T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN PANC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Aycan AŞIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN PANC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Aycan AŞIK

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-093 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez aşaması sürecinde bilgi birikimi ve katkılarıyla desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Hilal ARIKOĞLU'na,

Tez süresince desteklerini eksik etmeyen sayın hocam Öğr. Gör. Dr. Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Deneysel çalışmalarda yardımlarını eksik etmeyen ve tez çalışmam süresince bana yol arkadaşlığı yapan değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Ebru AVCI'ya,

Biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerde yardımcı olan sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Esma MENEVŞE ve Uzm. Dr. Duygu DURSUNOĞLU'na,

Hayatım boyunca her anımda yanımda olarak beni yalnız bırakmayan canım aileme,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

1. GİRİŞ 1

1.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri Gelişimi 1

1.1.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi 4

1.1.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri 5

1.1.3. Pankreas Kanserinin Moleküler Patolojisi 9

1.1.4. Klinik Tablo 12

1.1.5. Tanı 13

1.1.6. Pankreas Kanserinde Evreleme 15

1.1.7. Tedavi 16

1.2. Juglon 18

1.3. Apoptoz 19

1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Apoptozla İlişkisi 26

2. GEREÇ VE YÖNTEM 29

2.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler 29

2.1.1. Kullanılan Cihazlar 29

2.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler 29

2.2. Hücre Kültürü 30

2.2.1. Hücrelerin Dondurulması 31

2.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi 31

2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması 31

2.3. Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması 32

2.4. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 32

2.5. Gen İfadeleri Analizleri 33

2.5.1. Total RNA izolasyonu 33

2.5.2. cDNA Sentezi 34

2.5.3. PCR 34

2.6. Apoptoz Tayini 36

2.7. MnSOD Protein Analizi 36

2.7.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması 37

2.7.2. Bisinkoninik Asit (BCA) Protein Tayini 37
2.7.3. MnSOD Protein Analizi 38
2.8. İstatistiksel Analiz 38
3. BULGULAR 39
3.1. PANC-1 Hücre Morfolojisi 39
3.2. Juglonun Sitotoksik Etkisi 39
3.3. Juglonun *casp-3* ve *apaf-1* Genlerinin İfadeleri Üzerindeki Etkisi 40
3.4. Juglonun Apoptotik Etkisi 41
3.5. Juglonun MnSOD Protein Düzeyine Etkisi 45
4. TARTIŞMA 46
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 54
6. KAYNAKLAR 56
7. EKLER 63
Ek-A: Etik Kurul Kararı 63
8. ÖZGEÇMİŞ 64

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
AIF	Apoptoz Uyarıcı Faktör
AJCC	Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
ALP	Alkalen Fosfataz
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Bölge-1
AT	Ataksi telanjektazi
ATCC	American Type Culture Collection
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CA 19-9	Karbonhidrat Antijen 19-9
CAD	Kaspaz Aktiviteli DNaz
CARD	Kaspaz Toplayıcı Bölge
CEACAM-1	Karsinoembriyonik Antijen-ilişkili Hücre Adezyon Molekülü 1
DD	Ölüm Bölgesi
DED	Ölüm Efektör Bölgesi
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbacco'nun Fosfat Tamponlu Suyu
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERCP	Endoskobik Retrograd Kolanjiopankreatografi
EUS	Endoskobik Ultrasonografi
FAMMM	Ailesel Atipik Multiple Mole-melanom
FAP	Ailesel Adenomatöz Polipozis
FBS	Fetal Sığır Serumu
GGT	Gama-glutamil Transferaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GST	Glutatyon-S Transferaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HBOC	Kalıtsal Meme ve Over Kanseri
HNPCC	Kalıtsal Non-polipozis Kolorektal Kanser
HO-1	Hem Oksijenaz-1
HP	Kalıtsal Pankreatit
IAP	Apoptoz İnhibitör Protein

IPMN	İntraduktal Papiler Musinöz Neoplazi
MAPK	Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz
MCN	Musinöz Kistik Neoplazi
MIC-1	Makrofaj İnhibitör Sitokin-1
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NQO1	NADP(H) Kinon Oksidoreduktaz
PanIN	Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi
PBS	Fosfat Tamponlu Su
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PJS	Peutz-Jeghers Sendromu
PP	Pankreatik Polipeptit
qPCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksid Redüktaz
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
US	Ultrasonografi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKİ	Vücut Kitle İndeksi

