T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

PANKREAS KANSERİNDE YENİ SENTEZLENEN PT(11) SAKKARİNAT KOMPLEKSİ KİMYASAL BİLEŞİĞİNİN, ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DEMET SEVİMLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL- 2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

PANKREAS KANSERİNDE YENİ SENTEZLENEN PT(11) SAKKARİNAT KOMPLEKSİ KİMYASAL BİLEŞİĞİNİN, ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DEMET SEVİMLİ

YÜKSEK LİSANS

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL- 2020

KABUL

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Engin ULUKAYA	İstinye Üniversitesi
Prof. Dr. Elif ARMUTAK	İstanbul Üniversitesi
Dr. Öğrt. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL	İstinye Üniversitesi

ETİK BEYANI

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "**PANKREAS KANSERİNDE YENİ SENTEZLENEN PT(11) SAKKARİNAT KOMPLEKSİ KİMYASAL BİLEŞİĞİNİN, ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı
Tarih ve İmza

ÖZET

PANKREAS KANSERİNDE YENİ SENTEZLENEN PT(11) SAKKARİNAT KOMPLEKSİ KİMYASAL BİLEŞİĞİNİN, ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Demet Sevimli
Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2020

Pankreas kanseri genellikle hastalığın son evrelerinde belirti veren sinsi bir hastalıktır. Bununla birlikte günümüzün en ölümcül 4. kanser türü olarak bilinmektedir. Kemoterapi tedavisi sonrasında hücrelerin kazandığı direnç kanser ölümlerinin başlıca sebeplerinden biridir. Bu sebeple, birçok kanser türünün yanı sıra, pankreas kanseri tedavisine yönelik yeni ilaç ve tedavi stratejileri bulmak amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Sakkarin türevli bileşiklerin kanser tedavisinde umut verici etkilerinden dolayı geliştirilerek ilaç olarak kullanılabilir olması ön görülmektedir. Tatlandırıcı olarak kullanılmakta olan sakkarin (sacH), yapısındaki birden fazla verici ucuyla çok yönlü ve ilginç bir liganttır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, yeni sentezlenen sakkarin türevli bir bileşiğin (MP2) insan pankreas kanseri hücre hattı (Panc1) üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Sakkarin türevli bileşiğin hücre canlılığı üzerine etkileri SRB canlılık testi ile incelenmiştir. MP2 bileşiğinin belirlenen dozlarındaki hücre ölüm mekanizmasının belirlenmesi için akım sitometrisi kullanılmıştır.

Sonuç olarak, yeni sentezlenen sakkarin türevli bileşiğin Panc1 hücre hattında hücre ölümünü tetiklediği bulunmuştur. MP2 bileşiğinin pankreas kanserinde tedavi seçeneği olabileceği öngörüsüyle farklı deneylerin yapılması ve farklı kanser türleri üzerinde de in vitro deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, Apoptoz, Nekroz, Sakkarin, Sitotoksisite

ABSTRACT

PT (11) SACCARINATE NEW IN SYNTHESIS IN PANCREAS CANCER COMPLEX CHEMICAL COMPOUND, ANTICANCER EFFECTIVENESS INVESTIGATION

Demet Sevimli
Cancer Biology and Pharmacology
Supervisor: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2020

Pancreatic cancer is an insidious disease that usually presents in the late stages of the disease. However, it is known as the 4th deadliest cancer type today. Cell resistance gained after chemotherapy treatment is one of the main causes of cancer deaths. Therefore, many studies have been conducted to find new drugs and treatment strategies for pancreatic cancer treatment as well as many types of cancer. It is envisaged that saccharin derived compounds can be developed and used as medicines due to their promising effects in cancer treatment. Saccharin (sacH), used as a sweetener, is a versatile and interesting ligand with multiple donor tips in its structure. Therefore, in this thesis study, the cytotoxic effect of a newly synthesized saccharin derived compound (MP2) on human pancreatic cancer cell line (Panc1) was investigated. The effects of saccharin-derived compound on cell viability were investigated by SRB viability test. Flow cytometry was used to determine the cell death mechanism at the determined doses of the MP2 compound.
As a result, the newly synthesized saccharin derived compound was found to trigger cell death in the Panc1 cell line. It was concluded that different experiments should be performed and in vitro experiments should be performed on different types of cancer with the assumption that MP2 may be a treatment option in pancreatic cancer.

Keywords: Breast cancer, Apoptosis, Palladium, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bilgi vetecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL, Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK ve Dr. Öğrt. Üyesi Burçin GÜNGÖR'e

Deneylerim boyunca her zaman yanımda olan, tüm aşamarında bilgi ve tecrübelerini büyük bir sabır ve özveri ile bana aktaran değerli arkadaşlarım Merve ERKISA ve Hatice Dinçer'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi olan sevgili ailem babam Engin PARLAK, annem Ruhser PARLAK, ablam Deniz AYDIN, kardeşim Derya PARLAK'a

Varlıklarıyla bana enerji veren canım yeğenlerim Gözde ve Ömer AYDIN'a

Her zaman en kötü yoğunluğumda dahi desteğini ve sevgisini benden hiç eksik etmeyen deperli eşim Abdullah SEVİMLİ'ye en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

DEMET SEVİMLİ

10/01/2020

İÇİNDEKİLER

KABUL 3
ETİK BEYANI i
ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİL LİSTESİ vi
TABLO LİSTESİ vii
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ viii
GİRİŞ 10
1. GENEL BİLGİLER 11
1.1. Pankreas Anatomisi 11
1.2. Pankreas Kanseri 11
1.2.1 Risk Faktörleri 13
1.2.2. Pankreas Kanseri Moleküler Biyolojisi 13
1.2.3.Proto-Onkogenler Ve Tümör Baskılayıcılar 14
1.2.4.Pankreas Kanserinde Sinyal Yolakları C-Met / Hgf Sinyal Yolakları 14
1.2.5.RAS / RAF / MAPK Yolu 15
1.2.6.PTEN / PI3K / AKT Yolu 16
1.2.7. Moleküler Diagnostik 17
1.3. Apoptoz 20
1.3.1. Apoptoz Ve Nekroz 21
1.4.Sakkarin Türevli İlaçlar 23
2. MATERYAL METOD 24
2.1. MATERYAL 24
2.1.1. Kimyasal Maddeler 24
2.1.2. Sarf Malzemeler 24
2.1.3. Cihazlar 25
2.2. METOD 25
2.2.1. Uludağ Üniversitesi Tarafından Sentezlenen Pt(Iı) Sakkarinat Kompleksi Kimyasal Bileşiğinin Sentezlenmesi" 25

2.2.2. Hücre Kültürü....25
2.2.3. Hücrelerin Stoklanması....26
2.2.4. Kullanılan besiyerinin hazırlanması....26
2.2.5. Hemositometre ile hücre sayımı....26
2.2.6. Sulforhodamine B (SRB) testi ile canlılık tayini....26
3.2.7. Akım sitometrisi ile Anneksin V analizi....27
2.3.8. Akım sitometrisi ile kaspaz 3/7 aktivasyon analizi....28
2.3.9. Akım sitometrisi ile mitokondri membran potansiyeli analizi....29
2.3.10. Akım sitometrisi ile oksidatif stresin (ROS) analizi....29
2.3.11. İstatistiksel Analiz....29
4. BULGULAR....31
4.1. SRB Canlılık Testi Sonuçları....31
4.2. Akım Sitometrisi Sonuçları....32
4.2.1. Anneksin V Testi....32
4.2.2. Kaspaz 3/7 Testi....34
4.2.3. Mitopotential Testi....35
4.2.4. ROS Testi....36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....37
KAYNAKÇA....40
EKLER....50
ÖZGEÇMİŞ....51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Pankreasın anatomisi 11
Şekil 1.2: Pankreatik kanserin gelişim modeli 12
Şekil 1.3: Ras / Raf / mitojenle aktifleştirilen protein kinaz yolu 16
Şekil 1.4: PTEN / PI3K / AKT yolu şematik gösterimi 17
Şekil 1.5: Apoptozun mikroskobik görüntüsü. 20
Şekil 1.6: Hücre apoptozunun morfolojik görüntüsü 21
Şekil 4.1: Hücrelere uygulanan MP2 bileşiği sonrası kimyasalın pankreas kanseri hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. 31
Şekil 4.2: MP2 bileşiğinin 50 μM (IC90 değeri) konsantrasyonunda insan pankreas kanseri hücre hattında (Panc1) uygulanması ile anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 33
Şekil 4.3: MP2 bileşiğinin 50 μM (IC90 değeri) konsantrasyonunda insan pankreas kanseri hücre hattında (Panc1) uygulanması ile kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 34
Şekil 4.4: MP2 bileşiğinin 50 μM konsantrasyonunda Panc1 insan pankreas kanseri hücre hattında uygulanması sonucu mitokondri membranı değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerin 12 ve 24 saatlik sonuçları 35
Şekil 4.5: MP2 bileşiğinin 50 μM konsantrasyonunun Panc1 insan pankreas kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu elde edilen ROS değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları
İçsel ve dışsal yolağın şematik gösterimi. 36

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Pankreas kanseri risk faktörleri. (Zavoral M.ve ark. 2011)……13

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
7-AAD	: 7-Aminoaktinomisin D
AKT1	: RAC-alfa serin / treonin-protein kinaz
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albümin
CIAP	: Buzağı Bağırsak Alkali Fosfataz
C-MET	: Tirozin protein kinaz Met
CTNNB1	: Beta Katenin 1 Geni
DMSO	: Dimetilsufoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini
FBS	: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
kDa	: KiloDalton
MAPK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
PanIN	: Pankreatik intraepitelyal neoplazi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDAC	: Pankreas duktal adenokarsinoma
PI	: Propidyum iyodür
PIK3CA	: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat 3-kinaz
PT	: Platin

Raf	: Ras İlişkili Faktör
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
TCA	: Trikoloroasetik asit
TP53	: Tümör Proteini 53
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand

GİRİŞ

Kanser, vücudun normal kontrol mekanizması çalışmayı bıraktığında gelişir. Tüm kanser türlerinde, vücudun bazı hücreleri durmadan bölünmeye ve çevre dokulara yayılmaya başlar. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun hemen hemen her yerinde başlayabilir. Normalde insan hücreleri, vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreler oluşturmak için büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandıkça veya hasar gördüğünde ölürler ve yeni hücreler yerlerini alır. Ancak kanser geliştiğinde, bu düzenli süreç bozulur. Hücreler gittikçe anormal hale gelir, eski veya hasarlı hücreler ölmeleri gerektiğinde hayatta kalırlar. Bu anormal hücreler durmadan bölünebilir ve tümör adı verilen kitleler oluşturabilir. Birçok kanser, doku kitleleri olan katı tümörler oluşturur. Kanserli tümörler habistir, yani yakındaki dokulara yayılabilir veya istila edebilirler. Ek olarak, bu tümörler büyüdükçe, bazı kanser hücreleri kan veya lenf sistemi yoluyla vücuttaki uzak yerlere gidebilir ve orijinal tümörden uzak yeni tümörler oluşturabilir.

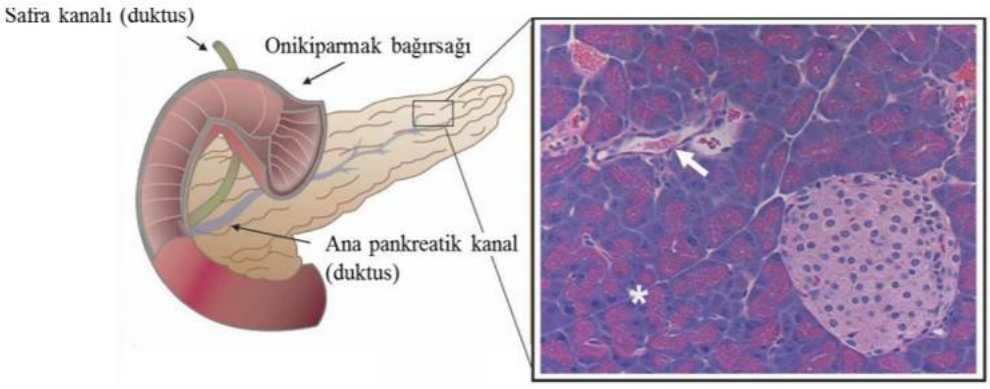
Günümüzde, mevcut ilaçlar ile kanser tedavisi (kemoterapi) yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde tedavi sağlanamamaktadır. Bu nedenle kanseri önleyici yeni ilaç geliştirme çalışmaları umut vadetmekte olan bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserde tedaviyi mümkün kılmayı amaçlayan kanser araştırmacıları, anti-kanser etkisi güçlü yeni ajan/ilaç geliştirme çalışmaları üzerine yoğunlaşmaktadır. Son yıllarda kanser tedavisinde metal bileşiklerin çok çeşitli tümör hücre hatlarına karşı umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Abu-Surrah ve ark., 2008; Ferraz ve ark., 2009; Ulukaya ve ark., 2011). Metal kompleksi içeren anti-kanser ajanların DNA'ya bağlanarak DNA lezyonlarının oluşumuna yol açarak sitotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir (Zhu ve ark., 2009). Bu metal bileşiklerden olan Palladyum; anti-fungal, anti-viral, anti-kanser ve anti-bakteriyal etkilere sahiptir. Sakkarin de negatif yüklü imino azot atomunun ve karbonil ve sülfonil oksijen atomlarının varlığı sayesinde çok yönlü bir çok fonksiyonlu ligand olarak davranır ve mononükleerden koordinasyon polimerlerine metal kompleksleri oluşturur.Ayrıca güçlü antikanser aktivitesi olan sac ait birkaç Pt (II) kompleksi, diğer araştırma grupları tarafından rapor edilmiştir

Bu çalışma, pt(II) sakkarinat kompleksinin, Panc1 pankreas kanseri hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin moleküler mekanizmalarının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pankreas Anatomisi

Pankreas genel olarak endokrin ve ekzokrin pankreas şeklinde iki başlık altında değerlendirilebilir. Ekzokrin pankreas, sindirim enzimlerini üreten ve onikiparmak bağırsağına sekrete eden kısımdır. Bu kısım bağ doku, kan damarları ve sinirler ile ilişki içinde bulunan asinar ve duktal hücreleri içerir. Ekzokrin kısım total pankreasın %95'lik kısmını meydana getirir. Endokrin pankreas ise kana insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptidleri salgılayan ve total pankreasın %1-2'lik kısmını oluşturan bölümüdür (Longnecker 2014). Endokrin pankreastaki hücre tiplerinin kümeler şeklinde bir araya gelmesiyle oluşan yapıya Langerhans Adacıkları adı verilmiştir (Hezel ve ark. 2006). Pankreasın genel yapısı Şekil 1.1'de verilmiştir.

