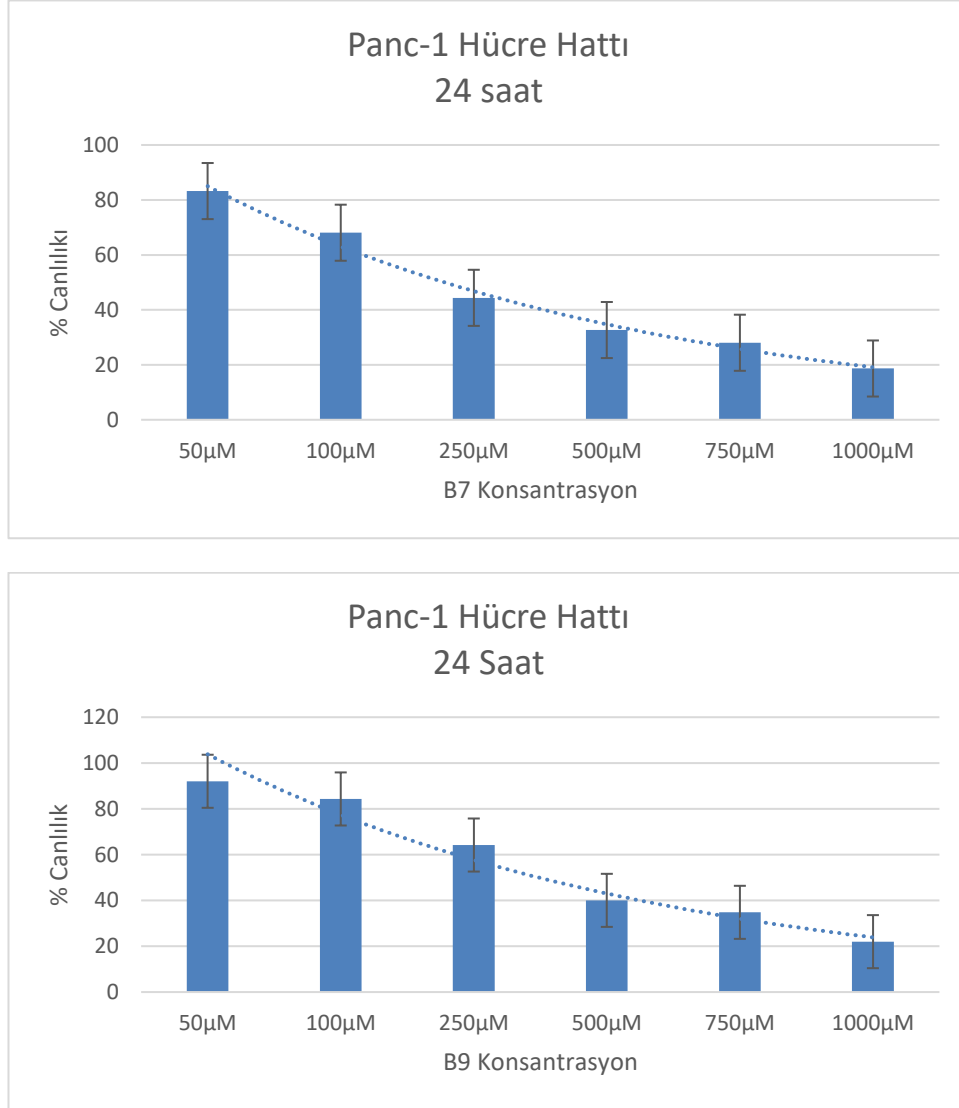
PCR Reaksiyon Basamakları	Sıcaklık(°C)	Zaman	Döngü
İlk Denatürasyon	95	300 Saniye	1
Denatürasyon	95	10-60 Saniye	25-40
Anneal	58	10-60 Saniye	25-40
Uzatma	72	60 Saniye	25-40

Normalizasyon GAPDH ekspresyonu ile yapıldı. Ekspresyon değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile belirlendi.

4. BULGULAR

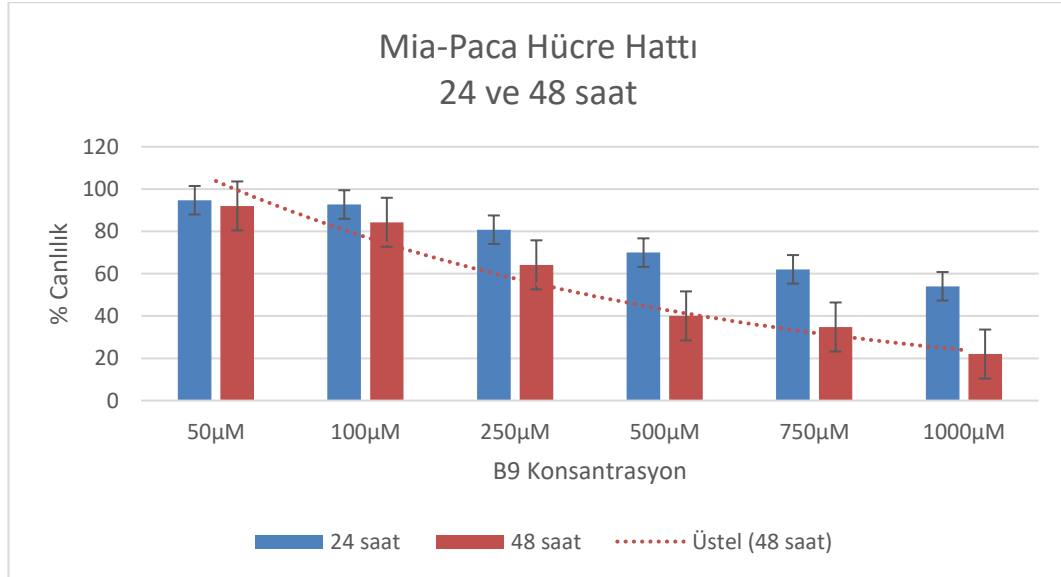
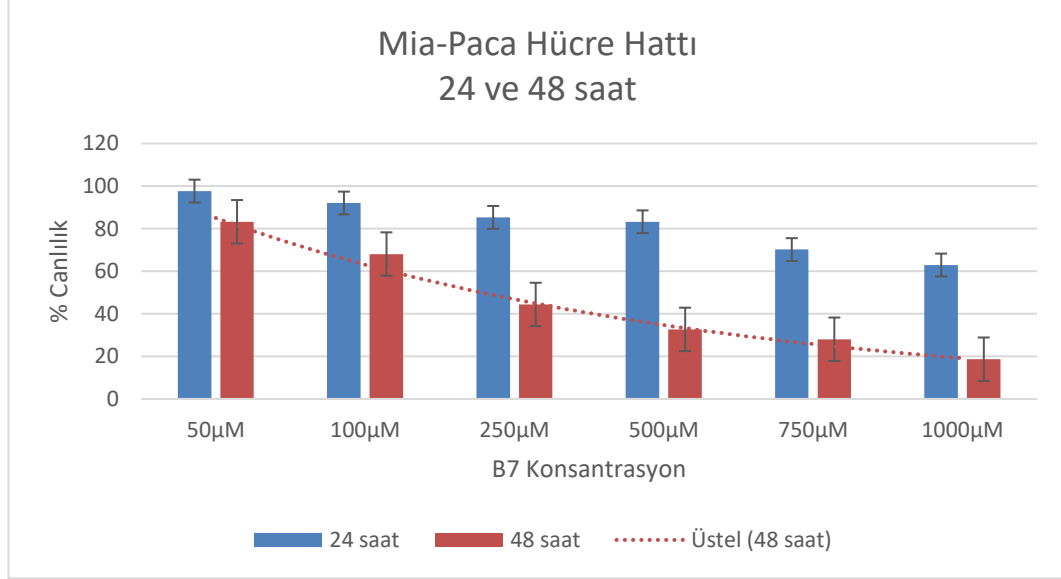
4.1. HÜCRE CANLILIĞI ANALİZİ SONUÇLARI

Panc-1 hücre hattının farklı konsantrasyonlarda B7 ve B9 muameleleri sonrasında IC_{50} değerleri 24 saatte B7 maddesi için $200\mu M$, B9 maddesi için $375\mu M$ olarak Şekil 4.1' de gösterilen değerler üzerinden hesaplanmıştır.



Şekil 4. 1.Panc-1 hücre hattının B7 ve B9 farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonrası yüzde canlı hücre değerleri

Mia-Paca hücre hattının farklı konsantrasyonlarda B7 ve B9 muameleleri sonrasında IC_{50} değerleri 48 saatte B7 maddesi için $200\mu M$, B9 maddesi için $375\mu M$ olarak Şekil 4.2'de gösterilen değerler üzerinden hesaplanmıştır.



Şekil 4.2: Mia-Paca hücre hattının B7 ve B9 farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonrası yüzde canlı hücre değerleri

4.2. hTERT EKSPRESYON SONUÇLARI

Ekspresyon sonuçlarına göre Panc-1 hücre hattında 24 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında hTERT ekspresyonu sırasıyla -13,09 kat ve -16,91 kat azalırken, Mia-Paca hücre hattında 48 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında sırasıyla -3,12 kat ve -1,48 kat azalmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: B7 ve B9 maddeleri muamelesi sonrası Panc-1 ve Mia-Paca hücre hatlarında hTERT kat değişimleri

	Panc-1		Mia-Paca	
	B7	B9	B7	B9
hTERT	-13.09	-16.91	-3.12	-1.48

5. TARTIŞMA

Pankreas kanserinin tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve yaşam süresinin kısa oluşu yeni terapötik stratejileri hedeflenmektedir. Bu nedenle, bu tümör hücrelerini daha etkili bir şekilde hedefleyebilen ve nüksetme insidansını azaltabilen yeni ilaçlara kritik bir ihtiyaç vardır. Telomeraz inhibitörlerinin, geleneksel kanser tedavisinden sonra artık kanser hücrelerinin yeniden büyümesini engellemesi son zamanlarda araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

Biz bu çalışmada yeni sentezlenen ve moleküler docking analizlerinde G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjileri yüksek olarak belirlenen antkrakinon grupları içeren, iki farklı ftalosiyanın türevi bileşiklerinin pankreas kanseri hücre hatlarında human telomeraz reverse transkriptazın (hTERT) ekspresyon tayinini araştırarak olası yeni aday telomeraz inhibitörlerinin gösterilmesini amaçladık. Çalışmamızda Panc-1 hücre hattında 24 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında hTERT ekspresyonu sırasıyla -13,09 kat ve -16,91 kat azalırken, Mia-Paca hücre hattında 48 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında sırasıyla -3,12 kat ve -1,48 kat azaldığını tespit ettik.

Çalışmamızın başlıca özelliği bu çalışmada kullanılan bileşiğin yeni ve dolayısıyla daha önce üzerinde çalışılmamış olmasıdır. Bu açıdan ele alınacak olursa, bu çalışma antrakinin yan zincir taşıyan çinkoftalosiyanın bileşiklerinin insan pankreas hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Tek sarmallı telomerik DNA'nın dörtlü bir yapıya katlanması, telomeraz enzimini inhibe ederek apoptoz yolları ile hücre ölümünü etkiler. Telomeraz ekspresyon seviyeleri, kanser ilerlemesi ve metastatik durum ile ilişkilidir ve kanser hücrelerinin çoğalmasına yönelik düzenleyici potansiyeli kanıtlanmıştır (91).

Çalışmamızda moleküler docking analizlerinde G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjileri yüksek olan ve yeni sentezlenen B7 ve B9 için hTERT ekspresyon analizi gerçekleştirdik. Ekspresyon sonuçlarına göre Panc-1 hücre hattında 24 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında hTERT ekspresyonu sırasıyla -13,09 kat ve -16,91 kat azalırken, Mia-Paca hücre hattında 48 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında sırasıyla -3,12 kat ve -1,48 kat azaldığını tespit ettik.