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Juglonun PANC-1 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler Ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması

Aycan AŞIK

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2015

Agresif ve malign özelliği yüksek olan pankreas kanseri, erken tanısının zor olması ve hızlı metastaz kabiliyeti ile ölüm oranı yüksek olan ciddi bir hastalıktır. Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi pankreas kanserinde de temel tedavisel yaklaşım kemoterapik ve radyoterapik uygulamalar olmakla birlikte kanser hücrelerinde oluşan direnç mekanizması tedaviyi başarısız kılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar, çeşitli fitokimyasal maddelerin kanser hücreleri üzerindeki antikanser özelliklerinin incelenmesi üzerine yoğunlaşmış ve bu maddelerin tamamlayıcı ya da alternatif terapötik ajan olarak kullanılabilecekleri öne sürülmüştür. Önemli bir fitokimyasal bileşik olan juglonun çeşitli kanser tiplerinde sitotoksik etkilerinin ve apoptozu uyarıcı etkilerinin gösterilmiş olması ile birlikte pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkisini gösteren bir literatür bilgisi yoktur. Çalışmamızda juglonun PANC-1 insan pankreas kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Amacımız doğrultusunda juglonun sitotoksik etkisini belirlemek için MTT testi yapılmış ve 24 saat için IC50 değeri 21,25 μM olarak bulunmuştur. Juglonun apoptotik etkisi Anneksin V/FITC yöntemi ile sitokimyasal olarak belirlenmiştir. qPCR yöntemi sonucu juglonun apoptotik moleküller olan kaspaz-3 ve apaf-1 gen ifadelerini arttırdığı tespit edilerek juglonun apoptotik etkisinin mitokondriyal apoptotik yolakla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hücreledeki apoptotik etkisini ROS üretimi aracılığıyla gösterdiği ifade edilen juglonun, ELISA yöntemi ile hücresel redoks homeostazisinin önemli düzenleyicilerinden antioksidan enzim MnSOD'un protein düzeyi üzerindeki konsantrasyon farklılığına bağlı olarak zıt etki gösterdiği bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda juglonun apoptotik mekanizması hakkında mevcut literatür bilgilerine katkı sağlanmış olmakla birlikte juglonun PANC-1 hücrelerindeki gösterdiği apoptotik ve sitotoksik etkiler nedeniyle pankreas kanserine karşı yürütülen savaşta bir terapötik ajan adayı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz; Juglon; MnSOD; PANC-1; Pankreas Kanseri

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigationf of The Cytotoxic and Apoptotic Effects of Juglone in PANC-1 Pancreatic Cancer Cells with Molecular and Immunohistochemical Methods

Aycan AŞIK

Department of Medical Biology

MASTER THESIS/KONYA-2015

Pancreatic cancer with high agressive and malignant feature, is a serious disease which has a high mortality rate because of early diagnosis difficulty and rapid metastasis capability. Basic therapeutic approaches in the pancreatic cancer as in other types of cancer are chemotherapeutic and radiotherapeutic applications, however, resistance mechanisms developed in cancer cells minimize the success of the current therapies. In recent years, studies have been focused on investigating the anticancer features of various of phytochemical compounds in cancer cells and suggest that this compounds can be used as complementary or alternative therapeutic agents. Juglone which is an important phytochemical compound has been showed to have cytotoxic and apoptotic effects on several types of cancer, however, there is not any literature data that presents the effect of juglone on pancreatic cancer cells. In our study, we aimed to investigate the apoptotic and cytotoxic effects of juglone on PANC-1 human pancreatic cancer cell line. MTT assay was done to determine cytotoxic effect of juglone and IC50 value was found as 21.25 μM for 24 hours. Apoptotic effect of juglone was determined cytochemically with Annexin V/FITC method. We showed that the apoptotic effect of juglone is related with mitochondrial apoptotic pathway by determining the increased expressions of apoptotic molecules caspase-3 and apaf-1 using qPCR technique. We found that juglone, suggested to show its apoptotic effects through ROS production, has antagonistic effect on protein levels of antioxidan enzyme MnSOD, an important regulator of cellular redox homeostasis, depending on differences of juglon concentration by ELISA method. By this study, juglone is suggested as a candidate therapeutic agent in the battle against the pancreatic cancer due to its apoptotic and cytotoxic effects on PANC-1 cells determined in our study as well as our contributions to current literature about the apoptotic mechanism of juglone.