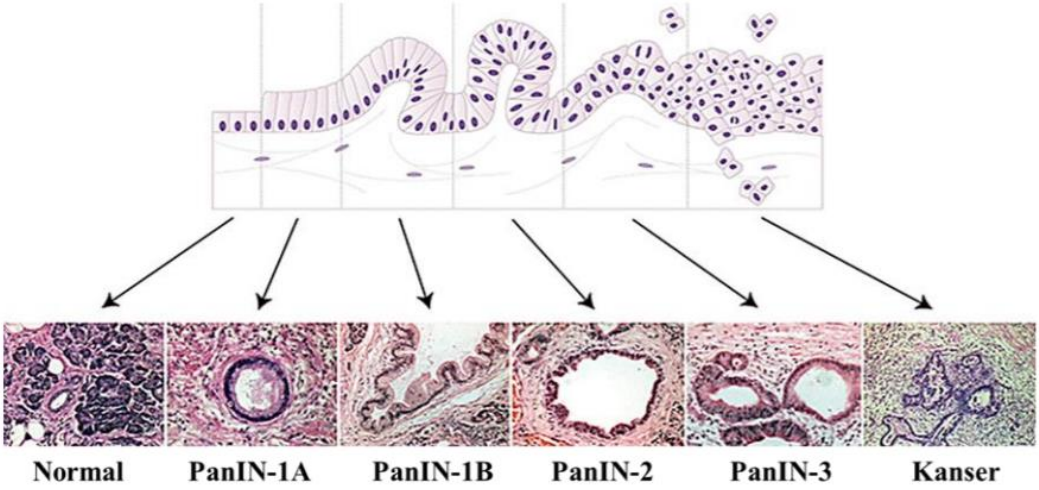


Şekil 1.1. Pankreasın anatomisi. Sağ alt köşedeki dairesel kısım; Langerhans adacıklarını, yıldız; asinar hücreyi, ok işareti; pankreatik kanalı (duktus) göstermektedir (Hezel ve ark. 2006'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

1.2. Pankreas Kanseri

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olması beklenen agresif ve tedavi edilemez bir malignitedir. PDAC'li birçok hastada tanı üzerine lenf nodu veya uzak metastaz görülür. PDAC'de büyüme ve proliferasyona dahil olan birkaç sinyal yolu aktive edilir. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar da PDAC'de saptanmıştır. Son on yılda pankreas kanseri araştırmalarında kaydedilen ilerlemeye rağmen, etkili tedavi rejimleri bulunmamaktadır. Kemoterapi ve radyasyon tedavisi çoğunlukla etkisiz kalmaktadır. Küratif rezeksiyon için tek girişim cerrahi olmaya devam etmektedir, ancak PDAC

hastalarının sadece %15-20'si başvuru anında cerrahi için uygundur. Bu hastalıkla mücadele etmek için yeni tedavi stratejileri geliştirmek için PDAC'ın moleküler patogenezinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. (He ve ark. 2012, Ottenhof ve ark. 2011). PDAC'lar pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) ve intraduktal papiler müsinöz neoplazm (IPMN) olarak bilinen hiperplastik lezyonların gelişimi ile meydana gelmektedir (Grant ve ark. 2016) (Şekil 2.1). Pankreatik intraepitelyal neoplazmalar (PanIN) pankreatik duktusta yer alan mikroskobik, non-invazif epitelyal proliferasyonlar olarak tanımlanmaktadır. PanIN formasyonu aynı zamanda asinar-duktal metaplazi olarak da bilinmektedir. Pankreatik hasar ya da KRAS aktivasyonunu takiben asinar hücreler aşamalı olarak asinar özelliklerini kaybeder ve duktal özellik kazanmaya başlar (Gooiker ve ark. 2014). Bu lezyonlar, mutasyonların birikimine paralel olarak artan displaziye göre 4 grade (sınıf) altında incelenmektedir: PanIN-1A, -1B, -2 ve -3) (Şekil 2.2). Apoptoz genellikle bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlar tarafından düzenlenir. Çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenen başlatıcı pro-kaspazların aktivasyonu, etkili kaspazların spesifik substratların bölünmesini katalize ederek kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile nükleer parçalanmaya yol açtığı uygulayıcı pro-kaspazları ayırır. FADD benzeri ICE inhibitör proteinleri (FLIP) ve cIAP, XIAP ve survivin dahil apoptoz (IAP) ailesinin inhibitörü, tümör nekroz faktörüne bağlı apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) karşı kanser direncine yol açan pro-kaspazların aktivasyonunu inhibe eder. (Grant ve ark. 2016)



Şekil 1.2. Pankreatik kanserin gelişim modeli (Chang ve ark. 2008'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

1.2.1 Risk Faktörleri

Altta yatan karsinogenezin karmaşıklığı ile karakterize edilen pankreas kanserinin nispeten nadir olması nedeniyle, birçok faktörün bir kombinasyonunun hastalığın başlamasına katkıda bulunması muhtemeldir. Sigara veya alkol alımı gibi bazı faktörler kontrol edilebilir, yaş veya aile öyküsü gibi diğerleri kontrol edilemez. Çoğu risk faktörü doğrudan hastalığa neden olmamasına rağmen, maruz kalma seviyesi genellikle kanser gelişimini etkiler. Tedavi seçenekleri hala sınırlı olduğundan ve sağkalım prognozu zayıf kaldığından, kontrol edilebilir risk faktörlerinin tanımlanması ve kaçması yüksek risk altındaki bireyler için özellikle önem kazanmaktadır (Zavoral M. ve ark.2011). En belirgin pankreas kanseri risk faktörleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

FAKTÖR	TİP	GRUP	MAKSİMUM RİSK
Sigara	Eksojen	Davranışsal	3
Alkol	Eksojen	Davranışsal	Anlamlı değil
Diyet / Obezite	Eksojen	Davranışsal	1.72
Mesleki tehlike	Eksojen	Çevresel	-
Radyasyon	Eksojen	Çevresel	Sonuçsuz-yetersiz
Yaş	Endojen	Biyolojik	-
Aile öyküsü	Endojen	Genetik	32
Peutz-Jeghers sendromu	Endojen	Genetik	132
FAMMM sendromu	Endojen	Genetik	13.1
Hormonal	Endojen	Biyolojik	Sonuçsuz-yetersiz

Tablo 1. Pankreas kanseri risk faktörleri. (Zavoral M.ve ark 2011)

1.2.2. Pankreas Kanseri Moleküler Biyolojisi

Katı kanserin moleküler mekanizmaları, hastalığın farklı aşamalarında meydana gelen ve dokuyu etkileyen farklı mekanizmalardan oluşan karmaşık bir yapıdır. Hastalığın temel prensipleri 1970'lerde ve 1980'lerde ortaya çıktığı için pankreas kanserinin başlaması, gelişimi ve ilerlemesinin detaylı moleküler mekanizmaları kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Pour P ve ark, 1977). Klasik pankreas kanseri gelişimi modeli prekürsör lezyonlardan invaziv karsinoma morfolojik ve moleküler transformasyonu tarif eder. Kanal lezyonlarının sınıflandırılması için standart isimlendirme ve tanı kriterleri öncelikle pankreatik intraepitelyal neoplazi derecelerine

dayanmaktadır (Berlin NI ve ark, 1981). 1A, 1B, 2 ve 3 dereceleri, polarite kaybı, nükleer kalabalıklaşma, genişlemiş çekirdekler, yalancı tabakalaşma ve hiperkromatizm ile karakterize büyüyen sitolojik atipi temsil eder. Her PanIN aşaması, spesifik genleri ve genetik yolları etkileyen genetik düzensizlikler ile karakterize edilen farklı bir moleküler süreç modeli ile karakterize edilir(Hruban RH ve ark, 2001).

1.2.3.Proto-Onkogenler Ve Tümör Baskılayıcılar

PanIN modelinde, genetik değişiklikler; hücre büyümesi, bölünmesi, apoptoz ve göç gibi tüm moleküler sistemlerin kararsızlığını indükleyen hücresel sinyallemenin kilit koruyucularını etkileyen temel bir role sahiptir. Proto-onkogenler, büyüme faktörleri, sinyal transdüserleri, transkripsiyon faktörleri veya apoptotik inhibitörler gibi bu sistemler için pozitif regülatörler olarak işlev gören proteinleri kodlar (Serra E ve ark, 1997). Mutasyona uğramış formları, onkogenleri genellikle kanser hücrelerinde bulunur. Mutasyon, onkogenlerin protein ürünlerinin kalıcı olarak aktive olmasına neden olur ve bu da kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanır (Herman JGve ark, 1996). Onkojenik mutasyonlar baskın bir karaktere sahiptir; bu nedenle ölümcül bir sonuç için bir allelin eksikliği (yani heterozigot mutasyon) yeterlidir. KRAS, CTNNB1 (β-katenin), PIK3CA veya AKT1 dahil olmak üzere pankreas kanserojenezinde yer alan birkaç anahtar proto-onkogen vardır. En yaygın onkojenik mutasyon tipleri nokta mutasyonu, delesyon, gen amplifikasyonu ve gen yeniden düzenlemesidir (Jackson MA ve ark, 2006). Tümör baskılayıcı genler, sinyal inhibitörleri, negatif transkripsiyon faktörleri, apoptoz aktivatörleri veya DNA onarım sistemlerinin üyeleri gibi hücre çoğalmasına karşı etki eden proteinleri kodlar. Genetik değişikliğin bir sonucu olarak, normal işlevleri tamamen azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar çekinik bir karaktere sahiptir; bu nedenle, hücre fonksiyonlarını sadece her iki allel de etkilendiğinde kaybeder. Çift vuruş modeli olarak tanımlanan en yaygın durumda, bir alel başlangıçta mutasyona uğrar, diğeri daha sonra mutasyona uğrar veya tamamen kaybolur. Tümör baskılayıcı deaktivasyonunun ayrı bir mekanizması hipermetilasyondur. Pankreas kanserinde, sık etkilenen tümör baskılayıcıları arasında TP53, APC, SMAD4 ve TP16 bulunur (Bamford Sve ark, 2004).

