T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN BxPC-3 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, İNVAZYON VE ANJİYOGENEZ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru AVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN BxPC-3 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, İNVAZYON VE ANJİYOGENEZ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru AVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü tarafından 2013-ÖYP-094 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen sayın hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın hocam Öğr. Gör. Dr. Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Bu süreci bereber atlattığımız, deneylerimin her aşamasında yanımda olan ve yardımlarını eksik etmeyen arkadaşım Arş. Gör. Aycan Aşık'a,

Hayatımın her anında her zaman yanımda olduklarını bildiğim, beni her konuda destekleyen canım aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR……iv

1. GİRİŞ……...1

1.1. Pankreas……. 1

1.2. Pankreas Kanseri……2

1.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri……5

1.2.2. Pankreas Kanseri ve Genetik……...8

1.2.3. Pankreas Kanseri Belirtileri…….. 12

1.2.4. Pankreas Kanserinin Tanısı……... 12

1.2.5. Pankreas Kanserinin Evrelendirilmesi…….. 14

1.2.6. Pankreas Kanseri Tedavisi…… 15

1.3. Juglon……... 17

1.4. Pankreas Kanseri Metastazı……. 18

1.4.1. Hücre Adezyon Molekülleri……..19

1.4.2. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)……20

1.5. Anjiyogenez ve Phactr-1……...25

2. GEREÇ VE YÖNTEM…… 28

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar……... 28

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar……. 28

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler……... 28

2.2. Hücre Kültürü…….. 29

2.2.1. Hücre Hattının Dondurulması……... 29

2.2.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Çözdürülmesi……30

2.2.3. Hücre Hattının Pasajlanması……. 30

2.3. Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması……31

2.4. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi……31

2.5. Hücre Adezyon Analizi……32

2.6. Hücre İnvazyon Analizi……... 33

2.7. Gen İfade Analizi……34

2.7.1. Total RNA izolasyonu……...35

2.7.2. cDNA Sentezi……35

2.7.3. qPCR Analizi……36
2.8. İstatistiksel Analiz……37
3. BULGULAR…… 38
3.1. BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücre Hattı…… 38
3.2. Juglonun Sitotoksik Etkisi……38
3.3. Juglonun Hücre Adezyon ve İnvazyonu Üzerine Etkisi…….. 40
3.4. Juglonun MMP-2, MMP-9 ve Phactr-1 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi……. 41
4. TARTIŞMA…….. 43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER……... 50
6. KAYNAKLAR…….. 52
7. EKLER…….. 62
EK-A: Etik Kurul Kararı……62
8. ÖZGEÇMİŞ…….. 63

SİMGELER VE KISALTMALAR

α: Alfa

β: Beta

δ: Delta

AJCC: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi

ALT: Alanin Aminotransferaz

AST: Aspartat Aminotransferaz

BT: Bilgisayarlı Tomografı

CA: Karsinoembriyonik Antijen

CAM: İmmünglobülin Süper Ailesi Hücre-Hücre Adezyon Molekülleri

CEACAM1: Karsinoembriyonik Antijen İlişkili Hücre Adezyon Molekülü 1

COX-2: Siklooksijenaz-2

DMSO: Dimetilsülfoksit

DPBS: Dulbacco'nın Fosfat Tamponlu Suyu

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EMT: Epidermal-Mezenşimal Değişim

ERCP: Endoskopik Retrograd Kolanjiopankreatografi

EUS: Endoskopik Ultrasonografi

FBS: Fetal Sığır Serumu

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

ICAM-1: İntersellüler Adezyon Molekülü-1

IGF-1: Insülin Benzeri Büyüme Faktörü

IPMN: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi

LEF-1: Lenfoid Arttırıcı-Bağlayıcı Faktör 1

MCN: Müsinöz Kistik Neoplazi

MMP: Matriks Metalloproteaz

MMPI: Endojen MMP inhibitörü

MNQ: 2-metoksi-1,4-naftakinon

MR: Magnetik Rezonans Görüntüleme

MIC-1: Makrofaj İnhibitör Sitokin 1

MT-MMP: Membran Tip MMP

MTT: 3-(4,5- dimetiltiazolil–2-)-2,5-difeniltetrazolyumbromid

N-CAM: Nöral Hücre Adezyon Molekülü

NFD: Nafta-(1,2 b)furan-4,5-dion

NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B

NGF: Sinir Büyüme Faktörü

PanIN: Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

PBS: Fosfat Tamponlu Su

qPCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

u-PA: Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü

TIMP: MMP'lerin Doku İnhibitörleri

TGF-β: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β

TNF-α: Tümör Nekroz Faktör-alfa

TNM: Tümör-Nod-Metastaz

TPA: 12-O-tetradekanol-forbol-13-asetat

USG: Ultrasonografi

VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Juglonun BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Değerlendirilmesi, İnvazyon ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması

Ebru AVCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2015

Pankreas kanseri, klinikte kullanılan kemoterapötik ajanlara direncin gözlendiği, uygulanan tipik tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı oldukça agresif bir kanser türüdür. Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar, doğal ürünlerin pankreas kanserini de içeren bazı insan tümörlerine karşı korunmada yararlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, son yıllarda yapılan çalışmalarda doğal kaynaklardan yeni antikanser ajanların elde edilmesi önemli bir odak noktasıdır. Bu çalışma ile çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkisi gösterilmiş doğal bir bileşen olan juglonun, BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattında, sitotoksik etkisinin belirlenmesi, pankreas kanseri hastalarında yüksek seviyede ifade edilen, invazyon ve metastaz ile doğrudan ilişkili olduğu saptanan matriks metalloproteinazları kodlayan MMP-2, MMP-9 ve kanser anjiyogenezi ile ilişkili olduğu düşünülen Phactr-1 genlerinin ifade düzeylerinin değerlendirilmesiyle invazyon ve anjiyogenez üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Juglonun hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenmiş ve 24 saat için IC_{50} değeri 21,05 μM olarak bulunmuştur. Yapılan hücre adezyon ve invazyon analizleri ile BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerine 5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında 24 saat süresince juglon uygulamasının, hücrelerin adezyon ve invazyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla doza bağlı şekilde azalttığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulamasında MMP-2 gen ifadesinin sırasıyla 1,09; 1,85 ve 2,81 kat, MMP-9 gen ifadesinin ise sırasıyla 1,28; 1,43 ve 1,57 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Phactr-1 geninde anlamlı azalma ise 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması ardından görülmüştür ($p<0,05$). Bu çalışma ile, juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde invazyon ve metastazı inhibe ettiği ilk kez gösterilmiş olup, pankreas kanserinde etkili bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: BxPC-3; İnvazyon; Juglon; Metastaz; Pankreas Kanseri

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Cytotoxicity Assessment of Juglone in Human Pancreatic Cancer BxPC-3 Cells and Investigation of Its Effects on Invasion and Angiogenesis

Ebru AVCI

Department of Medical Biology

MASTER THESIS/KONYA-2015

Pancreatic cancer is a very aggressive cancer type which a resistance to clinically used chemotherapeutic agents is observed and typical treatment methods are inadequate. The results of epidemiological and experimental studies have showed that natural products are beneficial for the protection against certain human malignancies including pancreatic cancer. For this reason, recent studies have focused on discovering novel anticancer agents from natural sources. In this study, it is aimed to determine the cytotoxic effect of juglone, a natural component shown to have cytotoxic and apoptotic effects in several cancer cell line, in the BxPC-3 pancreatic cancer cell lines, and also to investigate its effect on invasion and angiogenesis through evaluating the expression levels of MMP-2 and MMP-9 genes, which are determined directly related with invasion and metastasis, and Phactr-1 gene thought to be associated with cancer angiogenesis. The effect of juglone on cell viability was determined by MTT test and the IC_{50} value of juglone in BxPC-3 cell line was found as 21.05 μM for 24 hour. It is observed that 5, 10, 15 and 20 μM juglone treatment to BxPC-3 cell line among for 24 hour, adhesion and invasion features of the cells are reduced dose-dependently compared to the control group. As a result of qPCR analysis, expression of MMP-2 gene reduced 1.09, 1.85 and 2.81 folds while expression of MMP-9 gene reduced 1.28, 1.43 and 1.57 folds ($p < 0.05$) respectively, in 10, 15 and 20 μM juglone treatment. On the other hand, a significant decrease in the expression of Phactr-1 gen was observed after 15 μM and 20 μM juglone treatments. By this study, it has been shown for the first time that juglone inhibits cell invasion and metastasis in BxPc-3 pancreatic cancer line and can be evaluated as an effective anticancer agent in pancreatic cancer.

Key Words: BxPC-3; Invasion; Juglone; Metastasis; Pancreatic cancer

1.GİRİŞ

1.1. Pankreas

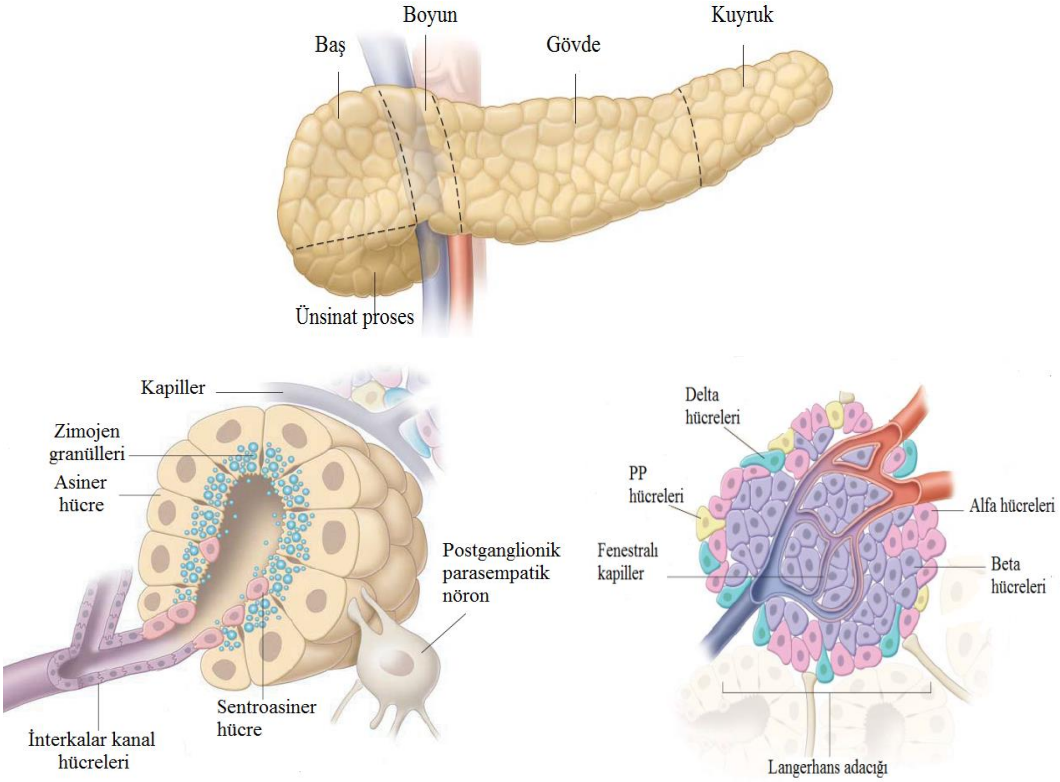
Pankreas; karnın üst kısmında, duedonum ile dalak arasında transvers olarak yer alan retroperitoneal bir organ olup, 14-20 cm uzunluğunda, 70-150 gr ağırlığındadır (Menteş 1975, Slack 1995). Baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 bölümden meydana gelen pankreasın baş kısmı duedonumun yaptığı yay içine yerleşim gösterirken, gövdesi ve kuyruğu aorta, superior mezenterik damarlar, sol böbrek ve börek üstü bezi ile komşudur, kuyruk kısmı dalak hilusunda sonlanmaktadır (Menteş 1975).

Dallanmış pankreas kanallarının etrafına dizili halde bulunan lobüler yapılardan meydana gelen, önemli sindirim enzimleri ve hormonların sentezlendiği, depolandığı ve salgılandığı bir organ olan pankreas, karbonhidrat, protein ve yağların sindirimi için gerekli günlük yaklaşık 1200 ml pankreatik sıvı salgılayan ekzokrin kısım ve karbonhidrat metabolizmasını kontrol eden hormonları salgılayan endokrin kısım olmak üzere işlevsel olarak iki yapıya ayrılır. Pankreasın %98-99'unu oluşturan ekzokrin kısmı asiner ve kanal hücrelerinden meydana gelirken, %1-2'sini oluşturan endokrin kısmı Langerhans adacık hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 1.1) (Rovasio 2010).

Proteazlar, amilazlar, lipazlar ve nükleazlar olmak üzere en az 22 sindirim enziminin üretimden sorumlu olan asiner hücreler, dallanmış kanal sisteminin uçlarında üzüm salkımı şeklinde kümeleşerek ekzokrin pankreasın enzim salgılayan ünitesi olan asinileri meydana getirirler. Burada çoğu enzim aktif olmayan öncüller şeklinde sentezlenirken duodenuma girdikten sonra aktif hale gelir. Ekzokrin pankreasın kanal hücreleri ise aktif protein sentezi ve salgılanmasında rol oynamazken esas olarak su ve elektrolit salınımından sorumludur (Şimşek 1993, Slack 1995).

Pankreasın endokrin hücreleri, ekzokrin dokuya sıkı bir şekilde gömülü halde bulunan Langerhans adacıkları şeklinde gruplanmıştır. Alfa (α), Beta (β), Delta (δ) ve Pankreatik polipeptit (PP) hücreleri olmak üzere başlıca 4 tip endokrin hücresi vardır. α hücreleri glukagon salgılarken, Langerhans adacığı hücrelerinin %80'ini

oluşturan β hücreleri insülin ve amilin, δ hücreleri somatostatin ve PP hücreleri ise pankreatik polipeptit salgılamaktadır (Slack 1995).



Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı ve pankreatik hücreler (Windsor 2012).

1.2. Pankreas Kanseri

Pankreas tümörleri endokrin ve ekzokrin hücrelerden gelişebilir, ancak ekzokrin hücrelerden gelişme oranı daha yüksektir. Ekzokrin tümörlerin büyük bir çoğunluğu, duktal epitel hücrelerden köken alan adenokarsinomlardır. Endokrin pankreas tümörleri ise yaygın olarak adacık hücre tümörleri ya da nöroendokrin tümör olarak adlandırılırken daha az yaygın olarak gastrinomalar, insülinomalar, glukagonomalar, somatostatinomalar, VIPoma'lar, PPoma'lar vb. şeklinde sınıflandırılabilir (Singh ve ark 2015).

Ekzokrin parankimden gelişen duktal adenokarsinom, malign pankreatik neoplazilerin %90'dan fazlasını; adacık hücrelerinden kaynaklananlar ise %5-10'unu oluşturmaktadır (Braunwald ve ark 2004). Pankreas kanserlerinin %57'si pankreas başında, %9'u gövdesinde, %8'i kuyruk kısmında, %6'sı birden fazla yerde meydana gelmekte; %20'sinin ise anatomik yeri saptanamamaktadır (Alberts ve Grothey 2004).

Pankreas kanseri gelişiminde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN) ve müsinöz kistik neoplaziler (MCN) olmak üzere 3 öncü lezyon rol oynamaktadır (Hruban ve ark 2004).

PanIN'ler, küçük pankreatik kanallarda yerleşim gösteren, çapları 5 mm'den küçük, makroskobik olarak ayırt edilemeyen mikroskobik lezyonlardır. Bu özellikleri ile çapı 1 cm'den daha büyük olan IPMN'lerden ayrılırlar (Hruban ve ark 2004). Görülme sıklığı yaş ile artmakla birlikte yaklaşık %20'dir (Kozuka ve ark 1979). Epitelyal atipiye göre; PanIN-1A/B, PanIN-2 ve PanIN-3 olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar. Minimal atipi gösteren PanIN-1 lezyonları, PanIN-1A (düz tip) ve PanIN-1B (papiller tip) olarak ikiye ayrılır. PanIN-2 lezyonlarında yalancı çok katlı epitelyum oluşumu, çekirdek hiperkromazisi ile birlikte orta dereceli displazi ile uyumlu çekirdek kutuplaşması kaybı başlamıştır. Önemli derecede sitolojik atipi gösteren PanIN-3 lezyonları ise, çekirdek kutuplaşmasının tamamen kaybı, çekirdek hiperkromazisi, belirgin çekirdekçik ve atipik mitotik şekiller ile karakterizedir (Wilde ve ark 2012).

PanIN lezyonlarındaki genetik anomaliler de lezyonlarda gözlenen bu histolojik ilerleyişi yansıtmaktadır. K-ras mutasyonu PanIN lezyonlarının gelişiminde önemli role sahiptir. PanIN-1 lezyonlarının %36'sında, PanIN-1B lezyonlarının %44'ünde, PanIN-2/-3 lezyonlarının %87'sinde K-ras mutasyonu tespit edilmiş, K-ras mutasyon artışının neoplazi gelişimi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Hruban ve ark 2000, Lohr ve ark 2005). CDK2NA/p16 aktivasyon kaybına neden mutasyonlar PanIN-2 lezyonlarında görülmeye başlarken, TP53, SMAD4/DPC4 ve BRCA2 aktivasyon kaybı genellikle daha ileri evre PanIN lezyonu olan PanIN-3 ile ilişkilendirilmektedir (Wilentz ve ark 2000, Hruban ve ark 2008).

IPMN'ler müsin üreten epitel hücrelerin papiller çoğalması sonucu aşırı müsin üretimi ve pankreatik kanalların kistik genişlemesi ile karakterize makroskobik lezyonlardır. Ekzokrin pankreatik neoplazilerin yaklaşık %3'ünü, kistik pankreatik neoplazilerin ise %20'sini oluştururlar (Kosmahl ve ark 2004). Çoğu IPMN hastaları sigara içicisidirler, bunun yanı sıra Peutz-Jeghers sendromu ve ailesel adenomatöz polipozis hastalarında bu lezyonların varlığı rapor edilmiş, ailesel pankreas kanseri hastalarında da yaygın olarak görülen neoplaziler oldukları gösterilmiştir (Fukushima ve Mukai 1999, Maire ve ark 2002). Pankreasın ana kanal

ya da yan kanallarından gelişen bu lezyonlar klinik olarak ana kanal tip IPMN (IPMN-MD) ve yan kanal tip IPMN (IPMN-BD) olmak üzere 2'ye ayrılırlar. IPMN-MD'lerin yaklaşık %60'ı yüksek derece displazi gösterir ve yaklaşık %45'i invaziv karsinom ile ilişkilendirilir (Salvia ve ark 2004). IPMN'ler, morfolojilerine ve müsin antikoru ile immünohistokimyasal boyamadaki farklılıklarına göre ise gastrik, intestinal, pankreatobiliyer ve onkositik tip olmak üzere 4 alt gruba ayrılırlar (Kloppel ve Kosmahl 2005). En sık görülen tip olan intestinal tip, genelde pankreasın baş kısmında, ampulla vateri civarında, pankreatik kanalın giriş yerinde görülmektedir. İntestinal tipe göre daha nadir olan pankreatobiliyer tip, yaygın olarak pankreas başı ana kanalında oluşur (Ban ve ark 2006). Çok az müsin ifadesi olan onkositik tip ana pankreatik kanalın büyük doku nodüllerini oluşturur (Adsay ve ark 1996). Gastrik tip ise IPMN-BD'ye karşılık gelir, genellikle pankreatik parankimin periferinde bulunur (Ban ve ark 2006). Düşük derecede displazi gösteren IPMN'lerin yaklaşık %50'sinde K-ras onkogenini aktive eden nokta mutasyonları görülürken, K-ras mutasyonu sıklığında displazi derecesine bağlı olarak artış gözlenmektedir (Schonleben ve ark 2008). CDK2NA/p16 ve TP53 aktivasyon kaybı yüksek derece displazi gösteren IPMN'lerde tespit edilmiştir (Abe ve ark 2007). PanIN-3 lezyonlarının yaklaşık %30'unda görülen SMAD4 ifade kaybı ise IPMN'lerin yaklaşık %3'ünde gözlenir (Iacobuzio-Donahue ve ark 2000).

MCN'ler müsin üreten, septasyonlu kist oluşturan, duktal sistem ile iletişimi bulunmayan ayırt edici bir overyan tip stromaya sahip epitelyal neoplaziler olarak tanımlanmaktadır. Genellikle pankreasın gövde ve kuyruk kısımlarında, tek, multiloküler veya uniloküler lezyonlar olarak gözlenen MCN'lerin büyüklükleri 2-35 cm arasında değişiklik gösterirken ortalama büyüklükleri 6-10 cm'dir (Fukushima ve Fukayama 2007). Musin, hemorajik sıvı veya nekrotik materyal içerebilen kalın bir fibrotik duvarları vardır (Campbell ve Azadeh 2008). Nadir olarak görülmekle birlikte kadın ve erkeklerde görülme oranı 20:1' dir. Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, musin üreten silindirik epitel ile sınırlanan kistin farklı derecelerde displazi gösterdiği ortaya konmuş, buna göre MCN'ler; düşük MCN, orta MCN ve ileri MCN olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır (Zamboni ve ark 1999). MCN lezyonlarında K-ras ve TP53 mutasyonları yaygın olarak gözlenmekte, genetik anormalliklerin görülme sıklığı displazi derecesine bağlı olarak artış göstermektedir

(Jimenez ve ark 1999). SMAD4 ifade kaybı ise invaziv karsinoma ile ilişkilendirilen MCN lezyonlarında gözlenmiştir (Iacobuzio-Donahue ve ark 2000).