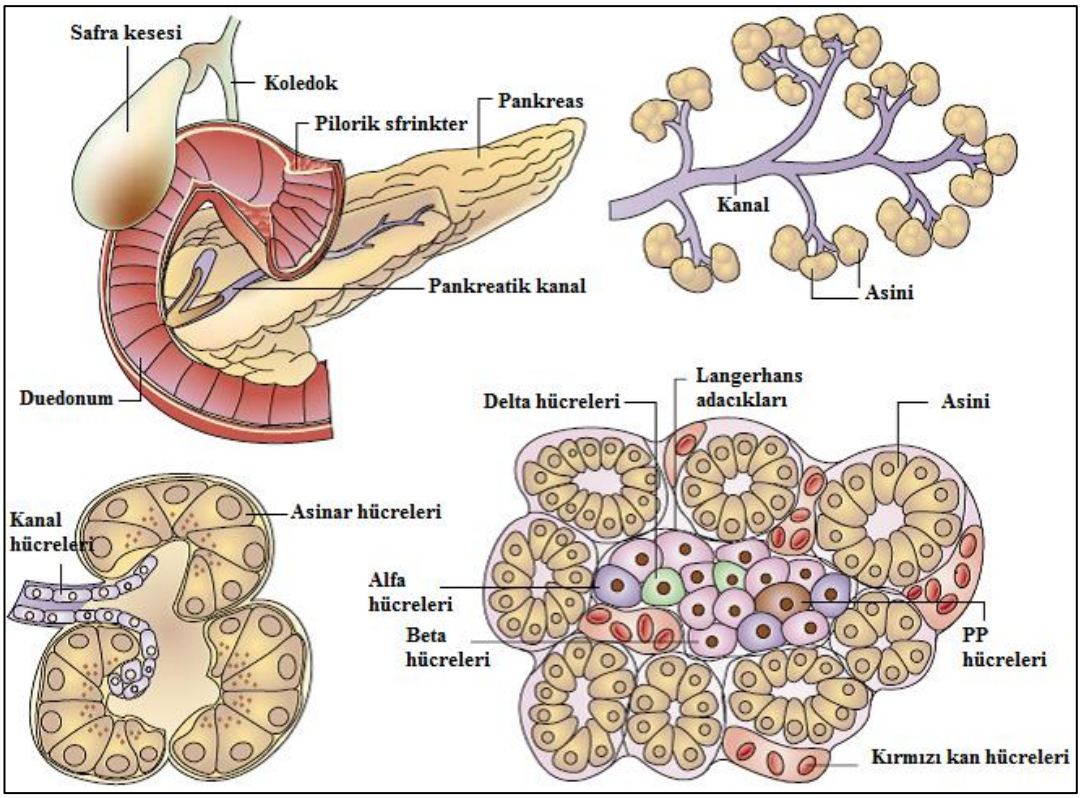
Key words: Apoptosis; Juglon; MnSOD; PANC-1; Pancreatic Cancer

1. GİRİŞ

1.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri Gelişimi

Pankreas, ikinci ve üçüncü lomber vertebralar arasında yer alan, kabaca şekli çekice benzeyen sarımtırak renkli, yetişkinlerde 14-20 cm uzunluğunda ve ortalama 100 gr ağırlığında olan retroperitoneal bir organdır (Campbell ve Verbeke 2013). Anatomik olarak baş, gövde ve kuyruk kısımlarından oluşmaktadır. Pankreas başı, en büyük çapa sahip kısım olup duedonumun yaptığı yay içine yerleşiktir (Şekil 1.1). Pankreas, baş kısmı tarafında koledok kanalının etrafını sarmıştır ve duedonuma yapışık olarak bulunur. Arka yüzü vena kava inferiyor, böbrek venleri ve sağ böbrek arterine dayanır. Ön yüzü peritonla örtülüdür. Midenin antral kısmı, transvers kolon, karaciğer ve ince bağırsakla komşudur. Pankreas gövde ve kuyruğu, arkada aorta, superiyor mezenterik damarlar, sol böbrek ve böbreküstü bezi ile komşuluk yapar. Pankreasın kuyruğu dalağın hilusuna kadar uzanır. Dalak damarları pankreas kuyruğunun üst kısmı içinde bulunur. Kuyruk kısmı ile mide arasında küçük periton boşluğu vardır (Menteş 1976).