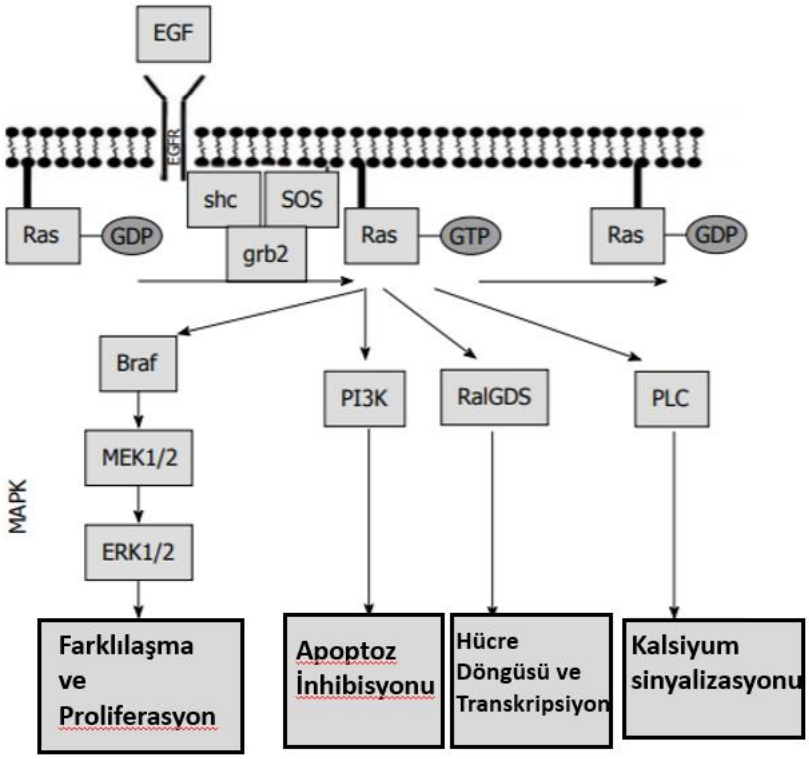
1.2.4.Pankreas Kanserinde Sinyal Yolakları C-Met / Hgf Sinyal Yolakları

C-MET / HGF (hepatosit büyüme faktörü) sinyal yolu, pankreas kanserinin erken ilerlemesinde anahtar bir faktördür. Yol, anahtar onkogenlerin aktivasyonu,

anjiyogenez ve saçılma (hücre ayrışması ve metastaz) yoluyla invaziv büyümeden sorumludur (Chmielowiec J,ve ark, 2007). C-MET, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinde birincil işlevi olan bir HGF reseptörünü kodlayan bir proto-onkojendir. C-MET mRNA normal insan ekzokrin pankreasında çok düşük seviyelerde mevcut olmasına rağmen, pankreatik kanserlerin çoğunda ve pankreatitten etkilenen epitel hücrelerinde yukarı regüle edilir (Yu J. Ve ark, 2006). Akut pankreatitten etkilenen rejenere dokuda c-MET'in aşırı ekspresyonu da gözlenir ve pankreatik kanserojenezde erken bir olay olarak görülür. HGF, c-MET'in birincil ligandıdır. C-MET / HGF etkileşimi üzerine Ras, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), Janus kinaz (JAK) / sinyal transdüseri ve transkripsiyon (STAT) ve enin-katenin (Wnt) yollarının aktivatörü dahil olmak üzere birkaç farklı sinyalleme yolu aktive edilir (Otte JM ve ark, 2000).

1.2.5.RAS / RAF / MAPK Yolu

Ras / Raf / mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) yolu, kanserde en çok çalışılan ve en iyi tarif edilen sinyal yollarından biridir. Ras / Raf / MAPK sinyallemesinin rolü, hücre büyümesi ve bölünmesi, hücre farklılaşması ve migrasyonu, doku iyileşmesi ve onarımı ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok kanserojen süreç için kritiktir. Hücre dışından hücre içi ortama sinyal iletiminin merkezi regülatörü, hücresel zarın iç duvarında lokalize olan Ras proteinidir. Normal fizyolojik koşullar altında, hidrofobik Ras proteini inaktiftir ve GSYİH'ye bağlıdır. Büyüme faktörü transmembran reseptörlerinden (büyüme faktörü reseptörleri veya sitokin reseptörleri gibi) gelen hücre dışı bir sinyal, GDP'ye bağlanması ve ardından GTP'ye bağlanması üzerine aktive edilmesini başlatan bir guanidin değişim faktörü SOS'un salınmasını teşvik eder. Aktive edilmiş GTP-Ras kompleksi, raf kinazın bir kinaz aktivitesini tetikler, bu da sonuçta DNA transkripsiyonu ve mRNA çevirisinin önemli bir düzenleyicisi olan bir MAPK'nın aktivasyonuyla sonuçlanır. Ras / Raf / MAPK üyelerinden herhangi birini etkileyen mutasyonlar tümör oluşumunda bir artışa neden olur. Raf ve MAPK'nın yanı sıra PI3K dahil Ras proteininin diğer akış aşağı efektörleri vardır, böylece çoklu yollar arasında çapraz konuşma sağlar (Şekil 1.3)(Molina JR ve ark, 2006).

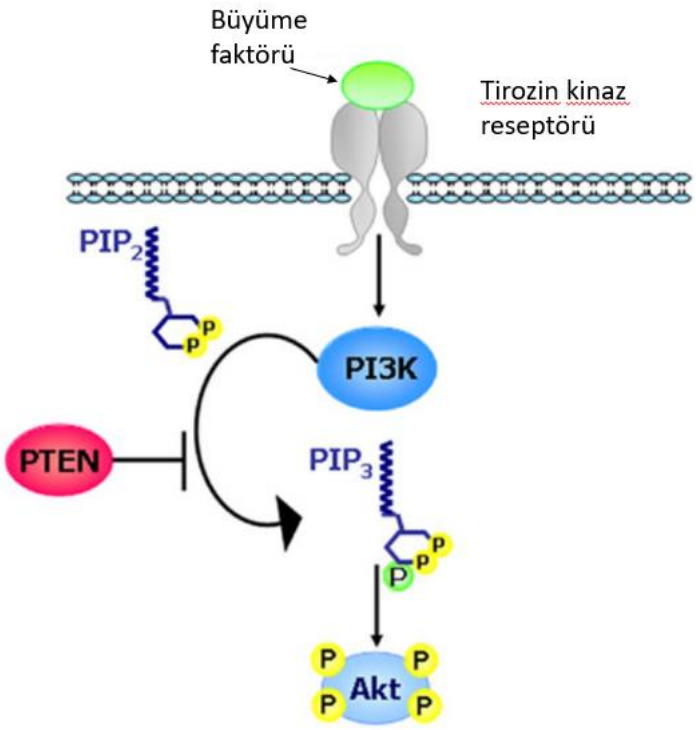


Şekil 1.3. Ras / Raf / mitojenle aktifleştirilen protein kinaz yolu

1.2.6.PTEN / PI3K / AKT Yolu

PTEN / PI3K / AKT temel olarak AKT onkogeninin hücre zarındaki lokalizasyonu yoluyla düzenlenmiş aktivasyonuna dayanan önemli bir sinyalleşme yoludur. AKT'nin membran lokalizasyonunda yer alan iki önemli protein ailesi, PI3K ve PTEN fosfatazlardır (Carnero A ve ark, 2008). PI3K, fosfoinositidler olarak bilinen bazı membrana bağlı lipitleri fosforile edebilir. PI3K aracılı fosforilasyon üç aşamada ilerleyebilir, bunlar fosfatidilinositol 3-fosfat (PIP), fosfatidilinositol (3,4) -bisfosfat (PIP2) ve fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfat (PIP3) üretir. Fosforile formlar, PIP3 ve daha az ölçüde PIP2, hücre zarına önemli protein kinazları çeker (Perugini RA ve ark, 2000). En belirgin olanı, glikoz metabolizması, hücre proliferasyonu, apoptoz, transkripsiyon ve hücre göçünü içeren bir dizi anahtar hücresel süreci tetikleyen bir serin / treonin protein kinaz ailesi AKT'dir (Roy SK ve ark, 2010). AKT aktivitesi, hücre zarında uygun lokalizasyonuna büyük ölçüde bağlıdır. AKT'nin membrana konumlandırılması, PIP3'e güçlü bağlanması ile elde edilir (Yao Z ve ark, 2002). Pankreatik karsinogenezde AKT1, hücre döngüsü durmasının üstesinden , apoptozu bloke ederek ve anjiyogenezi teşvik ederek hücre sağkalımını koruyan bir onkogen

görevi görür. PTEN, PI3K'ye karşı hareket eden bir fosfatazdır (Ripka S ve ark, 2010). PIP3'ü tekrar PIP2'ye ve PIP'ye dönüştürerek tümör baskılama yeteneğine sahiptir, böylece membran lokalizasyonunu bozar ve AKT aktivitesini azaltır. Çoğu kanserde PI3K ve AKT'nin ekspresyon seviyeleri yüksektir, PTEN genellikle mutasyonla devre dışı bırakılır veya tamamen silinir (Ma J ve ark, 2009). Pankreas karsinogenezindeki kilit rolü sayesinde PI3K / AKT / PTEN sinyalizasyonu antikanser tedavisi için önemli bir hedeftir (Maitra A. Ve ark, 2005).



Şekil 1.4. PTEN / PI3K / AKT yolu şematik gösterimi (Francesca M. ve ark 2003'den Türkçeleştirilerek alınmıştır.)

1.2.7. Moleküler Diagnostik

Son yıllarda pankreas kanserinde habis dönüşümün moleküler biyolojik temeli ile ilgili bir dizi bulgu yayınlanmış ve lokalize tümörlerin tanı, evreleme ve tedavisinde de bazı ilerlemeler kaydedilmiştir (Poley JW ve ark, 2009). Yeni teşhis edilen vakaların çoğunu temsil eden gelişmiş tümörlerin önlenmesi, erken teşhisi, taranması ve tedavisi alanlarında, araştırmalar pankreas kanseri olan hastaların prognozunu önemli ölçüde etkileyecek herhangi bir temel keşif sağlayamamıştır (Harsha HC,ve ark, 2009). Pankreas karsinogenezinde yer alan moleküler genetik mekanizmalarının

daha iyi anlaşılması, probandlarda artan kanser riskini temsil eden bir dizi kalıtsal sendromun tanımlanmasını sağlamıştır. Karbonhidrat antijeni (Ca) 19-9, tümör belirteçleri arasındaki baskın rolünü korur. Klinikte uygulanmış, tanı konmuş ve tedavi gören hastalarda erken nüksü saptamak için kullanılan tek belirteçtir. Tarama testi olarak Ca 19-9'un kullanılması tatmin edici olmayan sonuçlar verdi. Bu markör pankreas kanseri için spesifik değildir ve çeşitli kolestatik sendromlarda yükselebilir ve mutlaka bir tümör olmayabilir. Ayrıca salgılanan Ca 19-9 seviyeleri, Lewis antijeni a ve b'nin pozitifliğinden etkilenir (Bussom Sve ark, 2010). Umut verici markör PAM4 bile erken evre la karsinomunda %54, evre 1b karsinomunda %75 duyarlılık göstermiştir. Mevcut popülasyonda genel popülasyonda erken pankreas kanserinin saptanması imkansızdır. Bu risk düşük, orta ve yüksek olarak sınıflandırılabilir. Yakın zamanda yayınlanmış olan birçok çalışma, yüksek riskli gruplarda erken ve rezektabl karsinomu görüntüleme yöntemleri yardımıyla saptamaya çalışmıştır. Tarama muayeneleri genellikle endoskopik ultrason, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi veya genetik testler gibi bazı görüntüleme yöntemlerini içerir. Küçük tümörlerin veya prekürsör lezyonların, kistik tümörlerin ve intradüktal papiller müsinöz neoplazinin başarılı bir şekilde tanımlanması artık risk altındaki popülasyonda genel popülasyondan daha yüksek bir dereceye kadar mümkündür. Katı duktal adenokarsinomun ortaya çıktığı durumlarda, bu lezyonlar genellikle rezektabl olur. Bununla birlikte, mevcut literatüre göre, tüm bu hastalarda birkaç aylık bir süre içinde nüks gösterilmiştir. Son yıllarda, klinik araştırmalar, pankreas kanseri geliştirme riski yüksek olan kronik pankreatitli hastaları belirlemeye odaklanmıştır. Yukarıda tartışıldığı gibi şu risk faktörleri tanımlanmıştır: sigara içme, kronik pankreatit süresi, semptomatik bireylerde kronik pankreatit için ameliyat sonrası durum (tekrarlayan ağrı, sarılık, kilo kaybı, iştah kaybı), ince iğne aspirasyon biyopsisi veya pankreatik kanal fırçası sitolojisi, baskılayıcı gen p16 ekspresyonunun kaybı ve üridin difosfat glukuroniltransferazın polimorfizmi kullanılarak elde edilen bir örnekte mutasyona uğramış bir K-ras onkogen formunun varlığı ve üridin difosfat glukuroniltransferazın polimorfizmi gen (enzimin düşük detoksifikasyon aktivitesine neden olan UGT1A7 alelinin varlığı). Akut ve kronik pankreatitin tamamen farklı patogenezi ve dolayısıyla pankreas kanseri gelişimi ile farklı ilişki göz önüne alındığında, akut pankreatit şu anda pankreas kanseri gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilmemektedir. Aksine, alkolik, hiperkalsemik, tropikal ve kalıtsal kronik pankreatit ile artmış pankreas kanseri riski arasındaki ilişki genellikle

geçerlidir. Kronik pankreatitli hastalarda pankreas kanseri gelişme riski, sağlıklı popülasyona göre 16 kat daha yüksektir (Brand RE ve ark, 2007). K-ras mutasyonları karsinomlu hastaların yaklaşık %80'inde tespit edilebilir. Kronik pankreatitli hastalarda K-ras mutasyonlarının saptanması, bu nedenle erken karsinomun saptanması için bir tarama testi olarak diğer yöntemlerle birlikte kullanılabilir. Yukarıda tarif edildiği gibi, şu anda yeni teşhis edilen tip 2 diabetes mellitus ve pankreas kanseri arasındaki ilişkiye de çok dikkat edilmektedir, bu şekilde diyabet, bu malignitenin olağan klinik belirtilerinden önce pankreas kanserinin erken bir tezahürü olarak kabul edilir. Yeni tanı konmuş diyabetli hastalar muhtemelen bugün olduğundan daha yüksek risk altında olacak ve taranacaktır. Bununla birlikte, tarama için uygun diyabetli hastaların çok düzeyli seçime tabi tutulması gerekecektir ve diyabetin teşhisi böyle bir sürecin ilk filtresini temsil edecektir. İkinci seviye, mevcut biyobelirteçlerden birinin varlığı veya tercihen daha yüksek bir tahmin değerine sahip yeni bir markörün tanımlanması olmalıdır. Şu anda böyle bir işaretleyici mevcut değildir, bu nedenle, öngörülü bilgisayar modelleri de öngörülmektedir. Son çalışmalar, pankreatojenik diyabet mellitusta kronik pankreatitli hastalarda pankreas kanseri gelişme riskini azaltmak için metforminin koruyucu bir etkisini göstermiştir. Buna karşılık, insülin veya sekretagogları ile tedavi, bu hastalarda karsinom riskini arttırır. (Lockhart AC.ve ark. 2005)