Wang ve ark 2006 yılında yaptıkları çalışmada antisens (ans) fosforotiyoat oligodeoksinükleotitlerin pankreas kanseri hücre dizisi Bxpc-3' te telomeraz

aktivitesi ve in vitro hücre çoğalması üzerindeki inhibe edici etkilerini araştırdılar. Ans-hTERT'nin neden olduğu hücre çoğalmasının kontrol gruplarına göre bariz bir şekilde engellendiğini gösterdiler. 72 saat inkübasyonundan sonra hücrelerin 6 µmol/L ans-hTERT ile kontrol grubuna kıyasla ans-hTERT grubunun telomeraz aktivitesinin inhibisyon oranı %63 olarak tespit ettiler. Sonuç olarak ans-Htert oligodeoksinükleotidlerinin, hTERT gen ekspresyonunu etkili bir şekilde inhibe edebildiğini, telomeraz aktivitesini azaltabildiğini ve apoptozu tetikleyebildiğini gösterdiler. Oluşan bu etkinin doza ve zamana bağlı olduğunu gösterdiler (103). Ayrıca çalışmalarında pankreatik kanser hücresi Bxpc-3'ün çoğalmasının, G0/G1 fazındaki hücre döngüsü birikimi ile bağlantılı olarak doza ve zamana bağlı bir şekilde antisens oligodeoksinükleotit (ans)-hTERT oligodeoksinükleotitleri tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir. G0/G1 fazının hücre oranı %2,70'den %14,69'a yükselmiş, S fazının hücre oranı %72,7'den %51,0'e düşmüş ve G1 evresinin önünde G1 altı evre hücre apoptoz zirvesi ortaya çıkmıştır. Sonuçlar, ans-Htert oligodeoksinükleotidlerinin, hTERT gen ekspresyonunu etkili bir şekilde inhibe edebildiğini, telomeraz aktivitesini azaltabildiğini ve apoptozu tetikleyebildiğini gösterdiler. Apoptoz üzerinde ans-hTERT tarafından hızla indüklenen kısa süreli bir etki ilave telomeraz aktivitesi üzerinde uzun vadeli bir etki ile telomer uzunluğu telomerik DNA tarafından kritik olarak kısaltıldığında hücre ölümüne neden olduğunu gösterdiler. Sürekli ans-hTERT oligodeoksinükleotit tedavisi, telomeri hücre yaşlanmasına yol açacak bir boyuta kısaltabilir. Sonuç olarak ans-hTERT oligodeoksinükleotitleri ile tedavi, telomeraz aktivitesi olan kanser için potansiyel bir strateji olabileceğini sonucuna vardılar (103).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri doza bağımlı olarak sitotoksiste artışı ve hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz inhibisyonu yapmıştır. İn vitro olarak yaptığımız çalışma telomeraz inhibisyonu yapmasıyla Wang ve ark'ının çalışması ile paraleldir. Biz de burada B7 ve B9 moleküllerinin hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz aktivitesi olan pankreas kanserinde potansiyel bir tedavi olabileceğini düşündük.

MIA PaCa-2 ve PANC-1, PDAK karsinogenezinin in vitro çalışmaları için yaygın olarak kullanılan iki tümör hücre hattıdır. Primer tümör kültürüne kıyasla daha kolay erişilebilir, daha güvenilir ve daha az problemlidirler. Hem MIA PaCa-2 hem de PANC-1'in farklılaşması zayıftır ve PANC-1, metastazı olan bir hastadan türetilirken, MIA PaCa-2'nin türetildiği hastanın metastatik durumu belirsizdir (104).

Shen ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları çalışmalarında immünohistokimyasal olarak belirlenen PANC-1 ve MIA-PaCa-2'nin sonuçları, PANC-1'de daha fazla kök hücre yüzeyi belirtecinin ifade edildiği göstermişlerdir. PANC-1 ve MIA-PaCa-2 hücre hatlarında, hücrelerin %99,9'u CD44 pozitif ve ayrıntılı olarak PANC-1'de CD24+ hücrelerinin yüzdesi $17,3 \pm 3,7$ ve EpCAM+ hücrelerinin yüzdesi $46,0 \pm 3,5$ MIA-PaCa-2'de, CD24+ hücrelerinin yüzdesi $11,5 \pm 0,7$ ve EpCAM+ hücrelerinin yüzdesi $38,7 \pm 0,5$ PANC-1'deki CD24+CD44+EpCAM+ hücrelerinin yüzdesi $16,8 \pm 3,6$ ve MIA-PaCa-2'de $11,5 \pm 0,7$ olarak bulmuşlardır. Kanser kök hücrelerinin varlığının, tümör agresifliğinden sorumlu olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir. Kök hücre yüzey belirteçleri tespitinin bu sonuçları, PANC-1 hücre hattının MIA-PaCa-2'den daha fazla kök hücreye sahip olduğunu göstermiştir.

Ayrıca Shen ve arkadaşları, PANC-1 ve MIA-PaCa-2 hücreleri, küre oluşturma yeteneğindeki farklılıkları değerlendirmek için küre oluşturma ortamında kültürelendiler. PANC-1'deki küre oluşum oranının yüzdesinin %96.7 olduğunu, MIA-PaCa-2'de küre oluşum oranı yüzdesi %80 olduğunu tespit ettiler. Bunun sonucunda PANC-1 hücre hattının daha fazla kanser köküne sahip olduğunu kanıtlamışlardır (104).

PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinin mikroskopik gözlemlerinde; MIA PaCa-2'de iki farklı morfolojik model (büyük hücreler ve küçük hücreler) olduğunu ortaya çıkarırken, PANC-1'de üç farklı morfolojik model (büyük hücreler, ara hücreler ve küçük hücreler) ortaya çıkarmıştır.

Gradiz ve ark 2016 yılında yaptıkları çalışmada E-cadherinin MIA PaCa-2'de eksprese olduğu ancak PANC-1'de eksprese olmadığı immünohistokimya analizi ile doğrulanmıştır. Artan E-cadherin ekspresyonu, çeşitli tümör tiplerinde iyileştirilmiş hayatta kalma ile ilişkili olduğundan PANC-1'in davranışının daha büyük bir metastaz yapma potansiyeli ile daha agresif olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlarla, PANC-1'in MIA PaCa-2'den daha heterojen ve istilacı olduğunu düşündüler (104, 105).

Çalışmamızda Panc-1 hücre hattının MIA PaCa' ya göre daha iyi cevap vermesinin nedeninin B7 ve B9 moleküllerinin metastatik özellikli pankreas kanser türlerinde daha etkin cevap alınabileceğini düşündürmüştür.

Deeb ve ark 2015 yılında yaptıkları çalışmada PDAK hücrelerinde Pristimerin (PM) antitümör aktivitesine aracılık etmede telomerazın rolünü araştırdılar. Çalışmalarında PM, hücre proliferasyonunu inhibe etti ve hücreleri G1 hücre döngüsü

fazında durdurdu. MiaPaCa-2 ve Panc-1 PDAK hücrelerinde apoptozu indüklediğini tespit ettiler. PM'nin bu antitümör aktiviteleri, telomeraz kompleksinin katalitik alt birimini kodlayan gen olan hTERT'inhibisyonu ile iyi bir şekilde ilişkili olduğunu buldular. PM, hTERT gen ekspresyonunu kontrol eden Sp1, c-Myc ve NF-κB transkripsiyon faktörlerini baskılayarak hTERT ekspresyonunu inhibe ettiğini tespit ettiler. PM ayrıca hTERT nükleer ithalatını ve telomeraz aktivitesini fosforile eden ve kolaylaştıran protein kinazAkt'ı da inhibe ettiğini tespit ettiler. Bu bulgular ışığında, hTERT'yi (telomeraz) PDAK'un tedavisi için potansiyel bir PM terapötik hedefi olarak tanımladılar. Bununla birlikte, PM tarafından hTERT'inhibisyonunun telomerlerin kısalmasıyla sonuçlanıp sonuçlanmadığını ve PM'nin telomerazın RNA şablonunu bağlayıp bozduğunu belirlemek için daha fazla çalışma gerekli olduğunu düşündüler (93).

Çalışmamızda da Deep ve arkadaşlarının çalışmalarındaki benzer şekilde hTERT ekspresyonunu azaldığını tespit ettik. Deep ve ark'ının çalışmasında PM'nin hücreleri G1 hücre döngüsü fazında durduğunu tespit etmişlerdir B7 ve B9 moleküllerinin daha ileri çalışmalar ile hTERT'i hangi gene bağlı transkripsiyon faktörlerini baskılayarak ya da hücre proliferasyonunu hangi hücre döngüsü fazında durdurabileceğinin araştırılması düşünmekteyiz.

Chiapporive ark 2015 yılında yaptıkları çalışmada ilerlemiş küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) için idame tedavisi olarak telomeraz inhibitörü imetelstat'ın randomize bir faz II çalışmasında imetelstat'ın etkinliğini değerlendirdiler. Çalışmalarında 52 hasta tek başına imetelstat aldı, 24 hasta imetelstat artı bevacizumab aldı, 12 hasta sadece bevacizumab aldı ve 26 hasta hiçbirini almadı. Vardıkları sonuçta, idame imetelstat, birinci basamak tedaviye yanıt veren çeşitli telomeraz uzunluğuna (TL) sahip ilerlemiş NSCLC hasta popülasyonunda progresyonsuz sağkalımı (PFS) iyileştirmede başarısız oldu. Özellikle kısa telomerleri olanlarda sağkalımda iyileşme eğilimi vardı. Kısa TL'nin prediktif bir biyobelirteç olarak prospektif olarak doğrulanması, imetelstat'ın daha fazla klinik gelişimi için gerekli olacaktır. Ayrıca, nötropeni ve trombositopeni, kontrol kollarına kıyasla tek başına imetelstat ve imetelstat ile bevacizumab birlikte olduğu kollarında daha yüksek olarak buldular (82).

Çalışmamızda B7 ve B9 moleküllerinin telomeraz enzim inhibitörü olarak in vitro ortamda değerlendirdik ve hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz inhibisyonu yaptığını gösterdik. Çalışmamızın in vivo ortam olmaması nedeni ile progresyonsuz

sağkalım ve klinik olarak yan etkilerinin araştırılması için invivo ortamda yapılacak daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Damm ve ark 2001 yılında yaptıkları çalışmada telomerazı in vitro ve in vivo olarak seçici olarak inhibe eden yeni kimyasal bileşikler tarif etmişlerdir. Bu Nükleosidik olmayan küçük bileşikler BBR1532 {2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoicacid} ve BBR1591 {5-morpholin- 4-yl-2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoicacid} şeklinde adlandırdılar. Bu bileşikler tarafından telomeraz inhibisyonunu, fibrosarkom, akciğer, meme ve prostat karsinomundan türetilen insan kanser hücre hatlarında telomerlerin sürekli erozyonu ile sonuçlandığını tespit ettiler. Kanser hücrelerinin bu inhibitörlerle tedavisi, akut sitotoksiste olmadan ilerleyici telomer kısalmasına yol açtığını, ancak morfolojik, mitotik ve kromozomal sapmalar ve değiştirilmiş gen ekspresyonu modelleri dahil olmak üzere yaşlanmanın ayırt edici özellikleri olan karakteristik bir gecikme döneminden sonra proliferasyonun durmasına yol açtığını tespit ettiler (106).

Çalışmamızda B7 ve B9 moleküllerinin G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanarak telomeraz inhibitörü olduğunu tanımladık. Çalışmamızda PANC-1'in MIA PaCa pankreas kanseri hücre hatları kullandık. İleri dönük çalışmalarda telomeraz aktivitesi olan farklı tür kanserlerde de bu bileşiklerin kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Xu ve ark 2000 yılında yaptıkları çalışmada insan tümör hücrelerinde vahşi tip (wt) p53'ün indüklenmesinin ardından hTERT ekspresyonunun aşağı regüle edildiğini ve wt p53'ün hTERT transkripsiyonunu doğrudan inhibe edildiğini gösterdiler. hTERT/telomeraz aktivasyonunun hücre ölümsüzleşmesi ve tümör gelişimi ve ilerlemesi için merkezi olduğu göz önüne alındığında, p53'ün bu yeni işlevi, p53'ün aracılık ettiği önemli bir tümör baskılama mekanizmasını temsil edebileceğini düşündüler (107).