Pankreas işlevlerine göre endokrin ve ekzokrin pankreas olarak ikiye ayrılan lobüler yapılı, sindirim ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili salgılama işlevli bir organdır. Ekzokrin salgı, asinar hücreler ve duktal hücreler tarafından üretilir. Asinar hücreler, pankreas enzimlerinin salgılamasından sorumludur ve ekzokrin pankreasın enzim salgılayan birimi olan asiniyi oluşturur (Şekil 1.1). Duktal hücreler, esas olarak, su ve elektrolit salgılanmasından sorumludur (Şimşek 1993). Endokrin hücreler, ekzokrin dokuya sıkı bir şekilde gömülü halde bulunan Langerhans adacıkları şeklinde gruplanmıştır. Langerhans adacıkları başlıca 4 tip hücreden oluşmuştur; Beta (β), Alfa (α), Delta (δ) ve Pankreatik polipeptit (PP) hücreleri. β-hücreleri, insülin ve amilin olarak adlandırılan bir insülin antagonisti salgılar ve bu hücreler büyük Langerhans adacık hücrelerinin çoğunluğunu oluşturur. α hücreleri glukagon salgılar, δ hücreleri somatostatin salgılar ve PP hücreleri pankreatik polipeptit salgılar (Slack 1995).



Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı ve pankreatik hücreler (Bardeesy ve DePinho 2002).

Pankreas kanseri, büyük çoğunluğu (%95) ekzokrin pankreas, kalan kısmı ise (%5) endokrin panreastan köken alan her türlü malign neoplazmalardır. Ekzokrin kökenli pankreas kanserlerin en yaygın tipi pankreatik duktal epitelyumu örten hücrelerden kaynaklanan ve tüm pakreas kanserlerinin %85'ini oluşturan duktal adenokarsinomlardır (DiMaio 2015). İnvaziv özellikteki pankreastik duktal adenokarsinomların, invaziv olmayan öncü lezyonlardan geliştiği bilinmektedir; başlıca önzü lezyonlar pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiler musinöz neoplazi (IPMN) ve musinöz kistik neoplazi (MCN)'dir (Yonezava ve ark 2008).

Pankreas kanserinin en önemli ve en iyi bilinen öncü lezyonu PanIN, küçük intralobüler pankreatik kanallarda ortaya çıkan sitolojik ve yapısal olarak değişkenlik gösteren invaziv olmayan mikroskobik (genellikle 5 mm'den küçük) epitelyal neoplazilerdir. İnsidansı yaşla birlikte artan ve kuyruktan çok pankreasın baş kısmında yaygın olarak yerleşim gösteren bu lezyonlarda, normal düz kübik epitel yapı değişime uğramıştır. Epitelyal atipi derecesine göre üç gruba ayrılır; PanIN-1 (minimal atipi), PanIN-2 (orta atipi) ve PanIN-3 (yüksek atipi) (Hruban ve ark 2007, Distler ve ark 2014). Silindirik epitel hücreli PanIN-1 kendi içinde düz tip PanIN-1A

ve papiller tip PanIN-1B olarak iki alt gruba ayrılır. Papiller yapıdaki PanIN-2'de yalancı çok katlı epitel hücreler bulunur. PanIN-3'de, kribriform ve papiller yapılar oluşmuştur ve bazı durumlarda hücre kümeleri kanal lümenine tomurcuklanmıştır (Hruban ve ark 2008). PanIN-1 ve PanIN-2 %60 ya da daha fazla karsinomlu yapılarda bulunmakla birlikte normal pankreatik yapıda da yaygın olarak bulunabildiklerinden klinik olarak önemsiz sayılmakta, PanIN-3 ise karsinomsuz durumlarda çok nadir iken invaziv karsinomlu durumlarda çok yaygın olarak bulunmaktadır ve bu nedenle klinik önemi büyüktür; ayrıca bu lezyon grupları, farklı histopatolojik yapıya sahip oldukları gibi genetik değişim derecelerine göre moleküler patolojilerinde de farklılık bulunmaktadır (Reid ve ark 2013, Distler ve ark 2014).