1.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012 yılına ait raporuna göre, pankreas kanseri, dünya genelinde erkeklerde en yaygın görülen 12. kanser iken, kadınlarda 11. sırada yer almaktadır. Aynı yıla ait kansere bağlı ölümlerin nedeni olarak ise pankreas kanseri 7. sıradadır. 2012 yılına ait vakaların üçte biri Avrupa ülkelerinde meydana gelmiş, en yüksek insidans oranları orta ve doğu Avrupa, Kuzey Amerika, Arjantin ve Uruguay'da, en düşük insidans oranları ise Afrika ve Doğu Asya ülkelerinde gözlenmiştir (Hruban ve ark 2014). Pankreas kanserinin Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılında en yaygın görülen 10. kanser olduğu belirtilmiş, erkeklerde ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin 4. nedeni olarak gösterilmiştir (Siegel ve ark 2014). 2015 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 48960 yeni pankreas kanseri vakası beklenmekte, pankreas kanserine bağlı ölümlerin sayısının ise 40560'a ulaşacağı tahmin edilmektedir (American Cancer Society 2015). Ülkemizde ise, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan Sağlık İstatistikleri Yıllığına göre pankreas kanseri erkeklerde en sık görülen 8. kanser iken kadınlarda ilk 10'da yer almamıştır (Başara ve ark 2014).

Pankreas kanseri oluşumunda pek çok faktörün etkili olabileceği belirtilmektedir. Risk faktörlerinin çoğu direkt olarak hastalığa sebep olmaz, ancak bu faktörlere maruz kalma düzeyi genellikle kanserin gelişmesini etkilemektedir. Tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle pankreas kanseri gelişiminde rol oynayabilecek kontrol edilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması, ailesinde pankreas kanseri öyküsü bulunan, yüksek risk taşıyan bireyler için özellikle önem taşımaktadır (Decker ve ark 2010).

Sigara kullanımının pankreas dokusundaki karsinojenik etkisi, tütün içerisinde bulunan karsinojen özellikte N-nitrozaminlerin ve metabolitlerinin duedonumdan pankreas kanalı içine geri akışı ile açıklanmaktadır (Harnack ve ark 1997). N-nitrozaminlerin oluşturduğu metabolitlerin DNA kırıkları oluşturarak K-ras mutasyonuna neden olduğu, ayrıca karsinogenezde rol oynayan siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (Hoffmann ve ark 1993). Pankreas

kanseri vakalarının yaklaşık %25'inin sigara kullanımına bağlı olduğu belirtilmektedir. Sigarayı bırakmış kişiler için risk, sigarayı bırakmanın ardından en az 10 yıl boyunca yüksek kalırken, daha uzun vadede (>10 yıl) aktif içicilere göre yaklaşık %30 azalır. Pasif içicilik ise pankreas kanseri için bir risk faktörü olarak gösterilmemektedir (Iodice ve ark 2008).

Alkol tüketimi ve pankreas kanseri gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya yönelik yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, alkol kullanımı ile pankreas kanseri riski arasında herhangi bir ilişkinin varlığı doğrulanmamıştır (Dusek ve ark 2010). Ancak, vücut kitle indeksi (VKİ) $\leq$25 kg/m^2 olan bir bireyde günlük $\geq$30 g dozunda alkol kullanımı durumunda kanser riskinde hafif bir artışın olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, alkol tüketimi, her ikisi de artmış pankreas kanseri riski ile ilişkilendirilen pankreatit ve tip II diyabet için risk faktörüdür (Zavoral ve ark 2011).

Yüksek oranda hayvansal protein ve yağ içeren besinlerle beslenmenin pankreas kanseri riskini 2,5 kat arttırdığı bildirilmiştir. Sebze ve meyve tüketimi, özellikle C vitamini olmak üzere vitamin ve liflerce zengin bir beslenmenin ise pankreas kanserinden koruyucu özelliği bulunmaktadır (Nkondjock ve ark 2005). Obezite ve pankreas kanseri arasındaki ilişki, obezitenin tip II diyabet ile bilinen ilişkisine dayandırılmaktadır. Yirmi bir çalışmanın meta analizi, vücut kitle indeksindeki 5 kg/m^2'lik bir artışın, pankreas kanseri riskinde %12'lik bir artışa sebep olduğunu ortaya koymuştur (Larsson ve ark 2007). 138503 postmenopozal dönemdeki kadın ile yapılan bir çalışmada, VKİ ile pankreas kanseri arasında bir ilişki bulunmazken, bel-kalça oranındaki artış ile pankreas kanseri riski arasında ilişki tespit edilmiş, bu durum insülin direnci ile santral obezite arasındaki ilişkiye dayandırılmıştır (Luo ve ark 2008).

Yaş, pankreas kanseri gelişiminde bir diğer risk faktörüdür. Yaşamın ilk 30-40 yılında pankreas kanserine yakalanma riski düşüktür. Hastaların büyük bir çoğunluğu 60-80 yaşlarındadır, ortalama tanı konma yaşı ise 72'dir (Anderson ve ark 2006). 20 yaşın altında tanı %0; 20-34 yaşlarında %0,4; 35-44 yaşlarında %2,4; 45-54 yaşlarında %9,6; 55-64 yaşlarında %18,9; 65-74 yaşlarında %26,6; 75-84 yaşlarında %29,5 ve 85+ yaşlarında %12,5'dir (Ries ve ark 2008).

Irksal farklılıklara bakıldığında ise, pankreas kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan Afro-Amerikanlarda, Kuzey Avrupa halkında, Yeni Zenlanda yerlileri ve Havai Polinezyalılarında en yüksek insidansa sahiptir. Amerika'da Afro-Amerikan popülasyonunda ölüm oranı Kafkas popülasyonuna göre 1,4 kat daha yüksektir (Silverman ve ark 2003).

Akut pankreatit, bir risk faktörü olarak düşünülmese de tropik ve herediter kronik pankreatitin pankreas kanserine yatkınlığı arttırdığı belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda pankreatit tanısının üzerinden geçen zamanla pankreas kanseri riskinin orantılı olduğu gösterilmiştir (Karlson ve ark 1997, Talamini ve ark 1999). 5 yıllık kronik pankreatit öyküsü olan hastaların ele alındığı bir çalışmada pankreas kanseri gelişmesi açısından insidans oranının 14,4 olduğu saptanmıştır (Ulubaşoğlu 2011). Herediter pankreatiti olan hastalarda ise yaşam boyu risk %40'lara kadar çıkmaktadır (Lowenfels ve ark 1997).

Tüm bu risk faktörlerinin yanı sıra, diyabet pankreas kanserinin hem erken bir bulgusu, hem de bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. 1975-1994 yıllarında yayımlanan çalışmaların meta analizi, uzun süreli diyabet hastalarında pankreas kanserinin artan bir sıklıkla meydana geldiğini ortaya koymuştur (Everhart 1995). Başka bir çalışmada da anormal glukoz metabolizmasının pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Johansen ve ark 2010). Bununla birlikte insülin direnci ve sekonder hiperinsülinizmin pankreatik karsinogenezde rol oynadığı düşünülmektedir (Hagop ve ark 2011).

Bugüne kadar yayınlanmış çalışmalar, şaşırtıcı şekilde özellikle solunum yolları alerjisi olmak üzere alerji görülen bireylerde pankreas kanseri riskinde bir azalma olduğunu göstermiştir (Gandini ve ark 2005, Eppel ve ark 2007). Tümörü çıkartılmış alerjik hastalar, alerjisi olmayan hastalara göre daha uzun süre hayatta kalmaktadır. Bu azalmış risk genellikle saman nezlesi, polen ve çime alerji gibi alerjinin solunum formları ile ilişkilendirilmektedir. Hastalarda alerjinin olası koruyucu etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte alerjik bireylerin hiperaktif bağışıklık sisteminin bir şekilde pankreas kanseri gelişimine karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (Olson ve ark 2010).

Pankreas kanseri gelişiminde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörler de önemli bir yere sahiptir.

Pankreas kanserlerinin %3-10'u ailesel pankreas kanseri olarak sınıflandırılır. Aile içerisinde etkilenen bireylerin sayısına bağlı olarak risk 4,46-32 kat artmaktadır (Lynch ve ark 1989). Ailesel pankreas kanseri hastalarınında sıklıkla tanımlanan mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarıdır. BRCA1 mutasyonu varlığı pankreas kanseri riskini 2,26 kat arttırırken, BRCA2 mutasyonu varlığında risk 3,5-8 kat artmaktadır (Ferrone ve ark 2009).

Bazı kalıtsal hastalıklar ve sendromlarda da pankreas kanseri riskinde artış görülür. Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser, pankreas kanseri insidansının gözlendiği, otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Bu hastalık MSH2, MLH1, MSH6 ve PMS2, DNA tamir genlerindeki (MMR) mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Pankreas kanseri, MMR geni mutasyon taşıyıcılarında mutasyon taşımayanlara göre yaklaşık yedi kat daha sık gözlenmektedir (Yamamoto ve ark 2001). CFTR gen mutasyonlarının sebep olduğu, otozomal resesif bir hastalık olan kistik fibrozisde de viskoz mukus üretimi pankreas kanalının tıkanmasına yol açarak inflamasyon riskini arttırır. Bu da kistik fiborizis hastalarında kronik pankreatit ve pankreas tümörü oluşumu riskini yükseltmektedir (Neglia ve ark 1995).

Peutz-Jeghers sendromu, otozomal dominant olarak kalıtılır, gastrointestinal kanalda hemartömatöz polipler, dudaklarda ve mukozalarda melanotik maküller ile karakterizedir. Bu hastaların neredeyse yarısı tümör baskılayıcı işlevi olan nükleer serin/tirozin kinazı kodlayan STK11/LKB1 geninde mutasyon taşımaktadır. Etkilenmiş bireylerde pankreas kanseri gelişim riski ise %36'dır (Latchford ve ark 2006). Bu hastalıkların yanı sıra pankreas kanseri, Li fraumeni sendromu, ataksitelanjiyektazi sendromu, multipl endokrin neoplazi tip I sendromu, Von Hippel-Lindau sendromu gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (Lowenfels ve Maisonneuve 2004).

1.2.2. Pankreas Kanseri ve Genetik

Pankreas kanseri gelişiminde, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar başta olmak üzere, kromozom ya da gen kopya sayısı

değişiklikleri, mikrosatellit kararsızlığı, epigenetik gen sessizleştirme gibi çok kapsamlı genetik değişiklikler rol oynamaktadır (Hansel ve ark 2003).

Kromozomal Değişiklikler

Primer pankreas kanserlerinde genomik kayıplar yaygın olarak 9p, 17p, 18q, 3p, 8p ve 6q'da meydana gelmektedir. Bu lokuslardan bazıları CDKN2A/P16/MTS1 (9p21), TP53 (17p13), ve MADH4/SMAD4/DPC4 (18q) gibi tümör baskılayıcı genleri içermektedir (Mahlamaki ve ark 1997). Sırasıyla AKT2, K-ras2, MDM2, ERBB2 ve AIB1 onkogenlerinin bulunduğu bölgelere karşılık gelen 19q, 12p, 12q, 17q ve 20q kromozom kollarında ise çoğalmış bölgeler saptanmıştır (Schleger ve ark 2000).

Onkogenler

Tüm insan kanserlerinde %20 oranında saptanan K-ras gen mutasyonu %95'lik oranla pankreas kanserinde en sık saptanan mutasyondur. K-ras hücre çoğalması, hücre farklılılaşması, hücre gelişimi gibi bir seri önemli hücresel süreç ile yakından ilişkilidir. 12p3'te yerleşim gösteren K-ras geninde meydana gelen mutasyon, genellikle 12. kodonda nadir olarak da 13 ve 61. kodonda meydana gelen nokta mutasyonudur (Caldas ve ark 1995). K-ras mutasyonu, güçlü çoğalma özelliğene sahip, duktal prekanseröz lezyon oluşumunu uyarır (Tada ve ark 1996).

K-ras geninde meydana gelen mutasyon birçok sinyal yolağını aktive edebilir. Bu sinyal yolakları mutasyona uğramış K-ras ile uyarılarak kanser gelişiminde rol oynayabilecekleri gibi, bunlarda meydana gelen mutasyonlar da kanser gelişiminde etkili olabilir. AKT onkogeninin hücre zarındaki yerleşimi yoluyla aktivasyonunun düzenlenmesine dayanan önemli bir sinyal yolağı olan PTEN/PI3K/AKT yolağı da bunlardan biridir (Carnero ve ark 2008). Bu yolakta, PI3K, hücre çoğalması, apoptoz, transkripsiyon ve hücre göçü dahil olmak üzere önemli hücresel süreçleri tetikleyen, serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesi olan AKT'nin hücre zarına çekilmesine sebep olurken, bir fosfataz olan PTEN PI3K'a karşı hareket eder, AKT'nin hücre zarındaki yerleşimini bozarak etkinliğini azaltır. Çoğu kanserde PI3K'lar ile AKT'nin ifadesi yüksek iken, PTEN genellikle mutasyona uğrayarak aktivitesini kaybetmiş ya da tamamen silinmiştir. Pankreatik karsinomların yaklaşık %10'unda da apoptozu engelleyen ve anjiyogenezi uyaran AKT'de artış

gözlenmektedir (Cheng ve ark 1999). K-ras mutasyonunun, anjiogenez, hücre çoğalması, apoptoz, hücre göçü ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan MEK ve ERK1/2'yi de aktive etmesinin yanı sıra, solid tümörlerde anjiyogenezi uyaran vasküler endotelyal büyüme faktöründe (VEGF) de artışa sebep olabileceği gösterilmiş, bu nedenle bu mutasyonun sadece hücre çoğalması değil dolaylı olarak anjiyogenezde de rol oynadığı belirtilmiştir (Rak ve ark 1995, McCubrey ve ark 2007). JAK/STAT sinyal yolağında yer alan, hücrenin kendini yenilemesi, hücre yaşamı, metastaz ve hücre apoptozunda etkili STAT3 transkripsiyon faktörünün de pankreas kanseri anjiyogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (Huang ve ark 2011).

Pankreas kanserinde büyüme hormonları ve onların reseptörlerini kodlayan bazı genlerin ifade seviyeleri artmaktadır. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) seviyelerindeki artış azalan yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), IGF-1 reseptörü, sinir büyüme faktörü (NGF) genlerindeki ifade artışı ise artan tümörijenite ile ilişkilidir (Korc 1998, Shi ve ark 2001).

Tümör Bakılayıcı Genler

Pankreas kanserinde en sık mutasyonun gözlendiği tümör baskılayıcı genler TP53, SMAD4/DPC4 ve CDKN2A/p16'dır (Hong ve ark 2011).

Kromozom 17p'de yerleşim gösteren TP53 geni tarafından kodlanan p53 proteini, hücre döngüsünün G2-M'de durdurulması, G1-S kontrol noktasının düzenlenmesi, apoptozun indüklenmesi ve DNA tamiri gibi mekanizmalarda rol oynamaktadır. TP53 geninde meydana gelen mutasyon sonucu p53 proteininde işlev kaybının olması, DNA hasarının meydana gelmesi durumunda hücrenin hayatta kalmasına ve bölünmenin devam etmesine sebep olur, bu da kanser gelişimine neden olabilecek genetik anomalilerin hücre içinde birikmesine yol açar (Vogelstein ve Kinzler 2004). Pankreas kanserlerinin %75'inde, TP53 geninde mutasyon mevcuttur (Scarpa ve ark 1993, Moore ve ark 2001).

Pankreas kanserlerinin %55'inde, kromozom 18q'da yerleşik SMAD4 geni aktivasyonunu kaybetmiştir (Hahn ve ark 1996, Iacobuzio-Donahue ve ark 2004). SMAD4 (DPC4) proteini, hücre döngüsünün durdurulması ve hücre göçünde önemli

genlerin transkripsiyonunda görevli TGF-β sinyalinin anahtar düzenleyicisi olarak görev yapar. SMAD4 geninde meydana gelen mutasyonlar, SMAD4 proteininde işlev kaybına neden olarak kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca SMAD4 mutasyonu pankreas kanserinde metastaz gelişimi ile de ilişkilendirilmektedir (Schutte ve ark 1996).

CDKN2A hücre döngüsünün negatif kontrolünde rol oynayan anahtar faktörlerden biridir. CDKN2A'nın iki promotor bölgesi bulunur, alternatif kesip-ekleme sonucunda siklin bağımlı kinaz inhibitörü p16INK4a (p16) ve p53 aktivatörü p14ARF olmak üzere iki alternatif protein ürünü meydana gelir. Hücre döngüsünün negatif kontrolünde her iki protein de aktif iken, pankreatik tümörlerde nokta mutasyonları, delesyonlar ve hipermetilasyona bağlı olarak G1 kontrol noktasında hücre döngüsünün ilerlemesinde rol oynayan anahtar molekülleri engelleyen p16INK4a işlevini kaybetmiştir (Rozenblum ve ark 1997). p16 aktivasyon kaybı pankreatik karsinogenezin erken aşamasında gözlenir ve p16'nın düşük seviyedeki ifadesi erken metastaz, tümör büyüklüğü ve sağkalım oranı ile ilişkilidir (Sasaki ve ark 2003). Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %95'inde CDKN2A geninde mutasyon ve delesyonlar sonucunda p16 miktarında azalma vardır (Delpu ve ark 2011).

Diğer Genetik Değişiklikler

Pankreas kanserinde, MLH1, MSH2 gibi DNA tamir mekanizmalarında görevli olan genlerde aktivasyon kaybı sonucu, DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmasında (MMR) meydana gelen bozukluklar mikrosatellit kararsızlığa neden olmakta, bu durum pankreas kanseri hastalarının %10' undan daha azında görülmektedir (Sakorafas ve Smyrniotis 2012).

Pankreas kanserlerinin yaklaşık %60'ında birden fazla gen, promotor bölgelerinde bulunan sitozinlerin hipermetilasyonu ile sessizleşmiştir. Pankreas kanserinde epigenetik mekanizmalar ile sessizleştirilen genler; ppENK (%90), RARB (%20), CDKN2A/P16 (%18), CACNA1G (%16), TIMP3 (%11), CDH1 (%7), THBBS1 (%7) ve hMLH1 (%4) olarak rapor edilmiştir (Ueki ve ark 20020).

1.2.3. Pankreas Kanseri Belirtileri

Pankreas kanserinde belirtiler genellikle tümörün safra kanalı, mezenterik ve çölyak sinirler, pankreas kanalı ve duedonum gibi yapılara baskı uyguladığı ileri evrelerde ortaya çıkmaktadır (Evans ve ark 1997). Semptomlar tümörün pankreastaki yerleşimine bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Genel olarak pankreas kanseri belirtileri; üst karın ağrısı, sarılık, iştah kaybı, bulantı ve kusma, ani ortaya çıkan diyabet, hazımsızlık, steatore (yağlı dışkı) ve idiyopatik pankreatit'dir (Perek 2002).

Pankreas başında yerleşim gösteren çok küçük bir tümör için ağrısız sarılık tek işaret olabilir. Bunun yanı sıra çoğu hastada, tıkanma sarılığı gelişiminin takip ettiği karın ve sırt ağrısı şikayeti söz konusudur. Diğer belirtiler olarak diyabetes mellitus gelişimi ya da malabsorbsiyon (emilim bozukluğu) sayılabilir. Daha az yaygın şekilde ciddi derecede pankreas kanalı tıkanıklığı durumunda pankreatit de gözlenmektedir (Lin ve ark 1990). Pankreasın kuyruk ve gövde bölümünde yerleşim gösteren tümörlerin varlığında ise, hastaların %60'ında sırt ağrısı ile beraber belirgin bir kilo kaybı mevcuttur (Pai ve Spalding 2015). Sarılığın pankreas başı yerleşimli tümörlerde, daha sık görüldüğü doğru olsa da gövde ve kuyruk yerleşimli tümörlerde de görülebileceğini unutmamak gerekir. Yine aynı şekilde, ağrı gövde ve kuyruk yerleşimli tümörlerde daha sık görülse de pankreas kanserinin en yaygın belirtisidir (Mentes 1975).

1.2.4. Pankreas Kanserinin Tanısı

Pankreas kanseri tanısında tümör belirteçleri ve çeşitli görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Tümör Belirteçleri

Pankreas kanseri tanısında karsinoembriyonik antijen (CA) 19-9 başta olmak üzere çeşitli CA glikoproteinleri ile karsinoembriyonik antijen ilişkili hücre yapışma (adezyon) molekülü 1 (CEACAM1) ve serum makrofaj inhibitör sitokin 1 (MIC-1) gibi aşırı ifade edilen genlerin protein ürünleri moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır.

Siyalilatlı Lewis (a) antijeni olarak da bilinen CA 19-9 pankreas kanseri tanısında en yaygın kullanılan tümör belirtecidir. Başta normal pankreas ve biliyer

sistem hücreleri olmak üzere çeşitli dokular tarafından salgılanır ve pankreatit, siroz, kolanjit gibi hastalıklarda serumdaki miktarı yükselir. Pankreas kanseri için duyarlılığı %80, özgünlüğü %73'dür (Valls ve ark 2002). Popülasyonun %5-10'unda üretilemediğinden bir tarama testi olarak önerilmemektedir (DiMagno ve ark 1999). Ancak CA19-9 seviyesi cerrahi operasyon sonrasında takipte ve kemoterapiye cevabın değerlendirilmesinde kullanılabilir. CA 72-4, CA 50 ve CA 242 gibi diğer CA glikoproteinleri de tümör belirteci olarak kullanılsa da bugüne kadar CA19-9'dan daha ayırt edici oldukları tespit edilmemiştir (Göral 2014).