Çalışmamızda B7 ve B9 molekülleri G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanarak hTERT ekspresyonunu azaltmıştır. Bu ekspresyon azalmasının p53 üzerinden etkisi olup olmadığının araştırılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olabileceğini düşündürmüştür.

Li ve ark 2020 yılındaki çalışmalarında Çin ilacının aktif bir bileşeni olan antrakininonun yapısal modifikasyonu ile bir dizi yeni antrakininon, 8a(1-nitro-2-asil antrakininon-lösin) bileşiğini ürettiler. Bu bileşik 8a'nın kolon kanseri hücrelerine karşı en iyi anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu ve ROS (reaktif oksijen türleri)/JNK sinyal

yolları yoluyla apoptozu indüklediğini gösterdiler. 8a ile indüklenen apoptozda, ROS-JNK sinyal yolunun ilk aktivasyonu, artan ROS üretimine, JNK fosforilasyonuna, ardından mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalmaya ve Bax ve Bcl-2'nin eylemlerinin aracılık ettiği sitokrom c'nin salınmasına neden oldu. Bu sonuçlar kaspaz 9 ve kaspaz 3 bölünmesine yol açarak, bu da kaspaz sinyal yolunun aktivasyonuna ve nihayetinde apoptoza yol açtılar. Bu nedenle çalışmalarının daha etkili anti-tümör ilaçlarının gelecekteki tasarımı ve geliştirilmesi için yeni bilgiler sunacağını düşündüler (100).

Çalışmamızda da Li ve arkadaşlarının çalışmalarındaki benzer şekilde kullanılan bileşikler de antrakınon türevi bileşiklerdir. Li ve ark antrakınon türevi bileşiğin kolon kanseri hücrelerinde apoptoza yol açtığı tespit edilmiş olup, bizim çalışmamızda da bileşiklerimiz pankreas kanseri hücrelerinde sitotoksik aktiviteyle etkili olmuştur. Antrakınon türevli ilaçların farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılması bizim sonuçlarımız ile uyumludur.

Zeng ve ark 2018 yılında yaptıkları çalışmada nükleotid analogunu 5-FdU (5-fluoro-2'-deoxyuridine) tedavisi telomeraz-pozitif pankreas kanseri MIA-PaCa2 hücrelerinde hücre ölümünü doza bağlı bir şekilde indüklediğini göstermişlerdir. Bunu kanser hücrelerinde telomer işlev bozukluğunu ve daha hızlı hücre ölümünü tetiklemek için toksik, doğal olmayan nükleotitleri seçici olarak iletmek için kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesini bir "Truva atı" olarak kullanma alternatif bir stratejisi ile göstermişlerdir. Florlu pirimidin analogu 5-FdUTP'yi, ssDNA'nın telomeraz aracılı uzantısı için etkili bir substrat olarak tanımlamışlar ve sonuç olarak 5-FdU tedavisinin 3 gün içinde ve telomeraza bağımlı bir şekilde önemli hücre ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, bu bulgular telomerazın 5-FdU'nun telomerlere yanlış dahil edilmesine aracılık ettiğini ve ilacın klinik olarak uygulanabilir konsantrasyonlarında insan kanser hücrelerinin hızlı bir şekilde öldürülmesine yol açtığını düşünmektedirler (92).

Çalışmamızda kullandığımız bileşikler MIA-PaCa hücre kültürlerinde 48 saatte IC₅₀ değerleri B7 maddesi için 200µM, B9 maddesi için 375µM olarak hesapladık. Panc-1 hücre hattı farklı konsantrasyonlarda B7 ve B9 muameleleri sonrasında IC₅₀ değerleri 24 saatte B7 maddesi için 200µM, B9 maddesi için 375µM olarak hesapladık. B7 ve B9 bileşiklerinin G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanıp telomerik G-Kuadrupleks DNA'nın çözünürlüğünü bloke ederek aracılık ettiğini ve ilacın klinik

olarak uygulanabilir konsantrasyonlarında insan kanser hücrelerinin hızlı bir şekilde öldürülmesine yol açabileceğini düşünmekteyiz.

Burger ve ark 2005 yılındaki çalışmalarında 3,6,9-trisübstitüe bir akrinin bileşiği olan G-Kuadrupleks bağlayıcı ligand BRACO-19'u in vitro ve in vivo telomeraz fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu bileşiğin, dörtlü DNA için yüksek seçiciliğe ve afiniteye sahip olduğunu bulmuşlardır. BRACO-19'un biyolojik aktivitesi, çok kısa telomerlere (2.7 kb) sahip olan insan endometrium karsinomu hücre hattı UXF1138L'de değerlendirmişlerdir. İn vitro, hTERT ekspresyonu 24 saat sonra büyük ölçüde azalmıştır. Ayrıca hücrelerde telomer kısalmasını göstermişlerdir (87).

Çalışmamızda da moleküllerimiz telomerik G-Kuadrupleks DNA'nın çözünürlüğünü bloke ederek etkisini gösterdiğini tespit ettik. 24 saatte Panc-1 hücre hattında B7 ve B9 muamelesi sonrasında hTERT ekspresyonu sırasıyla -13,09 kat ve -16,91 kat azalırken, Mia-Paca hücre hattında 48 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında sırasıyla -3,12 kat ve -1,48 kat azalmıştır. Benzer şekilde Li ve ark'nın yaptığı çalışmada da ankrakinon bileşiklerinin apapitoza yol açarak sitotoksositeye yol açtığından bahsetmiştik. Fakat çalışmalarında telomer uzunluk tayini yapmamışlardı. Bileşiklerimizin telomerin kısalmasına ne kadar etki edeceğini bulabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Guterresve ark 2020 yılında hTERT aktivitesinin inhibe edilmesine dayalı tedaviler, her hücre bölünmesinde telomerlerin kademeli olarak yıpranmasına bağlı olduklarından, anti-kanser etkileri uygulanmadan önce uzun bir tedavi süresi gerektirebileceğini düşündüler. Bu, onları birinci basamak tedavi olarak kullanım için uygunsuz hale getirebilir ve dirençli klonların evrimi ve büyümesi potansiyelini artırabilir. Ayrıca, telomeraza yönelik tedavilerin yan etkileri, hematopoyetik soylar gibi kök ve öncü hücrelerde telomerazın ekspresyonu nedeniyle potansiyel olarak ortaya çıkabilir. Ek olarak, telomeraz inhibitörü etkinliğinin, düşük seviyelerde telomeraz aktivitesinin kısa telomerleri sürdürme ve tümör hücresi çoğalmasını sürdürme kabiliyeti ile sınırlandırılması muhtemeldir, bu da oldukça güçlü inhibitörlere ihtiyaç olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, telomeraz, evrenselliği, kanser hücrelerine yüksek özgüllüğü ve replikatif ölümsüzlük verme yeteneği açısından çekici bir kanser hedefi olduğunu düşündüler (80).

Çalışmamızda da hTERT ekspresyonunun azaldığı sonuçlarını bulmuştuk. Bulduğumuz bileşiklerin telomer ekspresyonu olan hematopoetik hücreler gibi hücrelere de etkilerinin ileriki in vivo çalışmalarda gösterilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Tauchave ark 2006 yılında yaptıkları çalışmada G-Kuadrupleks yapı ile etkileşimli olan telomestatin ile telomeraz inhibisyonunu araştırmışlardır. Telomestatinin farklı tümör hücre tiplerinde apoptozu indüklediğini ve normal progenitör hücrelere kıyasla kanser hücrelerine karşı seçicilik gösterdiğini düşünmüşlerdir. Bu kaniya telomestatinin normal fibroblastlar üzerinde daha az etkiye sahip olduğunu gözlemleyerek yüksek bir antikanser özgüllüğü olduğunu düşünmüşlerdir. Ayrıca telomestatinin ALT (alternatif telomer uzaması)-pozitif hücreler üzerinde minimum etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Telomestatinin aksine, tercihen moleküller arası G-Kuadrupleks yapıların oluşumunu kolaylaştıran bir bileşik olan TMPyP4, ALT pozitif hücrelerin çoğalmasını baskılar. Bu farkın, molekül içi (telomestatin) veya moleküller arası (TMPyP4) G-Kuadrupleks yapılar için bileşiklerin seçiciliğinden kaynaklandığını bildirmiştir. Ayrıca telomestatin sistemik uygulamalarında dozu artırıldıkça 3 mg/kg veya 9 mg/kg veya 15 mg/kg kontrole kıyasla tümör telomeraz aktivitesini sırasıyla %60,2, %74 ve %92,5 azalttığını bulmuşlardır (108).

Çalışmamızda B7 ve B9 molekülleri G-Kuadrupleks yapı ile etkileşime girerek telomeraz inhibisyonu yaptığını tespit ettik. B7 ve B9 moleküllerinin G-Kuadrupleks yapılar için kanser hücrelerindeki telomeraza özgüllüğünü ve seçiciliğini daha iyi bulabilmek için telomerik olmayan G-Kuadrupleks gruplar için afinitesi ileriki çalışmalarda araştırılabilir.

Mu-Yong Kim ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada moleküller arası G-Kuadrupleks yapılar için TMPyP4 bileşiğinin telomeraz pozitif hücrelerin yanı sıra telomer (ALT) alternatif uzaması pozitif hücrelerin çoğalmasını da baskıladığını görmüşlerdir. Ayrıca, TMPyP4'ün deniz kestanesi embriyolarında anafaz köprülerini indüklediğini, oysa telomestatinin bu etkiye sahip olmadığını göstermişler ve sonucunda bizi telomestatinin molekül içi G-Kuadrupleks yapılar için ve TMPyP4'ün moleküller arası G-Kuadrupleks yapılar için seçiciliğinin farklı olduğu sonucuna götürmüştür (109).

Çalışmamızda B7 ve B9 molekülleri pankreas kanseri hücre kütlerinde hTERT ekspresyonunu azaltarak telomer inhibisyonu yaptığını gördük. Telomeraz pozitif hücrelerde alternatif telomer uzamasını baskıladığını görmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Huang ve ark 2008 yılında yaptıkları çalışmada insan telomerik dizisinin oluşturduğu G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize eden karbazol türevleri tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bunların arasında 3,6-bis(1-metil-4-vinilpiridinyum)karbazoldiyodür (BMVC), G-Kuadrupleks erime sıcaklığında 13°C artış göstermiş ve telomeraz aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. BMVC'lerin insan H1299 (lenf düğümünden türetilen bir insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücre dizisi) kanser hücrelerinin yaklaşık %70'inde 40 dakika içinde tespit edildiğini bulmuşlar. Buna karşılık, aynı miktarda normal insan IMR90 hücresinin BMVC'yi alması 300 dakikadan fazla sürmüş, bu da BMVC'nin kanser hücrelerine alınmasının normal hücrelerden daha verimli olduğunu göstermişlerdir (110).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri insan telomerik dizisinin oluşturduğu G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize eden antrakınon yan zincir taşıyan ilaçlardır. Telomeraz pozitif pankreas kanseri hücre kültürlerine kıyasla normal hücrelere etkilerinin kıyaslanması açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Gaove ark 2020 yılındaki yaptıkları çalışmada multidisipliner yaklaşımlar kullanarak, insan telomerik G-Kuadrupleks multimerlerine yüksek seçicilik ile monomerik G-Kuadrupleks üzerinden bağlanan ve ilgili DNA ile birlikte G-Kuadrupleks DNA'nın oluşumunu indükleyen yeni bir kinolin çekirdek ligandı olan BMPQ-1'i belirlemişlerdir. BMPQ-1'in dimerik G-Kuadrupleks çözeltiye titrasyonu, konformasyonel değişiklik yapmıştır. Bu konformasyonel kayma, üçlü, dördü, beşli, altılı G-Kuadrupleks birimlere uzanan tanıma için de gözlemlenmiştir. Çalışmalarında, konformasyonel dağılımın değişiminin, multimerik G-Kuadrupleks gruplar için BMPQ-1'in seçiciliğinde önemli bir rol oynadığını gözlemlenmişlerdir. Çalışmalarında (3+1) hibritmultimerik G-dördü gruplara seçici olarak bağlandığı ve konformasyonel değişiklikleri indüklediği gösterilen bir ligandın ilk örneği olduğunu düşündüler. BMPQ-1'in farklı kanser hücre hatlarında ve normal karaciğer hücrelerinde CCK8 yardımı ile sitotoksitesini değerlendirdiler. Sırasıyla IC50 değerleri insan alveoler bazal epitelyal kanser hücre dizisinde (A549) $1,46 \pm 0,16 \mu\text{M}$, insan hepatoselülerkarsinoma kanseri

hücre dizisinde (HepG2) $2,14 \pm 0,26 \mu\text{M}$, insan mide kanseri hücresinde(MGC-803) $2,36 \pm 0,48 \mu\text{M}$, insan kolon adenokarsinomunda (HT29) $1,40 \pm 0,06 \mu\text{M}$ önemli bir doza bağımlı sitotoksik etkiye yol açtığını ve $4.38 \pm 0.39 \mu\text{M}$ 'lik bir IC50 ile insan normal karaciğer hücrelerinde (HL-7702) büyüme inhibisyonunu indüklediğini gösterdiler. Hücre büyümesi inhibisyon eğrilerine dayalı olarak, $2 \mu\text{M}$ 'deki BMPQ-1 bileşiği, normal hücrelere (HL-7702) karşı tümör hücreleri için en yüksek seçiciliği sergilediğini sonucuna vardılar.