Son yıllarda insidans artışı gösteren pankreasın kistik lezyonlarının heterojen grupları içerisinde olan IPMN'ler, genellikle uzun parmak benzeri papiller formunda oldukça büyük invaziv olmayan yapıdaki müsin üreten epitelyal neoplazilerdir. Kuyruktan ziyade sıklıkla pankreas başında ortaya çıkmakla birlikte, boyutu çoğunlukla 1 cm'den büyüktür (Hruban ve ark 2007, Distler ve ark 2014). Papiller oluşumu, müsin sekresyonu, kanal genişlemesi (kist oluşumu) ve displazi dereceleri değişkenlik gösterir. IPMN'ler müsinöz kistik neoplazilerde karakterize edilen "over-tipi" hiperselüler periduktal stromadan yoksundur. Displazi derecelerine ve invaziv karsinomla bir ilişkisinin olup olmamasına göre düşük, orta, yüksek dereceli displazi ve invaziv karsinom displazi olarak sınıflandırılır (Capella ve ark 2011). Morfolojik olarak, köken aldıkları bölgelere göre ana duktal tip (MD-IPMN) branşiyal duktal tip (BD-IPMN) olarak alt gruplara ayrılır; kombine duktal tip denen hem ana hem de branşiyal kanalın gözlendiği durumlar da vardır. Histolojik yapıları ve immünohistokimyasal boyanma özeliklerine göre de gastrik, intestinal, pankreatobiliyer ve onkositik alt tiplerine ayrılır. Gastrik tip, branşiyal duktal kökenli iken diğerleri ana duktal kökenlidir (Distler ve ark 2014).

MCN'ler, hücrelerin müsin üreten epitelyal tabakalarında ortaya çıkan ve kadınlarda erkeklere nazaran çok daha fazla görülen, pankreasın ayırıcı over-tip stromalı musinöz kistik tümörleridir (Hruban ve ark 2007). Diğer lezyonlara kıyasla çok nadir görülen ve pankreatik kanallarla bağlantısı olmayan bu lezyonlar, pankreasın gövde ve kuyruk kısmında yerşleşim göstermektedir (Distler ve ark

2014). Çok geniş çapta büyüme eğiliminde olan MCN'ler boyutları ortalama 6-10 cm olmakla birlikte 2-35 cm aralığında değişmektedir (Brosens ve Offerhaus 2013). Histolojik yapılar incelendiğinde MCN'ler, silindirik hücrelerden oluşan çeşitli derecede displazili epitelyal yapı görülmekte ve dispalazi derecelerine göre düşük, orta ve ileri MCN olarak sınıflandırılmaktadır. MCN'lerin yaklaşık 3'de 1'i genellikle duktal adenokarsinomları oluşturmak üzere invaziv hale gelebilir; buna rağmen bu lezyonlar non-invaziz (invaziv olmayan) olarak tanımlanırlar (Distler ve ark 2014).

1.1.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri batı dünyasındaki en sık görülen ikinci gastrointestinal kanser olmakla birlikte insan solid kanserlerinin en ölümcüllerinden biridir. Diğer malignitelere kıyasla pankreas kanserini öne çıkartan durum, iyileştirilmiş sağkalım açısından son on yıl içerisinde klinik ilerlemenin eksikliğidir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %5'in altındadır (Søreide ve Sund 2015).

Kötü seyir özelliği gösteren pankreas kanseri, dünya çapında yılda 331.000 kişinin ölümünden sorumlu olarak kansere bağlı ölüm nedeni ile yedinci, görülme sıklığı olarak da on ikinci sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark 2013). Amerika'da pankreas kanseri insidansı 2007'ye kadar son on yılda yavaş bir artış, 2007'den 2011'e kadar ise sabit bir oran göstermişken, günümüze değin ölüm oranı yılda %0,3 oranında hafif bir artış göstermiştir. Ayrıca 2015 yılında tahminen 48 960 yeni pankreatik kanser vakasının olacağı ve tahminen 19 850'si kadın ve 20 710 erkek olmak üzere 40 560 ölüm beklenmektedir (American Cancer Society 2015). Avrupa Birliği ülkelerinde pankreas kanseri insidans oranı erkeklerde 8,2/100 000 kadınlarda ise 5,6/100 000'dir. 2009-2015 yılları arasına bakıldığında erkeklerde %4 ve kadınlarda %5 artış göstermesi ve ölüm oranı ile her iki cinste de olumsuz bir durum sergilemesi ile birlikte; 2015 yılında tahmin edilen tüm kanser ölümlerinin %6'sını oluşturacak şekilde pankreas kanserinden 85 300 ölüm beklenmektedir (Malvezzi ve ark 2015). GLOBOCAN-2012 verilerine göre ülkemizde pankreatik kanser insidans oranı erkeklerde 6,1 (10. sırada), kadınlarda 3,1 (14. sırada); ölüm oranı ise erkeklerde 6, kadınlarda 2,9'dur (Ferlay ve ark 2013).