Tümör belirteçlerinin yanı sıra kan testleri de pankreas tanısında yardımcı olabilir. Tıkanma sarılığı durumunda serum bilirubin (konjuge ve total), alkalin fosfataz ve γ-glutamiltransferaz miktarlarında önemli bir artış görülür. Serum aspartat aminotransferaz (AST) ve serum alanin aminotransferaz (ALT) miktarlarında da genellikle daha az miktarda artış gözlenebilir. Tümörün karaciğere metastaz yapması durumunda da serum alkalin fosfataz ve transaminaz seviyelerinde nispeten küçük artışlar görülebilir (Bond-Smith ve ark 2012).

Görüntüleme Yöntemleri

Pankreas kanseri için şüpheli vakalarda ilk olarak başvurulan görüntüleme yöntemleri ultrasonografi (USG) ve bilgisayarlı tomografı (BT)'dir. Bunların yanı sıra magnetik rezonans görüntüleme teknikleri (MR), pozitron emisyon tomografisi (PET), endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP) gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

Pankreası net bir şekilde göstermesinden dolayı en sık kullanılan tanı yöntemlerinden biri BT'dir. Üç cm'den büyük lezyonların tespit edilmesinde tek güvenilir yöntem olabileceğine dair raporlar vardır (Valls ve ark 2002). Ayrıca BT ile karaciğer metastazları, vasküler invazyon, lenf nodu metastazları da değerlendirilirken tümörün cerrahi işleme uygun olup olmadığı da tespit edilmektedir (Moossa ve Gamagami 1995).

Bir diğer görüntüleme çeşidi olan abdominal ultrason, pankreas görüntülemesinde BT kadar etkin değildir ve 3 cm'den küçük tümörler sıklıkla kaçırılır. İleri pankreas kanserinde görülen karaciğer metastazı ve assit (karında sıvı toplanması) ultrason ile görüntülenebilir (Shrikhande ve ark 2008).

Endoskopik Ultrasonografi (EUS) ise BT' ye göre özellikle 3 cm'den küçük tümörler için daha yüksek bir hassasiyete sahiptir ve özellikle portal ve mezenter vene invazyonun tespit edilmesi, pankreas çevresindeki lenf ganglionlarının değerlendirilmesi ve cerrahi operasyona karar verilmesinde önemli olan bir diğer görüntüleme yöntemidir (Legman ve ark 1998). Tanısal belirsizliği bulunan lezyonların sitolojik değerlendirilmesi için yapılacak ince iğne aspirasyon biyopsisi (FNA) için de yol gösterici olarak kullanılmaktadır. EUS rehberliğinde yapılan ince iğne aspirasyon biyopsisinin duyarlılığı ise %85-90'dır (Bond-Smith ve ark 2012).

MR yöntemi ise pankreasın yüksek çözünürlükte görüntülenmesine imkan sağlar. Küçük lezyonların tesbit edilmesi ve çıkartılabilirliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. EUS, BT ve MR'nin tanısal etkinliklerini karşılaştıran, pankreas kanseri şüphesi bulunan hastalar ile yapılan bir çalışmada, bu görüntüleme yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %94, %69 ve %83 olarak belirlenmiştir (Müller ve ark 1994)

PET yöntemi primer tümörlerin tespiti ve metastazik hastalıkların varlığını ortaya koymak için kullanılır. BT ile birlikte kullanıldığında (PET-BT) pankreas kanseri ve ekstra hepatik metastazların tespit edilmesinde konvensiyonel görüntüleme yöntemlerine göre daha duyarlıdır (Bond-Smith ve ark 2012).

Pankreas kanalını tıkayabilen, ancak BT ile ayırt edilemeyen tümörlerin tanısında ERCP yöntemi kullanılabilir. Bu bölge direkt olarak görüntülenebileceği gibi biyopsi alınmasında da kullanılabilir (Moossa ve Gamagami 1995).

1.2.5. Pankreas Kanserinin Evrelendirilmesi

Pankreas kanserlerinin evrelendirilmesinde, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) evrelendirilme sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde tümörün yayılımı, nodal metastaz ve uzak metastazların tanımlanması için Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemi kullanılır (Çizelge 1.1) (AJCC 2010).

Çizelge 1.1. Pankreas kanseri için TNM evreleme sistemi ve pankreas kanseri evreleri (AJCC 2010).

T	**Primer Tümör**
TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinom in situ

Çizelge 1.1 (Devam). Pankreas kanseri için TNM evreleme sistemi ve pankreas kanseri evreleri (AJCC 2010).

T1	Tümör pankreasa sınırlı, < 2 cm çapında
T2	Tümör pankreasa sınırlı, > 2 cm çapında
T3	Tümör pankreas dışına yayılmış, çölyak ve/veya superior mezenterik arter tutulumu yok
T4	Tümör çölyak ve/veya superior mezenterik arteri infiltre etmiş (rezekte edilemez)
N	**Bölgesel Lenf Nodları**
NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı var.
M	**Uzak Metastaz**
MX	Uzak metastaz değerlendirilemedi.
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
Evre	**TNM**
Evre I A	T1, N0, M0
Evre I B	T2, N0, M0
Evre II A	T3, N1, M0
Evre II B	T1-3, N1, M0
Evre III	T4, N0-1, M0
Evre IV	T1-4, N0-1, M1

Evre I ve II tümörler çıkartılabilirken, Evre III ve IV'de uzak metastaz ya da ana arteryal tutulumun varlığı nedeniyle tümör çıkartılamamaktadır. Pankreas kanseri hastalarının ortalama sağ kalım süreleri de evrelere göre değişiklik göstermektedir. Evre I ve II tümörlü hastalarda ortalama sağ kalım süresi 15-22 ay, Evre III tümörlü hastalarda 8-18 ay, Evre IV tümörlü hastalarda ise 4-8 aydır (Lowery ve Q'Reilly 2012).

1.2.6. Pankreas Kanseri Tedavisi

Pankreas kanseri tedavi seçenekleri; cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi olup, malignite aşamalarına bağlı olarak bu yöntemler tek başlarına ya da birlikte kullanılmaktadır.

Cerrahi operasyon, pankreas kanserinde kullanılan en temel tedavi yöntemidir. Cerrahi operasyonun amacı, lenf nodu metastazı olsa bile mikroskobik rezeksiyon sınırı bulunmadan makroskobik tümörün tamamen tezmizlendiği R0 rezeksiyon (kesip çıkarma) yapmaktır, pozitif mikroskobik sınır kalacak şekilde

makroskobik tümörün temizlendiği durum R1, makroskobik tümör rezeksiyonunun tamamlanmadığı durum ise R2 olarak belirtilir (Alexakis ve ark 2004). İlk başarılı cerrahi operasyon 1935 yılında pankreasın tümör taşıyan bölgesi ile mide, duedonum, safra kesesi ve safra kanalının bir bölümünün uzaklaştırıldığı, sindirim meaknizmasını destekleyici kısımların ise bırakıldığı Whipple yöntemi ile gerçekleştirilmiştir, günümüzde bu pankreatoduodenektomi yöntemi standart cerrahi operasyon yöntemi olarak uygulanmaktadır (Wagner ve ark 2004, Loos ve ark 2008). Çoğu pankreas tümörü, pankres başında ortaya çıkmakta, ve bu tümörlerin rezeksiyonu Kausch-Whipple kısmi pankreatoduodenektomi ya da pilor koruyucu pankreatoduodenektomi uygulaması ile gerçekleştirilmektedir (Tewari ve Lobo 2013). Kuyruk ve gövde bölümünde lokalize olan tümörlere ise distal pankreatoduodenektomi uygulanmaktadır (Pai ve Spalding 2015). Pankreas kanseri tedavisinde cerrahi operasyon kabul edilebilir sonuçlar sağlasa da hastaların yaklaşık %80'inde kanser nüksetmekte ve 5 yıllık sağ kalım oranı ise %10-24 olabilmektedir (Arvold ve ark 2012).

Kemoterapi/radyoterapi uygulamaları adjuvan (cerrahi sonrası tedavi), neoadjuvan (cerrahi öncesi tedavi) ve palyatif olarak sınıflandırılır. Pankreas kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları gemsitabin, 5-fluourasil, kapesitabin, sisplatin ve oksaliplatindir (Mahalingam ve ark 2009). Bu ilaçların işlevi, reaktif bölgelerinin hücre DNA veya RNA'sındaki nükleotitlerle etkileşime girmelerini sağlayan çapraz bağlanma mekanizmasına dayanmaktadır. Bu şekilde hücre döngüsünün kesintiye uğraması kanser hücrelerinde apotoza neden olur (Barton-Burke 1999, Moniri ve ark 2014). Radyoterapi ise cerrahi operasyondan önce ve sonra, genellikle kemoterapi ile birlikte kullanılır, kanser cerrahi olarak tedavi edilmediğinde de kemoterapi/radyoterapi birlikteliği önerilmektedir. Radyasyon, vücudun dışındaki bir makineden (eksternal-ışın radyasyon tedavisi) veya vücudun içinde (internal radyasyon tedavisi) kanser hücrelerine yakın bir yere konan radyoaktif maddeden gelebilir. Radyoterapi ayrıca cerrahi operasyon sırasında (intraoperatif radyaysyon) da kullanılabilir (Pierantoni ve ark 2008).

Pankreas kanseri tedavi seçeneklerinin yetersizliği nedeniyle, mevcut tedaviler ile birlikte kullanılabilen antikanser ajanlar ile yeni terapötik stratejiler de geliştirilmiştir. Bu amaçla bevasizumab gibi VEGF inhibitörlerinin yanı sıra, erlotinib gibi EGFR inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu ajanların gemsitabin ile

birlikte kullanımının gemsitabinin tek başına kullanıldığı tedaviye göre istatistiksel olarak önemli yaşamsal yarar gösterdiği belirtilmiştir (Kindler ve ark 2007).

1.3. Juglon

Düzenli olarak sebze, meyve ve sert kabuklu yemiş tüketiminin özellikle mide, özofagus, akciğer, ağız boşluğu ve yutak kanseri, pankreas ve kolon kanserleri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinin ve iskemik kalp hastalıklarının insidansını azalttığı bilinmektedir (Reddy ve ark 2003, Mathew ve ark 2004). Bu gıdaların antioksidan ve kemopreventif özellikleri, özellikle askorbik asit (C vitamini), tokoferoller (E vitamini), β-karoten (provitamin A), antosiyaninler ve diğer polifenoller gibi doğal antioksidanları yüksek miktarda içermeleri ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, fenolik bileşenlerin insan sağlığına yararlı biyoaktif fitokimyasallar oldukları gösterilmiş, tohum, meyve ve sebzelerdeki antioksidan aktivite ile fenolik içerik arasında direkt bir ilişki rapor edilmiştir (Silva ve ark 2004, Giada ve Filho 2006). Bundan yola çıkarak yapılan hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında birçok fitokimyasalın antikanser etkisi gösterilmiş ve gösterilmeye devam etmektedir. Kimyasal yapıları nedeniyle biyolojik hedefler ile kovalent bağlar oluşturabilen ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında elektron transfer edici ajan olarak görev alan kinonlar da; kanser hücrelerinde toksisiteyi indükleyerek antikanser özellik göstermeleri nedeniyle bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılan geniş bir antitümör ailedir (Bolton ve ark 2000). Bu aile içerisinde yer alan, 1-4 naftakinon sınıfını oluşturan, K vitamini, plumbagin, lapakol ve juglon gibi naftakinon türevlerinin de önemli farmakolojik özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Grolig ve Wagner 2005).

Juglon; Juglandaceae (Cevizgiller) familyasına ait ağaçların (*J. nigra, J. regia, J. cinerea* vb.) köklerinde, yapraklarında, gövdesinde, meyvelerinde bulunan ve antifungal, antiviral, antibakteriyal aktivitelerinin yanı sıra; antikanser etkisi de çeşitli çalışmalarda saptanmış olan doğal bir naftakinondur (Babula ve ark 2009). Bhargava ve Westfall (1968) Swiss albino farelerine ceviz ekstratları uygulamasının, spontan meme adenokarsinomun büyümesini azalttığını göstermişlerdir. Benzer bir şekilde juglon uygulanmış Erlich asit hücrelerinin Swiss farelerine aktarımı; hücre döngüsünün metafazda durmasıyla eş zamanlı şekilde mitozda azalma gibi juglonun terapötik etkisini gösteren mitotik anormalliklere yol açmıştır (Okada ve ark 1967).

Başka bir çalışmada Sugie ve arkadaşları (1998), F344 ratlarına juglon uygulanmasının, azoksimetan ile uyarılan intestinal tümör oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. Ji ve arkadaşları da (2008), juglonun fare sarkom 180 tümöründe büyümeyi engellediğini, G2/M fazında hücre döngüsünü durdurduğunu ve apoptozu uyardığını belirtmişlerdir. Ayrıca juglonun; hücre döngüsü kontrolünde rol oynayan ve çoğu kanser türünde aşırı ifade edildiği belirlenen, kemoterapötik ilaçların hedefi Pin1'in (peptidil-prolil izomeraz) etkili bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (Fila ve ark 2008). Çeşitli kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda da juglonun etkili bir sitotoksik ajan olduğu, kanser hücrelerinde büyümeyi engellediği, reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini önemli ölçüde arttırarak hücrede redoks homeostazisinde değişikliğe sebep olduğu, böylelikle sitokrom c salınımı ile mitokondriyal zar potansiyeli kaybı oluşturarak doza bağlı şekilde apoptozu uyardığı ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadelerini etkilediği gösterilmiştir (Kamei ve ark 1998, Xu ve ark 2010, Ji ve ark 2011, Xu ve ark 2013).

1.4. Pankreas Kanseri Metastazı

Pankreas kanseri tedavisinde karşılaşılan en önemli problemlerden biri olan metastaz, pankreas kanseri hastalarının %90'dan fazlasının ölümünden sorumludur. Metastaz rastgele gelişen bir olay olmayıp tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılması, stromaya invazyon, lenf ve kan damarlarına intravazasyon, hedef organa ekstravazasyon, çoğalma ve anjiyogenezin uyarılması gibi birbirleriyle ilişkili bir dizi olaylar zinciri ile gerçekleşen çok aşamalı bir süreçtir (Chambers ve ark 2002).

Pankreas kanseri gelişimi sırasında tümör kitlesi er ya da geç komşu dokuları istila edecek ve uzak organlara yayılacak öncü metastatik hücreleri oluşturmaktadır (DiMagno ve ark 1999). Pankreas kanserinde hastaların %80'inden fazlasında tümör pankreas dışına doğru genişleyerek bölgesel lenf nodlarına metastaz yapmakta, uzak metastazın görüldüğü organların başında ise karaciğer gelmektedir. Bunu periton, akciğer ve plevra, kemik ve adrenal bezler takip etmekte, bununla birlikte beyin, diyafram, safra kesesi, kalp, ince ve kalın bağırsak, böbrek yumurtalık, perikard, seminal veziküller, deri, mide, dalak, testis, tiroid bezi, mesane ve uterus olmak üzere hemen hemen her organ alanında metastatik pankreas kanseri rapor edilmektedir (Kamisawa ve ark 1995, Evans ve ark 1997).

Kanser hücrelerinin, yerleşecekleri organları seçmelerindeki mekanizmalar tam olarak bilinmese de seçici organ metastazı yapma eğiliminde oldukları bilinmektedir. Bu durumu açıklayan birkaç teori öne sürülmüştür. Bu teorilerden biri olan "homing teorisine" göre, primer tümöre uzak organlar, çözülebilen kemotatik faktörlerin salınımı veya adezyon reseptörlerin ifade edilmesi aracılığıyla malign hücreleri kendilerine çekerler (Muller ve ark 2001). "Mekanik-anatomik metastaz teorisi" metastazların primer tümörle vasküler bağlantısı olan bölgelerde öncelikli olarak geliştiklerini ileri sürmektedir (Liotta ve ark 1987). Başka bir teori olan "tohum-toprak teorisine" göre ise kanser hücreleri, kendileri için yeterli miktar ve uygun tipte büyüme faktörleri içeren, özgün olarak etkileşim içerisinde olabilecekleri bazı özel organlara yerleşme eğilimi gösterirler (Fokas ve ark 2007).

Gelişen bir tümörün invaziv bir hal almaya başlaması, metastaz için ilk adımdır. Bu süreç kanser hücrelerinde epidermal-mezenşimal değişim (EMT) olarak isimlendirilmektedir. EMT, polarize epitel hücrelerinin çeşitli biyokimyasal değişikliklere uğrayarak sonuçta artmış hücre göçü ve invazivlik, apoptoza direnç gibi mezenşimal karakterler kazandığı biyolojik bir süreçtir (Kalluri ve Neilson 2003). EMT süreci, epitelyal hücre-hücre adezyon molekülü E-kaderin ifadesinde azalmanın olduğu, başta N-kaderin olmak üzere epitelyal olmayan kaderinlerde ifade artışı ve çekirdek beta katanin birikiminin yanı sıra, vimentin ve SMA gibi mezenşimal hücre iskeleti belirtiçlerinin kazanımı ile karakterizedir. Primer tümörlerin invaziv yüzünde yer alan, EMT geçirmiş tümör hücreleri metastazın daha sonraki adımlarına geçmektedir (Coghlin ve Murray 2010).

İnvazyonun ilk aşamaları kanser hücresinin primer tümörden ayrılması, matrikse, endotel hücrelerine ve subendotelyal bazal zara tutunmalarıdır. Bu süreçte çeşitli hücre adezyon molekülleri rol oynamaktadır (Chen ve ark 2012). Diğer bir aşama olan bazal zar ve hücre dışı matriks bileşenlerinin yıkımında ise matriks metalloproteazlar (MMP) başta olmak üzere çeşitli enzim grupları etkilidir (Coussens ve Werb 1996, Wang 2001).

1.4.1. Hücre Adezyon Molekülleri

Kanser hücrelerinin göçü ve invazyonunda, özellikle immünglobülin süper ailesi hücre-hücre adezyon molekülleri (CAM), kalsiyum bağımlı kaderin ailesi ve integrinler önemli rol oynamaktadır (Hanahan ve ark 2000).

Pankreas kanserlerinin büyük bir çoğunluğunda hücre içi partikülü olan β-katenin ile birlikte hücre-hücre bağlantılarının devamlılığını sağlayan, ayrıca transaktivasyonu önleyerek bazı genlerin ifadesini düzenleyen bir zar kateden proteini olan E-kaderinde işlev kaybı mevcuttur. Bu durum epitel hücrelerinin polaritesini ve diğer hücreler ile olan bağlantısını kaybederek hücresel harekete ve metastaz yapmaya yatkın hale gelmesine sebep olurken aynı zamanda sitoplazmada serbest β-katenin miktarında artışı takiben β-kateninin çekirdeğe geçerek LEF-1'e (lenfoid arttırıcı-bağlayıcı faktör 1) bağlanması ve MYC, CCND1, MMP7 ve TCF7 gibi tümör gelişiminde etkili olan hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmesi ile sonuçlanmaktadır (Orsulic ve ark 1997).

İnvaziv pankreas kanserlerinde immünglobülin süper ailesinde yer alan nöral hücre adezyon molekülünde (N-CAM) ifade kaybı gözlenirken, intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ifadelerinde artış gözlenmiştir. Burdan yola çıkarak ICAM-1 ve VCAM-1 ifade artışının, kanser hücrelerinin göçüne ve diğer organlara yayılmasına katkı sağlayarak pankreas kanseri patolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (Tempia-Caliera ve ark 2002).

İntegrinler, kanser hücrelerinin matrikse ve subendotelyal bazal zara tutunmalarında etkilidir. Kültür hücrelerinde integrin alt ünitelerinin ifadesinde görülen değişikliklerin invaziv veya metastatik büyümeyi uyardığı ya da engellediği gösterilmiştir (Desgrosellier ve Cheresh 2010). Epitelyal tümörlerde ifade artışı gözlenen integrinlerin başında ise vitronektin reseptörü olan $\alpha v\beta_3$ heterodimeri gelmektedir (Hsu ve ark 1998, Sloan ve ark 2006). Pankreas kanseri hücrelerinde de $\alpha v\beta_3$'nin artmış ifadesi bölgesel lenf nodlarına metastaz ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiş, $\alpha v\beta_3$'ün aşırı ifadesi olan hücrelerde hücre dışı matriksin yıkımında görev alan matriks metalloproteinazlardan MMP-2'nin aktivasyonunda da artış saptanmıştır (Hosotani ve ark 2002).

1.4.2. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

MMP'ler, kalsiyum bağımlı, çinko içeren, büyük bir nötral endopeptitaz ailesi olup, hücre dışı matriksin önemli bileşenleri olan kollajen, elastin, jelatin, matriks glikoproteinleri ve proteoglikanları yıkıma uğratarak, hücre dışı matriksin parçalanması ve yeniden yapılanmasında rol oynayan en önemli enzimlerdir (Nagase

ve ark 2006). Bağışıklık sistemi elemanlarının enfeksiyon alanına göçü, fetus tutunması, doku gelişimi ve farklılaşması, ovulasyon, anjiyogenez gibi pek çok mekanizmada rol oynayan MMP'ler, tümörlü dokularda ise proteinaz aktiviteleri ile, hücre dışı matriks elemanlarını, özellikle de epitelyal bazal lamina elemanlarını yıkarak invazyon engellerini ortadan kaldırırlar. Ayrıca hücre tutunmasını düzenleme yetenekleri ile hücrelerin hücre dışı matriks boyunca hareketi için, hücre-matriks ve hücre-hücre bağlantılarını da etkilerler (Leinonen ve ark 2006, Wang ve ark 2006).