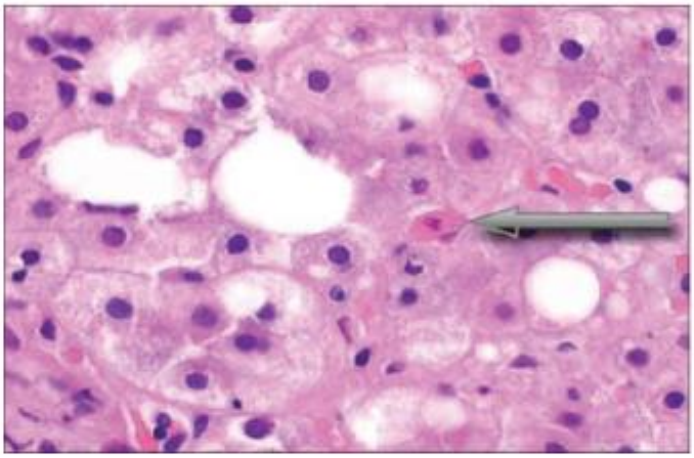
1.2.8. Pankreas Kanseri Ve Tedavisi

Tüm gastrointestinal malignite formlarından pankreasın adenokarsinomu en kötü sağkalım ile ilişkilidir. Çoğu hasta, tanı konulduktan sonraki bir yıl içinde ölür. Hayvan deneyleri ile vurgulanan epidemiyolojik çalışmalar, sigara içme ve alkol tüketiminin sanayileşmiş ülkelerde pankreas kanseri insidansının artmasına katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır; kalıtsal kanser sendromları, pankreasın malign lezyonlarının%8'inden azında görülür. Cerrahi tedavideki ilerlemeye rağmen, rezeksiyon oranlarının artmasına ve tedaviye bağlı morbidite ve mortalitede azalmaya rağmen, gerçek tedavi rakamları bugün bile%3'ün altındadır. Bu makalede pankreas kanserinin yayılma kökleri hakkındaki mevcut bilgiler, cerrahi, adjuvan kemoterapi ve radyoterapi ve neoadjuvan tedavi yöntemleri de dahil olmak üzere mevcut tedavi protokollerinin sonuçları ışığında yeniden değerlendirilmektedir. (Lockhart, AC. ve ark. 2005)

1.3. Apoptoz

Apoptoz başlangıçta hücre büzülmesi, membran taşması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer fragmantasyon gibi morfolojik özellikleri ile tanımlanmıştır (Şekil1.3). Apoptozun gene yönelik bir program olduğunun farkına varılması, gelişimsel biyoloji ve doku homeostazı hakkındaki anlayışımız üzerinde derin etkilere neden olmuştur, çünkü hücre sayılarının hücre sağkalımını etkileyen faktörlerin yanı sıra proliferasyon ve farklılaşmayı kontrol eden faktörler tarafından düzenlenebileceğini ima eder. Ayrıca, apoptozun genetik temeli, diğer herhangi bir metabolik veya gelişimsel program gibi hücre ölümünün mutasyonla bozulabileceğini ima eder.

Aslında, apoptotik yollardaki kusurların artık nörodejeneratif bozukluklardan maligniteye kadar çeşitli insan hastalıklarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (4). (Lowe SW. ve ark 2000)



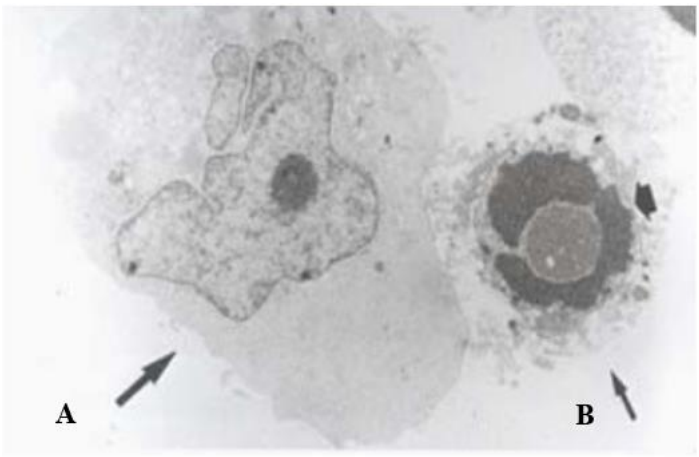
Şekil.1.5. Apoptozun mikroskobik görüntüsü (anonim)

Apoptozun malign fenotipi etkileyebileceği düşüncesi 1970'lerin başına kadar gitmektedir. Tümör büyümesinin kinetik çalışmaları, tümörlerden hücre kaybının çok büyük olabileceğini; aslında, gözlenen tümör büyüme oranları sadece proliferasyon ölçümlerinden tahmin edilenden <%5 olabilir. Prensip olarak, bu hücre kaybı faktörü'ndeki değişikliklerin tümör büyümesi veya gerilemesi üzerinde büyük etkisi olabilir. Her ne kadar bu ölümün nekrozdan kaynaklandığı varsayılsa da- katastrofik (ve kolayca ayırt edilebilir) bir hücre ölümü türü- Kerr ve ark. tümörlerden hücre kaybının büyük bir yüzdesinin apoptoza bağlı olması olasılığını arttırmıştır. Daha sonraki çalışmalar kendiliğinden gerileyen tümörlerde ve sitotoksik antikanser ajanlarla tedavi edilen tümörlerde yüksek apoptoz sıklığını ortaya koymuştur. Bu

gözlemlerle birlikte, apoptozun malign tümörlerde yüksek hücre kaybına katkıda bulunduğunu ve ayrıca tümör ilerlemesini destekleyebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, apoptozun kanserdeki önemi 15 yıldan fazla önemsenmedi. (Fadeel ve ark. 1999, Evan ve Vousden 2001, Gewis 2003).

1.3.1. Apoptoz Ve Nekroz

Çeşitli fizyolojik ve farmakolojik ajanlar tarafından indüklenebilen kontrollü bir hücre ölümü tipi olarak tanımlanan 'apoptoz' terimi ilk önce Kerr ve arkadaşları (Kerr JF ve ark1972) tarafından aşağıdaki ana morfolojik kriterlere dayanılarak üretilmiştir: hücresel büzülme, nükleer kromatinin yoğunlaşması ve marjı, DNA parçalanması, sitoplazmik vakuolizasyon, hücre lizizi (Şekil.1.4.).



Şekil.1.6. Hücre apoptozunun morfolojik görüntüsü. A- Normal bir hücre; B-Apoptotik hücre, (apoptotik hücrede normal hücreye kıyasla sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu görülmektedir.) (anonim)

Kapsamlı literatür bir takım yanlış kavramlar sürdürmüştür:

a) apoptoz, genetik olarak kontrol edilen, enerjiye bağımlı bir inflamasyon olmaksızın hücresel silme yöntemidir, ancak nekroz geleneksel olarak inflamasyonla ilişkilidir (Kelly KJve ark 2001);

b) herhangi bir hafif yaralanmaya yanıt olarak apoptoz meydana gelirken, aynı tip yaralanmaların daha şiddetli formlarına yanıt olarak nekrozun oluştuğu söylenir (Uezono Tve ark. 2001);

c) apoptoz, koordineli, öngörülebilir ve önceden belirlenmiş bir yolla meydana gelirken, nekroz, hücre enerji depolarının ciddi şekilde tükenmesi ile aktive edilen bir dizi bağımsız biyokimyasal olayın katkı etkisinden kaynaklanır;

d) nekrozun önlenmesi zordur, oysa apoptotik yol hücre canlılığını korumak için potansiyel olarak modüle edilebilir. Nekrozun pasif bir sürecin özelliklerine sahip 'sıradan' hücre ölümü olduğu varsayılırken, apoptoz aktif bir sürecin özelliklerine sahip 'özel' bir hücre ölümü biçimidir. (McLaughlin R ve ark.2001)

Son sentezde, aşağıdaki gerçekleşme ortaya çıkar: apoptoz ve nekroz, hücre ölümünün iki farklı formudur (Renvoize Cve ark 1998). Öncelikle, apoptozu nekroz ile karşılaştırmanın bilimsel olarak haksız olduğunu öneriyoruz. Hücrelerin ölme sürecini, yani hücre ölümünü ve hücreler öldükten sonra hücre ve dokuların yaşadığı değişiklikleri, yani nekrozu karşılaştırmak mantıksızdır. Bu iki süreç geçici olarak yerinden çıkar ve bir sürekliliğin iki ucunu temsil eder: nekroz işlemi sadece ve sadece hücre öldüğünde ve geri dönüşümsüz bir süreç olduğunda başlayabilir, hücre yaşamında 'geri dönüş yok' yoludur. Hücre ölümünü ve lizozomal enzim salınımını takiben, ölü hücreler karyorrheksise (1966'da ayrıntılı olarak tarif edilen nükleer parçalanma) ve karyolizise (nükleer materyalin aşamalı kaybı) geçebilir (Popper H ve ark, 1998). Bu nedenle, apoptozun karakteristik ve özel parametreleri olarak, tutarsız nükleozomal ladderleme etkisi de dahil olmak üzere kromatin yoğunlaşmasını varsaymak imkansızdır. Ayrıca, apoptozun karakteristik morfolojik görünümü olan hücrelere DNA parçalanması kanıtı gösterilemeyebilir ve bazen hücre kültürü sistemlerinde DNA merdiveni oluşumuna mikoplazmal nükleazlar da neden olabilir (Paddenberg Rve ark, 1996).

1.4.Sakkarin Türevli İlaçlar

Son yirmi yılda, cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi klinik olarak kullanılan platin bazlı antikanser ilaçlara alternatif yeni kemoterapötik metal bazlı kompleksleri keşfetmek için yapılan araştırmalar, sınırlamalarının üstesinden gelmek ve seçiciliklerini arttırmak için büyük ilgi gördü. Bu platin bazlı ajanların DNA'yı hedeflediği iyi bilinmektedir. Sulu çözeltiyi hidrolize ederek katyonik türler verir, bu da DNA'ya kovalent olarak çapraz bağlar oluşturan bağlar oluşturur (F.A.Blommaertve ark.1995). DNA ve bu bileşikler arasında stabil komplekslerin oluşumu, DNA çoğalmasını ve transkripsiyonunu bloke ederek kanser hücrelerinin ölümünü tetikler. Öte yandan, kovalent olmayan DNA ile etkileşen metal komplekslerinin de potansiyel olarak köpüren antikanser ilaçlarına sahip olduğu gösterilmiştir. Klinik olarak kullanılan platin ilaçları içeren nano ölçekli ilaç formülasyonları, umut verici in vitro ve in vivo farmakolojik özellikler sergiledi ve bu formülasyonların bazıları klinik çalışmalarda art arda gerçekleşti.