Çalışmalarında BMPQ-1'i insan kolon adenokarsinomasının bir HT29 ksenograft fare modelinde de test ettiler. Fareleri normal salinle tedavi edilen grup ve BMPQ-1 (15 mg/kg) ile tedavi edilen grup olarak ayırdılar. Sonuç olarak 3 haftalık tedaviden sonra, tümörler eksize edildi ve nihai boyut için ölçtüler. Normal salin grubundaki tümör hacmi 700 mm^3 'e ulaşırken; BMPQ-1 ile tedavi edilen tümör taşıyan farelerde tümör hacmi 300 mm^3 olarak buldular. Bu sonuçların, BMPQ-1'in tümör büyümesini in vivo etkili bir şekilde inhibe ettiğini gösterdiler (111).

Çalışmamızda da insan telomerik dizisinin oluşturduğu G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize eden antrakınon türevi ilaç olan B7 ve B9 molekülleri pankreas kanseri hücre kültürlerinde önemli bir doza bağımlı sitotoksik etkiye yol açtığını gösterdik. B7 ve B9 molekülleri daha ileri çalışmalarda farklı hücre kültürlerinde ve normal hücrelerde çalışılıp, seçiciliği hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabileceğini düşündük. Ayrıca yukarıda olduğu gibi biz de in vivo olarak molekülün tümör büyümesine etkisini makroskopik olarak hacim ve ağırlık açısından değerlendirilebilmesi için de in vivo şartlarda çalışma yapmayı planlamaktayız.

Berardinelli ve ark 2015 yılında yaptıkları çalışmada etkili ve seçici G-Kuadrupleks stabilize edici moleküllerden biri olarak kabul edilen Pentasiklikakridin bileşiğini RHPS4 (3,11-difloro-6,8,13-trimetil-8H-kino[4,3,2-kl]akridinyummetosülfat) araştırmışlardır. Bu bileşiğe uzun süreli maruziyette, telomeraz inhibisyonunu ve insan telomeraz katalitik alt birim (hTERT) geninin aşağı regülasyonunu, telomer erozyonunu, G2/M geçişinde önlediğini ve kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun baskılanmasını indüklediği bulmuşlardır. Buradaki çalışmalarında RHPS4 ve X-ışınlarının submikromolar konsantrasyonlarının kombine etkisi, U251MG glioblastom radyodirençli hücre hattında değerlendirildi. Sonuç olarak ışınlanmadan sonra yeniden birleşen DNA çift sarmal kırılmaları, ilaçla ön-muameleye tabi tutulmuş hücrelerde gecikmiş onarım kinetiğini ve kromozom tipi değiş tokuşlarda ve telomerik füzyonlarda sinerjistik bir artışı ortaya çıktığını tespit ettiler (112).

Çalışmamızda önce in vitro olarak B7 ve B9 moleküllerinin pankreas kanseri hücre kültürlerinde hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz inhibisyonu yaptığını tespit ettik. Moleküllerimiz in vitro deneylerden sonra kombinasyon tedavisi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Salvative ark 2007 yılında yaptıkları çalışmada telomer dizisinin G-Kuadrupleks DNA'sını bağlayan ve mikromolar altı seviyelerde telomeraz aktivitesini inhibe eden bir pentasiklikakridin olan RHPS4 (3,11-difloro-6,8,13-trimetil-8H-kino[4,3,2-kl]akridinyummetosülfat)'nin antitümör etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında sağlıklı fareler üzerinde yapılan bir akut toksikolojik çalışma temelinde seçilen maksimum tolere edilen dozu (15 mg/kg) enjekte ederek RHPS4'ün M14 melanom, PC3 prostat, H460 küçük hücreli olmayan akciğer, CG5 meme ve HT29 kolon karsinom gibi farklı histotiplerdeki tümörler üzerindeki antitümör aktivitesini değerlendirdiler. 15 gün boyunca verilen tedavi, fare uygunluğunun ve kan sayımlarının değerlendirilmesiyle kemik iliğinin ve ana organların histolojik analizi sonuçlarını düşündükleri kadar toksik olarak bulmadılar. Spesifik olarak, CG5 meme ksenogreftleri, tedavi çok kısa bir süre içinde tümör ağırlığında belirgin bir inhibisyon (tümör ağırlığı inhibisyonu [TWI] yaklaşık %80; $P < 0.001$) ürettiğinden ve bu etki en az 30 gün kadar devam ettiğinden en duyarlı olarak değerlendirdiler. Diğer tüm tümör ksenogreftlerinde, RHPS4 tedavisi, etkinin en alt noktasında yaklaşık %50 ($P < 0.001$) TWI üretti ve daha da önemlisi, tümör büyümesinde yaklaşık 15 (M14 ve PC3) ve 10 (HT29 ve H460) günlük gecikmeyle sonuçlandığını tespit ettiler (113).

Çalışmamızda da insan telomerik dizisinin oluşturduğu G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize eden antrakınon türevi ilaç olan B7 ve B9 molekülleri pankreas kanseri hücre kültürlerinde önemli bir doza bağımlı sitotoksik etkiye yol açtığını gösterdik. B7 ve B9 molekülleri daha ileri çalışmalarda farklı hücre kültürlerinde ve normal hücrelerde çalışılıp, seçiciliği hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabileceğini düşündük. Ayrıca yukarıda olduğu gibi biz de in vivo olarak molekülün tümör büyümesine etkisini makroskopik olarak hacim ve ağırlık açısından değerlendirilebilmesi için de in vivo şartlarda çalışma yapılabileceğini düşünüyoruz.

Phatak ve ark 2007 yılında yaptıkları çalışmada bir G-dörtlü yapıyı katlamak için indükleyen pentasiklikakridinyummetosülfat tuzu RHPS4'i mitotik iğ zehiri mikrotüpleri stabilize eden Taxol ile bir kombinasyonu ile telomer işlev bozukluğunun in vivo deneylerde değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak RHPS4 ve Taxolsinerjistik olarak hareket edebileceğini mitotik bir iğ zehrinin etkisi altında, mitotik hücreler anafaza

giremez. Anafaz köprüsüne yol açan RHPS4 tarafından indüklenen telomerik DNA hasarı tepkisi ile birlikte bu mekanizmanın iki ajanın sinerji oluşturabileceğini düşündüler. Tek ajanlı RHPS4'ün in vivo etkinliği sınırlı olmasına rağmen, RHPS4'ün mitotik iğ zehiri Taxol ile bir kombinasyonu, tümör remisyonlarına ve telomer işlev bozukluğunun daha da artmasına neden olabileceğini tespit ettiler (114).

Çalışmamızda önce in vitro olarak B7 ve B9 moleküllerinin G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize ederek pankreas kanseri hücre kültürlerinde hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz inhibisyonu yapmasını tespit ettik. Moleküllerimiz in vitro deneylerden sonra kombinasyon tedavisi için daha ileri çalışmalara için Phatak ve arkadaşlarının çalışmasının bizim için yol gösterici olabileceğini düşünüyoruz.

Rha ve ark yaptıkları çalışmada pek çok aday bileşik arasından dörtlü DNA'yı stabilize etmek için G-Kuadrupleksle etkili bir şekilde birleştiği bulunan katyonik porfirin, TMPyP4[5,10,15,20-tetra(N-metil-4-piridil) porfinklorür]'ü ajan olarak seçtiler. Kontrol ajanı olarak, da G-Kuadrupleks gruplarla daha az spesifik bir etkileşime sahip olan TMPyP4'ün izomeri olan TMPyP2'yi ve azidotimini (AZT) kullandılar. Kolon kanseri (HCT-116 ve HT-29), meme kanseri (HS₅₇₈T VE MDA-MB-231), nöroblastoma(SK-N-FI), serviks kanseri (HeLa), pankreas kanseri (MIA PaCa-2) prostat kanseri (DU 145) olmak üzere sekiz tümör hücre dizisini ve beş normal hücre dizisi(CRL-2115 ve CRL-2120 fibroblastlar; NHEK-Ad, yetişkin keratinositler; CCL) için hücre proliferasyonu tahlil sonuçları, hücre sayma tekniğine dayalı olarak karşılaştırdılar. Sonuç olarak Tümör hücre dizilerinde TMPyP4 ve TMPyP2 için IC50 değerleri sırasıyla 11.4–53 µm ve 9.0–28.2µm aralığındayken, AZT tümör hücre dizilerine karşı çok düşük sitotoksik etkiler gösterdi. Normal insan hücre dizilerinde TMPyP4 ve TMPyP2 için IC50 değerleri sırasıyla 2,9–48,3µm ve 1,7–15,5 µm aralığındayken, AZT tümör hücre dizilerinde olduğu gibi çok düşüksitotoksik etkiler gösterdi. Sonuç olarak porfirin sınıfı telomer ve telomeraz etkileşimli ajanların normal hücreleri etkileyebileceğini düşündüler (115).

Çalışmamızda önce in vitro olarak B7 ve B9 moleküllerinin pankreas kanseri hücre kültürlerinde sitotoksitesini değerlendirdik. Çalışmamızda kullanılan moleküller de Rha ve ark'nın kullandığı molekül gibi G-Kuadrupleks ile etkileşerek telomeraz inhibisyonu yapmaktadır. Çalışmalarında sadece kanser hücre kültürleri haricinde fibroblast ve kreatinosit hücrelerinde de sitotoksiteyi değerlendirmişlerdir. Moleküllerimizin in vivo deneylerde sağlıklı insan hücrelerinde sitotoksite açısından değerlendirilebileceğini düşünüyoruz.

Ohnmacht ve ark yaptıkları çalışmada bir tetra-ikameli naftalin-diimid türevinin (MM41) BCL-2 ve k-RAS genlerinin promotör dizilerinde kodlanan dörtlülere güçlü bir şekilde bağlandığını gösterdiler. MM41 uygulanmasının BCL-2 inhibisyonu yoluyla apoptoz indüklediğini düşündüler. IC50 değeri (96 saatlik bir tahlilde hücre büyümesini %50 engellemek için gereken konsantrasyon), MIA PaCa-2 pankreatikadenokarsinom hücre hattında 10 nM olarak tespit ettiler. Yaptıkları deneylerde haftada iki kez 15 mg/kg dozunda IV uygulama ile tümör taşıyan bir grup hayvanda tümör büyümesinde yaklaşık %80 azalma sağlar (116).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri de G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize ederek etki etmektedir. Fakat BCL-2 ve KRAS genlerinin promotör dizi dörtlülere spesifik olup olmadığı açısından ileri çalışmalara ihtiyaç olacağını düşünmekteyiz.