Kanser dışında, artrit, inflamasyon, multipl skleroz, kronik akciğer hasarı, bronşiyal astım gibi hastalıklarda da rol oynadığı bilinen MMP'ler, aktif olmayan zimojenler olarak salınırlar ve proteolitik enzimler (serin proteazlar, furin, plazmin vs) tarafından aktif formlarına dönüştürülürler (Kontogiorgis ve ark 2005). Normal fizyolojik şartlar altında MMP'ler genellikle minimum düzeyde ifade edilirler, proteolitik aktiviteleri endojen MMP inhibitörleri (MMPI) ve MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından sıkı bir şekilde kontrol altındadır, bu şekilde hücrede homeostaz korunmuş olur. Patolojik şartlarda MMP'ler ile MMP inhibitörleri arasında kurulan bu denge MMP aktivitesi yönünde artış gösterir, bu durum da hücre dışı matriksin yıkılması ile sonuçlanır (Cheng ve ark 2000). İnsanlarda 26 çeşit olarak sentezlendiği bilinen MMP'ler, substrat sepesifikliklerine göre, kollajenazlar, jeletinazlar, stromelisinler, metaloelastazlar, membran tip MMP'ler (MT-MMP) ve diğer MMP'ler olarak sınıflandırılırlar (Çizelge 1.2) (Puente ve ark 2003).

Çizelge 1.2. MMP'lerin sınıflandırılması (Zitka ve ark 2010) (Düzenlenerek alınmıştır).

MMP	**Enzim**	**Lokus**	**Substrat**
MMP-1	Kollajenaz-1	11q22-q23	Kollajen (I,III,VIII,X) , jelatin, agrekan, L-selektin, IL-1, proteoglikan, entaktin
MMP-2	Jelatinaz A	16q12.2	Kollajen (I,IV,V,VII,X,XI, XIV), jelatin, elastin
MMP-3	Stromelisin-1	11q23	Kollajen (III, IV, V, IX), jelatin, agrekan, dekorin, perlekan, laminin, elastin, antaktin, plazminojen
MMP-7	Matrilisin-2	11q21-q22	Kollajen (IV,X), jelatin, agrekan, dekorin, fibronektin, laminin, entaktin, elastin, kazein, transferin, plazminojen

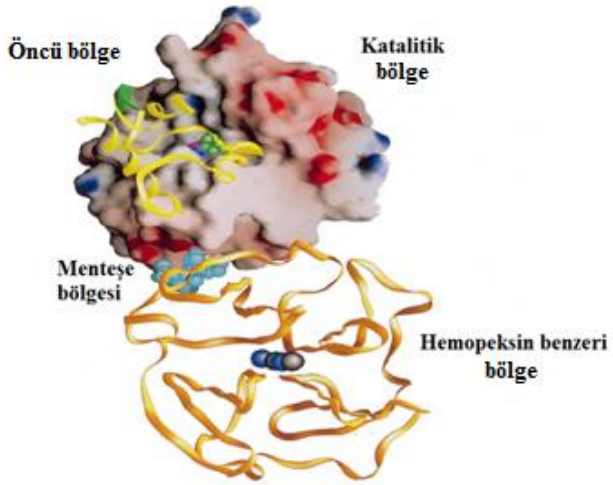
Çizelge 1.2 (Devam). MMP'lerin sınıflandırılması (Zitka ve ark 2010) (Düzenlenerek alınmıştır).

MMP-9	Jelatinaz B	20q13.12	Kollajen (IV,V,VII,X,XIV), jelatin, entaktin, agrekan, elastin,fibronektin, osteonektin, plazminojen
MMP-10	Stromelisin-2	11q22.3-q23	Kollajen (III-V), jelatin, kazein, agrekan, elastin
MMP-11	Stromelisin-3	22q11.2	Bilinmiyor
MMP-12	Makrofaj metaloelastaz	11q22.2-q22.3	Kollajen IV, jelatin, elastin, kazein, fibronektin, vitronektin, laminin, entaktin, fibrinojen, fibrin, plazminojen
MMP-13	Kollajenaz 3	11q22.3	Kollajen (I,II,III,IV,IX,X, XIV), jelatin, plazminojen, agrekan,perlekan,fibronektin, osteonektin
MMP-14	MT1-MMP	14q11-q12	Kollajen (I-III), jelatin, kazein,fibronektin,laminin, vitronektin,entaktin,proteoglikanlar
MMP-15	MT2-MMP	16q12.2-q21	Fibronektin, entaktin, laminin, perlekan
MMP-16	MT3-MMP	8q21	Kollajen III, jelatin, kazein, fibronektin
MMP-17	MT4-MMP	12q24	Bilinmiyor
MMP-18	Kollajenaz-4	Bilinmiyor	Kollajen (I,II,III,VIII,X), jelatini agrekan
MMP-19	RASI-1	12q14	Jelatin,agrekan, fibronektin
MMP-20	Enamelisin	Bilinmiyor	Amelogenin, agrekan
MMP-21*		1p36.3	Bilinmiyor
MMP-22*		1p36.3	Bilinmiyor
MMP-23*		Bilinmiyor	Bilinmiyor
MMP-24	MT5-MMP	20q11.2	Bilinmiyor
MMP-25	MT6-MMP	16p/3.3	Pro-jelatinaz A, fibrin, fibronektin, kollajen IV, jelatin
MMP-26	Matrilisin-2	Bilinmiyor	Jelatin 1α, fibrinojen, fibronektin, vitronektin
MMP-28	Epilisin	17q11.2	Kazein

*Fonksiyonları ve yapıları henüz tanımlanmamıştır.

MMP'ler yapısal olarak, N-terminal öncü bölge (pro-domain), katalitik bölge, menteşe bölgesi ve C-terminal hemopeksin benzeri bölge olmak üzere 4 temel bölge içerirler (Şekil 1.2). Yaklaşık 80 aminoasitten oluşan N-terminal pro-domaini, enzimin latent formda kalmasından sorumludur, enzim aktivasyonunu takiben

kaybolur. N-terminal propeptidinde bulunan en önemli işlevsel aminoasit olan sistein, katalitik bölgede bulunan Zn^{+2} iyonları ile etkileşim halinde bulunarak enzimin latent pro-MMP formunun devamlılığını sağlar (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003). MMP'lere proteolitik aktivite sağlayan ve 170 aminoasitten meydana gelen katalitik bölge, iki Zn^{+2} iyonu ve iki veya üç Ca^{+2} iyonu içerir. Aktif bölgede bulunan Zn^{+2} iyonları direkt olarak katalitik aktiviteye katılırken, Ca^{+2} iyonları domain yapısının kararlılığı için gereklidir (Zitka ve ark 2010). Prolince zengin olan menteşe bölgesi ise katalitik bölgenin C-terminal hemopeksin benzeri bölgeye bağlanmasını sağlar. MMP-7 ve MMP-26 dışında bütün MMP'lerde bulunan, yaklaşık 200 aminoasitten meydana gelen C-terminal hemopeksin benzeri bölge, substratlarla ek protein-protein etkileşimi sağlar ve endojen inhibitörlerinin bağlanma bölgelerini içerir (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003). Bu temel yapıya ek olarak, jelatinazların katalitik bölgelerinde, jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmalarını sağlayan 3 adet fibronektin tip II benzeri bölge bulunmaktadır (Overall 2002).



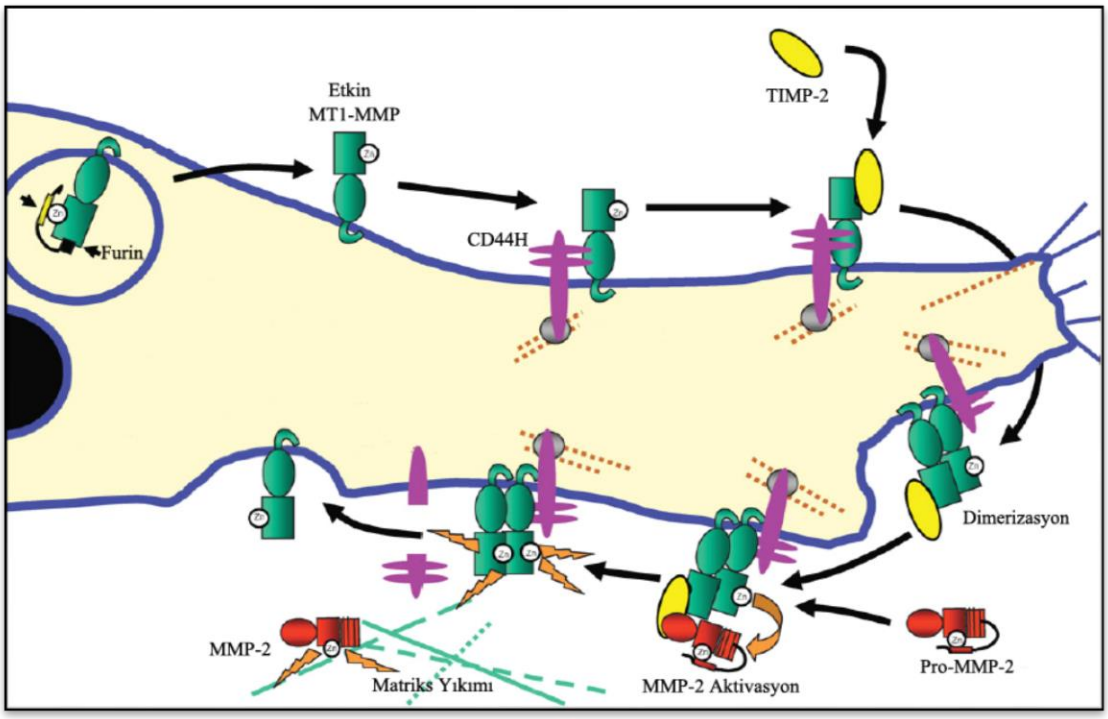
Şekil 1.2. MMP'lerin yapısı (Ansari ve ark 2013).

Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9)

MMP'lerin jelatinaz sınıfını MMP-2 ve MMP-9 (jelatinaz A ve Jelatinaz B) oluşturmaktadır. Kollajen IV, V, VII, X, XI ve XIV, jelatin, elastin, proteoglikan ve fibronektini parçalama özelliğine sahip jelatinazlar, bu özellikleri ile kanser invazyonunda oldukça etkilidir (Birkedal-Hansen ve ark 1993). Pankreas kanserinin lokal ve sistemik büyümesinde de MMP-2 ve MMP-9 etkin rol oynamakta, pankreas kanseri hastalarında serum ve dokuda MMP-9, pankreatik sıvıda ise aktif MMP-2

düzeyinin kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğu belirtilmektedir (Yokoyama ve ark 2002, Tian ve ark 2008).

MMP-2 fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreleri ve kondrositleri içeren çok çeşitli hücreler tarafından sentezlenmektedir (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003). Enzimi kodlayan gen 17 kilobaz (kb) büyüklüğünde olup 16q12.2'de lokalizedir, uzunlukları 110 ile 901 baz çifti (bç) arasında değişen 13 ekzon ve 175 ile 4350 bç arasında değişen 12 introndan meydana gelmiştir. Promotor bölgesinde ise bir adet TATA kutusu bulunmaktadır (Hajihoseini ve ark 2011). 72 kDA olarak sentezlenen enzim, aktif formu olan 64 kDA'a parçalanır. MMP-2 aktivasyonu pro-MMP-2, metalloproteinaz-2 doku inhibitörü (TIMP-2) ve MT-MMP1'i kapsayan MT-MMP bağımlı yolak ile gerçekleştirilir (Şekil 1.3). Bu üç molekülün hücre yüzeyinde bir kompleks oluşturması pro-MMP-2'nin inaktif formda kalmasına sebep olan propeptit kısmının uzaklaştırılması ile sonuçlanır (Zucker ve ark 2004).

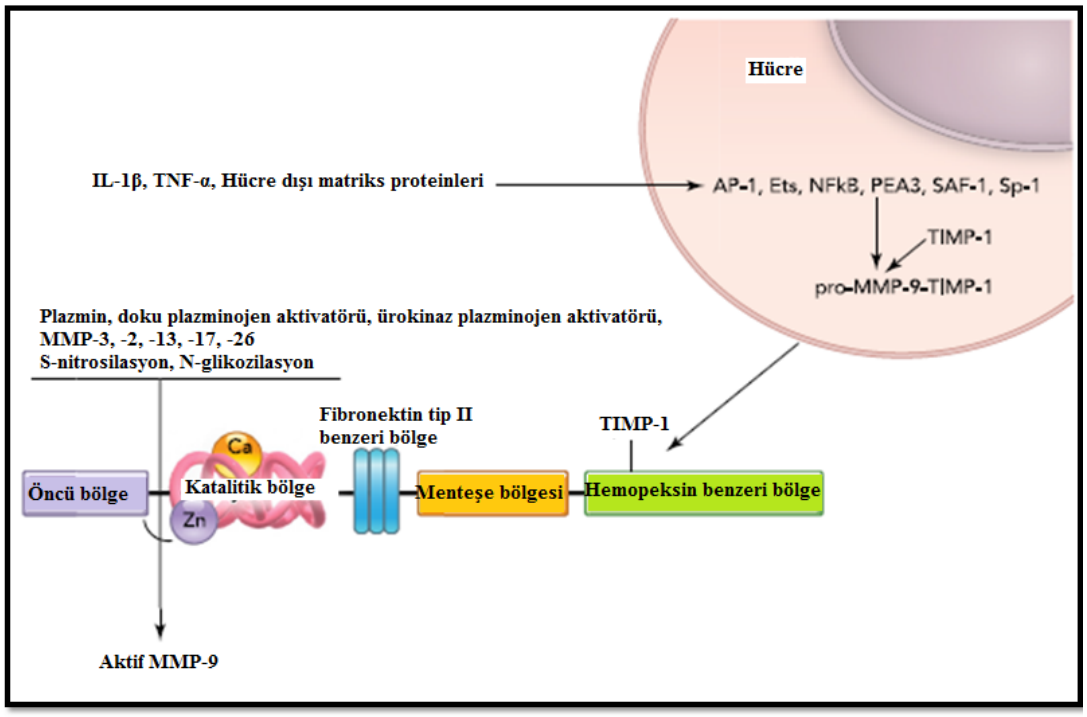


Şekil 1.3. MMP-2 aktivasyonu (Van Hinsbergh ve Koolwijk 2008).

Endotel hücreleri, alveoler hücreler, makrofajlar, fibroblastlar ve diğer bağ dokusu hücrelerinde inflamatuar uyarı ile MMP-9 sentezi gerçekleşse de, MMP-9 sentezi genellikle nötrofiller ve eozinofiller tarafından gerçekleştirilmektedir (Schwingshackl ve ark 1999). Birçok malign hücrede ise hem MMP-2 ve MMP-9 üretilmektedir (Atkinson ve Senior 2003). MMP-9 enzimi, 20q13.12'de yerleşik

olan, 13 ekzondan oluşmuş, 7,7 kb büyüklüğünde bir gen tarafından kolanır. MMP-2 geninden farklı olarak TATA kutusu, AP-1 element, SP-1 transkripsiyonal faktör, TRE ve NF-kB bağlanma bölgesine sahiptir (Chintala ve ark 1999). 92 kDA olarak sentezlenen enzim, aktif formu olan 83 kDA'a parçalanır. MMP-9'un aktivasyonu serin proteazların yanı sıra MMP-2 ve MMP-3 gibi MMP'ler tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.4) (Ogata ve ark 1992).

Aktif MMP-2 ve MMP-9'un aktivasyon kaybını sağlayan fizyolojik inhibitörleri ise α2-makroglobulin ve TIMP'lerdir. TIMP-1 MMP-9'u inhibe ederken, TIMP-2 MMP-2'yi inhibe etmektedir (Crocker ve ark 2004).



Şekil 1.4. MMP-9 aktivasyonu (Yabluchanskiy ve ark 2013).

1.5. Anjiyogenez ve Phactr-1

Tümör gelişimi ve kanser metastazı için oldukça önemli süreçlerden biri olan anjiyogenez, varolan kapillerden yeni damarların oluşumu olarak tanımlanmaktadır (Folkman ve Klagsbrun 1987).

Tümör dokusu 1-2 mm^3'lük bir büyüklüğe ulaştıktan sonra oksijen ve besin desteği sağlamak için ilk olarak anjiyogenezi uyarır. Vasküler destek yokluğunda ise tümör nekrotik hale gelebileceği gibi apoptoz da gerçekleşebilir. Bu nedenle anjiyogenez kanser gelişiminde önemli faktörlerden biridir (Roskoski 2007)

Anjiyogenezi içeren yeni damarlanma süreci, temel olarak 4 adımda gerçekleşmektedir. İlk olarak doku bazal zar hasarı gerçekleşir. Ardından bir kısmı zar hasarı sonucunda oluşan çeşitli büyüme faktörleri tarafından endotel hücrelerin göçü uyarılır. Üçüncü adımda endotel hücrelerin çoğalması gerçekleştirilir. Son basamakta ise, anjiyogenik faktörler tarafından anjiyogenez süreci uyarılır (Nishida ve ark 2006). Embriyogenez, yara iyileşmesi, menstrüel siklus gibi fizyolojik olaylarda, inflamasyon, iskemik ve immün hastalıklar gibi patolojik durumlarda da görülen anjiyogenezde çok sayıda pro- ve karşıt- anjiyogenik faktör rol alır, bunlar arasında en önemlisi ve anjiyogenez gelişiminin anahtar düzenleyicisi vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) sistemidir (Çizelge 1.3) (Harper ve Bates 2008). Bu sistem tümör mikroçevresinin karakteristik bir özelliği olan hipoksi ile düzenlenmektedir.

Hipoksi, nükleer alt ünite HIF1β ve hipoksi düzenleyici alt ünite HIF1α olmak üzere iki alt üniteden meydana gelen HIF1 transkripsiyon faktörü tarafından algılanır. HIF1'in hedef genleri ise dokuda oksijen seviyesini artıran eritropoietin, glikolitik yolu enzimleri, karbonik anhidraz, hem oksijenaz ve VEGF-A'yı kodlayan genlerdir (Buchler ve ark 2003) Özellikle VEGF-A ifadesinin anjiyogenezin eşlik ettiği, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati gibi durumlarda, melanom ve kolorektal karsinoma gibi kanser türlerinde arttığı belirlenmiştir (Perrin ve ark 2005, Harper ve Bates 2008). Pankreas kanserlerinde de, HIF1α mRNA seviyesinde artış ile paralel şekilde VEGF-A mRNA seviyesinde artış gözlenmektedir (Buchler ve ark 2003).

Çizelge 1.3. Anjiyogenez uyarıcı ve engelleyici faktörler (Böhle ve Kalthoff 1999).

Anjiyogenez Uyarıcı Faktörler	**Engelleyici Faktörler**
Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	Platelet faktör 4 (PF 4)
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Trombospondin
Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	Metalloproteinaz doku inhibitörleri
Hepatosit büyüme faktörü (HGF)	Prolaktin
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Anjiyostatin (plasminojen kısmı)
İnsülin-benzeri büyüme faktörü (IGF)	Endostatin (kollajen XVIII kısmı)
Transforme edici büyüme faktörü α,β	İnterferon α
Tümör nekrosis faktör α (TNFα)	İnterlökin -1, 12
Plasental büyüme faktörü	
Matriks metalloproteinazlar (MMP)	
Pleotrofin	
Interlökin 8	
Granulosit-koloni uyarıcı faktör	

İnsan endotelyal hücreleri ile yapılan çalışmalarda, fosfataz aktin düzenleyici Phactr ailesinin dört üyesinden biri olan, kromozom 6p24.1'de yerleşik, 20 ekzondan meydana gelen, Phactr-1 geni tarafından kodlanan, Phactr-1 proteininin, VEGF-A ile uyarıldığı gösterilmiştir (Jarray ve ark 2011). Phactr ailesi tarafından kodlanan Phactr proteinlerinin fizyolojik rolleri ile ilgili çok az bilgi bulunmakla birlikte, insanlarda melanoma gelişimi, erken evre miyokard infarktüsü, Phactr-1 ile ilişkilendirilmiş, Phactr-1 polimorfizmleri ile kardiyovasküler hastalıklar arasında da anlamlı ilişki tespit edilmiştir (Smith ve ark 2005, Koh ve ark 2009, Kathiresan ve ark 2009, Trufant 2011). İnsan meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada da meme kanseri hücrelerinde prometastatik transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) ile uyarılan hücre göçü için Phactr-1 gen ifadesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (Fils-Aimé ve ark 2013). Bu bilgiler ışığında Phactr-1'in kanser anjiyogenezi sürecinde de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Kanser hastalarında metastaz gelişimi tedavide başarısızlığın başlıca nedeni ve kanser ölümlerinin ana etkenidir. Pankreas kanseri hastalarının da tümörün agresifliği ve yüksek ölüm oranı metastazla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle pankreas kanseri ile savaşta invazyon ve metastazı engelleyen ajanlar büyük önem taşımaktadır, son yıllarda yapılan çalışmalar da doğal ürünlerden yeni anti kanser ajanların elde edilmesi yönünde olmaktadır. Etkili bir sitotoksik ajan olduğu ve kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan juglonun, pankreas kanseri kanseri hücrelerinde de antikanser özelliği gösterebileceği düşüncesinden yola çıkarak bu çalışmada, juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattında sitotoksik etkisinin belirlenmesi, hücre dışı matriks elemanlarının yıkımından sorumlu metalloproteinazları kodlayan MMP-2 ve MMP-9 ve kanser anjiyogenezinde rol oynadığı düşünülen Phactr-1 genlerinin ifade düzeylerinin değerlendirilmesiyle invazyon, metastaz ve anjiyogenez üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan Cihazlar ve Markaları.

Cihaz	**Marka**
Sınıf II Biyogüvenlik kabini	Metisafe
İnverted mikroskobu	Leica
Işık mikroskobu	Olympus
CO2'li inkübatör	Thermo Scientific
Sntrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific
Mikroplate okuyucu	Biotech
Floresan mikroplate okuyucu	Hitachi
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific
Real-time PCR	Roche
Termal Cycler	Bio-Rad
Hassas terazi	Kern
Su banyosu	WiseBath
Vorteks	Nüve
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Stuart
Çalkalayıcı	WiseShake
Otomatik pipet	Thermo Scientific
+4 Buzdolabı	Uğur
-20 Derin dondurucu	Arçelik
-80 Derin dondurucu	Haier

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler ile markaları.