1.1.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, risk artışıyla ilişkili olduğu bilinen birkaç faktör mevcuttur (Muniraj ve ark 2013).

Sigara

Sigaranın pankreas kanseri ile ilişkisi, akciğer kanseri ile olduğu kadar güçlü bir ilişki olmamakla birlikte; sigara, pankreas kanserine yol açan en önemli çevresel faktörlerden biri olarak ifade edilmektedir (Maisonneuve ve Lowenfels 2010). Pankreas kanserlerinin yaklaşık %25'inde sorumlu olduğu bilinmekle birlikte, sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla yaklaşık 2,2 kat artmış risk bulunmaktadır (Wolfgang ve ark 2013). Risk oranları cinsiyet ve popülasyon farklılıkları nedeniyle sapmalar gösterebilir. Sigara içmeyi bırakmış kişilerde 15-20 yıl içerisinde kanser riski sigara içmeyenlerin seviyesine iniş göstermektedir (Becker ve ark 2014). Pasif içicilik ise zayıf ve önemsiz sayılabilecek bir risk artışına neden olmaktadır (Lowenfels ve Maisonneuve 2006). Kansere yol açan nedenlerin sigara dumanındaki nitrozamin gibi karsinojen bileşiklerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Jiao ve Li 2010) .

Alkol

Özafagus, karaciğer gibi bazı organlar için kesin risk faktörü olan alkolün, pankreas kanseri ile ilişkisi şüphesini korumakla birlikte; alkol tüketim düzeyine göre kanser riski değişkenlik göstermektedir (Maisonneuve ve Lowenfels 2010, Wörmann ve Algül 2013). Düşük ve orta seviyede alkol tüketimi, bir risk artışına neden olmazken, günde 30 gr ya da daha fazla olmak üzere ağır alkol tüketiminin yaklaşık %22 oranında pankreas kanseri risk artışına yol açabileceği belirtilmiştir (Maisonneuve ve Lowenfels 2010). Bir kanserojen olan asetaldehit, yağ asidi etil esterleri ve etanolün kendisi olmak üzere alkolik metabolitlerin pankreas inflamasyonuna neden olarak dolaylı bir şekilde ya da doğrudan karsinogeneze katkıda bulunabildiği ifade edilmektedir (Becker ve ark 2014).

Yaş

Pankreas kanseri insidansı ve ölüm oranı, ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır (Muniraj ve ark 2013). Yaşamın ilk 30 yılında çok nadir görülmekle birlikte 30 yaşından sonra insidans artışı başlar ve %80 teşhis oranıyla 70-80 yaşlarında

pankreas kanseri insidansı pik yapmış durumdadır (Zavoral ve ark 2011). 50 yaşından önce pankreas kanseri teşhisi %10'dur; bu genç hasta grubunun pankreas kanserine yakalanmasının altta yatan nedeni yüksek oranda genetik bozukluktan kaynaklı olabileceği de belirtilmiştir (Pandol ve ark 2012).

Etnik köken

Pankreas kanseri risk faktörü olarak etnik köken farklılıkları incelendiğinde en yüksek insidans Afro-Amerikalılar, Kuzey Avrupa halkı, Polinezyalılar ve Yeni Zelenda Maori halkında görülmektedir (Zavoral ve ark 2011). ABD'de Afro-Amerikan nüfusunun ölüm oranı Kafkas nüfusundan 1,4 kat daha fazladır (Zavoral ve ark 2011, Muniraj ve ark 2013).