Yan ve ark 2022 yılında yaptıkları çalışmada sanguinarine klorür (SC) ve brezilin (Braz) doğal ürünlerinin birden fazla kanser hücresinde hTERT'nin ekspresyonu ve telomeraz aktivitesini değerlendirdiler. Telomeraz-pozitif fibrosarkom hücre dizisi olan HTC75' de SC'nin telomeraz aktivitesini doza bağlı bir şekilde baskıladığını tespit ettiler. Yaptıkları hücre döngüsü ve apoptozun bir analizinde G2/M fazında ince bir hücre döngüsü durması, ve 2 uM SC ile inkübe edildiğinde ise apoptotik hücrelerde akut bir artış sergilediklerini gördüler. Bir meme kanserini hücre kültürü olan MDA-MB-231'i farelerde ortotopik bir ksenograft modelinde kullandılar. 3 günde bir 1 uM SC ile tedavi edilen farelerdeki tümörler, 24 günlük uygulamadan sonra kontrol farelerindekiyle kıyasla %40 azaldığını tespit ettiler. Birlikte ele alındığında, 1 uM SC'nin hem in vitro hem de in vivo olarak güçlü antitümör etkinliği sergilediğini buldular. HTC75, HeLa (serviks kanseri) ve DLD1 (kolon kanseri) hücrelerinde azalmış telomeraz aktivitelerini ve hücre çoğalmasını gösterirken, MDA-MB-231, Hs578t (meme kanseri) ve A549 (akciğer kanseri) hücrelerinin 8 uM Braz'a yanıt vermediğini tespit ettiler. Bunun sonucunda Braz'ın belirli kanser hücresi türlerinde telomerazı seçici olarak inhibe ettiğini düşündüler (117).

Çalışmamızda da pankreas kanseri hücre kültürlerinde B7 ve B9 moleküllerinin hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz inhibisyonu yapmasını değerlendirdik. B7 ve B9 moleküllerin de sitotoksitesinin doza bağımlı olduğunu tespit ettik. Çalışmamızda Panc-1 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri 24 saatte B7 hücre hattı için 200µM, B9 maddesi için 375µM olarak belirledik. Çalışmamızdaki bileşiklerin de farklı

kanser hücre kültürlerinde telomeraz inhibisyonu ve sitotoksitesinin belirlenmesi bileşiklerimizin seçiciliğinin tespiti açısından faydalı olacağını düşünüyoruz.

Deeb ve ark 2014 yılında yaptıkları çalışmada bir kinonmetidtriterpenoid olan Pristimerin (PM) pankreas kanseri hücre kültürlerinde antikanser aktivitesini ve etki mekanizmasını değerlendirdiler. PM'nin pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için MiaPaCa-2 ve Panc-1 hücreleri, 0.625 ila 5 uM arasında değişen konsantrasyonlarda 72 saat boyunca PM ile muamele edildi. Tedavi sonunda kültürlerin yaşayabilirliği MTS testi ile MiaPaCa-2, %52 ila %85 azalma; Panc-1, %13 ila %81 azalma şeklinde belirlendiler. PM apoptozu inhibe eden anti apoptotik Bcl-2 mRNA'nın doza bağlı bir şekilde inhibisyonunu tespit ettiler (118).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri MiaPaCa-2 ve Panc-1 hücre kültürlerinde doza bağımlı olarak sitotoksitesine yol açmıştı. Bcl-2 gen bölgesi de G-Kuadrupleks DNA yapısından zengin olduğu için bizim bileşiklerimiz de buradaki promotor dizilerine de bağlanarak apoptoza yol açabilir. İleri çalışmalarda bileşiklerimizin bu açıdan araştırılması ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Drygin ve ark 2009 yılında yaptıkları çalışmada nükleolustaki nükleolin/rDNA G-Kuadrupleks komplekslerini seçici olarak bozan böylece RNA Polimeraz I transkripsiyonunu inhibe eden ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen küçük moleküllü bir nükleolus hedefleme ajanı olan CX-3543 molekülünü değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında kolorektal adenokarsinom hücrelerinde HCT 116, CX-3543'ün DNA ve protein sentezi yerine RNA sentezini tercihen inhibe ettiğini gösterdiler. Kanser hücre dizilerinde rRNA sentezinin inhibisyonunun, nükleollerin parçalanması ve ardından p53 yanıtının aktivasyonu ve apoptoz ile sonuçlanan nükleolar strese neden olduğu bilinmektedir. Akciğer kanseri (MDA-MB-231) dahil olmak üzere birçok insan kanserinin murinksenogreft modellerinde in vivo olarak geniş bir antitümör aktivitesi gözlemlendi. Burada CX-3543 (6.25 veya 12.5 mg/kg) ile günlük tedavi iyi tolere edildi ve tümör büyümesi baskılandığını ve benzer şekilde, MIA PaCa-2 pankreatik ksenogreftleri taşıyan farelerin 13 gün boyunca CX-3543 (5 mg/kg) ile tedavisi, hayvan vücut ağırlıkları üzerinde minimum etkiyle tümör büyümesinin önemli ölçüde önlenmesiyle sonuçlandırdılar. CX-3543 dozlaması, bir ilaç tatiline izin vermek için 14 ila 20. günlerde durduruldu. 21 ila 26. günlerde doz uygulamasına yeniden başlanması üzerine, tümör büyümesi yeniden inhibe edildi; bu,

tümörlerin duyarlılığı koruduğunu ve tedavi veya tatil sırasında CX-3543'e direnç geliştirmedeğini düşündüler (119).

Çalışmamızdaki B7 ve B9 molekülleri de pankreas kanseri hücre hatlarında G-Kuadrupleks komplekslerine bağlanıp stabilite ederek etki gösterdiğini düşünüyoruz. Literatürdeki çalışmalarda telomer işlevine müdahale ettiği bilinen başka dörtlü etkileşimli bileşik olan BRACO-19 da DNA sentezini RNA sentezine göre tercihen inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu da bize farklı G-Kuadrupleks bağlayıcı ligandların birbirlerine alternatif olabileceğini düşündürür. İlaç direnci açısından moleküllerimizin in vivo koşullarda ileri çalışmalarda çalışılabileceğini düşünüyoruz.

Marchetti ve ark 2018 yılında yaptıkları çalışmada pankreas duktaladenokarsinomunda G-Kuadrupleks bağlayıcı küçük molekül 2,7-bis(3-morpholinopropyl)-4-((2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)amino)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone (CM03) 'ü PDAK hücre kültürlerinde antikanser etkilerini başka bir üç ikameli naftalin diimid türevleri MM41 ve gemtamisine kıyaslayarak çalışmışlardır. MM41 ve CM03 ile kenetleme, elde edilen G-Kuadrupleks komplekslerinin benzer olduğunu ortaya çıkardılar, ancak CM03 yan zincirleri yalnızca üç oluştura erişebilirken MM41 dört oluştura da hedeflediğini gösterdiler. Her iki bileşik de, özellikle düşük nM konsantrasyonlarında yanıt veren akciğer ve pankreatik kanser hücre dizileri için oldukça güçlü büyüme önleme aktivitesi gösterdiğini tespit ettiler. CM03, MCF-7 hücrelerine kıyasla MIA PaCa-2 için >20 kat seçicilik göstermiştir. Daha sonra in vivo bir deri altı MIA PaCa-2 pankreas tümörü ksenograft modeli kullanılarak sekiz fareden oluşan bir grupta 4 haftalık bir süre boyunca (28 gün: 8 doz), her biri haftada iki kez olmak üzere 10 ve 15 mg/kg'da tedavi verildi. Diğer iki gruba 15 mg/kg'da MM41 veya gemsitabin verildi ve aynı doz rejimini aldılar. Deney boyunca CM03, doza bağımlı bir antitümör tepkisi gösterdi. 28. günde doz uygulamasının sonunda, dört terapi grubunun tümü, araç kontrol grubuna kıyasla anlamlı tümör büyümesi inhibisyonu ve tümör hacminde düşme gösterdi. ($p < 0,001$) CM03 ile tedavi edilen hayvanlardan daha sonra alınan hayati organların histopatolojik analizi de hiçbir organ hasarı belirtisi göstermedi. MM41 CM03'ü kıyasladaha yüksek moleküler ağırlığı ve dört pozitif yükü nedeniyle afinitesi daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (120).

Çalışmamızda G-Kuadrupleks bağlayıcı B7 ve B9 molekülleri pankreas kanseri hücre hatlarında hTERT ekspresyonunu azaltarak telomerase inhibisyonunu doza bağımlı şekilde yaptı. Moleküllerimizin in vivo ksenograft modellerinde tümör hacim

takibinin yapılması ve diğer organlara hasar verip vermeyeceğini tespit edilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca 2 molekülümüzün afinite açısından karşılaştırılması 24 ve 48 saatte oluşan IC50 değerlerini açıklamamıza yardımcı olabileceğini düşünüyoruz.

Gunaratnam ark 2007 yılında yaptıkları çalışmada trisübstitüeakridin bileşiği olan, G-Kuadrupleks yapılarını stabilize eden bir ligand olan BRACO-19'un telomeraz inhibisyonu ve kısaltmasının mekanizmalarını incelemişlerdir. BRACO-19, kısa süreli maruz kalma deneylerinin ortaya koyduğu gibi, kanserli ve normal fibroblast hücre hatları IMR90 ve WI-38 arasında seçicilik gösterirken, tüm kanser hücre dizilerinde sitotoksik konsantrasyonlarda uzun süreli kültürde optimum büyüme inhibe edici aktivite gösterdiğini tespit ettiler. 2 hafta kadar BRACO-19 ile tedavi edilen meme kanseri hcre hattı dizisi olan MCF7 hücrelerinden alınan protein özleri, Telomere Tekrar Amplifikasyon Protokolü (TRAP) tahlili kullanılarak telomeraz aktivitesini ölçüldü. Sonuç olarak telomeraz aktivitesi numunelere kıyasla 1 mM BRACO-19 konsantrasyonunda 2 haftalık tedavinin sonunda toplam %65 oranında inhibe edildiğini gösterdiler. Daha düşük 0,5 mMBRACO-19 konsantrasyonunda ise örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı fark saptamadılar. Ayrıca, BRACO-19'un HT1080 hücre popülasyonunun bir bölümünde POT1'in bağlanmasını bozduğunu ancak TRF2 sinyalini değiştirmediklerini gösterdiler. Uzun süre maruz kaldıktan sonra A2780 yumurtalık kanseri hücre hattında telomer uzunluğunun azaldığını tespit ettiler (121).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri de pankreas kanseri hücre hatlarında G-Kuadrupleks komplekslerine etki ederek doza bağımlı şekilde sitotoksiten sorumludurlar. İnsan sağlıklı hücre kültürlerinde kanser hücre hatlarına göre seçicilik ya da afinite açısından değerlendirilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz. Yukarıdaki çalışmada bir ligand olan BRACO-19 gibi ligand olan bileşiklerimizin telomer uzunluğuna etkilerini incelemek için de çalışmamızın genişletebileceğimizi düşünüyoruz.

Bryan ve ark 2015 yılında yaptıkları çalışmada BIBR1532 (2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoicacid) molekülünün telomeraz inhibisyonunun yapısal temelini anlamaya çalışmışlardır. Nükleosidik olmayan, rekabetçi olmayan, küçük moleküllü bir telomeraz inhibitörü olan BIBR1532 molekülünün telomeraz enziminin başparmak bölgesinin dış yüzeyinde korunmuş bir hidrofobik cebe (FVYL) bağlanarak in vivo telomer kısaltmasına neden olduğunu tespit ettiler (83).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri telomerazın G-Kuadrupleks komplekslerine etki ederek Htert ekspresyonunu azalttıklarını tespit ettik. Telomerin kısalmasına etkisini görebilmek için çalışmamızın genişletilmesinin literatüre daha fazla katkısı olabileceğini düşünüyoruz.