Kimyasal/Sarf Malzeme	**Marka**
RPMI 1640	Lifetech
Penisilin/streptomisin	Biochrome
Fosfat tamponlu su (PBS)	Sigma
Dulbacco'nın fosfat tamponlu su (DPBS)	Sigma
Fetal sığır serumu (FBS)	Gibco
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applicem
Tripsin-EDTA (%0.05)	Gibco
Juglon	Sigma
MTT	Sigma

Çizelge 2.2 (Devam). Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler ile markaları.

Kimyasal/Sarf Malzeme	**Marka**
TRidity G	Applicem
Tripan mavisi	Sigma
Kristal viyole	Sigma
Asetik asit	Merck
Kalsiyum klorür	Sigma
Magnezyum klorür	Sigma
Kloroform	Merck
Ethanol	Dop Organik Kimya
2-propanol	Merck
Hücre Adezyon kiti	Cell Biolabs
Hücre İnvazyon Kiti	Cell Biolabs
SYBR Green Qpcr Master Mix	Thermo Scientific
cDNA Sentez Kiti	Vivantis
Hücre sayım lamı	Neubauer
T75 Flask	Cellstar
T25 Flask	Cellstar
6-kuyucuklu plate	Costar
96-kuyucuklu plate	Costar

2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan insan pankreas adenokarsinomu hücre hattı olan BxPC-3 ATCC (American Type Culture Collection (Rockville, Md))'den temin edildi (Çizelge 2.3). BxPC-3 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve 100 IU/ mL penisilin ve 100 mg/ml streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 besiyerinde, kendileri için uygun kültür ortamı olan 37 ˚C'de % 5 CO_2'li etüvde inkübe edildi.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullalan BxPC-3 hücre hattının özellikleri.

BxPC-3 Hücre Hattı (ATCC® CRL1687™)	
Organizma	Homo sapiens, insan
Doku	Pankreas
Hastalık	Adenokarsinom
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Kadın
Yaş	61
Büyüme özelliği	Yapışarak çoğalan (aderent)

2.2.1. Hücre Hattının Dondurulması

Hücrelerin dondurulması işleminde; yapışarak çoğalan hücreler, %0.05'lik Tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra 37˚C'de %5 CO_2'li etüvde 1-2 dk

inkübasyona bırakılarak flasktan ayrılmaları sağlandı. İnkübasyon sonrasında inverted mikroskop ile hücrelerin kalktığı belirlendikten sonra flaska taze besiyeri ilave edildi, hücre-besiyeri içeriği falkon tüpe alındı. 1500 rpm'de 4 dk santrifüj işlemi uygulandı, ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpe 9:1 oranında besiyeri ve DMSO'dan oluşan dondurma çözeltisinden 1-2 ml eklenerek hücreler kritotüplere alındı, hazırlanan kriyotüpler -20˚C donduktan sonra -80˚C'de depolandı.

2.2.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Çözdürülmesi

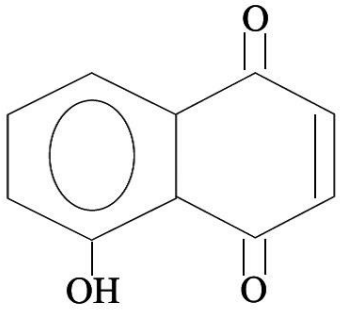
Dondurulmuş hücrelerin hızlı bir şekilde çözdürülmesi gerektiği için içerisinde dondurulmuş hücre bulunan ve -80˚C'den alınan kriyotüpler, 37˚C'ye ısıltımış su banyosunda kapak kısımlarından tutularak ve su içerisinde hafifçe sallanarak hızlı bir şekilde çözdürüldü. Ardından kriyotüp içeriği, içerisinde 10 ml besiyeri bulunan falkon tüpe yavaş bir şekilde aktarıldı, 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pellet flask büyüklüğüne göre uygun miktarda besiyeri ile homojenize edildikten sonra hücreler flaska alındı, 37 ˚C'de %5 CO_2'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler flask yüzeyini doldurana kadar iki günde bir besiyeri değiştirildi, flask yüzeyi dolduğunda ise hücrelerinin canlılığını devam ettirmek için pasajlama işlemi yapıldı.

2.2.3. Hücre Hattının Pasajlanması

Flaskta %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlanmasında öncelikle eski besiyeri uzaklaştırıldı, ardından 1-2 ml 1X'lik DPBS ile yıkama işlemi yapıldı. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak amacıyla flaska 1-2 ml %0.05'lik Tripsin-EDTA eklendi, hücreler 37˚C'de %5 CO_2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında inverted mikroskopta hücrelerin kalktığı tespit edildikten sonra, flaska Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı kadar taze besiyeri ilave edildi, hücre-besiyeri içeriği pipet ile homojenize edildikten sonra falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 4 dk santrifüj yapıldıktan sonra, süpernatant atıldı, pellet 10 ml besiyeri ile homojenize edildi. Tripan mavi boyası ile sayım lamı kullanılarak hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı. Hücre sayımı sonrasında hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü, çoğalmaları için 37 ˚C'de % 5 CO_2'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.3. Juglon Stok Solüsyonun Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan juglon ticari olarak temin edildi (Sigma, St Louis, Amerika, Katalog No: H47003). 174.15 molekül ağırlığına, 5-hidroksi-1-4-naftakinon açık kimyasal formülüne sahip Juglon, katı halde oda sıcaklığında muhafaza edilmektedir (Şekil 2.1). Çalışma için juglonun DMSO içinde çözdürülerek 20mM konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlandı, stok solüsyon 0,22 µm'lik filtreden geçirerek steril edildi ve -20˚C'de saklandı. Hazırlanan bu stok solüsyondan RPMI 1640 besiyeri ile seyreltmeler yapılarak çalışmada kullanılan farklı konsantrasyonlar elde edildi.



Şekil 2.1. Juglonun kimyasal yapısı (Thakur 2011).

2.4. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Juglonun BxPC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil–2-)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) testi ile belirlendi. MTT, suda çözünebilen sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. Canlı hücrelerde mitokondride bulunan suksinat dehidrogenez enziminin MTT'nin tetrazolyum halkasını parçalaması ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristalleri oluşmaktadır. Formazan kristallerinin DMSO ile çözdürülmesi ile mikoplate okuyucuda elde edilen absorbans değerleri hücre canlılığı ile doğru orantılıdır.

MTT testi için, 96-kuyucuklu plate'e her kuyucukta 5-10x10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve yüzeye yapışmalarını sağlamak için hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırılarak, kontrol grubu dışındaki bütün kuyucuklara 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µM konsantrasyonlarında hazırlanmış 100 µl juglon solüsyonu eklendi, hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı, 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 100 µl MTT solüsyonu eklenerek hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. Dört saatin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Plate oda sıcaklığında 20 dk bekletildi, ardından mikroplate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Juglon uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlığı hesaplandı.

2.5. Hücre Adezyon Analizi

Juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde, hücre adezyonu üzerine etkisi "CytoSelect^{TM} 48-Well Cell Adhesion Assay" (Cell Biolabs, CBA-053) ile belirlendi. Analiz aşağıdaki protokole göre modifiye edilerek gerçekleştirildi.

1- 24 saat süresince 6-kuyucuklu plate'de, 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonunda juglon ile muamele edilmiş hücreler sayıldı, 0.1-1x10^6/ml olacak şekilde serum içermeyen besiyeri ile hücre süspansiyonları hazırlandı.

2- Kollajen I ile kaplanmış 48-kuyucuklu plate oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Her bir grup için analiz 3'lü tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi, gruplardaki her bir kuyucuğa 150 µl hücre süspansiyonu eklendi, hücreler CO_2'li etüvde 30-90 dk inkübasyona bırakıldı.

4- İnkübasyon sonunda her bir kuyucuk kurumalarına izin verilmeden dikkatli bir şekilde boşaltıldı, ardından 250 µl 2 mM $CaCl_2$ ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 1XPBS ile 4-5 kere yıkama işlemi yapıldı.

5- Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 200 µl %0.1'lik kristal viyole çözeltisi eklendi, 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

6- İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltıldı, 500 µl deiyonize su ile 4-5 kere yıkama işlemi uygulandı.

7- Yıkama işleminin ardından kuyucuklar boşaltılarak kurumaya bırakıldı.

8- Kurutulan kuyucuklara 150 µl %33'lük asetik asit çözeltisi eklendi, karıştırıcıda 10 dk inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuktaki 150 µl örnek 96-kuyucuklu plate'e aktarıldı, mikroplate okuyucuda 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon ile muamele edilen grupların absorbans değerleri ile kontrol grubu absorbans değerleri karşılaştırılarak juglonun hücre adezyonu üzerine etkisi yüzde olarak hesaplandı.

2.6. Hücre İnvazyon Analizi

Juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde, hücre invazyonu üzerine etkisi "CytoSelect™ 96-Well Cell Invasion Assay" (Cell Biolabs, CBA-112) ile belirlendi. Kitin 96-kuyucuklu plate'i 8 um çapında polikarbonat membran içermektedir. Membranın üst yüzeyi, bazal membran matriks solüsyonu ile kaplanmıştır. Bu bazal membran tabakası invaziv hücrelerin invaziv olmayan hücrelerden ayrılmasında bir bariyer olarak görev yapar. Kit, invaziv hücrelerin tabakadaki bazal membran proteinlerini parçalayarak polikarbonat membrandan geçerken invaziv olmayan hücrelerin membrandan geçememesi esasına dayanmaktadır. Analiz aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1- 24 saat süresince 6-kuyucuklu plate'de, 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonunda juglon ile muamele edilmiş hücreler sayılarak 0.2-2x10^6/ml olacak şekilde serum içermeyen besiyeri ile hücre süspansiyonları hazırlandı.

2- Kit içeriğinde bulunan, üstte "membran chamber" ve altta "feeder tray" olmak üzere 2 aparattan oluşan 96-kuyucuklu invazyon plate'i oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.

3- "Membran chamber"lara 100 µl serum içermeyen besiyeri eklendi, oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.

4- İnkübasyon sonunda bazal membran tabakasına zarar vermeden "membran chamber"ları boşaltıldı.

5- Steril koşullar altında "membran chamber" ile "feeder tray" ayrıldı, "feeder tray"e 150 µl, %10 FBS içeren besiyeri eklendi, ardından "membran chamber", "feeder tray"in üzerine yerleştirildi. Bu aşamada membran altında baloncuk oluşmamasına dikkat edildi.

6. Her bir grup için analiz 3'lü tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi, "membran chamber"lara 150 µl hücre süspansiyonu eklendi, hücreler CO_2'li etüvde 12-24 saat inkübasyona bırakıldı.

7- İnkübasyonun sonlanmasına yakın kit içeriğinde bulunan 96-kuyucuklu "cell harvesting tray"ine 150 µl hücre ayırma solüsyonu eklendi.

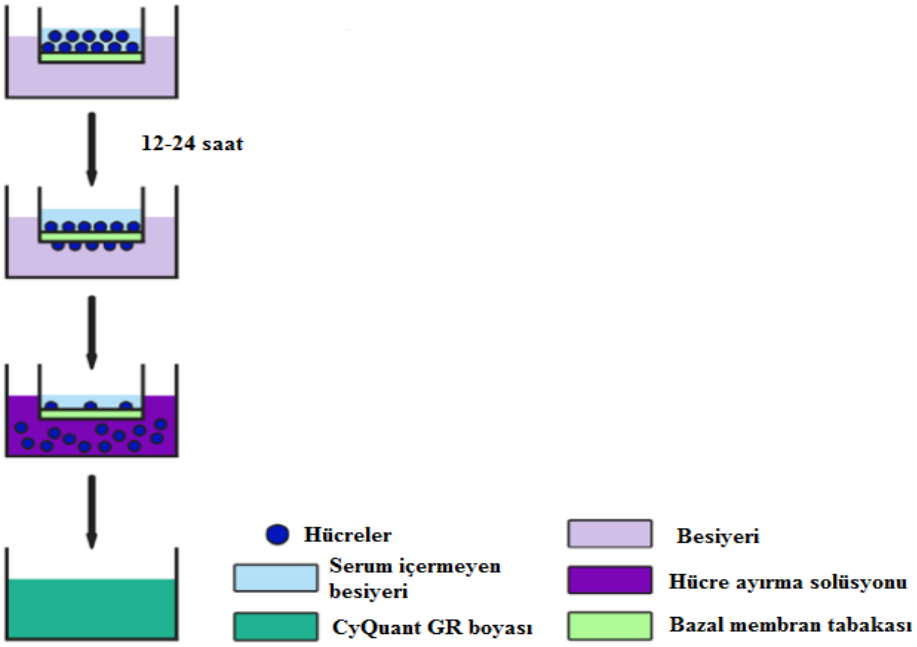
8- İnkübasyon sonunda etüvden çıkartılan 96-kuyucuklu invazyon plate'inde, "membran chamber" ile "feeder tray" ayrıldı.

9- "Membran chamber" içeriği boşaltıldı ve 150 µl hücre ayırma solüsyonu içeren 96-kuyucuklu "cell harvesting tray" üzerine yerleştirildi ve 37˚C'de 30 dk

inkübasyona bırakıldı. Membranın alt kısmında bulunan hücrelerin ayrılarak 96-kuyucuklu "cell harvesting tray"e geçmelerini kolaylaştırmak için "membran chamber" hücre ayırma solüsyonu içerisinde birkaç kez hareket ettirildi.

10- İnkübasyon sonunda 96-kuyucuklu "cell harvesting tray" ile "membran chamber" ayrıldı, içerisinde 150 µl hücre ayırma solüsyonu bulunan kuyucuklara kit içeriğinde bulunan, 4X Liziz Tamponu/CyQuant GR boyasından oluşan solüsyon ilave edildi, karıştırıcıda 20 dk bekletildi.

11- Süre sonunda karışım floresan okuma için uygun bir plate'e aktarıldı, 480 nm/520 nm dalga boyunca floresan okuma yapıldı.



Şekil 2.2. Hücre invazyon analizi protokol şeması.

Kontrol grubu ile oluşturulan satandartların floresan değerleri ile 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon ile muamele edilen grupların floresan değerlerinin karşılaştırılması ile juglonun hücre invazyonu üzerine etkisi yüzde olarak hesaplandı.

2.7. Gen İfade Analizleri

5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulamasının MMP-2, MMP-9 ve Phactr-1 genlerin ifadesi üzerine etkisi Roche Light Cycler 1.2 cihazı kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemi ile belirlendi.

2.7.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu TRidity G solüsyonu (Applicem, A4050) kullanılarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1- 6-kuyuklu plate'e her bir kuyucuğa $2x10^5$ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı, 24 saat inkübasyonda bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışması sağlandı.

2- İnkübasyon sonrasında kontrol grubu dışındaki hücreler 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon ile muamele edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3- 24 saatin sonunda her bir kuyucuğa 1 ml TRidity G solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.

4- Her bir kuyucuktaki karışım ependorf tüpüne aktarıldı, üzerlerine 200 µl kloroform eklendi, tüpler alt üst edilerek karıştırıldı, 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.

5- Sürenin sonunda tüpler 12000 g'de +4˚C'de 15 dk santrifüj edildi.

6- Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni bir ependorf tüplerine aktarıldı, üzerlerine 250 µl 2-propanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.

7- Sürenin sonunda tüpler 12000 g'de +4˚C'de 10 dk santrifüj edildi.

8- Santrifüj sonrası her bir tüpdeki supernatant uzaklaştırıldı, pellete 1 ml %70'lik etanol eklendi.

9- Etanol ile yıkama işleminin ardından tüpler 12000 g'de +4˚C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her bir tüpdeki supernatant uzaklaştırldı ve RNA pelleti kurumaya bırakıldı.

11- Kurumanın ardından RNA pelletleri 50 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürüldü.

İzole edilen total RNA'nın konsantrasyonu belirlenmesi için 1µl RNA örneği ile Nanodrop spektrometre cihazı ile ölçüldü ve RNA konsantrasyonları ng/µl olarak elde edildi. cDNA sentezi için 1 µg RNA örneği kullanıldı, kalan örnekler -80˚C'de muhafaza edildi.

2.7.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, Vivantis "2-steps RT-PCR Kiti" (Vivantis, RTPL2) kullanılarak gerçekleştirildi. İlk aşamada bir tüp içerisinde 1 µg RNA, 1 µl oligo $(dT)_{18}$ primer (40 µM), 1µl 10mM dNTP'den oluşan karışım nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı denatürasyon için Biorad thermal cycler cihazında 65˚C'de 5 dk inkübe edildikten sonra, bir buz üzerine alınarak 2 dk

bekletildi. İkinci aşamada, nükleaz içermeyen su ile 10 µl'ye tamamlanmış, 2 µl 10X M-MuLV tamponu, 100 ünite M-MuLV revers transkriptaz enzimi içeren reaksiyon karışımı, buz üzerinden alınan tüpe pipetaj yapılarak ilave edildi. Thermal cycler cihazında 42˚C'de 60 dk inkübasyonun ardından 85˚C 5dk inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılması gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar qPCR analizlerinde kullanıldı ve -20'de muhafaza edildi.

2.7.3. qPCR Analizi

qPCR analizi, "SYBR Green qPCR Master Mix" (Thermoscientific, K0251) kullanılarak gerçekleştirildi. Hedef genler ile referans olarak kullanılan β-aktin genine ait primerler Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. qPCR analizinde kullanılan genlere özgü primer dizisi.

Gen	Primer Dizisi	Referans
MMP-2	İ: 5-TTTCCATTCCGCTTCCAGGGCACAT-3 G: 5-TCGCACACCACATCTTTCCGTCACT-3	El-Ghlban ve ark 2014
MMP-9	İ: 5-TGGGCTACGTGACCTATGACAT-3 G: 5-GCCCAGCCCACCTCCACTCCTC-3	Nagamatsu ve ark 2014
Phactr-1	İ: 5-GATTGGCACCAAGCTCACCA-3 G: 5-ACCGTGGGCCTTTGACTGAG-3	Fils-Aimé ve ark 2013
β-aktin	İ: 5-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3 G: 5-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3	Hsu ve ark 2005

İ: İleri primer dizisi
G: Geri primer dizisi

Genlerin ifade düzeylerinin analizi için, Çizelge 2.4'de gösterilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 2.4. qPCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12.5 µl
İleri primer (50 µM)	0,25 µl
Geri primer (50 µM)	0,25 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen su	10 µl
Toplam	**25 µl**

Çizelge 2.4'e göre hazırlanan karışım, Roche Light Cycler 1.2 cihazına uygun kapiler tüplere aktarılarak cihaza yerleştirildi ve denatürasyon, amplifikasyon ve soğuma basamaklarından oluşan qPCR protokolü uygulandı (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. qPCR protokolü.

Denatürasyon	95˚C'de 10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	94˚C'de 30 sn
	60˚C'de 30 sn
	72˚C'de 30 sn
Soğuma	40˚C'de 30 sn

MMP-2, MMP-9 ve Phactr gen ifadeleri düzeyi, Ct değerleri üzerinden yorumlandı. Normalizasyon için β-aktin geni kullanıldı, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile kontrol gurubu genleri ile 5,10,15, ve 20 μM konsantrasyonda juglon uygulanan grupların genlerinin ifade düzeyleri karşılaştırıldı.

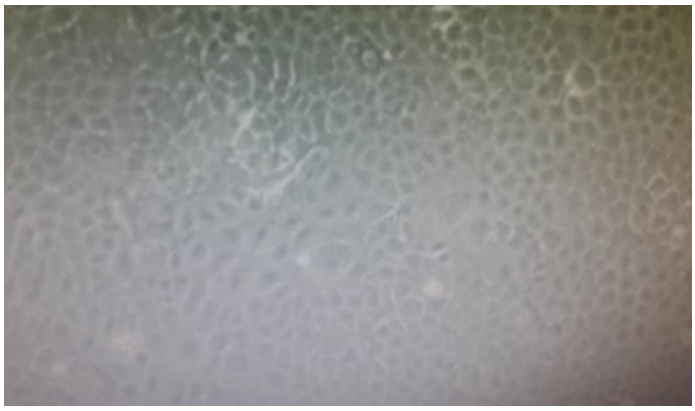
2.8. İstatistiksel Analiz

Farklı konsantrasyonlarda juglon ile muamele edilmiş hücre grupları ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırma SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago) programı kulanılarak tek yön varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücre Hattı

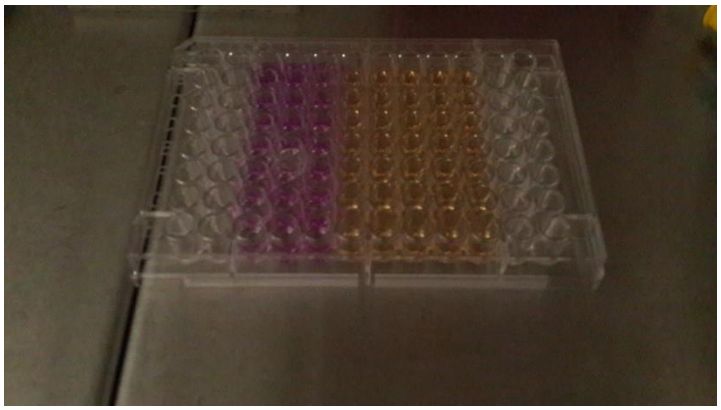
Çalışmamızda kullanılan BxPC-3 pankreras kanseri hücre hattı, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ mL penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde, 37 ˚C'de % 5 CO_2'li etüvde kültüre edilmiştir (Şekil 3.1). BxPC-3 hücrelerine, juglonun sitotoksik etkisini belirlemek için 24 saat süresince 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında, diğer analizlerde ise 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulanmıştır.