Kullanılan ligandlardan biri, bir yapay tatlandırıcı, sakarindir (sacH, o-sülfobenzimid). SacH, çözeltilerdeki imin hidrojeni kolayca yok eder. Karşılık gelen anyon sac-charinat (sac), negatif yüklü imino azot atomunun ve karbonil ve sülfonil oksijen atomlarının varlığı sayesinde çok yönlü birçok fonksiyonlu ligand olarak davranır ve mononükleerden koordinasyon polimerlerine metal kompleksleri oluşturur. Bu komplekslerin bazılarının in vitro ve in vivo sitotoksik aktiviteleri de cesaret verici sonuçlar ile değerlendirilmiştir. (V. T. Yilmaz ve ark.2018)

2. MATERYAL METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kimyasal Maddeler

-Sakkarin (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

-SRB (Sulforhodamine B), Santa Cruz, ABD

-Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore, ABD

-Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore, ABD

-Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore, ABD

-Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore, ABD

-Fetal sığır serumu (FBS), PAA, ABD

-Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, ABD

-L-glutamin, Gibco

-Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, ABD

-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza

-0,25% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, ABD

-Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya

-Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries

-Annexin V-Fluos, Roche, İsviçre

2.1.2. Sarf Malzemeler

-25cm2 ve 75cm2'lik flask, Corning, ABD

-6 kuyulu plate, Corning, ABD

-96 kuyulu flat plate, Corning, ABD

-5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject

-10µl'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya

-100µl'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya

-1000µl'lik pipet uçları Biohit, Finlandiya

-Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific

-Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest, ABD

-Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest, ABD

-Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, ABD

-Kriyovial, Corning, ABD

2.1.3. Cihazlar

-Spektrofotometre, BGM Labtech

-Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D

-CO_2 inkübatörü, Panasonic, Japonya

-Buzdolabı, Panasonic, Japonya

-Steril kabin, Telstar

-Muse Cell Analyzer, MerckMillipore Sigma, Kanada

-Multipipet cihazı, Multipette eppendorf

-Inverted mikroskop, Nikon, Japonya

-Santrifüj, Hitachi, Japonya

-10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific

-0,5-5ml pipet, Brand, Almanya

-10ml pipet, Eppendorf

-5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific, ABD

-Pipet boy, ISO fill

2.2. METOD

2.2.1. Uludağ Üniversitesi Tarafından Sentezlenen Pt(Iı) Sakkarinat Kompleksi Kimyasal Bileşiğinin Sentezlenmesi"

Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından sentezlenen yeni sakkarinat türevli bileşiği (MP2) 25 mM stok konsantrasyonda hazırlandı. Bunun için 2,3 mg MP2 bileşiği 500 µl DMSO içerisinde çözdürülmüştür.

2.2.2. Hücre Kültürü

Üniversite laboratuvarında bulunan Panc1 (ATCC CRL 1469), pankreas kanseri hücre hattı kriyovial tüp içerisinde -80°C sıcaklığında dolapta saklandı.

Panc1 pankreas kanseri hücre hattının özellikleri aşağıdaki gibidir.

Panc 1 Hücre Hattı:

- İnsan pankreas kanseri hücre soyu
- KRAS mutant
- P53 mutant
- Lenf nodu metastazı

2.2.3. Hücrelerin Stoklanması

Flasklar mikroskop altında gözlemlendi ve hücre yoğunluğu arttığında besiyeri uzaklaştırılıp 1X PBS kullanılarak yıkama yapıldı. Adherent hücrelerin tutunduğu yüzeyden kalkabilmeleri için %0.25 Tripsin-EDTA ile 5 dakika 37°C'de bekletildi. Tripsin inhibisyonu için flask içerisine tripsinin on katı olacak şekilde besiyeri ilave edildi. Kalkan hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Sallanan kovalı rötarlı santrifüj cihazında 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edildi ve hücreler 1 ml dondurucu medium (%5-10 DMSO + %10 FBS + %80 DMEM) içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde kriyoviallere aktarıldı. Daha sonra -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.4. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

Panc1 hücreleri için besiyeri aşağıdaki gibi hazırlandı

RPMI 1640 (Gibco) besiyerine %10 Fetal Bovine Serum (Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco) ilave edildi.

2.2.5. Hemositometre ile hücre sayımı

Tripsinle kaldırılan hücreler süspanse hale getirildikten sonra 1:1 oranında boya ile karıştırıldı. (10 µl alınarak 96 kuyulu plate içerisinde 10 µl %0,5 tripan mavisi (Sigma) eklendi). Karışımdan 10 µl alınarak thoma lamının her iki yüzeyine de eklendi ve mikroskop altında hemasitometri üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde bulunan hücre sayısı hesaplandı.

2.2.6. Sulforhodamine B (SRB) testi ile canlılık tayini

Bu canlılık tayini yöntemi, hafif asidik koşullarda proteinlere bağlanan ve daha sonra bazik koşullarda çözünen SRB boyasının özelliğine dayanır.

Protokol dört basamaktan oluşur:

- Tedavinin hazırlanması
- Uygulanacak tedaviyle hücrelerin muamele edilmesi
- Hücre fiksasyonu ve SRB boyaması
- Absorbans ölçümü"

SRB boyası, %0.4 (kütle/hacim) olacak şekilde %1 asetik asit çözeltisi ile hazırlandı. Stok boya solüsyonu 4°C'de saklandı. Trikoloroasetik asit (TCA) %50 (kütle/hacim) olacak şekilde distile su ile hazırlandı ve 4°C'de saklandı.

SRB testi için MP2 bileşiğinin farklı konsantrasyonları (50-0,781 μM) hazırlanarak 96 kuyulu plate içerisine uygulandı. Farklı konsantrasyonlardaki MP2 kimyasalının her bir konsantrasyonu için birbirinden bağımsız üç farklı kuyu olacak şekilde uygulama yapıldı.

Panc1 hücreleri 100 μl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ekildi. Kontrol için sadece ilaç içermeyen besiyeri ortamı içerisine ekilen hücreler kullanıldı. Kör için kullanılacak kuyulara ise sadece 200 μl besiyeri eklendi. Ardından hücreler 48 saat boyunca 37°C, %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 48 saat inkübasyon sonunda hücreleri fikse etmek için her kuyuya 50 μl TCA eklenerek plate 4°C'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda TCA kuyulardan uzaklaştırılarak kuyular 5 kez distile su ile yıkandı. Yıkama sonunda plate havada kurutuldu ve her kuyuya 50 μl SRB boyası eklendi. SRB boyası ile hücreler 30 dakika oda sıcaklığında muamele edildi. İnkübasyon sonrası boya kuyulardan uzaklaştırılarak kuyular %1 asetik asit çözeltisi ile 5 kez yıkandı. Plate yıkama sonrasında havada kurutularak hemen ardından boyanın çözünmesi için her kuyuya 150 μl (10 mM, pH:10) Tris Bazı eklendi. Çalkalayıcıda boyanın çözünmesi ve homojen bir karışım için 10 dakika 100 rpm'de plate bırakıldı. Süre sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar) 564nm dalga boyunda ölçülerek okunan absorbanslar ile hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

Kontrol olarak kullanılan hücre grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve kimyasal uygulanan hücrelerin canlılığı aşağıda verilen formülle hesaplandı.

% Canlılık = [100 × (Kimyasal uygulanan grubun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması) / (Kontrol grubunun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması)]

3.2.7. Akım sitometrisi ile Anneksin V analizi

Akım sitometresinde analiz yapabilmek için hücrelerin süspanse olması gerekmektedir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Cihaz ölçüm yaparken hücreler birer birer "flow cell" ismi verilen kapiler borudan geçer ve

bu geçiş sırasında lazer ışınına maruz kalırlar. Hücreler lazer ışığının bir kısmını saptırır ve bu saptırma bize hücre boyutu hakkında bilgi verir. Ayrıca eğer hücreler floresan işaretli bir boya ile muamele edilmişse ilgili lazer ışığı tarafından uyarıldıkları zaman floresan ışıma yaparlar. Bu işaretleme hücre yüzeyindeki veya içindeki proteinlere spesifik antikor bağlanması ya da hücredeki moleküllere (ROS gibi) veya organellere spesifik boyalar kullanılarak gerçekleştirilir. İlgili boya ya da antikor ile işaretlenen hücre lazer ışınıyla uyarıldığında floresan ışıması cihaz tarafından belirlenir (Karaboz, Kayar, ve Akar 2008).

- Sağlıklı hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)
- Erken apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)
- Geç apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)
- Nekrotik hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

Muse Annexin V & Dead Cell Kiti kullanmak üzere, Panc1 hücreleri 6 kuyulu platelere 1×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ekim ile eş zamanlı olarak MP2 bileşiği 50 µM dozu kuyulara uygulandı. Kontrol grubu hücreler sadece besiyeri ile muamele edildi. Hücreler 12 ve 24 saat boyunca inkübatörde tutuldu ve süre sonunda MP2 uygulanan kuyuların üst besiyeri 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Kontrol grubunun kuyularındaki üst besiyeri ise uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili santrifüj tüplerine toplandıktan sonra 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası santrifüj tüplerinin süpernatantları uzaklaştırıldı. Hücreler 100 µl %1 FBS içeren PBS içerisinde süspanse hâle getirildi ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Örneklere 100 µl Mus Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Vortekslenen örnekler karanlıkta 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.8. Akım sitometrisi ile kaspaz 3/7 aktivasyon analizi

Apoptoz sürecinde etkili olan efektör kaspazlar grubunda yer alan kaspaz 3 ve 7 aktivasyonu kaspaz bağımlı apoptoz ve membran bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir.

Kaspaz 3/7 testi için Panc1 hücreleri Anneksin V testindeki gibi aynı şekilde ekildi, kimyasal uygulamaları yapıldı ve sürenin sonunda 50 µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hâle getirildi. Örnek içeren santrifüj tüplerine 5 µl "Caspase 3/7 working reagent" eklenerek, kapakları açık olarak inkübatörde 30 dk inkübe edildi. Sürenin

sonunda örneklere 150 µl 7-AAD boyası eklendi ve örnekler 5 dk, oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.9. Akım sitometrisi ile mitokondri membran potansiyeli analizi

Mitokondri membranında meydana gelen değişimler hücre sağlığı hakkında bilgi veren önemli parametrelerdendir. Pro-apoptotik proteinlerin artması ve anti-apoptotik proteinlere baskın gelmesi sonucunda mitokondri membran bütünlüğü bozulabilir ve içsel yolak başlayabilir (Finkel 2001).

Mitokondri membran testi için Panc1 hücreleri Anneksin V testinde olduğu şekilde ekildi, kimyasal uygulaması yapıldı ve sürenin sonunda 100 µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hâle getirildi. Örneklere 95 µl (boya içeren) "working reagent" eklendi hücreler 20 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda tüplere 5 µl 7-AAD boyası eklendikten sonra vorteks yapıldı ve örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.10. Akım sitometrisi ile oksidatif stresin (ROS) analizi

ROS fizyolojik durumda az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2\cdot^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-)'dir. Metabolik yolaklarda enzimatik reaksiyonlar sırasında ara ürün olarak ROS devamlı şekilde oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma ve kimyasal maddeler gibi birçok sebepten dolayı artabilir. Oldukça reaktif olan ROS, hücrenin lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi tüm önemli bileşiklerine etki edebilir ve DNA hasarına yol açabilir (Chio ve Tuveson 2017; Prasad, Gupta, ve Tyagi 2017).

ROS testi için Panc1 hücreleri Anneksin V testinde olduğu gibi ekilerek, kimyasal uygulaması yapıldı. Ardından süre sonunda kit içindeki oksidatif stres solüsyonu (200 µl) ile süspanse hâle getirildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu 30 dakika inkübatörde kapaklar açık şekilde inkübe edilerek süre sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.11. İstatistiksel Analiz

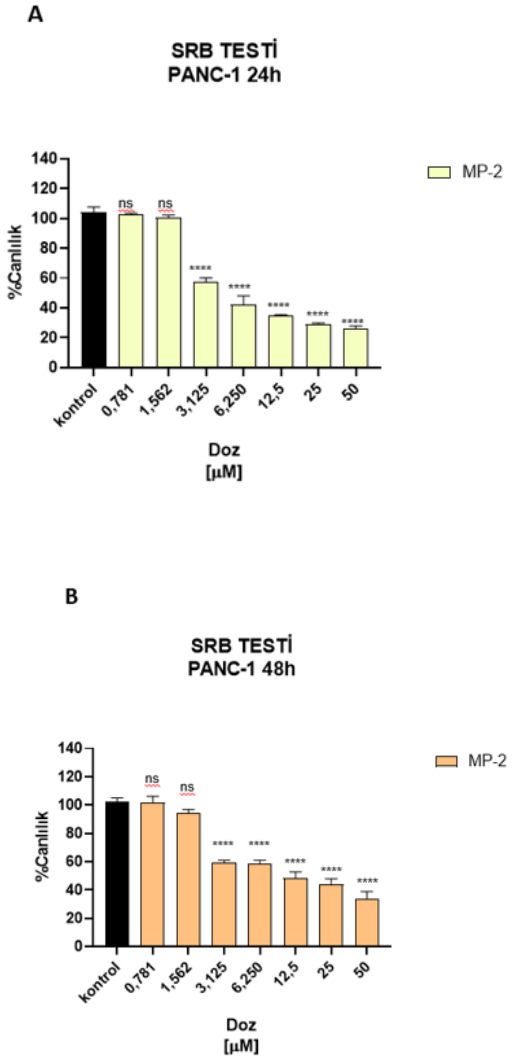
SRB testi canlılık deneyleri sonuçlarının grafiği "GraphPad Prism" programı kullanılarak çizilmiştir. Deney verileri MP2 uygulanmış pankreas kanseri hücre hattında yapılan SRB testi verilerinin en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Veriler "GraphPad Prism 8.0.1" istatistik programı ile analiz edilmiştir (Motulsky 1999).