Siddiqui-Jain ve ark 2002 yılındaki yaptıkları çalışmada c-MYC onkogeninin transkripsiyonunu baskılanmasında G-Kuadrupleksin stabilizasyonunu sağlayan katyonik porfirinlerden TMPyP4 ve TMPyP2 moleküllerinin rolünü araştırmışlardır. Anafaz köprülerinin üretimi ve in vivo antitümör aktivitesi gibi karşılık gelen biyolojik etkileri sadece TMPyP4 ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca TMPyP4'ün, c-myc transkripsiyonunu ve protein ekspresyonunu azalttığı göstermişlerdir (122).

Çalışmamızda da B7 ve B9 molekülleri de G-Kuadrupleks DNA yapısını stabilize ederek etki etmektedir. Fakat c-myc gibi onkogenlerin ekspresyonuna etkisi açısından ileri çalışmaların faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Temime-Smaalive ark 2009 yılında yaptıkları çalışmada G-Kuadrupleks Ligand Telomestatinin alternatif telomer uzatması (ALT) pozitif olan hücre hatlarında etkinliğini araştırmışlardır. Telomestatinin ALT hücrelerinde temel bir telomerik ilişkili faktör olan Topoizomeraz III α 'yı G-Kuadrupleks oluşumuna bağlanarak inhibe ettiğini tespit ettiler (123).

Çalışmamızda da benzer şekilde moleküllerimiz pankreas hücre kültürlerinde sitotoksitede yaptığını tespit ettik. hTERT ekspresyonunu azaltarak telomeraz inhibisyonunu yapan bileşiklerimizin ALT pozitif hücre kültürlerinde telomerazinhibisyonunu ileri çalışmalarda değerlendirmesinin faydalı olabileceğini düşünüyoruz.

Gomez ve ark 2004 yılında yaptıkları çalışmada triazin serisine ait güçlü bir G-Kuadrupleks etkileşimli ajan olan Ligand 12459'un telomerazın aşağı regülasyonu araştırmışlardır. 12459'un liganda kısa süreli maruz kaldıktan sonra A549 (akciğer kanseri hücre hattı) hücrelerinde telomeraz aktivitesini aşağı doğru düzenlediği de gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, 12459, c-myc gen transkripsiyonunu bloke eden TMPyP4 ligandından farklı olarak hTERT DNA transkripsiyonundan ziyade hTERT mRNA işlemlerini etkilediğini düşünmüşlerdir (124).

Çalışmamızdaki moleküllerden B7 bileşiği moleküler doking analizlerimizde DNA ve RNA yapılarıyla benzer etkileşim göstermişti. HTERT ekspresyonunun

azaltılmasının G-Kuadrupleksin stabilizasyonunu DNA'ya mı bağımlı RNA'ya mı bağımlı olarak ya da her ikisine de bağlanarak ortaya çıktığını tespit etmek için daha ileri çalışmaların faydalı olabileceğini düşünüyoruz.

Ramos ve ark 2019 yılında yaptıkları çalışmada G-Kuadrupleks DNA yapıları için seçici ligandlar olan çok yüklü ftalosiyeninleri çalışmışlardır. Bunlardan biri dört çevresel pozitif yüke (ZnPc1) ve diğeri sekiz pozitif yüke (ZnPc4) dupleks DNA yapıları üzerinde G-Kuadruplex için yüksek seçicilik ve afinite gösterdiğini tespit ettiler. Bu çalışmada 5,10,15,20-tetrakis(1-metilpiridinyum-4-il)porfirinin (TMPyP) de G-Kuadruplex için yüksek afinite gösterdiğini ve dolayısıyla potansiyel bir telomeraz inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. ZnPc1 ve ZnPc4'ün antitümör potansiyelini araştırmak için, UM-UC-3 mesane kanseri hücrelerine karşı sitotoksitelerini belirlediler. 48 saatlik tedaviden sonra ZnPc1, ZnPc4 ve TMPyP'nin IC50 değerleri ZnPc1'inki ZnPc4 veya TMPyP'ninkinden önemli ölçüde daha düşük olarak tespit ettiler ve bunun daha yüksek bir toksisiteye sahip olduğunu düşündüler (2).

Çalışmamızda kullanılan bileşikler de antrakınon yan zincir taşıyan bileşiklerdir. Ramos ve ark'nın yaptıkları çalışmada da antrokinon türevi bileşimin mesane kanseri hücrelerinde sitotoksiteye yol açtığı tespit edilmiş olup, bizim çalışmamızda da bileşiklerimiz telomeraz inhibisyonu yoluyla panreas kanseri hücrelerinde sitotoksiteye yol açmıştır. Burada antrakınon türevli ilaçların farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılabildikleri çalışmamız sonuçları ile uyumludur.

6. SONUÇ

- 1- Çalışmamızda yeni sentezlenen ve daha önce üzerinde çalışılmamış bir bileşik olan antrakinon yan zincir taşıyan ftalosiyenin türevlerinin (B7 ve B9) insan pankreas hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.
- 2- Çalışmamızda Panc-1 hücre hattında 24 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında hTERT ekspresyonu sırasıyla -13,09 kat ve -16,91 kat azalırken, Mia-Paca hücre hattında 48 saatte B7 ve B9 muamelesi sonrasında sırasıyla -3,12 kat ve -1,48 kat azaldığını tespit ettik.
- 3- Çalışmamızın başlangıcında B7 ve B9 moleküllerinin hTERT ekspresyonu inceledikten sonra telomeraz uzunluğu ölçümünü de araştırmamıza dahil etme amacındaydık. Ancak malzeme alımı sırasında yaşanan aksaklık nedeniyle kitlerin bozuk çıkması nedeniyle telomeraz uzunluk ölçümünü değerlendiremedik. Bu konuda daha ileri çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.
- 4- Çalışmamızda kullanılan moleküller suda çözünmüyor. Bu nedenle ileride yapılacak in vivo çalışmalarda değerlendirilebilmesi için nanoküreler ya da hyaluronik asit ile birlikte suda çözünür hale getirilerek kullanılabilirliği araştırılacaktır. Bunlara ek olarak albumine bağlanarak etki edebilirliği in vivo çalışmalarda araştırılacaktır.
- 5- Çalışmamızda kullanılan moleküllerin Telomerik G-Kuadrupleks DNA'ya bağlanma enerjisi yüksektir. Fakat selektif değildir. Daha selektif molekül tasarımı ve sentezi için çalışmalarımız devam etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Luu HN, Huang JY, Wang R, Adams-Haduch J, Jin A, Koh WP, et al. Association between leukocyte telomere length and the risk of pancreatic cancer: Findings from a prospective study. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221697. Epub 20190829. doi: 10.1371/journal.pone.0221697. PubMed PMID: 31465482; PubMed Central PMCID: PMC6715276.
2. Ramos CIV, Almeida SP, Lourenço LMO, Pereira PMR, Fernandes R, Faustino MAF, et al. Multicharged Phthalocyanines as Selective Ligands for G-Quadruplex DNA Structures. *Molecules*. 2019;24(4):733. PubMed PMID: doi:10.3390/molecules24040733.
3. Tsuchiya R, Fujisawa N. On the etymology of "pancreas". *Int J Pancreatol*. 1997;21(3):269-72. doi: 10.1007/BF02821615. PubMed PMID: 9322128.
4. Townsend JCM, R. Daniel Beauchamp, B. Mark Evers, and Kenneth L. Mattox. *Sabiston textbook of surgery*. 20 ed: Elsevier - Health Sciences Division; 2016.
5. Fisher WE, Andersen DK, Windsor JA, Dudeja V, Brunicaardi FC. *Pancreas*. In: Brunicaardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Kao LS, Hunter JG, et al., editors. *Schwartz's Principles of Surgery*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
6. Çağlar V, Gönül Y, Songur A. Pankreas Anatomisi ve Varyasyonları. *Uluslararası Klinik Araştırmalar Dergisi* 2014;2(2).
7. Keller J, Layer P. Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*. 2005;54 Suppl 6(Suppl 6):vi1-28. doi: 10.1136/gut.2005.065946. PubMed PMID: 15951527; PubMed Central PMCID: PMC1867805.
8. Roder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):e219. Epub 20160311. doi: 10.1038/emm.2016.6. PubMed PMID: 26964835; PubMed Central PMCID: PMC4892884.
9. Brunicaardi FC, Sun YS, Druck P, Goulet RJ, Elahi D, Andersen DK. Splanchnic neural regulation of insulin and glucagon secretion in the isolated perfused human pancreas. *Am J Surg*. 1987;153(1):34-40. doi: 10.1016/0002-9610(87)90198-x. PubMed PMID: 3541657.
10. Ebert R, Creutzfeldt W. Gastrointestinal peptides and insulin secretion. *Diabetes Metab Rev*. 1987;3(1):1-26. doi: 10.1002/dmr.5610030101. PubMed PMID: 3552520.
11. Voss M, Pappas T. Pancreatic Fistula. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2002;5(5):345-53. doi: 10.1007/s11938-002-0023-0. PubMed PMID: 12207858.

12. Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab.* 2006;3(5):379-86. doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.004. PubMed PMID: 16679295.
13. Efendic S, Tatemoto K, Mutt V, Quan C, Chang D, Ostenson CG. Pancreastatin and islet hormone release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(20):7257-60. doi: 10.1073/pnas.84.20.7257. PubMed PMID: 2890162; PubMed Central PMCID: PMC299271.
14. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2020;395(10242):2008-20. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30974-0. PubMed PMID: 32593337.
15. Wong MCS, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JJY. Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Sci Rep.* 2017;7(1):3165. Epub 20170609. doi: 10.1038/s41598-017-02997-2. PubMed PMID: 28600530; PubMed Central PMCID: PMC5466634.
16. Ushio J, Kanno A, Ikeda E, Ando K, Nagai H, Miwata T, et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Epidemiology and Risk Factors. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(3). Epub 20210320. doi: 10.3390/diagnostics11030562. PubMed PMID: 33804776; PubMed Central PMCID: PMC8003883.
17. Huang J, Lok V, Ngai CH, Zhang L, Yuan J, Lao XQ, et al. Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 2021;160(3):744-54. Epub 20201013. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.007. PubMed PMID: 33058868.
18. Zhong Y, Naito Y, Cope L, Naranjo-Suarez S, Saunders T, Hong SM, et al. Functional p38 MAPK identified by biomarker profiling of pancreatic cancer restrains growth through JNK inhibition and correlates with improved survival. *Clin Cancer Res.* 2014;20(23):6200-11. Epub 20140624. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2823. PubMed PMID: 24963048; PubMed Central PMCID: PMC4866510.
19. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. Epub 20180912. doi: 10.3322/caac.21492. PubMed PMID: 30207593.
20. Başara Bora B. SÇİ, Aygün A., Özdemir T. A., Kulali B., Uzun B. B., Birge Kayış B. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2018. In: Bakanlığı TCS, editor. 2017.
21. Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2019;4:50. Epub 20190627. doi: 10.21037/tgh.2019.06.02. PubMed PMID: 31304427; PubMed Central PMCID: PMC6624347.
22. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol.* 2014;20(32):11182-98. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11182. PubMed PMID: 25170203; PubMed Central PMCID: PMC4145757.

23. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(5):318-48. Epub 20130715. doi: 10.3322/caac.21190. PubMed PMID: 23856911; PubMed Central PMCID: PMC3769458.
24. Rahman F, Cotterchio M, Cleary SP, Gallinger S. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124489. Epub 20150409. doi: 10.1371/journal.pone.0124489. PubMed PMID: 25856529; PubMed Central PMCID: PMC4391718.
25. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9694-705. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9694. PubMed PMID: 27956793; PubMed Central PMCID: PMC5124974.
26. Genkinger JM, Kitahara CM, Bernstein L, Berrington de Gonzalez A, Brotzman M, Elena JW, et al. Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Ann Oncol.* 2015;26(11):2257-66. Epub 20150907. doi: 10.1093/annonc/mdv355. PubMed PMID: 26347100; PubMed Central PMCID: PMC4621029.
27. Wahi MM, Shah N, Schrock CE, Rosemurgy AS, 2nd, Goldin SB. Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. *Ann Epidemiol.* 2009;19(2):103-11. doi: 10.1016/j.annepidem.2008.11.003. PubMed PMID: 19185803.
28. Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M. Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17(24):2897-908. doi: 10.3748/wjg.v17.i24.2897. PubMed PMID: 21734801; PubMed Central PMCID: PMC3129504.
29. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol.* 2019;10(1):10-27. Epub 20190226. doi: 10.14740/wjon1166. PubMed PMID: 30834048; PubMed Central PMCID: PMC6396775.
30. Bosetti C, Rosato V, Li D, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, et al. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol.* 2014;25(10):2065-72. Epub 20140723. doi: 10.1093/annonc/mdu276. PubMed PMID: 25057164; PubMed Central PMCID: PMC4176453.
31. Wormann SM, Algul H. Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. *Front Oncol.* 2013;3:282. Epub 20131118. doi: 10.3389/fonc.2013.00282. PubMed PMID: 24303367; PubMed Central PMCID: PMC3831165.
32. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013;144(6):1252-61. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.068. PubMed PMID: 23622135; PubMed Central PMCID: PMC3662544.