Şekil 3.1. BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattı (X10 büyütme).

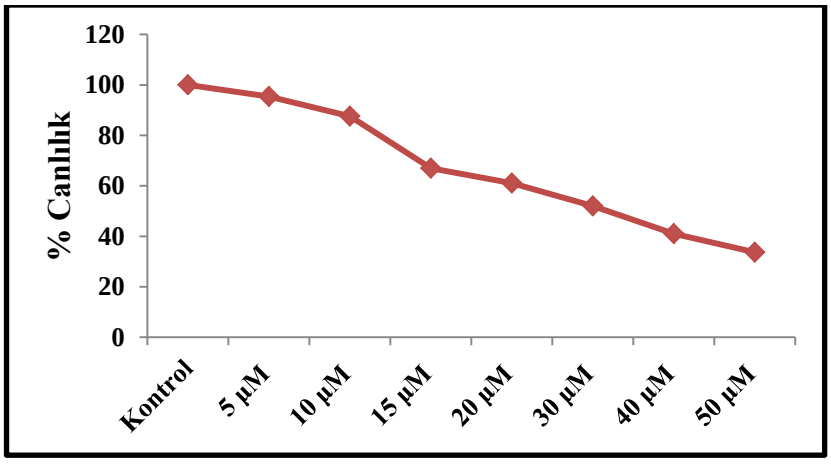
3.2. Juglonun Sitotoksik Etkisi

BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattında juglonun 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyon sonrası sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.2).



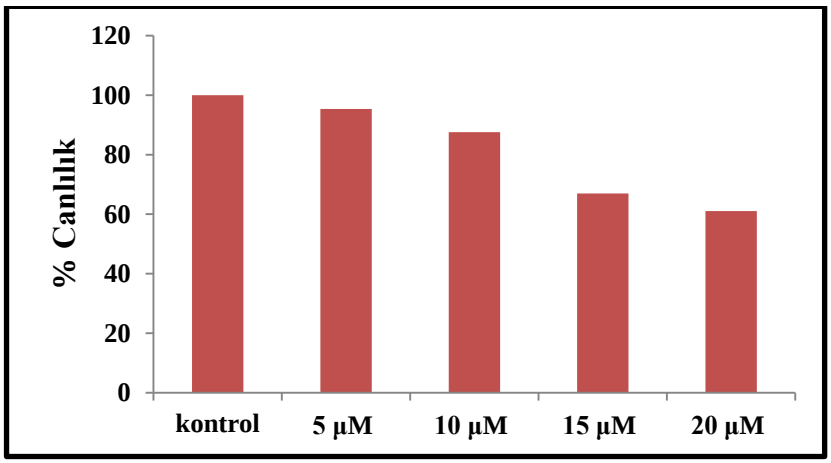
Şekil 3.2. MTT testinde gözlenen renk değişimi.

BxPC-3 hücre hattında, juglonun 24 saat inkübasyon sonrası IC_{50} dozu GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak 21,05 µM olarak hesaplanmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 3.3). IC_{50} değeri altındaki 5, 10, 15 ve 20 µM juglon konsantrasyonları çalışma dozları olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. 24 saat juglon uygulamasının BxPC-3 hücre canlılığına etkisi.

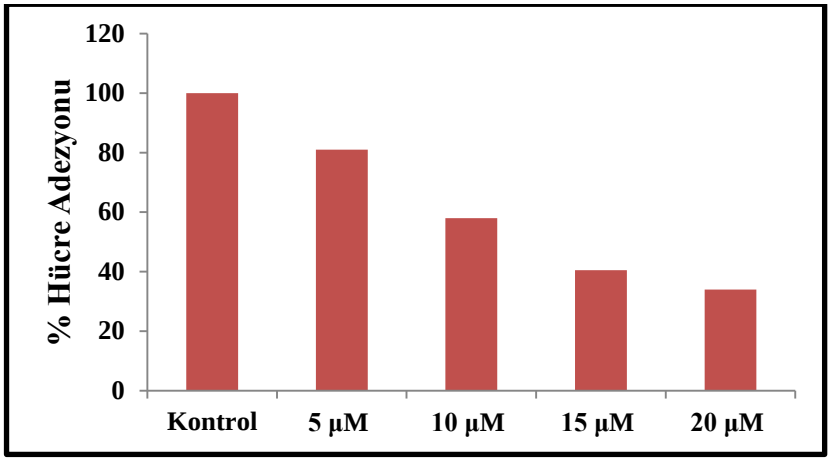
Çalışma dozlarının 24 saat'lik uygulamasının BxPC-3 hücre canlılığına etkisi Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Buna göre, 24 saat sonunda 5 µM juglon uygulanmış grupta hücre canlılığı %95,37 iken, 10 µM juglon uygulanmış grupta %87,58; 15 µM juglon uygulanmış grupta %66,94 ve 20 µM juglon uygulanmış grupta %61,05 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 3.4. Çalışma dozlarının BxPC-3 hücre canlılığına etkisi.

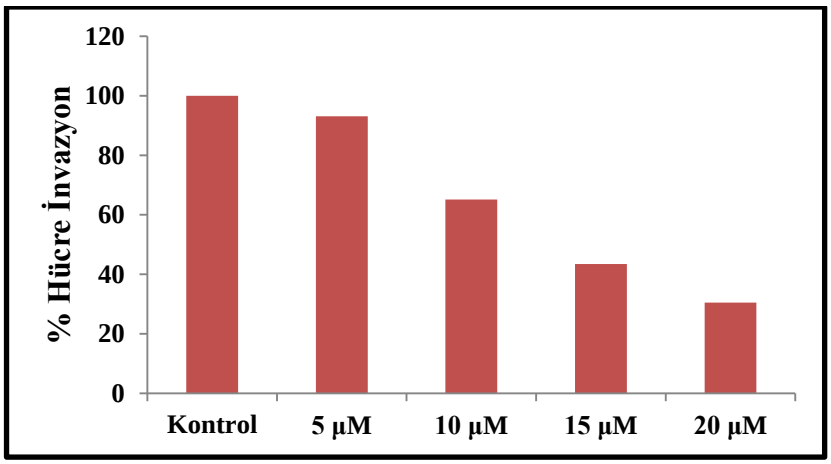
3.3. Juglonun Hücre Adezyon ve İnvazyonu Üzerine Etkisi

Hücre adezyon analizi ile, BxPC-3 hücre hattında 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saat juglon uygulamasının hücrelerin adezyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %9, %42, %59,5 ve %66 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.5) ($p < 0,05$).



Şekil 3.5. Çalışma dozlarının BxPC-3 hücrelerinin adezyonu üzerine etkisi.

Hücre invazyon analizi ile, BxPC-3 hücre hattına 24 saat süresince 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucu, hücrelerin invazyon özelliklerinin kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %6,87; %34,86; %56,55 ve %69,5 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.6) ($p < 0,05$).

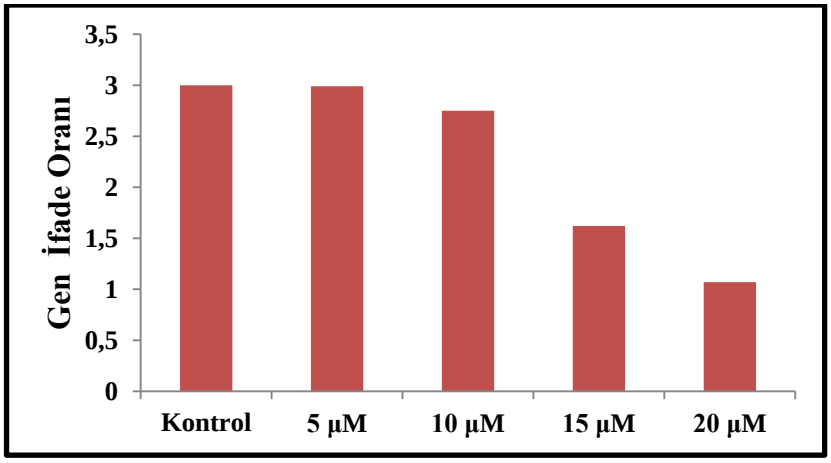


Şekil 3.6. Çalışma dozlarının BxPC-3 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi.

3.4. Juglonun MMP-2, MMP-9 ve Phactr-1 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi

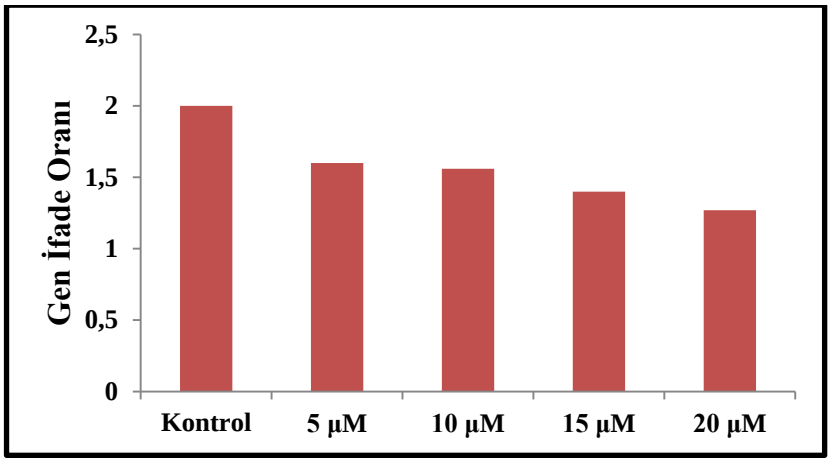
BxPC-3 hücre hattında 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saat juglon uygulamasının MMP-2, MMP-9 ve Phactr-1 gen ifadeleri üzerine etkisi qPCR yöntemi ile analiz edilmiş, kontrol grubu ile çalışma grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak ‘‘Relative Expression Software Tool- 384 (REST-384)’’ programı ile istatistiksel olarak belirlemiştir.

BxPC-3 hücrelerine 24 saat süresince 5 µM juglon uygulaması sonucu kontrol grubuna kıyasla MMP-2 gen ifadesinde 1 kat azalış tespit edilmiş, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). BxPC-3 hücrelerine 24 saat süresince 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucunda ise MMP-2 gen ifadesinde kontrol grubuna göre sırasıyla 1,09; 1,84 ve 2,81 kat istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.7).



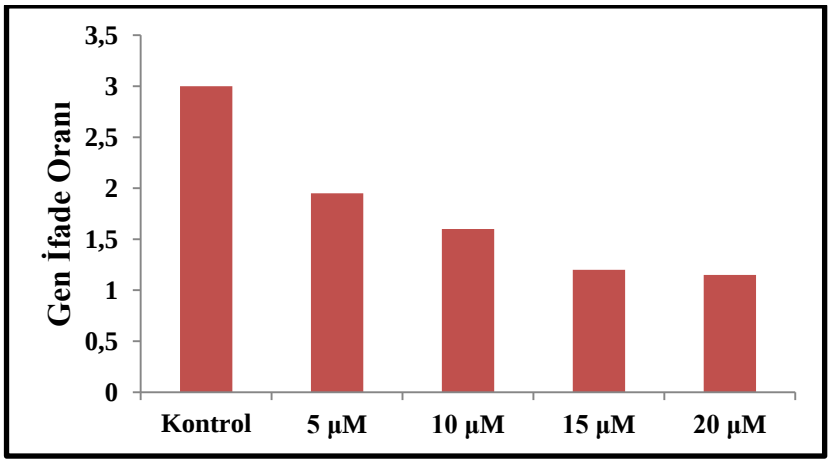
Şekil 3.7. Çalışma dozlarının MMP-2 gen ifadesi üzerine etkisi.

BxPC-3 hücrelerine 24 saat süresince 5 µM juglon uygulaması sonucu MMP-9 gen ifadesinde kontrol grubuna kıyasla 1,24 kat istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir azalış tespit edilmiştir ($p>0,05$). Diğer çalışma dozlarımız olan 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucunda ise MMP-9 gen ifadesi kontrol grubuna göre sırasıyla 1,28; 1,43 ve 1,57 kat istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Çalışma dozlarının MMP-9 gen ifadesi üzerine etkisi.

BxPC-3 hücrelerine 24 saatlik 5 µM ve 10 µM juglon uygulaması sonucu kontrol grubuna göre Phactr-1 geninde sırasıyla 1,54 ve 1,87 kat azalış tespit edilmiş, ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). BxPC-3 hücrelerine 24 saatlik 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucunda ise Phactr-1 geninde kontrol grubuna göre sırasıyla 2,49 ve 2,60 kat istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Çalışma dozlarının Phactr-1 gen ifadesi üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

Gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümler arasında 4. sırada yer alan pankreas kanseri, insidansına neredeyse yakın bir ölüm oranı ile en agresif kanser türlerinden biridir. Genellikle erken evrede tespit edilemeyen pankreas kanserinde, ameliyat küratif bir seçenek olmaya devam etmektedir. Ancak pankreasın yerleşimine bağlı olarak hastaların sadece %15'inde tümör cerrahi rezeksiyon için uygun olmakta, rezeke edilmiş tümörlerin de %70-80'inde ameliyatı takiben nüks görülebilmektedir (Lygidakis ve ark 2005, Boreddy ve Srivastava 2013). Pankreas kanseri hücrelerinin sitotoksik kemoterapötik ajanlara ve/veya radyoterapiye karşı direnç geliştirmeleri nedeniyle de tedavide güçlükler ortaya çıkmaktadır (Schneider ve ark 2005). Bu nedenle hastalıktan korunmada ve tedavide yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Arumugam ve ark 2009, Conroy ve ark 2011, Von Hoff ve ark 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile düşük toksisiteye sahip olan kurkumin, genistein, resveratrol, likopen, ellagik asit, ursolik asit, folik asit, beta karoten, selenyum, Vitamin E, flavonoidler gibi doğal bileşenlerin ve bitkisel ürünlerin apoptozu uyarma ya da karsinogenezin başlamasını önleme gibi farklı mekanizmalarla kanser hücrelerini etkileyebildikleri, standart kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımlarının ek ya da sinerjik etkiler ortaya koyabildiği, yan etkileri hafifletebildiği, konvansiyonel ilaçların alınımını artırabildiği gösterilmiştir (Amin ve ark 2009). Bu sonuçlar doğrultusunda, hücre kültürü ve hayvan çalışmaları ile doğal bileşenlerin antikanser özelliklerinin araştırılması kanser ile savaşta yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi adına önemli bir odak haline gelmiştir.

Pankreas kanseri hücreleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda da sulforafan, plumbagin, kurkumin, genistein, ellagik asit, ursolik asit gibi doğal bileşenlerin önemli sinyal yolaklarını etkileyerek apoptoza neden olabildikleri, kanser gelişiminde rol oynayan onkogenlerin ifadelerini baskılayabildikleri, tümör baskılayıcı genlerin ifadelerinde artışa yol açabildikleri, invazyon ve metastazı engelleyebildikleri gösterilmiş, bu bileşenlerden bazılarının standart tedavide kullanılan gemsitabin ile sinerjik etki gösterebildiği kanıtlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda fitokimyasalların özellikle NF-kB, SP1, STAT3, Notch-1, COX-II, ATM/Chk1 ve AKT gibi çeşitli sinyal yolaklarını hedef alarak pankreatik tümör

gelişimini baskıladıkları gösterilmiştir (Li ve ark 2004, Aggarwal ve Shishodia 2006, Wang ve ark 2006, Padhye ve ark 2009, Sahu ve ark 2009, Batra ve ark 2010, Jutooru ve ark 2010).

Çalışmamızda BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde metastaz karşıtı (antimetastatik) etkisini araştırdığımız juglon, geleneksel Çin tedavisinde uzun bir geçmişi olan ve gastrik kanseri hücreleri (SGC-7901), lösemi hücreleri (HL-60), kolon karsinom hücreleri (HCT-15), prostat kanseri hücreleri (LNCaP) ile yapılan çalışmalarda antikanser etkisi gösterilmiş doğal bir naftakinondur. Yapılan bu çalışmalarda juglonun, reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini önemli ölçüde arttırarak mitokondriyal zar potansiyeli kaybı ile doza bağlı şekilde apoptozu uyardığı, Bax, kaspaz-3, kaspaz-9, TP53 gen ifadelerinde artış, Bcl-2 gen ifadesinde azalma gibi apoptoz ile ilgili genleri etkilediği gösterilmiştir (Kamei ve ark 1998, Xu ve ark 2010, Ji ve ark 2011, Xu ve ark 2013).

Literatürde, juglonun kanser hücrelerinde antimetastatik etkisinin araştırıldığı çalışma sayısı ise oldukça sınırlıdır. HCT-8 kolon kanseri hücrelerinde juglonun hücre adezyonu ve MMP aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 72 saat süresince 1.25, 2.5, 5, 10 ve 20 μg/ml konsantrasyonlarında juglon uygulamasının, hücrelerin adezyonunu doza bağlı şekilde önemli ölçüde azalttığı, 2.5, 5, 10 ve 20 μg/ml konsantrasyonlarında juglon uygulaması ile MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Yang ve ark 2012). Zhao ve ark (2014); SKOV3 over kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışmada, 24 saat süresince 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında juglon uygulamasının kanser hücrelerinin göçünü inhibe ettiğini göstermiştir.

Literatürde, juglonun antimetastatik etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmaların yetersizliğinden yola çıkarak, bu çalışma ile juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde invazyon, metastaz ve anjiyogenez üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerine, 24 saat süresince 5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulanması sonucu, hücrelerin adezyon ve invazyon özelliklerinde doza bağlı şekilde azaldığı gösterilmiş, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucu metastaz ile ilişkilendirilen MMP-2 ve MMP-9 genlerinde, 15 ve 20 μM juglon uygulaması sonucunda da anjiyogenez ile ilişkili Phactr-1 gen ifadesinde anlamlı azalma tespit edilmiştir.

Juglon ile benzer kimyasal yapıya ve kanser hücrelerinde benzer sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip naftakinon ailesinin diğer üyelerinin antimetastatik etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, sonuçlarımıza benzer şekilde naftakinon türevlerinin çeşitli kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı engellediği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda, naftakinon türevleri ile muamele sonrasında, hücre adezyon, invazyon ve hücre göçü analizleri yapılmış ve özellikle hücre dışı matriksin iki major elemanı olan kollajen IV ve jelatini yıkıma uğratmaları nedeniyle kanser metastazı ile direkt olarak ilişkilendirilen MMP-2 ve MMP-9, hücre dışı matriksin yıkımında etkili bir diğer enzim olan ürokinaz plazminojen aktivatörü (u-PA) ile bu enzimlerin inhibitörlerindeki seviye değişiklikleri araştırılmıştır (Shih ve ark 2009, Shieh ve ark 2010, Min ve ark 2011, Hsieh ve ark 2013, Liew ve ark 2014).

Shih ve ark (2009); 1-4 naftakinon sınıfınında yer alan plumbaginin, HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesini doza ve zamana bağlı şekilde engellediğini göstermiş, HepG2 hücrelerine 0-2 μM konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat süresince plumbagin uygulamasının da doza bağlı olarak kanser hücrelerinin adezyon, invazyonu ve migrasyonunu baskılağını ortaya koymuşlardır. MMP-2 ile u-PA seviyesinde de doza bağlı bir şekilde önemli derecede azalma tespit eden araştırıcılar, bu enzimlerin inhibitörü olarak görev yapan TIMP-2 ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) seviyelerinde ise artış tespit etmişlerdir.

Promotor bölgelerinde NF-kB ve AP-1 bağlanma bölgeleri ihtiva eden MMP'ler ve u-PA'ların ifadesi, NF-kB ve AP-1 transkripsiyon faktörlerini aktive edebilen sitokinler ya da 12-O-tetradekanol-forbol-13-asetat (TPA) gibi bazı uyarıcılar tarafından da kontrol edilebilmektedir. Shieh ve ark (2010); A549 akciğer kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışmada, 1,5 μM konsantrasyonlarında 24 saat plumbagin uygulamasının akciğer kanseri hücrelerinin TPA ile indüklenen adezyonunu %57 oranında azalttığını, 48 saat plumbagin uygulamasının ise hücrelerin TPA ile indüklenen invazyon ve migrasyonunu sırasıyla %74 ve %66 oranında inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, plumbagin uygulaması sonucu kanser hücrelerinde MMP-2 ve u-PA gen ifadesi seviyesinde doza bağlı şekilde azalmaya paralel, MMP-2 ve u-PA protein seviyelerinde de doza bağlı azalma tespit edilmiştir. Bu azalmanın MMP-2 ve u-PA protein seviyelerinde sırasıyla %70 ve %85 oranında olduğu belirtilmiştir.

Plumbaginin antimetastatik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda; MMP'ler ve u-PA ifadesindeki değişikliklerin yanı sıra metastaz ile ilişkilendirilen diğer moleküllerdeki ifade değişiklikleri de araştırılmıştır. Manu ve ark (2011); meme kanseri ve mide kanseri hücrelerine plumbagin uygulamasının, meme kanseri, mide kanseri, over kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, sevikal kanser, kolon kanseri gibi çeşitli tümörlerde aşırı ifade edildiği bilinen, kanserde çoğalma, hücre göçü ve metastazda önemli rol oynayan CXCR4 kemokin reseptörü ifadesinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir.