Beslenme biçimi ve obezite

Doymuş yağlardan zengin beslenme, pankreas kanseri insidansıyla gösterdiği pozitif korelasyon ile kabul gören bir risk faktörüdür (Krejs 2010). Kesin olmamakla birlikte kırmızı etin (kızartılmış ya da kavrulmuş) de pankreas kanseri riskini arttırabileceği belirtilmiştir (Zavoral ve ark 2011). Taze meyve ve sebze tüketiminin kanser riskini azalttığı, omega-3 yağ asidi içeren besin tüketimi ve kesin olmamakla birlikte folat'ın pankreas kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Zavoral ve ark 2011, Wörmann ve Algül 2013).

Obezite, hem kadınlar hem de erkekler için kabul görmüş bir risk faktörüdür (Zavoral ve ark 2011). Obez bireyler, normal vücut ağırlığındaki bireylere kıyasla %20 daha fazla pankreas kanseri riski taşımaktadır (Muniraj ve ark 2013). Vücut kitle indeksine (VKİ) bakıldığında hem erkek hem de kadınlar için 25 VKİ değeri artan pankreas kanseri riski ile ilişkili bulunurken, VKİ değeri 35 ya da daha fazla olan insanlarda bu risk artışı çok daha belirgindir (Wörmann ve Algül 2013). Özellikle abdominal obezite, erken yaşta pankreas kanserine yakalanma riski ile ilişkili bulunmuş ve ayrıca fiziksel aktivitenin pankreas kanseri riskini azaltabileceği bildirilmiştir (Muniraj ve ark 2013, Wörmann ve Algül 2013).

Diyabet

Diabetes mellitus, pankreas kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Uzun süreli diyabet durumu, diyabetik olmayan durumlara göre yaklaşık 2 kat risk

taşımaktadır (Yadav ve Lowenfels 2013). Yeni başlangıçlı diyabet ise, pankreas kanserinin potansiyel erken bulgusudur; öyle ki yeni başlangıçlı diyabetik yetişkinlerin yaklaşık %1'inde, diyabet teşhisi konulduktan sonra 3 yıl içerisinde pankreas kanseri teşhisi konulmaktadır (Wolfgang ve ark 2013, Wörmann ve Algül 2013). Diyabet çeşitlerine bakıldığında, tip 1 dibetes mellitus ve tip 2 diabetes mellitus'un pankreas kanserinde sırasıyla 2 ve 1,8 kat risk artışına neden olduğu belirtilmiştir (Becker ve ark 2014). Ayrıca gestasyonel diyebetin de risk artışına neden olabileceği bulunmuştur (Perrin ve ark 2007, Yadav ve Lowenfels 2013).

Kronik pankreatit

Kronik pankreatit, geriye dönüşümsüz histolojik değişimler ve sonrasındaki işlev kayıplarıyla ilişkili ilerleyici bir inflamatuar pankreas hastalığıdır (Bhardwaj ve Lloyd 2013). Pankreas kanseri için bir ön tanı da olabilen kronik pankreatit, zamana bağlı olarak risk artışına neden olmaktadır (Wörmann ve Algül 2013). Bununla birlikte 20 yıllık bir süreçte kronik pankreatitli hastaların yaklaşık %5'inde pankreas kanseri gelişimi gözlendiği belirtilmiştir (Muniraj ve ark 2013).

Kalıtsal sendromlar ve genetik risk faktörleri

Ailesel pankreas kanseri, pankreas kanseri riski artışıyla ilişkili belirlenebilir bir gen mutasyonu bulunan bir genetik sendrom olarak tanımlanabilir (Solomon ve ark 2012). Pankreas kanserlerinin çoğu sporadik olmasına rağmen, %10'u ailesel temellidir (Wörmann ve Algül 2013). Ailesinde 1 pankreas kanserli 1. dereceden akrabası olan bireyler, normal popülasyona göre 2 kat daha fazla risk taşımakla birlikte, pankreas kanserli 1. dereceden akraba sayısı arttıkça risk de o denli artış göstermektedir (Hong ve ark 2011).

Peutz-Jeghers sendromu (PJS), otozomal dominant geçişli bir kalıtsal bir hastalık olup hastaların yaklaşık %80'ni hücre enerji metabolizmasının düzenlenmesinde işlev gören *STK11/LKB1* tümör baskılayıcı geninde mutasyon taşımaktadır (Seicean ve Seicean 2012). Bu sendrom normal popülasyona göre 132 kat pankreas kanseri riski oluşturmaktadır (Seicean ve Seicean 2012, Poruk ve ark 2013).