"Grupların karşılaştırılmasında one way ANOVA testi kullanılmış ve Dunnett doğrulama yöntemiyle anlamlı değişimler için p değeri <0,0001 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Testi Sonuçları

Panc1 pankreas kanseri hücrelerine 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (0,6-50 µM) MP2 bileşiği uygulandı. MP2 bileşiğinin Panc1 hücre soyunun canlılığı üzerindeki etkisini belirleyebilmek için SRB canlılık testi yapıldı. SRB testi sonuçlarına göre MP2 bileşiği Panc1hücre hattında doza bağlı olarak ters orantılı bir şekilde hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya sebep olduğu belirlendi. (Şekil 4). Bu deneyde Panc1 pankreas kanseri hücre hattında %10 canlılık gösteren dozun (IC90) belirlenmesi amaçlandı. %10 canlılığa sebep olan en yakın dozun ek yüksek doz olan 50µM olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. Hücrelere uygulanan MP2 bileşiği sonrası kimyasalın pankreas kanseri hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. (A) Panc1 24 saat, (B) Panc1 48 saat 0, 0.781, 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µM dozlarında MP2 uygulaması sonucu hücre canlılıkları ölçülmüştür (ns:0,9999 ****:p<0,0001).

4.2. Akım Sitometrisi Sonuçları

4.2.1. Anneksin V Testi

MP2 bileşiğinin Panc1 pankreas kanseri hücre hattında sebep olduğu apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde Anneksin-V testi ile araştırıldığında bulunan sonuçlar Şekil 4.2 gösterilmiştir.

Anneksin V-FITC ve 7-AAD her ikiside düşük olan bölge- sağlıklı hücreleri

Anneksin V-FITC yüksek ve 7-AAD düşük olan bölge- erken apoptotik hücreleri

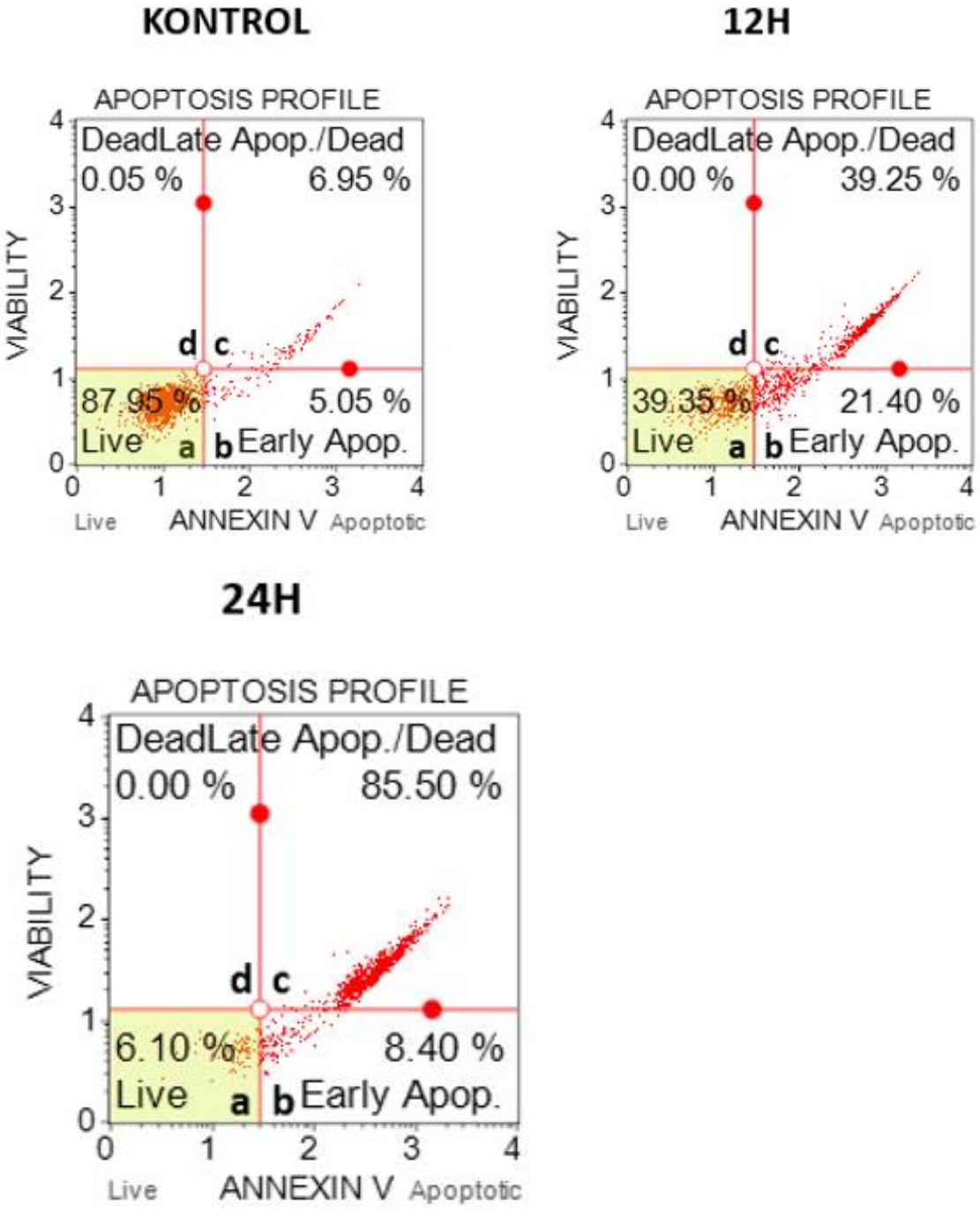
Anneksin V-FITC ve 7-AAD her ikiside yüksek olan bölge geç- apoptotik hücreleri

Anneksin V-FITC düşük ve 7-AAD yüksek olan bölge nekrotik hücreleri (d) göstermektedir.

MP2 bileşiğinin IC90 konsantrasyonunun uygulanması sonrasında 12 ve 24. saatlerde Panc1 hücrelerinde geç apoptoz ve nekrotik ölümün zamana ve doza bağlı arttığı bulunmuştur.

MP2 bileşiğinin uygulanması sonucu Panc1 hücrelerinde 12. saatte erken apoptotik hücrelerin yüzdesi %21,40' ı bulurken 24. Saatte %8.40 a düşmüştür.

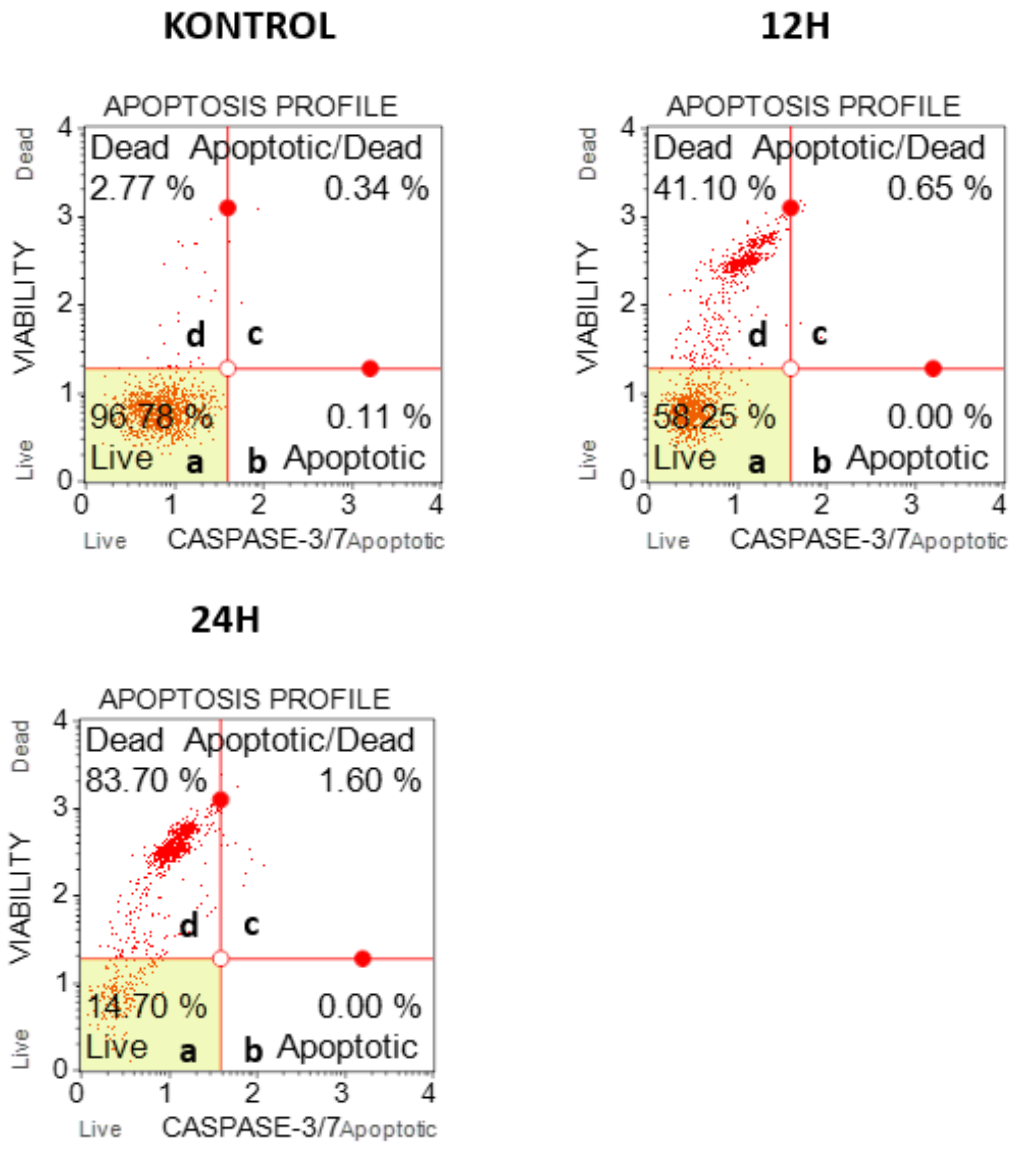
MP2 bileşiğinin uygulanması sonucu Panc1 hücrelerinde 24. saatte geç apoptotoik hücrelerin yüzdesi %39,25 iken 24. Saatte %85,50'ye yükselmiştir.



Şekil 4.2. MP2 bileşiğinin 50 µM (IC90 değeri) konsantrasyonunda insan pankreas kanseri hücre hattında (Panc1) uygulanması ile anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (a: sağlıklı hücreler; b: Anneksin V-FITC yüksek ve 7-AAD düşük erken apoptotik hücreler; c: Anneksin V-FITC ve 7-AAD yüksek geç apoptotik hücreler; d: Anneksin V-FITC düşük ve 7-AAD yüksek nekrotik hücreler

4.2.2. Kaspaz 3/7 Testi

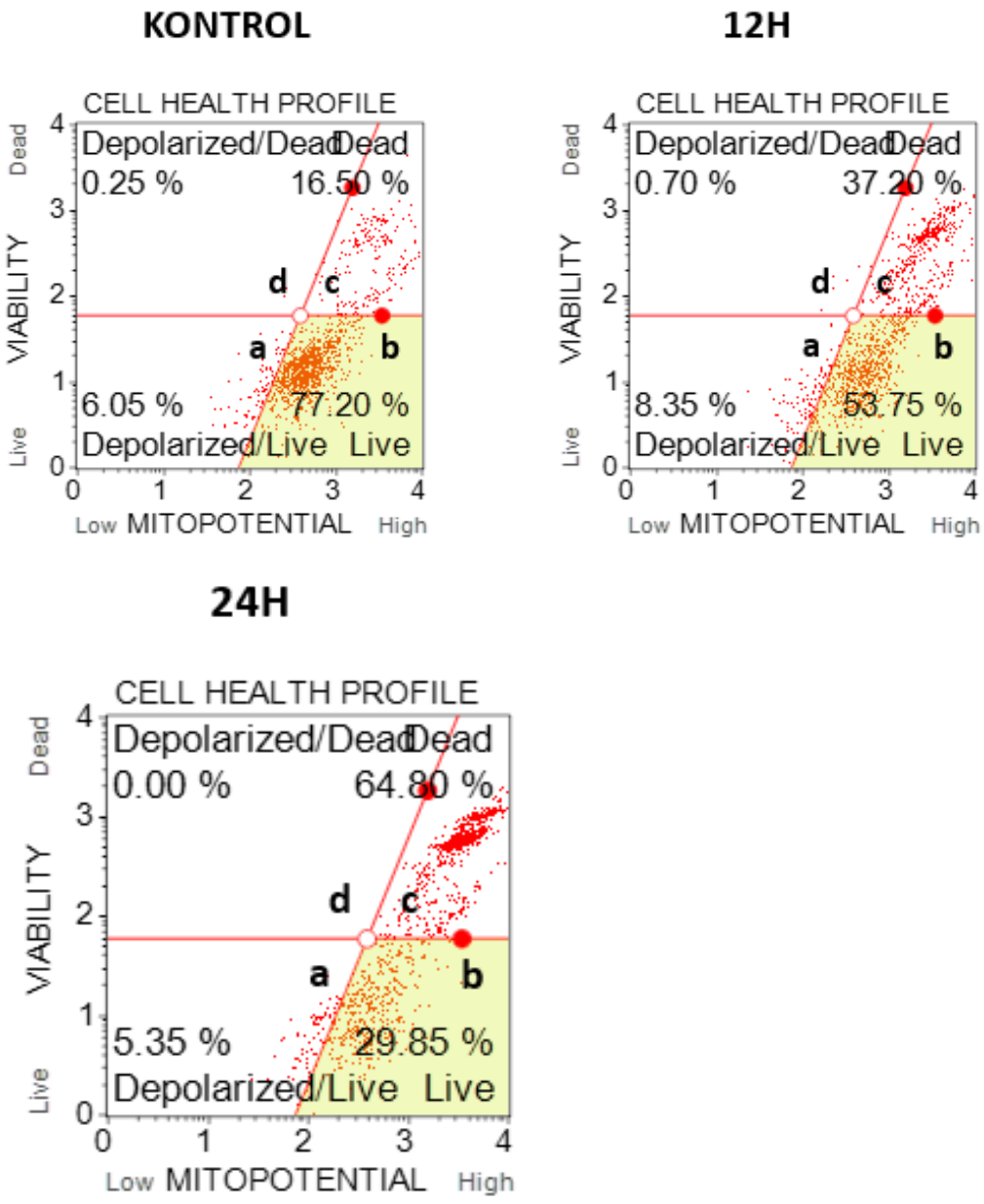
Yapılan SRB ve Anneksin-V deneyleri sonuçları MP2 bileşiğinin Panc1 hücre hattında 12 ve 24 saatte apoptoza neden olduğu görülmüştür. Bundan dolayı apoptoz yolağının efektör kaspazlarından olan kaspaz 3/7 aktivasyonunun incelenmesi düşünülmüştür. Akım sitometrisinde kaspaz 3/7 değerlendirilmesiyle elde edilen sonuçlar Şekil 4.3. gösterilmiştir. MP2 bileşiğinin IC90 konsantrasyonunun uygulanması sonrasında 12 ve 24. saatlerde Panc1 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivasyonunun olmadığı bulunmuştur.