Plumbaginin çeşitli kanser hücre hatlarında metastazı engelleme özelliğinin gösterildiği çalışmaların ardından, ortotopik ksenograft fare modeli oluşturularak yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hafeez ve ark (2013); PC-3M-lusiferaz prostat kanseri hücreleri ile oluşturulan ksenograft fare modelinde, farelere 2mg/kg plumbagin uygulamasının tümör büyümesini engellediğini, MMP-2, MMP-9 ve uPA ifadeleri ile anjiyogenezde etkili CD31 ve VEGF ifadelerindeki azalmaya neden olarak karaciğere metastazı da önemli ölçüde engellediğini göstermişlerdir.

MMP'lerin ifadesi transkripsiyonel seviyede, tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α), interlökin-1 gibi sitokinler, EGF başta olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri ve onkogen ürünleri ile uyarılır (Reel ve ark 2006). Bunun yanı sıra, NF-kB'nın bazı kanser türlerinde MMP-2 ve MMP-9 başta olmak üzere çeşitli MMP'lerin ifade seviyelerinde ve aktivitelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Lin ve ark 2010, Ordonez ve ark 2014). Naftakinon türevleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda da, MMP-9 ifadesindeki azalmanın moleküler mekanizması incelenmiş, naftakinonların AP-1 ve NF-kB transkripsiyon faktörlerini etkileyerek MMP-9 seviyesinde azalmaya sebep oldukları gösterilmiştir (Min ve ark 2011, Hsieh ve ark 2013, Tsai ve ark 2014, Liew ve ark 2015).

Hsieh ve ark (2013); 1-2 naftakinon ailesinde yer alan nafta-(1,2 b)furan-4,5-dionun (NFD), EGF ile uyarılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine, 24 saat süresince 0-3 μM konsantrasyonlarında uygulanmasının hücre büyümesi, apoptoz ve hücre döngüsü üzerine bir etkiye yol açmazken, MMP-9 ifadesinde azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Meme kanseri hücrelerinde MMP-9 ifadesinin EGF ile uyarıldığını belirten araştırıcılar, NFD'nin EGFR bağımlı PI3K/Akt sinyal yolağını

engelleyerek AP-1 ifadesinde azalma ile MMP-9 aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir. NFD'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre göçü ve invazyon üzerine etkisinin araştırıldığı, Tsai ve ark (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da aynı konsantrasyonlarda NFD uygulamasının kanser hücrelerinde MMP-9 ifadesinde azalmaya sebep olduğunun gösterilmesinin yanı sıra meme kanseri göçü ve invazyonunda etkili Src kinaz aktivitesini de önemli derecede engellediği belirtilmiştir. Aynı araştırıcılar tarafından yapılan bir başka çalışmada da NFD'nin c-MET ifadesini engellemesi sonucu PI3K/Akt sinyal yolağını baskılaması ile NF-kB ifadesinde azalma MMP-9 aktivitesini azaltmış, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde HGF ile uyarılan hücre invazyon ve göçü baskılanmıştır (Tsai ve ark 2014).

Liew ve ark (2014); 1-4 naftakinon ailesinde yer alan 2-metoksi-1,4-naftakinonun (MNQ) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 24 saat süresince 0-7,5 μM konsantrasyonlarında uygulanmasının hücre invazyon ve göçünü doza bağlı şekilde engellediğini göstermiş, 7,5 μM konsantrasyonunuda MNQ uygulamasının kanser hücrelerinde hücre invazyonunu %59 oranında, hücre göçünü ise %46 oranında baskıladığını belirtmişlerdir. MNQ uygulaması ile MMP-9 aktivitesinde de azalma tespit edilmiş, 7,5 μM konsantrasyonunuda MNQ uygulaması sonucu kanser hücrelerinde MMP-9 aktivitesi %75 oranında baskılamıştır. Aynı araştırıcılar MNQ'nun MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki antimetastatik etkisinin moleküler mekanizmasını inceledikleri proteomik analizi çalışmasında, MNQ uygulamasının kanser hücrelerinde prometastatik ERK1/2 ve NF-kB sinyal yolaklarının aktivasyonunu azalttığını, kanser hücrelerinde metastazı baskılayan E-kaderin ifadesini ise arttırdığını göstermişlerdir (Liew ve ark 2015).

Min ve ark (2011); ACC-M adenoid kistik karsinom hücrelerine 24 ssat süresince 0-10 μM konsantrasyonlarında şikonin uygulamasının MMP-2 ifadesi üzerine bir etkisi bulunmazken, MMP-9 ifadesinde doza bağmlı bir şekilde azalma olduğunu göstermiş, 5 ve 10 μM şikonin uygulaması sonucu hücrelerin invazyonunda anlamlı azalma tespit etmişlerdir. MMP-9 ifadesinin NF-kB ile düzenlendiğini gösteren araştırıcılar, ACC-M adenoid kistik karsinom hücrelerinde şikonin MMP-9 ifadesi üzerine etkisini NF-kB aktivasyon kaybı ile gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Pankreas kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarda da çeşitli fitokimyasalların antimetastatik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Roomi ve ark (2005); MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine lizin, prolin, arjinin, askorbik asit ve yeşil çay ekstratı ile oluşturulan 10, 50, 100 ve 500 µg/ml konsantrasyonundaki karışımın 24 saat süresince uygulanmasının, hücre invazyonunu sırasıyla, %66, %66, %87 ve %100 oranında engellediğini, MMP-9 ifadesini de doza bağlı şekilde azalttığını göstermişlerdir.

BxPC-3 ve Panc-1 pankreas kanseri hücrelerinde resveratrolün etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da, 24 saat süresince 12,5; 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında resveratrol uygulamasının hücrelerin invazyonu ve göçünü doza bağlı şekilde engellediğini, 48 saat süresince uygulanması halinde ise MMP-2 ve MMP-9 ifadelerini azaltırken, E-kaderin ifadesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Li ve ark 2013).

Wang ve ark (2010); BxPC-3 ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine 72 saat süresince 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında genistein uygulamasının, hücrelerin invazyonu ile VEGF ve MMP-9 aktivitesini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerine 24 saat süreyle uyguladığımız farklı konsantrasyonlardaki juglonun, kanser hücrelerinin metastazında kritik süreç olan invazyon mekanizmasında önemli rol oynayan MMP-2 ve MMP-9'un gen ifadelerini doza bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Farklı naftakinon bileşikleri ile yapılan diğer çalışmaları destekler nitelikte olan bu sonucumuz, invazyon ve adezyon analiz yöntemleri kullanarak elde ettiğimiz bulgularla da teyit edilmiştir. Diğer naftakinon bileşiklerinin AP-1 ve NF-kB ifadelerini inhibe ederek etki göstermesi juglonun da benzer mekanizmalar ile etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çeşitli pro ve karşıt anjiyogenik faktörler arasındaki denge ile kontrol edilen, tümör büyümesi ve gelişimi sırasında bu dengenin pro-anjiyogenik faktörler lehine bozulduğu anjiyogenez sürecinin anahtar düzenleyicisi olduğu belirtilen VEGF, pankeras kanseri tedavisinde de kullanılan anjiyogenez inhibitörlerinin hedef

molekülüdür. İnsan endotel hücreleri ile yapılan bir çalışmada Phactr-1 geninin VEGF ile uyarıldığı gösterilmiştir (Jarray ve ark 2011).

Literatürde Phactr üyelerinin fizyolojik rolleri üzerine oldukça az bilgi bulunmakla birlikte, Phactr-1'in insanlarda melanoma gelişimi, erken evre miyokard infarktüsü ile ilişkili olduğu, melanom ve akciğer kanseri hücrelerinde düşük seviyede bulunan Phactr-3'ün ise hücre hareketini ve hücre yayılmasını arttıran aktin polimerizasyonunu engellediği bildirilmiştir (Smith ve ark 2005, Kathiresan ve ark 2009, Koh ve ark 2009).

Fils-Aimé ve ark (2013); meme kanseri hücrelerinde prometastaik faktör olduğu belirtilen ve meme kanseri gelişminde önemli role sahip olan transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) ile uyarılan hücre göçü için Phactr-1'in artmış ifadesinin gerekli olduğunu göstermiş, Phactr-1 geninin susturulması sonucu TGF-β ile uyarılan hücre göçünün azaldığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda anjiyogenez sürecinin anahtar düzenleyicisi olan VEGF ile uyarılan, meme kanseri hücrelerinde prometastatik TGF-β aracılı hücre göçü için önemli bir gen olduğu kanıtlanan, dolayısıyla anjiyogenez ile ilişkili olduğu düşünülen Phactr-1 gen ifadesinde 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonrasında anlamlı azalma tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz diğer bulgular ile de uyumlu olan sonuç, Phactr-1'in anjiyogenik etkisinin olabileceği öngörüsünü kuvvetlendirmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre, önemli bir fitokimyasal bileşik olan juglonun pankreas kanseri ile savaşta yeni terapötik stratejilerin oluşturulmasında metastazı engelleme özelliği ile de etkili bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda bir naftakinon bileşiği olan juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde invazyon ve anjiyogenez üzerine etkisi, hücre adezyon ve invazyon analizleri ve MMP-2, MMP-9, Phactr-1 gen ifade analizleri ile araştırılmıştır.

BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerine 24 saat süresince 5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulamasının pankreas kanseri hücrelerinde doza bağlı şekilde sitotoksik etki gösterdiği, 24 saat için IC_{50} değerinin 21,05 μM olduğu belirlenmiştir. BxPC-3 hücrelerine 24 saat süresince IC_{50} değerinin altındaki 5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucunda, kanser hücrelerinin adezyonu ve invazyonu doza bağlı şekilde azalmıştır. 5 μM juglon uygulaması ile MMP-2, MMP-9 ve Phactr-1 gen ifadelerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik saptanmazken, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon ile muamele sonucu MMP-2 ve MMP-9 gen ifadelerinde doza bağlı azalma tespit edilmiştir. Phactr-1 gen ifadesinde anlamlı azalma ise 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucunda gözlenmiştir. Çalışmada Phactr-1 gen ifadesi üzerine bir etkisi bulunmamakla birlikte, araştırılan diğer analizlerde anlamlı sonuçların elde edildiği en düşük sitotoksik etkiye sahip juglon konsantrasyonu 10 μM olarak belirlenmiştir.

Kanser gelişiminin önemli bir basamağı olan invazyon sürecinde rol oynayan MMP'lerden MMP-2 ve MMP-9'un gen ifade düzeyindeki bu azalma juglonun terapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu bulguların, aktif olmayan zimojenler halinde sentezlenen MMP'lerin jel zimografi tekniği ile enzim aktivitelerinin ortaya konacağı ileriki çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra metastaz ile ilişkilendirilen hücre adezyon molekülleri ile hücre dışı matriksin yıkımında sorumlu u(PA)'lar başta olmak üzere, çeşitli metaztaz belirteçlerindeki ifade değişiklikleri de araştırılabilir. Ayrıca, juglonun pankreas kanseri hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 ifadeleri üzerine etkisinin moleküler mekanizmasını incelemek amacıyla, juglon ile benzer kimyasal yapıya sahip olan naftakinonların NF-kβ üzerine etkilerinin gösterilmesinden yola çıkarak, juglon uygulaması sonrasında NF-kβ aktivasyonunun belirlenmesi ile birlikte juglonun karsinogenez ile ilgili diğer sinyal yolakları üzerine etkisi de çalışılabilir.

Çalışmamızda, anjiyogenez belirteci olarak kullanılan Phactr-1 geninin ifade düzeyinde 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonrasında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, tek başına juglonun anjiyogenez üzerine etkisinin değerlendirilmesinde yeterli olmamakla birlikte, Phactr-1 ile ilgili sınırlı sayıdaki veriye katkı sağlamaktadır. İleriki çalışmalarda VEGF, HIF-1 gibi anjiyogenez belirteçlerinin de çalışılması, juglonun anjiyogenez üzerine etkilerinin daha kapsamlı değerlendirilmesi bakımından önemli olacaktır.

Bu çalışma ile juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde antimetastazik etkiye sahip olduğu gösterilmiş olup, daha sonra yapılacak çalışmalar için bir temel oluşturulmuştur. Ayrıca, bu çalışma ile elde edilen verilerin pankreas kanseri ile savaşta yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abe T, Fukushima N, Brune K, Boehm C, Sato N, Matsubayashi H, Canto M, Petersen GM, Hruban RH, Goggins M, 2007. Genome-wide allelotypes of familial pancreatic adenocarcinomas and familial and sporadic intraductal papillary mucinous neoplasms. Clin Cancer Res, 13, 6019–25.

Adsay NV, Adair CF, Heffess CS, 1996. Intraductal oncocytic papillary neoplasms of the pancreas. Am J Surg Pathol, 20, 980–94.

Aggarwal BB, Shishodia S, 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol, 71, 1397-421.

AJCC, 2010. Exocrine and endocrine pancreas. In: AJCC Cancer Staging Manual. Eds: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, 7th ed. New York: Springer, p. 241-9.

Alberts RS, Grothey A, 2004. Gastrointestinal tract cancers. In: Manual of clinical oncology. Ed: Casciato AD, 7th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, p. 213-9.

Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R, Neoptolemos JP, 2009. Current standards of surgery for pancreatic cancer. Br J Surg, 91, 1410–27.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM, 2009. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. J Clin Oncol, 27, 2712-25.

Ansari MA, Shaikh S, Muteeb G, Rizvi S, 2013. Role of matrix metalloproteinases in cancer. In: Advances in Protein Chemstry. Eds: Ashraf G, Sheikh IA, 1th ed. USA: OMICS, p.5.

Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W, 2009. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. Cancer Res, 69, 5820–8.

Arvold ND, Ryan DP, Niemierko A, Blaszkowsky LS, Kwak EL, Wo JY, Allen JN, Clark JW, Wadlow RC, Zhu AX, Fernandez-Del Castillo C, Hong TS, 2012. Long-term outcomes of neoadjuvant chemotherapy before chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer. Cancer, 118, 3026-35.

Atkinson JJ, Senior RM, 2003. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol. 28, 12-24.

Babula P, Adam V, Kizek R, Sladky Z, Havel L, 2009. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. Environ Exp, 2009; 330–7.

Ban S, Naitoh Y, Mino-Kenudson M, 2006. Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas: Its histopathologic difference between 2 major types. Am J Surg Pathol, 30, 1561–9.

Ban S, Naitoh Y, Ogawa F, 2006. Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the gastric-type with focal nodular growth of the arborizing papillae: A case of high-grade transformation of the gastric-type IPMN. Virchows Arch, 449, 112–6.

Barton-Burke M, 1999. Gemcitabine: a pharmacologic and clinical overview. Cancer Nurs, 22, 176-83.

Başara BB, Güler C, Yentür GK, 2013. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı, Ankara, s. 32-3.

Batra S, Sahu RP, Kandala PK, Srivastava SK, 2010. Benzyl isothiocyanatemediated inhibition of histone deacetylase leads to NF-kappa B turnoff in human pancreatic carcinoma cells. Molecular Cancer Therapeutics, 9, 1596–1608.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA, 1993. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med, 4, 197–250.

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ, 2000. Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol, 2000, 13:135–60.

Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ, 2012. Pancreatic adenocarcinoma. BMJ, 344, e2476.

Boreddy SR, Srivastava SK, 2013. Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals. Cancer Letters, 86–94.

Böhle AS, Kalthoff H, 1999. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. Langenbeck's Arch Surg, 384, 133–40.

Buchler P, Reber HA, Buchler M, Shrinkante S, Buchler MW, Friess H, Semenza GL and Hines OJ, 2003. Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. Pancreas, 26, 56-64.

Caldas C, Kern SE, 1995. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. Int J Pancreatol, 18, 1–6

Campbell F, Azadeh, B, 2008. Cystic neoplasms of the exocrine pancreas. Histopathology, 52, 539–51.

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF, 2008. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. Curr Cancer Drug Targets, 8, 187-98.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC, 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer, 2, 563- 72.

Chen X, Wang Y, Xia H, Wang Q, Jiang X, Lin Z, Ma Y, Yang Y, Hu M, 2012. Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. Mol Biol Rep, 39, 6707-14

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR, 1996. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. Proc Natl Acad Sci, 93, 3636–41.

Cheng M, De B, Pikul S, Almstead NG, Natchus MG, Anastasio MV, McPhail SJ, Snider CE, Taiwo YO, Chen L, Dunaway CM, Gu F, Dowty ME, Mieling GE, Janusz MJ, Wang-Weigand S, 2000. Design and synthesis of piperazine-based matrix metalloproteinase inhibitors. J Med Chem, 43, 369-80.

Chintala SK, Tonn JC, Rao JS, 1999. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. Int J Dev Neurosci, 17, 495-502.

Coghlin C, Murray G, 2010. Current and emerging concepts in tumour metastasis. J Pathol, 222, 1-15.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, 2011. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. N Engl J Med, 364, 1817-25.

Coussens LM, Werb Z, 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. Chem Biol, 3, 895-904.

Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL, 2004. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. J Neurosci Res, 75, 1-11.

Decker GA, Batheja MJ, Collins JM, Silva AC, Mekeel KL, Moss AA, Nguyen CC, Lake DF, Miller LJ, 2010. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening. Gastroenterol Hepatol (N Y), 6, 246-54.

Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, Cordelier P, 2011. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. Current Genomics, 12, 15–24.

Desgrosellier JS, Cheresh DA, 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nat Rev Cancer, 10, 9-22.

DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA, 1999. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. Gastroenterology, 117, 1464–84.

Dusek L, Muzík J, Gelnarová E, Fínek J, Vyzula R, Abrahámová J, 2010. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. Klin Onkol, 23, 311-24.

Eppel A, Cotterchio M, Gallinger S, 2007. Allergies are associated with reduced pancreas cancer risk: A population-based case-control study in Ontario, Canada. Int J Cancer , 121: 2241-5.

Evans DB, Abbruzzese JL, Rich TR, 1997. Cancer of the pancreas. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer principles and practice of oncology, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Raven, 1054–87

Everhart J, Wright D, 1995. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer: A meta analysis. JAMA, 273, 1605-9.

Ferrone CR, Levine DA, Tang LH, Allen PJ, Jarnagin W, Brennan MF, Offit K, Robson ME, 2009. BRCA germline mutations in Jewish patients with pancreatic adenocarcinoma. J Clin Oncol, 27, 433-8.

Fila C, Metz C, Van Der Sluijs P, 2008. Juglone inactivates cysteine-rich proteins required for progression through mitosis. J Biol Chem, 283, 21714–24.

Fils-Aimé N, Dai M, Guo J, El-Mousawi M, Kahramangil B, Neel JC, Lebrun JJ, 2013. MicroRNA-584 and the protein phosphatase and actin regulator 1 (PHACTR1), a new signaling route through which transforming growth factor-β Mediates the migration and actin dynamics of breast cancer cells. J Biol Chem, 288, 11807-23.

Fokas E, Engenhart-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX, 2007. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. Cancer Metastasis Rev, 26, 705-15.

Folkman J, Klagsbrun M, 1987. Angiogenic factors. Science, 235, 442-7.

Fukushima N, Fukayama M, 2007. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas: pathology and molecular genetics. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 14, 238–42.

Fukushima N, Mukai K, 1999. Pancreatic neoplasms with abundant mucus production: Emphasis on intraductal papillary-mucinous tumors and mucinous cystic tumors. Adv. Anat. Pathol. 6,65–77.

Gandini S, Lowenfels AB, Jaffee EM, Armstrong TD, Maisonneuve P, 2005. Allergies and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis with review of epidemiology and biological mechanisms. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14, 1908–16

Giada ML, Filho JM, 2006. The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. Biol Health Sci, 12, 7–15.

Göral V, 2014. Pankreas kanseri: patogenez ve tanı. Güncel Gastroenteroloji, 18, 407-14.

Hafeez BB, Zhong , Fischer JW, Mustafa A, Shi X, Meske L, Hong H, Cai W, Havighurst T, Kim K, Verma AK, 2013. Plumbagin, a medicinal plant (Plumbago zeylanica)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. Mol Oncol, 7, 428-39.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE, 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science, 271, 350–3.

Hanahan D, Bergers G, Bergsland E, 2000. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. J Clin Invest, 105, 1045-7.

Hansel DE, Kern SE, Hruban RH, 2003. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. Annu Rev Genomics Hum Genet, 4, 237-56.

Hajihoseini S, Bahmani MK, Khosravi A, Ghezelsofla E, Ghaderi A, 2011. Prognostic significance of MMP2 and MMP9 functional promoter single nucleotide polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma. Iran J Basic Med Sci, 14, 137-44.

Harnack LJ, Anderson KE, Zheng W, Folsom AR, Sellers TA, Kushi LH, 1997. Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 6, 1081-86.

Harper SJ, Bates DO, 2008. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Nat Rev Cancer, 8, 880-7.

Hoffmann D, Rivenson A, Abbi R, Wynder EL, 1993. A study of tobacco carcinogenesis: effect of the fat content of the diet on the carcinogenic activity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in F344 rats. Cancer Res, 53:2758–2761.

Hong SM, Park JY, Hruban RH, Goggins M, 2011. Molecular signatures of pancreatic cancer. Arch Pathol Lab Med, 135, 716-27.

Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshiba T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Imamura M, 2002. Expression of Integrin αVβ3 in Pancreatic Carcinoma: Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis. Pancreas, 25, 30-5.

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE, 2000. Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 6, 2969–72.

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S, 2004. An illustrated consensus on the classifi cation of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. Am J Surg Pathol, 28, 977–87.

Hruban RH, Maitra A, Goggins M, 2008. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. Int J Clin Exp Pathol, 1, 306–16.

Hruban RH, Klöppel G, Offeraus GJ, 2014. Pancreatic cancer. In: World cancer report 2014. Eds: Stewart BW, Wild CP, 1th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 594-608.

Hsieh CY, Tsai PC, Tseng CH, Chen YL, Chang LS, Lin SR, 2012. Inhibition of EGF/EGFR activation with naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells. Toxicol In Vitro. 27, 1-10.