33. Turati F, Edefonti V, Bosetti C, Ferraroni M, Malvezzi M, Franceschi S, et al. Family history of cancer and the risk of cancer: a network of case-control studies. *Ann Oncol.* 2013;24(10):2651-6. Epub 20130724. doi: 10.1093/annonc/mdt280. PubMed PMID: 23884440.
34. Ghiorzo P. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(31):10778-89. doi: 10.3748/wjg.v20.i31.10778. PubMed PMID: 25152581; PubMed Central PMCID: PMC4138458.
35. Phan AT, Halperin DM, Chan JA, Fogelman DR, Hess KR, Malinowski P, et al. Pazopanib and depot octreotide in advanced, well-differentiated neuroendocrine tumours: a multicentre, single-group, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):695-703. Epub 20150505. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70136-1. PubMed PMID: 25956795; PubMed Central PMCID: PMC4800487.
36. Stevens KJ, Lisanti C. Pancreas Imaging. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2022.
37. Klimstra DS. Noductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* 2007;20 Suppl 1:S94-112. doi: 10.1038/modpathol.3800686. PubMed PMID: 17486055.
38. Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(7):1766-73. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0120. PubMed PMID: 16030115.
39. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2018;24(43):4846-61. doi: 10.3748/wjg.v24.i43.4846. PubMed PMID: 30487695; PubMed Central PMCID: PMC6250924.
40. Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter AM, Kloppel G. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol.* 2014;20(38):13833-41. doi: 10.3748/wjg.v20.i38.13833. PubMed PMID: 25320520; PubMed Central PMCID: PMC4194566.
41. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grutzmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int.* 2014;2014:474905. Epub 20140324. doi: 10.1155/2014/474905. PubMed PMID: 24783207; PubMed Central PMCID: PMC3982269.
42. Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008;1(4):306-16. Epub 20080101. PubMed PMID: 18787611; PubMed Central PMCID: PMC2480542.
43. Wilde RFd, Hruban RH, Maitra A, Offerhaus GJ. Reporting precursors to invasive pancreatic cancer: Pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal neoplasms and mucinous cystic neoplasm. *Diagnostic Histopathology.* 2012;18:17-30.

44. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016;144:241-75. Epub 20161015. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.008. PubMed PMID: 27865459; PubMed Central PMCID: PMC6260831.
45. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000;60(7):2002-6. PubMed PMID: 10766191.
46. Askan G, Bagci P, Memis B, Basturk O. Intraductal Neoplasms of the Pancreas: An Update. *Turk Patoloji Derg.* 2017;33(2):87-102. doi: 10.5146/tjpath.2017.01386. PubMed PMID: 28272684.
47. Salvia R, Fernandez-del Castillo C, Bassi C, Thayer SP, Falconi M, Mantovani W, et al. Main-duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical predictors of malignancy and long-term survival following resection. *Ann Surg.* 2004;239(5):678-85; discussion 85-7. doi: 10.1097/01.sla.0000124386.54496.15. PubMed PMID: 15082972; PubMed Central PMCID: PMC1356276.
48. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36(4):831-49, vi. doi: 10.1016/j.gtc.2007.08.012. PubMed PMID: 17996793; PubMed Central PMCID: PMC2194627.
49. Brosens LA, Hackeng WM, Offerhaus GJ, Hruban RH, Wood LD. Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing "landscape". *J Gastrointest Oncol.* 2015;6(4):358-74. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.032. PubMed PMID: 26261723; PubMed Central PMCID: PMC4502163.
50. Fukushima N, Fukayama M. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas: pathology and molecular genetics. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2007;14(3):238-42. Epub 20070529. doi: 10.1007/s00534-006-1168-3. PubMed PMID: 17520198.
51. Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, Dominguez I, Bassi C, Falconi M, et al. Mucinous cystic neoplasm of the pancreas is not an aggressive entity: lessons from 163 resected patients. *Ann Surg.* 2008;247(4):571-9. doi: 10.1097/SLA.0b013e31811f4449. PubMed PMID: 18362619; PubMed Central PMCID: PMC3806104.
52. Saiki Y, Horii A. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathol Int.* 2014;64(1):10-9. doi: 10.1111/pin.12114. PubMed PMID: 24471965.
53. Gungor C, Hofmann BT, Wolters-Eisfeld G, Bockhorn M. Pancreatic cancer. *Br J Pharmacol.* 2014;171(4):849-58. doi: 10.1111/bph.12401. PubMed PMID: 24024905; PubMed Central PMCID: PMC3925023.
54. Hong SM, Park JY, Hruban RH, Goggins M. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(6):716-27. doi: 10.5858/2010-0566-RA.1. PubMed PMID: 21631264; PubMed Central PMCID: PMC3107523.

55. Weissmueller S, Manchado E, Saborowski M, Morris JPt, Wagenblast E, Davis CA, et al. Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell*. 2014;157(2):382-94. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.066. PubMed PMID: 24725405; PubMed Central PMCID: PMC4001090.
56. Abramson MA, Jazag A, van der Zee JA, Whang EE. The molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2007;1(4 Suppl 2):S7-S12. PubMed PMID: 19360152; PubMed Central PMCID: PMC2666839.
57. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*. 2006;1(1):7-9. PubMed PMID: 17409820.
58. Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Ogura Y, Yamada D, et al. Overexpression of c-met in the early stage of pancreatic carcinogenesis; altered expression is not sufficient for progression from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2006;12(24):3878-82. doi: 10.3748/wjg.v12.i24.3878. PubMed PMID: 16804974; PubMed Central PMCID: PMC4087937.
59. Maitra A, Hruban RH. A new mouse model of pancreatic cancer: PTEN gets its Akt together. *Cancer Cell*. 2005;8(3):171-2. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.007. PubMed PMID: 16169459.
60. De La Cruz MS, Young AP, Ruffin MT. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am Fam Physician*. 2014;89(8):626-32. PubMed PMID: 24784121.
61. Tummala P, Junaidi O, Agarwal B. Imaging of pancreatic cancer: An overview. *J Gastrointest Oncol*. 2011;2(3):168-74. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.036. PubMed PMID: 22811847; PubMed Central PMCID: PMC3397617.
62. Lee ES, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: a state-of-the-art review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(24):7864-77. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7864. PubMed PMID: 24976723; PubMed Central PMCID: PMC4069314.
63. Kitano M, Yoshida T, Itonaga M, Tamura T, Hatamaru K, Yamashita Y. Impact of endoscopic ultrasonography on diagnosis of pancreatic cancer. *J Gastroenterol*. 2019;54(1):19-32. Epub 20181107. doi: 10.1007/s00535-018-1519-2. PubMed PMID: 30406288; PubMed Central PMCID: PMC6314985.
64. Nakai Y, Takahara N, Mizuno S, Kogure H, Koike K. Current Status of Endoscopic Ultrasound Techniques for Pancreatic Neoplasms. *Clin Endosc*. 2019;52(6):527-32. Epub 20190724. doi: 10.5946/ce.2019.025. PubMed PMID: 31337194; PubMed Central PMCID: PMC6900295.
65. Duan H, Baratto L, Iagaru A. The Role of PET/CT in the Imaging of Pancreatic Neoplasms. *Semin Ultrasound CT MR*. 2019;40(6):500-8. Epub 20190425. doi: 10.1053/j.sult.2019.04.006. PubMed PMID: 31806148.

66. Conti CB, Cereatti F, Grassia R. Endoscopic ultrasound-guided sampling of solid pancreatic masses: the fine needle aspiration or fine needle biopsy dilemma. Is the best needle yet to come? *World J Gastrointest Endosc.* 2019;11(8):454-71. doi: 10.4253/wjge.v11.i8.454. PubMed PMID: 31523377; PubMed Central PMCID: PMC6715568.
67. Liao X, Zhang D. The 8th Edition American Joint Committee on Cancer Staging for Hepato-pancreato-biliary Cancer: A Review and Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2021;145(5):543-53. doi: 10.5858/arpa.2020-0032-RA. PubMed PMID: 32223559.
68. Loveday BPT, Lipton L, Thomson BN. Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management. *Aust J Gen Pract.* 2019;48(12):826-31. doi: 10.31128/AJGP-06-19-4957. PubMed PMID: 31774983.
69. Lambert A, Schwarz L, Borbath I, Henry A, Van Laethem JL, Malka D, et al. An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Ther Adv Med Oncol.* 2019;11:1758835919875568. Epub 20190925. doi: 10.1177/1758835919875568. PubMed PMID: 31598142; PubMed Central PMCID: PMC6763942.
70. Varadhachary GR, Tamm EP, Abbruzzese JL, Xiong HQ, Crane CH, Wang H, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: definitions, management, and role of preoperative therapy. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(8):1035-46. Epub 20060724. doi: 10.1245/ASO.2006.08.011. PubMed PMID: 16865597.
71. Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R, Neoptolemos JP. Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg.* 2004;91(11):1410-27. doi: 10.1002/bjs.4794. PubMed PMID: 15499648.
72. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P, Group EGW. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7:vii33-40. doi: 10.1093/annonc/mds224. PubMed PMID: 22997452.
73. Lowery MA, O'Reilly EM. Pancreatic cancer: the role of molecular markers in diagnosis and management. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2011;9(12):900-8. PubMed PMID: 2252658.
74. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med.* 2010;7(4):e1000267. Epub 20100420. doi: 10.1371/journal.pmed.1000267. PubMed PMID: 20422030; PubMed Central PMCID: PMC2857873.
75. Harley CB. Human ageing and telomeres. *Ciba Found Symp.* 1997;211:129-39; discussion 39-44. doi: 10.1002/9780470515433.ch9. PubMed PMID: 9524755.
76. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):787-91. doi: 10.1016/S0959-8049(97)00062-2. PubMed PMID: 9282118.

77. Deeb D, Gao X, Liu Y, Varma NR, Arbab AS, Gautam SC. Inhibition of telomerase activity by oleanane triterpenoid CDDO-Me in pancreatic cancer cells is ROS-dependent. *Molecules*. 2013;18(3):3250-65. Epub 20130313. doi: 10.3390/molecules18033250. PubMed PMID: 23486104; PubMed Central PMCID: PMC3632053.
78. Xu Y, Goldkorn A. Telomere and Telomerase Therapeutics in Cancer. *Genes (Basel)*. 2016;7(6). Epub 20160526. doi: 10.3390/genes7060022. PubMed PMID: 27240403; PubMed Central PMCID: PMC4929421.
79. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-10. doi: 10.1101/gad.1346005. PubMed PMID: 16166375.
80. Guterres AN, Villanueva J. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene*. 2020;39(36):5811-24. Epub 20200730. doi: 10.1038/s41388-020-01405-w. PubMed PMID: 32733068; PubMed Central PMCID: PMC7678952.
81. Lilleby W, Gaudernack G, Brunsvig PF, Vlatkovic L, Schulz M, Mills K, et al. Phase I/IIa clinical trial of a novel hTERT peptide vaccine in men with metastatic hormone-naive prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(7):891-901. Epub 20170408. doi: 10.1007/s00262-017-1994-y. PubMed PMID: 28391357.
82. Chiappori AA, Kolevska T, Spigel DR, Hager S, Rarick M, Gadgeel S, et al. A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(2):354-62. Epub 20141202. doi: 10.1093/annonc/mdu550. PubMed PMID: 25467017; PubMed Central PMCID: PMC4304381.
83. Bryan C, Rice C, Hoffman H, Harkisheimer M, Sweeney M, Skordalakes E. Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532. *Structure*. 2015;23(10):1934-42. Epub 20150910. doi: 10.1016/j.str.2015.08.006. PubMed PMID: 26365799; PubMed Central PMCID: PMC4598299.
84. Kosiol N, Juranek S, Brossart P, Heine A, Paeschke K. G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy. *Mol Cancer*. 2021;20(1):40. Epub 20210225. doi: 10.1186/s12943-021-01328-4. PubMed PMID: 33632214; PubMed Central PMCID: PMC7905668.
85. Cao Q, Li Y, Freisinger E, Qin PZ, Sigel RKO, Mao Z-W. G-quadruplex DNA targeted metal complexes acting as potential anticancer drugs. *Inorganic Chemistry Frontiers*. 2017;4(1):10-32. doi: 10.1039/C6QI00300A.
86. Yaku H, Murashima T, Miyoshi D, Sugimoto N. Specific binding of anionic porphyrin and phthalocyanine to the G-quadruplex with a variety of in vitro and in vivo applications. *Molecules*. 2012;17(9):10586-613. Epub 20120905. doi: 10.3390/molecules170910586. PubMed PMID: 22951397; PubMed Central PMCID: PMC6268517.

87. Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, et al. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res.* 2005;65(4):1489-96. doi: 10.1158/0008-5472.Can-04-2910. PubMed PMID: 15735037.
88. Baginski M, Serbakowska K. In silico design of telomerase inhibitors. *Drug Discov Today.* 2020;25(7):1213-22. Epub 20200506. doi: 10.1016/j.drudis.2020.04.024. PubMed PMID: 32387261.
89. Manet I, Manoli F, Zambelli B, Andreano G, Masi A, Cellai L, et al. Complexes of the antitumoral drugs Doxorubicin and Sabarubicin with telomeric G-quadruplex in basket conformation: ground and excited state properties. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(8):1326-37. Epub 20110609. doi: 10.1039/c1pp05065f. PubMed PMID: 21655621.
90. Sato N, Mizumoto K, Nagai E, Tanaka M. Telomerase as a new target for pancreatic cancer treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002;9(3):322-7. doi: 10.1007/s005340200036. PubMed PMID: 12353143.
91. Barthwal R, Tariq Z. Molecular Recognition of Parallel G-quadruplex [d-(TTGGGGT)](4) Containing Tetrahymena Telomeric DNA Sequence by Anticancer Drug Daunomycin: NMR-Based Structure and Thermal Stability. *Molecules.* 2018;23(9). Epub 20180905. doi: 10.3390/molecules23092266. PubMed PMID: 30189644; PubMed Central PMCID: PMC6225185.
92. Zeng X, Hernandez-Sanchez W, Xu M, Whited TL, Baus D, Zhang J, et al. Administration of a Nucleoside Analog Promotes Cancer Cell Death in a Telomerase-Dependent Manner. *Cell Rep.* 2018;23(10):3031-41. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.020. PubMed PMID: 29874588; PubMed Central PMCID: PMC6072277.
93. Deeb D, Gao X, Liu Y, Pindolia K, Gautam SC. Inhibition of hTERT/telomerase contributes to the antitumor activity of pristimerin in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 2015;34(1):518-24. Epub 20150519. doi: 10.3892/or.2015.3989. PubMed PMID: 25997419; PubMed Central PMCID: PMC4484616.
94. Kusumoto M, Ogawa T, Mizumoto K, Ueno H, Niiyama H, Sato N, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2140-7. PubMed PMID: 10473098.
95. Xu D, Wang Q, Gruber A, Bjorkholm M, Chen Z, Zaid A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene.* 2000;19(45):5123-33. doi: 10.1038/sj.onc.1203890. PubMed PMID: 11064449.
96. Garcia-Beccaria M, Martinez P, Mendez-Pertuz M, Martinez S, Blanco-Aparicio C, Canamero M, et al. Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage. *EMBO Mol Med.* 2015;7(7):930-49. doi: 10.15252/emmm.201404497. PubMed PMID: 25971796; PubMed Central PMCID: PMC4520658.

97. Chien SC, Wu YC, Chen ZW, Yang WC. Naturally occurring anthraquinones: chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:357357. Epub 20150318. doi: 10.1155/2015/357357. PubMed PMID: 25866536; PubMed Central PMCID: PMC4381678.
98. Dubey R, Prasad R. Biophysical characterization of in vitro bound *Streptomyces peucetius* daunorubicin-serine protease complex. *Int J Biol Macromol.* 2014;64:111-4. Epub 20131123. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.007. PubMed PMID: 24280032.
99. Soganci T, Baygu Y, Kabay N, Gök Y, Ak M. Comparative Investigation of Peripheral and Nonperipheral Zinc Phthalocyanine-Based Polycarbazoles in Terms of Optical, Electrical, and Sensing Properties. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(25):21654-65. Epub 20180615. doi: 10.1021/acsami.8b06206. PubMed PMID: 29870222.
100. Li Y, Guo F, Guan Y, Chen T, Ma K, Zhang L, et al. Novel Anthraquinone Compounds Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation via the Reactive Oxygen Species/JNK Pathway. *Molecules.* 2020;25(7). Epub 20200404. doi: 10.3390/molecules25071672. PubMed PMID: 32260423; PubMed Central PMCID: PMC7180728.
101. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(2):157-70. Epub 20120802. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x. PubMed PMID: 23278683.
102. Koç M, Kabay N. Synthesis and molecular docking studies of Zn(II)phthalocyanines containing anthraquinone moieties as selective ligands for G-quadruplex structures. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines.* 2022;26(01):19-30. doi: 10.1142/s1088424621500814.
103. Wang YF, Guo KJ, Huang BT, Liu Y, Tang XY, Zhang JJ, et al. Inhibitory effects of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on pancreatic cancer cell Bxpc-3 telomerase activity and cell growth in vitro. *World J Gastroenterol.* 2006;12(25):4004-8. doi: 10.3748/wjg.v12.i25.4004. PubMed PMID: 16810748; PubMed Central PMCID: PMC4087710.
104. Shen Y, Pu K, Zheng K, Ma X, Qin J, Jiang L, et al. Differentially Expressed microRNAs in MIA PaCa-2 and PANC-1 Pancreas Ductal Adenocarcinoma Cell Lines are Involved in Cancer Stem Cell Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18). Epub 20190910. doi: 10.3390/ijms20184473. PubMed PMID: 31510100; PubMed Central PMCID: PMC6770012.
105. Gradiz R, Silva HC, Carvalho L, Botelho MF, Mota-Pinto A. MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Sci Rep.* 2016;6:21648. Epub 20160217. doi: 10.1038/srep21648. PubMed PMID: 26884312; PubMed Central PMCID: PMC4756684.

106. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Priepke H, et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *Embo j.* 2001;20(24):6958-68. doi: 10.1093/emboj/20.24.6958. PubMed PMID: 11742973; PubMed Central PMCID: PMC125790.
107. Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene.* 2000;19(45):5123-33. doi: 10.1038/sj.onc.1203890. PubMed PMID: 11064449.
108. Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Okabe S, Ohyashiki JH, et al. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene.* 2006;25(42):5719-25. Epub 20060501. doi: 10.1038/sj.onc.1209577. PubMed PMID: 16652154.
109. Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, Hurley LH. The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer Res.* 2003;63(12):3247-56. PubMed PMID: 12810655.
110. Huang FC, Chang CC, Lou PJ, Kuo IC, Chien CW, Chen CT, et al. G-quadruplex stabilizer 3,6-bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide induces accelerated senescence and inhibits tumorigenic properties in cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6(6):955-64. Epub 20080530. doi: 10.1158/1541-7786.Mcr-07-0260. PubMed PMID: 18515756.
111. Gao C, Liu Z, Hou H, Ding J, Chen X, Xie C, et al. BMPQ-1 binds selectively to (3+1) hybrid topologies in human telomeric G-quadruplex multimers. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(20):11259-69. doi: 10.1093/nar/gkaa870. PubMed PMID: 33080032; PubMed Central PMCID: PMC7672424.
112. Berardinelli F, Siteni S, Tanzarella C, Stevens MF, Sgura A, Antoccia A. The G-quadruplex-stabilising agent RHPS4 induces telomeric dysfunction and enhances radiosensitivity in glioblastoma cells. *DNA Repair (Amst).* 2015;25:104-15. Epub 20141105. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.10.009. PubMed PMID: 25467559.
113. Salvati E, Leonetti C, Rizzo A, Scarsella M, Mottolese M, Galati R, et al. Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3236-47. doi: 10.1172/jci32461. PubMed PMID: 17932567; PubMed Central PMCID: PMC2000812.
114. Phatak P, Cookson JC, Dai F, Smith V, Gartenhaus RB, Stevens MF, et al. Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. *Br J Cancer.* 2007;96(8):1223-33. Epub 20070403. doi: 10.1038/sj.bjc.6603691. PubMed PMID: 17406367; PubMed Central PMCID: PMC2360152.
115. Rha SY, Izbicka E, Lawrence R, Davidson K, Sun D, Moyer MP, et al. Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):987-93. PubMed PMID: 10741725.

116. Ohnmacht SA, Marchetti C, Gunaratnam M, Besser RJ, Haider SM, Di Vita G, et al. A G-quadruplex-binding compound showing anti-tumour activity in an in vivo model for pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2015;5:11385. Epub 20150616. doi: 10.1038/srep11385. PubMed PMID: 26077929; PubMed Central PMCID: PMC4468576.
117. Yan S, Lin S, Chen K, Yin S, Peng H, Cai N, et al. Natural Product Library Screens Identify Sanguinarine Chloride as a Potent Inhibitor of Telomerase Expression and Activity. *Cells.* 2022;11(9). Epub 20220428. doi: 10.3390/cells11091485. PubMed PMID: 35563795; PubMed Central PMCID: PMC9104802.
118. Deeb D, Gao X, Liu YB, Pindolia K, Gautam SC. Pristimerin, a quinonemethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. *Int J Oncol.* 2014;44(5):1707-15. Epub 20140305. doi: 10.3892/ijo.2014.2325. PubMed PMID: 24603988; PubMed Central PMCID: PMC4027926.
119. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwaebe M, Lin A, Bliesath J, et al. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* 2009;69(19):7653-61. Epub 20090908. doi: 10.1158/0008-5472.Can-09-1304. PubMed PMID: 19738048.
120. Marchetti C, Zyner KG, Ohnmacht SA, Robson M, Haider SM, Morton JP, et al. Targeting Multiple Effector Pathways in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with a G-Quadruplex-Binding Small Molecule. *J Med Chem.* 2018;61(6):2500-17. Epub 20180207. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01781. PubMed PMID: 29356532; PubMed Central PMCID: PMC5867665.
121. Gunaratnam M, Greciano O, Martins C, Reszka AP, Schultes CM, Morjani H, et al. Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(5):679-89. Epub 20070616. doi: 10.1016/j.bcp.2007.06.011. PubMed PMID: 17631279.
122. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11593-8. Epub 20020823. doi: 10.1073/pnas.182256799. PubMed PMID: 12195017; PubMed Central PMCID: PMC129314.
123. Temime-Smaali N, Guittat L, Sidibe A, Shin-ya K, Trentesaux C, Riou JF. The G-quadruplex ligand telomestatin impairs binding of topoisomerase III α to G-quadruplex-forming oligonucleotides and uncaps telomeres in ALT cells. *PLoS One.* 2009;4(9):e6919. Epub 20090909. doi: 10.1371/journal.pone.0006919. PubMed PMID: 19742304; PubMed Central PMCID: PMC2732903.
124. Gomez D, Lemarteleur T, Lacroix L, Mailliet P, Mergny JL, Riou JF. Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(1):371-9. Epub 20040116. doi: 10.1093/nar/gkh181. PubMed PMID: 14729921; PubMed Central PMCID: PMC373291.