Şekil 4.3. MP2 bileşiğinin 50 µM (IC90 değeri) konsantrasyonunda insan pankreas kanseri hücre hattında (Panc1) uygulanması ile kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (a: sağlıklı hücreler; b: kaspaz 3/7 aktif erken apoptotik hücreler; c: kaspaz 3/7 aktif geç apoptotik hücreler; d: kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler)

4.2.3. Mitopotential Testi

Mitokondriyal membran permeabilitesinin değişimi apoptotik süreçde gözlenen önemli değişikliklerideni biridir. Akım sitometresi ile mitokondri membran potansiyeli kaybı analizleri Şekil 4.4. gösterilmiştir. MP2 bileşiğinin IC90 konsantrasyonunun uygulanması sonrasında 12 ve 24. saatlerde Panc1 hücrelerinde doz ve zamana bağlı olmaksızın MP2' nin mitokondri membranını depolarize etmeden hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür.

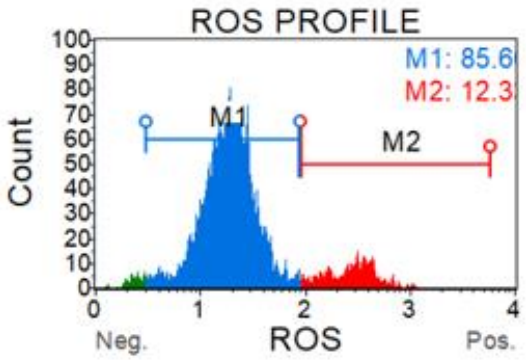


Şekil 4.4. MP2 bileşiğinin 50 µM konsantrasyonunda Panc1 insan pankreas kanseri hücre hattında uygulanması sonucu mitokondri membranı değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerin 12 ve 24 saatlik sonuçları (a: mitokondri membranı depolarize ve canlı hücreler; b: sağlıklı hücreler; c: ölü hücreler; d: mitokondri membranı depolarize hâlde olan ölü hücreler

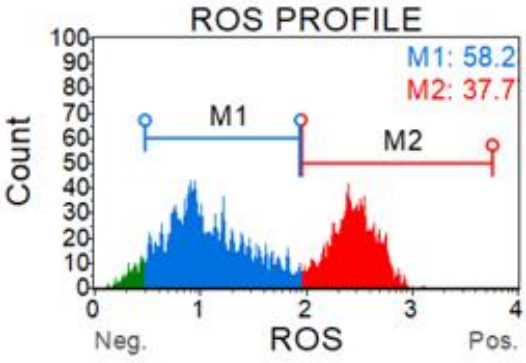
4.2.4. ROS Testi

DNA hasarının ROS kaynaklı mı yoksa değil mi sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı incelendi. Panc1 pankreas kanseri hücrelerine MP2 bileşiğiyle IC90 konsantrasyonunda tedavi uygulamasının sonucunda ROS miktarları, zamana bağlı olarak (12-24) artış göstermiştir. (Şekil12)

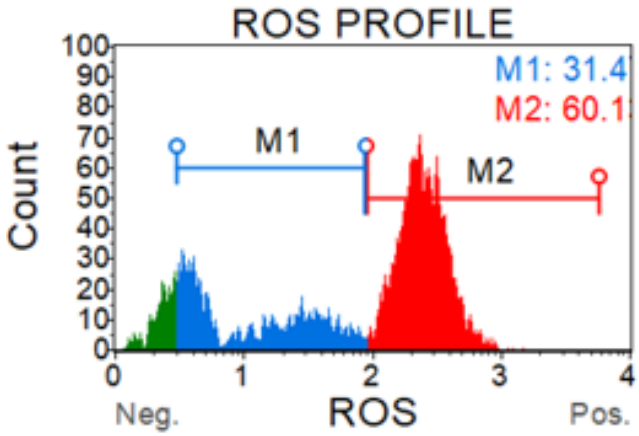
KONTROL



12H



24H



Şekil 4.5. MP2 bileşiğinin 50 µM konsantrasyonunun Panc1 insan pankreas kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu elde edilen ROS değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları M1: ROS negatif hücreler ROS (–); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezde Panc1 insan pankreas kanseri hücre hattında yeni sentezlenen pt(II) sakkarinat kompleksi kimyasal bileşiğinin, antikanser etkinliği araştırılmış sitotoksik etkilerine bakılmıştır. Çalışmanın önemli bir özelliği bu çalışmada kullanılan bileşiğin yeni ve dolayısıyla daha önce çalışılmamış olmasıdır. Bu açıdan ele alınacak olursa, bu çalışma MP2 bileşiğinin insan pankreas hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri kanserdir ve her yıl milyonlarca insan kanserden yaşamını kaybetmektedir. Güncel olarak kanser tedavisinde, kemoterapide kullanılan 60'dan fazla sitotoksik ilaç bulunmaktadır. Tedavi sürecinde ve sonrasında karşılaşılan en önemli sorun ise kanser hücresinin bu ilaçlara karşı gösterdiği dirençtir. Bu nedenle, kemoterapi rejimlerinde bu direnç mekanizmalarını hedeflemek, araştırmacılar için önem taşımaktadır. Metal bileşikler klinikte anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır. İlaçların başarılı sonuçlar vermesine rağmen yol açtığı ciddi yan etkiler ve hücrelerde gelişen platin direnci araştırmacıları yeni metal bileşiklerin sentezine yöneltmiştir (Reedijk 2003, Alderden ve ark., 2006; Dasari ve ark., 2014). Bu platin bazlı ajanların DNA'yı hedeflediği iyi bilinmektedir. Sulu çözeltiyi hidrolize ederek katyonik türler verir, bu da DNA'ya kovalent olarak çapraz bağlar oluşturan bağlar oluşturur (F.A.Blommaertve ark.1995). DNA ve bu bileşikler arasında stabil komplekslerin oluşumu, DNA çoğalmasını ve transkripsiyonunu bloke ederek kanser hücrelerinin ölümünü tetikler.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü araştırma grubu tarafından, umut vaadeden Pt (II) sakkarin (MP2) bileşiği geliştirildi ve bileşiğin bu tez kapsamında insan pankreas hücresi olan Panc1 üzerindeki sitotoksik etkileri çalışıldı. SRB ve ATP canlılık testi sonuçlarına göre, Panc1 hücrelerinde 24 ve 48 saat MP2 bileşiğinin uygulanması sonucu 0.781, 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatiksel açıdan anlamlı azalmalar görüldü.

V.T.Yilmaz ve ark. (2018) tarafından Pt (II) sakkarin bileşiğinin farklı hücre hatlarında sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada MP2 bileşiğinin antikanser aktivitesi, insan meme (MCF-7), akciğer (A549), kolon (HCT116) ve prostat (DU145) normal bronşiyal epitel (BEAS-2B) hücrelerine karşı test edilmiştir. Çalışmalarda pankreas kanseri hücre hattına yer verilmediği tespit edilerek bu tez çalışmasında insan pankreas kanseri hücre hattı seçildi ve MP2 bileşiği bu hücre hattı üzerinde çalışıldı. SRB canlılık testi sonuçlarına göre kullanılan MP2 bileşiğinin tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırıldı. İlk olarak bir apoptozis belirteci olan Anneksin-V-FITC boyaması yapıldı ve floresan mikroskobu altında değerlendirildi. Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Bunun nedeni Anneksin-V fosfotidilserine bağlanması membran hasarlanmadan önce nüklear kondensasyon safhasına denk gelmektedir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 1997). Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfotidilserine bağlanarak pozitif sonuç verir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için propidyum iyodür ile birlikte kullanılır (Hammill ve ark. 1999). Panc1 hücrelerinin MP2 bileşiğiyle tedavisi sonucunda Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI' da pozitif sonuç verdi (geç apoptotik). MP2 kompleksi uygulanması sonucunda Panc1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi kaspaz 3/7 testi ile akım sitometride değerlendirildiğinde; 12 ve 24 saat tedavilerin sonunda hücre canlılık yüzdesinde azalma görülürken nekrotik hücre oran yüzdesinde artış belirlendi. Annexin-V ve kaspaz 3/7 testi sonuçlarına göre membran asimetrisinin bozulduğu fofotidilserinlerin membran üzerinde translokasyona uğradığı belirlendi. Ayrıca kaspaz 3/7 aktivasyonunun olmaması nedeniyle kaspaz bağımsız apoptoz ölüm modunun aktif olabileceği düşünüldü. Bu çalışmaları takiben her iki hücre soyunda da mitokondri membran potansiyelindeki değişimler incelendi. MP2 kompleksi uygulanması sonucunda her iki hücre soyunda da 12 ve 24 saatlik tedavide mitokondri membran potansiyelinin bozulmadan hücrelerin öldüğü belirlendi.

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi birtakım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey 2000, Cooke ve ark. 2003). Bu çalışmada, Panc1 hücrelerinde görülen DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı mı sorusuna yanıt olarak akım

sitometrisinde ROS miktarı saptandı. Her iki hücre soyunda da MP2 bileşiği uygulanması sonucunda kontrole kıyasla ROS miktarının belirgin derecede arttığı görüldü. Sonuçlar, MP2 bileşiği tedavisinin Panc1 hücre hattında oluşan yüksek seviyedeki DNA hasarının nedeninin ROS kaynaklı gerçekleştiğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, MP2 bileşiğinin insan pankreas hücre hattı olan Panc1 hücre hattında kaspaz bağımsız apoptotik ölümün olduğu tespit edilmiştir. Bir sonraki inceleme basamağı olarak daha geniş kapsamlı analizlarin yapılması gerektiği ve bu bileşiğin kliniğe uyarlanabilmesi için in vivo olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

Anonim. 2013. “Muse ® Oxidative Stress Kit User ’ s Guide”. 100111: 1–14.

Anonim 2019. “Gleason Score - Prostate Conditions”.https://www.prostateconditions.org/about-prostate-conditions/prostate-cancer/newly-diagnosed/gleason-score (10 Mayıs 2019).

Artandi, S. E., ve R. A. DePinho. 2010. “Telomeres and telomerase in cancer”. Carcinogenesis 31(1): 9–18. https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp268 (09 Mayıs 2019).

Artandi, Steven E., ve Ronald A. DePinho. 2000. “Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer?” Nature Medicine 6(8): 852–55. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932211 (09 Mayıs 2019).

Berlin NI, Williams M. Pancreatic cancer: an epidemiologic approach and model. JAMA 1981; 245: 171

Berx, G., ve F. van Roy. 2009. “Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer”. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1(6): a003129–a003129. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457567 (09 Mayıs 2019).

BEIR V: implications for the nuclear workforce. Science 1990; 247: 620-622

Blasco, Maria A. 2005. “Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond”. Nature Reviews Genetics 6(8): 611–22. http://www.nature.com/articles/nrg1656 (09 Mayıs 2019).

Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, Neoptolemos JP, Whitcomb DC, Hruban RH, Brentnall TA, Lynch HT, Canto MI. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. Gut 2007; 56: 1460-1469

Bussom S, Saif MW. Methods and rationale for the early detection of pancreatic cancer. Highlights from the "2010 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium". Orlando, FL, USA. January 22-24, 2010. JOP 2010; 11: 128-130

Cadet, Jean, ve Thierry Douki. 2011. “Oxidatively Generated Damage to DNA by

UVA Radiation in Cells and Human Skin". Journal of Investigative Dermatology 131(5): 1005–7.

de Campos-Nebel, Marcelo, Irene Larripa, ve Marcela González-Cid. 2010. "Topoisomerase II-Mediated DNA Damage Is Differently Repaired during the Cell Cycle by Non-Homologous End Joining and Homologous Recombination" ed. Reuben S. Harris. PLoS ONE 5(9): e12541.