Hsu CC, Lin TW, Chang WW, Wu CY, Lo WH, Wang PH, Tsai YC, 2005. Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids. Gynecol Oncol, 96, 415-22.

Hsu M, Shih D, Meier FE, van Belle PA, Hse J, Elder DE, Buck C, Herlyn M, 1998. Adenoviral gene transfer of β_3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. Am J Pathol, 153, 1435–41.

Huang C, Jiang T, Zhu L, Liu J, Cao J, Huang KJ, Qiu ZJ, 2011. STAT3-targeting RNA interference inhibits pancreatic cancer angiogenesis in vitro and in vivo. Int J Oncol, 38, 1637–44

Iacobuzio-Donahue CA, Klimstra DS, Adsay NV, Wilentz RE, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH, 2000. Dpc-4 protein is expressed in virtually all human intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: comparison with conventional ductal adenocarcinomas. Am J Pathol, 157, 755–61.

Iacobuzio-Donahue CA, Song J, Parmiagiani G, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE, 2004. Missense mutations of MADH4: characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors. Clin Cancer Res, 10, 1597–1604.

Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB, 2008. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. Langenbecks Arch, 393:535–45.

Jarray R, Allain B, Borriello L, Biard D, Loukaci A, Larghero J, Hadj-Slimane R, Garbay C, Lepelletier Y, Raynaud F, 2011. Depletion of the novel protein PHACTR-1 from human endothelial cells abolishes tube formation and induces cell death receptor apoptosis. Biochimie, 93, 1668-75.

Ji YB, Qu ZY, Zou X, Cui L,Hu GJ, 2008. Growth inhibition and induction of apoptosis in sarcoma 180 cells by juglone invivo. EngineeringTechnology Press, 325–8.

Ji YB, Qu ZY, Zou X, 2011. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. Toxicol Pathol, 63, 69-78.

Johansen D, Stocks T, Jonsson H, Lindkvist B, Bjorge T, Concin H, 2010. Metabolic factors and the risk of pancreatic cancer: a prospective analysis of almost 580,000 men and women in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 19, 2307-17.

Jutooru I, Chadalapaka G, Lei P, Safe S, 2010. Inhibition of NFkappaB and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation, The Journal of Biological Chemistry, 285, 25332–44.

Kalluri R, Neilson EG, 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest, 112, 1776-84.

Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M, 1998. Inhibition of cell growth in culture by quinones. Cancer Biother Radiopharm, 13, 185-8.

Kamisawa T, Isawa T, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, 1995. Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. Pancreas, 11, 345–9.

Karlson BM, Ekbom A, Josefsson S, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr, Nyrén O, 1997. The risk of pancreatic cancer following pancreatitis. Gastroenterology, 113, 587-92.

Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, 2009. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. Nat Genet, 41, 334-41.

Kerkelä E, Saarialho-Kere U, 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. Exp Dermatol, 12, 109-25.

Kindler HL. Pancreatic cancer: an update. Curr Oncol Rep, 9, 170-6.

Kloppel G, Kosmahl M, Luttges J, 2005. Intraductal neoplasms of the pancreas: Cystic and common. Pathologe 2005, 26, 31–6.

Koh SS, Opel ML, Wei JP, Yau K, Shah R, Gorre ME. Whitman E, Shitabata PK, Tao Y, Cochran AJ, 2009. Molecular classification of melanomas and nevi using gene expression microarray signatures and formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. Mod Pathol, 22, 538-46.

Kontogiorgis CA, Papaioannou P, Hadjipavlou-Litina DJ, 2005. Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and (Q)SARs results. Curr Med Chem, 12, 339-55.

Korc M, 1998. Role of growth factors in pancreatic cancer. Surg Oncol Clin N Am, 7, 25-41.

Kosmahl M, Pauser U, Peters K, Sipos B, Lüttges J, Kremer B, Klöppel G, 2004. Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classifi cation proposal. Virchows Arch, 445, 168–78.

Kozuka S, Sassa R, Taki T, Masamoto K, Nagasawa S, Saga S, Hasegawa K, Takeuchi M, 1979. Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. Cancer 43, 1418–28.

Larsson SC, Orsini N, Wolk A, 2007. Body mass index and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. Int J Cancer, 120, 1993–98.

Latchford A, Greenhalf W, Vitone LJ, Neoptolemos JP, Lancaster GA, Phillips RK, 2006. Peutz-Jeghers syndrome and screening for pancreatic cancer. Br J Surg, 93, 1446-55.

Legman P, Vignaus O, Dousser B, Baraza A, Palazzo L, Dumontier I, Coste J, Louvel A, Rousseau G, Couturier D, Bonnin A, 1998. Pancreatic tumors: comparisons of dual- phase helical CT and endoscopic sonography. Am J Radiol, 170, 1315-22.

Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, Johansson R, Ropponen K, Kosma VM, 2006. Expression of matrix metalloproteinases 7 and 9 in non-small cell lung cancer Relation to clinicopathological factors, beta-catenin and prognosis. Lung Cancer . 51, 313-21.

Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, Abbruzzese J, Kurzrock R, 2004. Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. Cancer, 101, 2351–2362.

Li W, Ma J, Ma Q, Li B, Han L, Liu J, Xu Q, Duan W, Yu S, Wang F, Wu E, 2013. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-κB pathway. Curr Med Chem, 20, 4185-94.

Liew K, Yong PV, Lim YM, Navaratnam V, Ho AS, 2014. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). Toxicol In Vitro, 28, 335-9.

Liew K, Yong PV, Navaratnam V, Lim YM, Ho AS, 2015. Differential proteomic analysis on the effects of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone towards MDA-MB-231 cell line. Phytomedicine, 22, 517-27.

Lin A, 1990. Pancreatic carcinoma as a cause of unexplained pancreatitis: report of ten cases. Ann Intern Med, 113, 166–7.

Lin ML, Lu YC, Chung JG, Wang SG, Lin HT, Kang SE, Tang CH, Ko JL, Chen SS, 2010. Down-regulation of MMP-2 through the p38 MAPK-NF-kappaB-dependent pathway by aloe-emodin leads to inhibition of nasopharyngeal carcinoma cell invasion. Mol Carcinog, 49, 783-97.

Liotta LA, Wewer U, Rao NC, Schiffmann E, Stracke M, Guirguis R, Thorgeirsson U, Muschel R, Sobel M, 1987. Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastasis. Anticancer Drug Des, 2, 195-202.

Loos M, Kleeff J, Friess H, Büchler MW, 2008. Surgical treatment of pancreatic cancer. Ann N Y Acad Sci, 1138, 169-80.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC, 1997. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. J Natl Cancer Inst, 89, 442-6.

Lowery M, O'Reilly E, 2012. Dx/Rx: Pancreatic Cancer. Ed: Shah MA. USA, Jones & Bartlett Learning.

Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J, 2005. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. Neoplasia, 7, 17–23.

Luo J, Margolis KL, Adami HO, LaCroix A, Ye W, 2008. Obesity and risk of pancreatic cancer among postmenopausal women: the Women's Health Initiative (United States). Br J Cancer, 527–31.

Lygidakis NJ, Jain S, Sacchi M, Vrachnos P, 2005. Adenocarcinoma of the pancreas: past, present and future. Hepatogastroenterology, 52, 1281–92.

Lynch HT, Lanspa SJ, Fitzgibbons RJ Jr, Smyrk T, Fitzsimmons ML, McClellan J. Familial pancreatic cancer (Part 1): Genetic pathology review, 1989. Nebr Med J 74, 109-12.

Mahalingam D, Kelly KR, Swords RT, Carew J, Nawrocki ST, Giles FJ, 2009. Emerging drugs in the treatment of pancreatic cancer. Expert Opin Emerg Drugs, 14, 311-28.

Mahlamaki EH, Hoglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi OP, Johansson B, 1997. Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. Genes Chromosomes Cancer, 20, 383-91.

Maire F, Hammel P, Terris B, 2002. Intraductal papillary and mucinous pancreatic tumour: A new extracolonic tumour in familial adenomatous polyposis. Gut, 51, 446–49.

Manu KA, Shanmugam MK, Rajendran P, Li F, Ramachandran L, Hay HS, Kannaiyan R, Swamy SN, Vali S, Kapoor S, Ramesh B, Bist P, Koay ES, Lim LH, Ahn KS, Kumar AP, Sethi G, 2011. Plumbagin inhibits invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4. Mol Cancer, 1, 10-107.

Mathew A, Peters U, Chatterjee N, Kulldorff M, Sinha R, 2004. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. Int J Cancer, 108, 287–292.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA, 2007. Roles of the Raf/MEK/ ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochimica et Biophysica Acta, 1773, 1263–84.

Menteş, 1976. Klinik Gastroentoroloji. 3. Baskı. İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 475s.

Min R, Zun Z, Min Y, Wenhu D, Wenjun Y, Chenping Z, 2011. Shikonin inhibits tumor invasion via down-regulation of NF-κB-mediated MMP-9 expression in human ACC-M cells .Oral Dis, 17, 362-9.

Moniri MR, Dai LJ, Warnock GL, 2014. The challenge of pancreatic cancer therapy and novel treatment strategy using engineered mesenchymal stem cells. Cancer Gene Ther, 21, 12-23.

Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Klöppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Löhr M, Scarpa A, 2001. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines: analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. Virchows Arch, 439, 798–802.

Moossa AR, Gamagami RA, 1995. Diagnosis and staging of pancreatic neoplasms. Surg Clin North Am, 75, 871-90.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 410, 50-6.

Müller MF, Meyenberger C, Bertschinger P, Schaer R, Marincek B, 1994. Pancreatic tumors: evaluation with endoscopic US, CT, and MR imaging. Radiology, 190, 745-51.

Nagase H, Visse R, Murphy G, 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res, 69, 562–73.

Neglia JP, FitzSimmons SC, Maisonneuve P, Schöni MH, Schöni-Affolter F, Corey M, Lowenfels AB, 1995. The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. N Engl J Med, 332, 494-9.

Nishida N, Yano H, Nishida T,Kamura T, Kojiro M, 2006. Angiogenesis in cancer. Vasc Health Risk Manag, 2, 213–219.

Nkondjock A, Krewski D, Johnson KC, Ghadirian P, 2005. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer. Int J Cancer, 114, 817-23.

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H, 1992. Matrix metallprioteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem, 267, 3581-4.

Okada TA, Roberts E, Brodie AF, 1967. Mitotic abnormalities produced by juglone in Ehrlich ascites tumor cells. Proc Soc Exp Biol Med, 126, 583–8.

Olson SH, Chou JF, Ludwig E, O'Reilly E, Allen PJ, Jarnagin WR, Bayuga S, Simon J, Gonen M, Reisacher WR, Kurtz RC, 2010. Allergies, obesity, other risk factors and survival from pancreatic cancer. Int J Cancer, 127: 2412-9.

Ordonez R, Carbajo-Pescador S, Prieto-Dominguez N, García-Palomo A, González-Gallego J, Mauriz JL, 2014. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. J Pineal Res, 56, 20-30.

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R, 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. J Cell Sci, 112, 1237-45.

Overall CM, 2002. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. Mol Biotechnol, 22, 51-86.

Padhye S, Banerjee S, Chavan D, Pandye S, Swamy KV, Ali S, Li J, Dou QP, Sarkar FH, 2009. Fluorocurcumins as cyclooxygenase-2 inhibitor: molecular docking, pharmacokinetics and tissue distribution in mice. Pharmaceutical Research, 26:2438–2445.

Pai M, Spalding D, 2015. Pancreatic cancer. Medicine.

Perek S, 2002. Pankreas kanseri. İ.Ü. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinleri, 28, 215-30.

Pierantoni C, Pagliacci A, Scartozzi M, Berardi R, 2008. Pancreatic cancer: Progress in cancer therapy. Crit Rev Oncol Hematol, 67, 27–38.

Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C, 2003. Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. Nat Rev Genet, 4, 544-558.

Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS, 1995. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. Cancer Res, 55, 4575-80.

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD, 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharmacol Ther, 99, 1–13.

Reel B, 2006. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. Türkiye Klinikleri J Med, 26, 527–37.

Roomi MW, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M, 2005. Antitumor effect of a combination of lysine, proline, arginine, ascorbic acid, and green tea extract on pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. Int J Gastrointest Cancer, 35, 97-102.

Roskoski Jr. R, 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. Crit Rev Oncol Hematol, 62, 179-213.

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Adachi Y, Takagi H, Matsumoto T, Itoh H, Nagakawa T, Miyakawa H, Muraoka S, Fujinaga A, Suga T, Satoh M, Itoh F, Endo T, Imai K, 2003. Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. Oncol Rep, 10, 21-5.

Rovasio AR, 2010. Development and structure of the pancreas. In: Pancreatic cancer. Eds: Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese M, Büchler M, 1th ed. USA: Springer, p. 27-38.

Sahu RP, Srivastava SK. The role of STAT-3 in the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by benzyl isothiocyanate. Journal of the National Cancer Institute.2009;101:176–193.

Sakorafas GH, Smyrniotis V, 2012. Molecular biology of pancreatic cancer: how useful is it in clinical practice? JOP,13, 332-7.

Salvia R, Fernández-del Castillo C, Bassi C, Thayer SP, Falconi M, Mantovani W, Pederzoli P, Warshaw AL, 2004. Main-duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical predictors of malignancy and long-term survival following resection. Ann Surg, 239, 678–85.

Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S, 1993. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. Am J Pathol, 142, 1534–43.

Schleger C, Arens N, Zentgraf H, Bleyl U, Verbeke C, 2000. Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (CGH). J Pathol, 19, 27-32.

Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM, 2005. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. Gastroenterology, 128, 1606–25.

Schonleben F, Qiu W, Remotti HE, Hohenberger W, Su GH, 2008. PIK3CA, KRAS, and BRAF mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/C) of the pancreas. Langenbecks Arch Surg, 393, 289–96.

Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, Sidransky D, Casero RA Jr, Meltzer PS, Hahn SA, Kern SE, 1996. DPC4 gene in various tumor types. Cancer Res, 56, 2527–30.

Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R, 1999. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. Allergy Clin Immunol, 104, 983-9.

Shi X, Friess H, Kleeff J, Ozawa F, Buchler MW, 2001. Pancreatic cancer: Factors regulating tumor development, maintenance and metastasis. Pancreatology, 1, 517-24.

Shieh JM1, Chiang TA, Chang WT, Chao CH, Lee YC, Huang GY, Shih YX, Shih YW.Plumbagin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions by reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1 via ERK signaling pathway in A549 human lung cancer cells.Mol Cell Biochem. 2010 Feb;335(1-2):181-93.

Shih YW, Lee YC, Wu PF, Lee YB, Chiang TA, 2009. Plumbagin inhibits invasion and migration of liver cancer HepG2 cells by decreasing productions of matrix metalloproteinase-2 and urokinase-plasminogen activator. Hepatol Res, 39, 998-1009.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A, 2014. Cancer Statistics, 2014. CA Cancer J Clin, 64, 9-29.

Silva BM, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA, 2004. Quince (Cydonia oblonga Miller) seed (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. J Agr Food Chem, 52, 4405–4712.

Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, Swanson GM, Schiffman M, Greenberg RS, Hayes RB, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Schwartz AG, Liff J, Pottern LM, Fraumeni JF Jr, 2003. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? Epidemiology, 2003; 14, 45-54.

Singh D, Upadhyay G, Srivastava RK, Shankar S, 2015. Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention. Biochim Biophys Acta, 1856, 13-27.

Slack JM, 1995. Developmental biology of the pancreas. Development, 121, 1569-80.

Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, Chia J, Moseley JM, Hards DK, Anderson RL, 2006. Tumor-specific expression of $\alpha v\beta_3$ integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. Breast Cancer Res, 8, 1–14.

Smith AP, Hoek K, Becker D, 2005. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/ melanoma in situ and advanced-stage melanomas. Cancer Biol Ther, 4, 1018-29.

Su GH, Hruban RH, Bansal RK, 1999. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. Am J Pathol, 154, 1835–40.

Sugie S, Okamoto K, Rahman KM, Tanaka T, Kawai K, Yamahara J, Mori H, 1998. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. Cancer Lett, 127, 177–83.

Şimşek H, 1993. Pankreasın yapısı ve konjenital anomaliler. In: Gastroenteroloji. Eds: Telatar H, Şimşek H. Ankara: Hekimler Yayı Birliği, s. 917-23.

Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, Yoshida H, Machinami R, Kishi K, Omata M, 1996. Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. Gastroenterology, 110, 227–31

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, 1999. Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. Am J Gastroenterol, 94, 1253-60.

Tempia-Caliera AA, Horvath LZ, Zimmermann A, Tihanyi TT, Korc M, Friess H, 2002. Adhesion molecules in human pancreatic cancer. J Surg Oncol, 79, 93-100.

Tewari N, Lobo DN, 2013. Pancreatic cancer. Surgery, 31, 286-94.

Thakur A, 2011. Juglone: A therapeutic phytochemical from Juglans regia L. JMPR, 5, 5324-30.

Tian M, Cui YZ, Song GH, Zong MJ, Zhou XY, Chen Y, Han JX, 2008. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. BMC Cancer, 2008; 241, 1-11.

Tsai PC, Chu CL, Fu YS, Tseng CH, Chen YL, Chang LS, Lin SR, 2014. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione inhibits MDA-MB-231 cell migration and invasion by suppressing Src-mediated signaling pathways. Mol Cell Biochem, 387, 101-11.

Tsai PC, Chu CL, Tseng CH, Chen YL, Chang LS, Lin SR, 2014. Inhibitory action of naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione on hepatocyte growth factor-induced migration and invasion of MDA-MB-231 cells: mechanisms of action. Clin Exp Pharmacol Physiol, 41, 716-26.

Ueki T, Walter KM, Skinner H, Jaffee E, Hruban RH, Goggins M, 2002. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived. Oncogene, 21, 211-47.

Valls C, Andía E, Sanchez A, Fabregat J, Pozuelo O, Quintero JC, Serrano T, Garcia-Borobia F, Jorba R, 2002. Dual-phase helical CT of pancreatic adenocarcinoma: assessment of resectability before surgery. AJR Am J Roentgenol, 178, 821-6.

Van Hinsbergh VW, Koolwijk P, 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. Cardiovasc Res, 78, 203-12.

Vogelstein B, Kinzler KW, 2004. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med, 10, 789–99.

Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, Korn RL, Desai N, Trieu V, Iglesias JL, Zhang H, Soon-Shiong P, Shi T, Rajeshkumar NV, Maitra A, Hidalgo M, 2011. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. J Clin Oncol, 29, 4548–54.

Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW, 2004. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. Br J Surg, 91, 586-94.

Wang J, Miao LJ, Wu YM, Wu YJ, Wang XC, 2006. Expression of AKT2, Cyclin D1, and MMP-9 and Their Correlations to Clinicopathologic Features of Non-small Cell Lung Cancer. Ai Zheng, 25, 69-72.

Wang Y, 2001. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. Med Res Rev, 21, 146-7.0

Wang Z, Ahmad A, Banerjee S, Azmi A, Kong D, Li Y, Sarkar FH, 2010. FoxM1 is a novel target of a natural agent in pancreatic cancer. Pharm Res, 27, 1159-68.

Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH, 2006. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. Cancer, 106, 2503–13.

Wilde RF, Hruban RH, Maitra A, 2012. Reporting precursors to invasive pancreatic cancer: pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal neoplasms and mucinous cystic neoplasm. Diagn Histopathol, 18, 17–30.

Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH, 2000. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. Cancer Res, 60, 2002–6.

Windsor J, 2012. Anatomy and physiology of pancreas. Scientific American Surgery, 1-14.

Xu H, Yu X, Qu S, Sui D, 2013. Juglone, isolated from Juglans mandshurica Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23, 3631–4.

Xu HL, Yu XF, Qu SC, Zhang R, Qu XR, Chen YP, Ma XY, Sui DY, 2010. Anti-proliferative effect of Juglone from Juglans mandshurica Maxim on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway. Eur J Pharmacol, 645, 14-22.

Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML, 2013. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. Physiology (Bethesda), 28, 391-403.

Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Fukushima H, Sasaki S, Perucho M, Imai K, 2001. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. Cancer Res, 61, 3139-44.

Yang L, 2012. Effects of Juglone on Adhesion and Activities of Matrix Metalloproteinases in Human Colon Carcinoma HCT-8Cells. Master's thesis.

Yokoyama M, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Shinji T, Koide N, Tsurumi T, Hasuoka H, Harada M, 2002. Matrix metalloproteinase-2 in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer. Pancreas, 24, 344-7.

Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, 1999. Mucinous cystic tumors of the pancreas: Clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. Am J Surg Pathol, 1999, 23, 410–22.

Zhao LZ, Chen S, Fang Q, Zhang D, Zhu YP, Fang F, 2014. Effect of Juglone on Migration of Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells. Advanced Materials Research, 912, 1911-4.

Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R, 2010. Matrix metalloproteinases. Curr Med Chem, 17, 3751-68.

Zucker S, Hymowitz M, Conner C, DeClerck Y, Cao J, 2004. TIMP-2 is released as an intact molecule following binding to MT1-MMP on the cell surface. Exp Cell Res, 293,164-74.

7. EKLER

Ek-A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2015/9	Toplantı Tarihi : 12.05.2015

Karar Sayısı 2015/172 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Hilal ARIKOĞLU'nun, "Juglonun BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Değerlendirilmesi, İnvazyon ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 07.05.2015 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Hilal ARIKOĞLU'nun, "Juglonun BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Değerlendirilmesi, İnvazyon ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması" adlı araştırmanın kabulüne oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
12/05/2015
Mahmut KESİK
Sekreterya

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Sarıkamış'da doğdu. İlk öğrenimini Manisa Ahmet Tütüncüoğlu İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimini Nazilli Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı, 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Yüksek lisans eğitimi alması için Selçuk Üniversite'sine görevlendirildi. Halen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.