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. Curr Cancer Drug Targets 2008; 8: 187-198

Chan, R.W., Lee, C.L., Ng, E.H., Yeung, W.S. 2017. Co-culture with macrophages enhances the clonogenic and invasion activity of endometriotic stromal cells. Cell Prolif., 2017 Jan 10. doi: 10.1111/cpr.12330. Chang, D.K., Merrett, N.D., Biankin, A.V. 2008. NSW Pancreatic Cancer Network. Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem? J. Gastroenterol. Hepatol., 7(1): 1036-1345.

Chandra, J, A Samali, ve S Orrenius. 2000. "Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress." Free radical biology & medicine 29(3–4): 323–33.

Chio, Iok In Christine, ve David A. Tuveson. 2017. "ROS in Cancer: The Burning Question". Trends in Molecular Medicine 23(5): 411–29. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491417300436 (31 Mayıs 2019).

Dawson, V L, ve T M Dawson. 1996. "Free radicals and neuronal cell death." Cell death and differentiation 3(1): 71–78.

DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, ve Craig B. Thompson. 2008. "The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation". Cell Metabolism 7(1): 11–20.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177721 (09 Mayıs 2019).

deCathelineau, Aimee M, ve Peter M Henson. 2003. "The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave." Essays in biochemistry 39: 105–17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585077 (19 Mayıs 2019).

Decker GA, Batheja MJ, Collins JM, Silva AC, Mekeel KL, Moss AA, Nguyen CC, Lake DF, Miller LJ. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening. Gastroenterol Hepatol (N Y) 2010; 6: 246-254

DeNardo, David G., Pauline Andreu, ve Lisa M. Coussens. 2010. "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity". Cancer and Metastasis Reviews 29(2): 309–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405169 (09 Mayıs 2019).

Deshpande, Amit, Peter Sicinski, ve Philip W Hinds. 2005. "Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective." Oncogene 24(17): 2909–15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838524 (09 Mayıs 2019).

Dusek L, Muzík J, Gelnarová E, Fínek J, Vyzula R, Abrahámová J. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. Klin Onkol 2010; 23: 311-324

Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Büchler MW, Korc M. Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. Cancer Res 1994; 54: 5775-5778

El-Najjar, Nahed vd. 2011. "The chemical and biological activities of quinones: Overview and implications in analytical detection". Phytochemistry Reviews 10(3): 353–70.

Erkisa, Merve, Didem Karakas, ve Engin Ulukaya. 2019. "Cancer Stem Cells: Root of the Evil". Critical Reviews^{TM} in Oncogenesis 24(1): 69–87. http://www.dl.begellhouse.com/journals/439f422d0783386a,370a5a2d6539c279,26a26a24193837fc.html (30 Nisan 2019).

Finkel, E. 2001. "The mitochondrion: is it central to apoptosis?" Science (New York, N.Y.) 292(5517): 624–26.

Gajewski, Thomas F, Hans Schreiber, ve Yang-Xin Fu. 2013. "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment". Nature Immunology 14(10): 1014–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048123 (09 Mayıs 2019).

Geiger, B., ve K. M. Yamada. 2011. "Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions". Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3(5): a005033–a005033. http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a005033 (09 Mayıs 2019).

Ghobrial, Irene M, Thomas E Witzig, ve Alex A Adjei. 2005. "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." CA: a cancer journal for clinicians 55(3): 178–94.

Gil, Joana, Sandra Almeida, Catarina R. Oliveira, ve A.Cristina Rego. 2003. "Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis". Free Radical Biology and Medicine 35(11): 1500–1514.

Gooiker, G.A., Lemmens, V.E., Besselink, M.G., Bush, O.R., Bonsing, B.A., Molenear, I.Q., 2014. Impact of centralization of pancreatic cancer surgery on resection rates and mortality. Br. J. Surg., 101: 1000e5

Gültekin, Murat, ve Güledal Boztaş. 2014. Türkiye Kanser İstatistikleri. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2009kanseraporu-1.pdf (30 Nisan 2019).

Hanahan, Douglas, ve Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". Cell 144(5): 646–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230 (01 Nisan 2019).

Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, Balakrishnan L, Dwivedi SB, Telikicherla D, Selvan LD, Goel R, Mathivanan S, Marimuthu A, Kashyap M, Vizza RF, Mayer RJ, Decaprio JA, Srivastava S, Hanash SM, Hruban RH, Pandey A. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. PLoS Med 2009; 6: e1000046

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2000; 6: 2969-2972

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. Am J Surg Pathol 2001; 25: 579-586

Hüttemann, Maik vd. 2007. "Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling." Biochimica et biophysica acta 1773(12): 1701–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240421 (09 Mayıs 2019).

Igney, Frederik H., ve Peter H. Krammer. 2002. "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis". Nature Reviews Cancer 2(4): 277–88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001989 (09 Mayıs 2019).

JJones, R. G., ve C. B. Thompson. 2009. "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth". Genes & Development 23(5): 537–48. http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1756509 (09 Mayıs 2019).

Jones, Valerie Sloane vd. 2016. "Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies". Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1865(2): 255–65.

Jouan-Lanhouet, S vd. 2012. "TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation". Cell Death & Differentiation 19(12): 2003–14.

Joyce, Johanna A., ve Jeffrey W. Pollard. 2009. "Microenvironmental regulation of metastasis". Nature Reviews Cancer 9(4): 239–52. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279573 (09 Mayıs 2019).

Karaboz, İsmail, Esra Kayar, ve Suna Akar. 2008. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları.

Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A., Natale, C., … Farber, E. (2002). Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). International Journal of Oncology. doi:10.3892/ijo.21.1.165

Kiehne K, Herzig KH, Fölsch UR. c-met expression in pancreatic cancer and effects

of hepatocyte growth factor on pancreatic cancer cell growth. Pancreas 1997; 15: 35-40

Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, Abbruzzese JL. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. JAMA 2009; 301: 2553-2562

Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. Gastroenterology 2009; 137: 482-488

Lockhart, A. C., Rothenberg, M. L., & Berlin, J. D. (2005). Treatment for Pancreatic Cancer: Current Therapy and Continued Progress. Gastroenterology, 128(6), 1642–1654.

Long, J., Zhang, Y., Yu, X., Yang, J., LeBrun, D. G., Chen, C., Yao, Q., Min, L. 2011. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 15(7): 817-828

Longnecker, D. 2014. Anatomy and Histology of the Pancreas. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, https://www.pancreapedia.org – (Erişim tarihi: 11.2.2017).

Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer . Carcinogenesis, 21(3), 485–495.

Maitra A, Hruban RH. A new mouse model of pancreatic cancer: PTEN gets its Akt together. Cancer Cell 2005; 8: 171-172

Mariño, Guillermo, ve Guido Kroemer. 2013. "Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure". Cell Research 23(11): 1247–48.

Matés, José M., Juan A. Segura, Francisco J. Alonso, ve Javier Márquez. 2012. "Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update". Archives of Toxicology 86(11): 1649–65.

Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. J Thorac Oncol 2006; 1: 7-9

Motulsky, Harvey. 1999. Analyzing Data with GraphPad Prism.

Nagata, Shigekazu. 2005. “DNA Degradation in Development and Programmed Cell Death”. Annual Review of Immunology 23(1): 853–75.

———. 2018. “Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells”. Annual Review of Immunology 36(1).

Nagata, Shigekazu, Rikinari Hanayama, ve Kohki Kawane. 2010. “Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells”. Cell 140(5): 619–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211132 (19 Mayıs 2019).

Nieto, M. Angela, Ruby Yun-Ju Huang, Rebecca A. Jackson, ve Jean Paul Thiery. 2016. “EMT: 2016”. Cell 166(1): 21–45.

Nkondjock A, Krewski D, Johnson KC, Ghadirian P. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer. Int J Cancer 2005; 114: 817-823

Nowell, P C. 1976. “The clonal evolution of tumor cell populations.” Science (New York, N.Y.) 194(4260): 23–28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840 (30 Nisan 2019).

Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1458-1465

Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP. UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Gastroenterology 2003; 124: 1802-1808

Otte JM, Kiehne K, Schmitz F, Fölsch UR, Herzig KH. C-met protooncogene expression and its regulation by cytokines in the regenerating pancreas and in pancreatic cancer cells. Scand J Gastroenterol 2000; 35: 90-95

Papetti, Michael, ve Ira M. Herman. 2002. “Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis”. American Journal of Physiology-Cell Physiology 282(5): C947–70. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940508 (09 Mayıs 2019).

Perona, Rosario. 2006. “Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors.” Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 8(2): 77–82. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632420 (09 Mayıs 2019).

Poley JW, Kluijt I, Gouma DJ, Harinck F, Wagner A, Aalfs C, van Eijck CH, Cats A, Kuipers EJ, Nio Y, Fockens P, Bruno MJ. The yield of first-time endoscopic ultrasonography in screening individuals at a high risk of developing pancreatic cancer. Am J Gastroenterol 2009; 104: 2175-2181

Pour P, Althoff J, Krüger FW, Mohr U. Improvement of pancreatic cancer model by modified treatment with N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine. Cancer Lett 1977; 2: 233-237

Prasad, Sahdeo, Subash C. Gupta, ve Amit K. Tyagi. 2017. “Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals”. Cancer Letters 387: 95–105. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383516302026 (31 Mayıs 2019).

Rosty C, Geradts J, Sato N, Wilentz RE, Roberts H, Sohn T, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. p16 Inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) arising in patients with chronic pancreatitis. Am J Surg Pathol 2003; 27: 1495-1501

Ripka S, Neesse A, Riedel J, Bug E, Aigner A, Poulsom R, Fulda S, Neoptolemos J, Greenhalf W, Barth P, Gress TM, Michl P. CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. Gut 2010; 59: 1101-1110

Qian, Bin-Zhi, ve Jeffrey W. Pollard. 2010. “Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis”. Cell 141(1): 39–51. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371344 (09 Mayıs 2019).

Sakorafas GH, Sarr MG. Pancreatic cancer after surgery for chronic pancreatitis. Dis Liver Dis 2003; 35: 482-485

Sinha, B.K., ve C.F. Chignell. 1979. “Binding mode of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA”. Chemico-

Biological Interactions 28(2–3): 301–8.

Skehan, P. vd. 1990. “New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening”. JNCI Journal of the National Cancer Institute 82(13): 1107–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2359136 (30 Mayıs 2019).

Stambolic, V vd. 1998. “Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.” Cell 95(1): 29–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778245 (07 Mayıs 2019).

Sun, Wanpeng, ve Jian Yang. 2010. “Functional mechanisms for human tumor suppressors.” Journal of Cancer 1: 136–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922055 (09 Mayıs 2019).

Susan, Elmore. 2007. “Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death”. Toxicologic Pathology 35(4): 496–516. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/pdf/nihms33547.pdf.

Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, Di Francesco V, Vaona B, Bovo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G. Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. Am J Gastroenterol 1999; 94: 1253-1260

Torre, Lindsey A. vd. 2015. “Global cancer statistics, 2012”. CA: A Cancer Journal for Clinicians 65(2): 87–108. http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21262 (30 Nisan 2019).

Ulukaya, Engin, Ceyda Acilan, ve Yusuf Yilmaz. 2011. “Apoptosis: Why and how does it occur in biology?” Cell Biochemistry and Function 29(6): 468–80.

Wong T, Howes N, Threadgold J, Smart HL, Lombard MG, Gilmore I, Sutton R, Greenhalf W, Ellis I, Neoptolemos JP. Molecular diagnosis of early pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk patients. Pancreatology 2001; 1: 486-509

Vestergaard EM, Hein HO, Meyer H, Grunnet N, Jørgensen J, Wolf H, Orntoft TF. Reference values and biological variation for tumor marker CA 19-9 in serum for different Lewis and secretor genotypes and evaluation of secretor and Lewis genotyping in a Caucasian population. Clin Chem 1999; 45: 54-61

Vichai, Vanicha, ve Kanyawim Kirtikara. 2006. “Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening”. Nature Protocols 1(3): 1112–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406391 (30 Mayıs 2019).

Cancer Progression”. Physiology 25(2): 85–101. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430953 (09 Mayıs 2019).

Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Ogura Y, Yamada D, Egami T, Fujita H, Ohashi S, Nagai E, Tanaka M. 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: 3878-3882

Zavoral, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. World Journal of Gastroenterology, 17(24), 2897.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. Biotechniques, 23: 525–531.

Zhu, J., Lin, M., Fan, D., Wu, Z., Chen, Y., Zhang, J. ve ark. (2009). The role of bridging ligands in determining DNA-binding ability and cross-linking patterns of dinuclear platinum (II) antitumour complexes. Dalton Transactions, (48), 10889-10895.