Ailesel atipik multiple mole-melanom (FAMMM), genetik nedenlerinin çeşitliliği fazla olan bir sendrom olmakla birlikte hastaların yaklaşık %38'i hücre döngüsünün düzenlenmesinde işlev gören *p16INK4A*/*CDKN2A* tümör baskılayıcı geninde otozomal dominant olarak kalıtılan bir mutasyon taşımaktadır (Becker ve ark 2014). Bu sendrom normal popülasyona göre 38 kat pankreas kanseri riski oluşturmaktadır (Lowery ve O'Reilly 2012).

Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC) ya da diğer adıyla Lynch sendromu, en yaygın kalıtsal kolorektal kanserdir (Becker ve ark 2014). DNA'da yanlış eşleşmelerin tamir mekanizmasında işlevsel olan *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* genlerinde otozomal dominant olarak kalıtılan bir mutasyon taşınmaktadır (Hong ve ark 2011). Bu sendrom normal popülasyona göre 8,6 kat pankreas kanseri riski oluşturmaktadır (Becker ve ark 2014).

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) sendromu, bazıları kaçınılmaz bir şekilde maligniteye ilerleyerek 40'lı yaşlarda kolorektal adenokarsinomlar için kesin risk faktörü oluşturan yüz binlerce kolorektal adenomatöz poliplerin erken gelişimi ile karakterize olan bir sendromdur (Kastrinos ve Syngal 2011, Becker ve ark 2014). Bu sendroma, Wnt/β-katenin sinyal yolağında işlev görerek hücre döngüsü kontrolü ve mikrotübül kararlılığında işlevsel olan *APC* geninde taşınan ve otozomal dominant olarak kalıtılan germline mutasyon neden olmaktadır. Pankreas kanseri ile ilişkisine bakıldığında normal popülasyona göre 4,5-6 kat artmış risk bulunmaktadır (Becker ve ark 2014).

Kalıtsal meme ve over kanseri (HBOC), gelişimi sırasıyla *BRCA2* (%95), *BRCA1* (%90) tümör baskılayıcı genlerindeki germline mutasyonlarının otozomal dominant kalıtımı ile karakterizedir (Solomon ve ark 2012). Bir Fanconi anemi gen ailesi üyesi olan ve DNA'da zincirler arası çapraz bağları ve çift iplik kırılmalarının tamirinden sorumlu olan *BRCA2* genindeki germline mutasyonu pankreas kanseri riskini normal popülasyona göre 3,5-10 kat arttırdığı rapor edilmiştir (Hong ve ark 2011). DNA tamir mekanizmasının, hücre döngüsü kontrol noktalarının ve genetik kararlılığın düzenlenmesinde işlevsel olan *BRCA1* geninde taşınan germline mutasyon pankreas kanseri hastalarında nadir görülmesine rağmen pankreas kanseri riskini normal popülasyona göre 2 kat arttırdığı belirtilmiştir (Becker ve ark 2014).

Pankreas kanseri için kesin risk faktörü olan kronik pankreatitin nadir bir formu olan kalıtsal pankreatit (HP), otozomal dominant olarak kalıtılan yüksek penetranslı (>%80) ve ailedeki atasal kökene bağlı olmakla birlikte genellikle 30 yaşından önce kendini gösteren bir hastalıktır (Rustgi 2014). Hastalarda, katyonik tripsinojeni kodlayan *PRSS1* geninde otozomal dominant kalıtılan ve bir tripsin inhibitörü kodlayan *SPINK1* geninde ise otozomal resesif olarak kalıtılan germline mutasyonlar bulunmaktadır (Becker ve ark 2014). Bu ailelerde pankreatik kanser insidansı, özellikle sigara kullanımı ve diyabetli durumlarda erken başlangıç göstermekle birlikte 20-40 yıllık bir kronik pankreatit sonrası artmaktadır (Solomon ve ark 2012). Normal popülasyona göre 53 kat artmış risk bulunmaktadır (Lowery ve O'Reilly 2012).

Ataksi telanjiektazi (AT), erken ilerleyici serebellar ataksi, cilt telenjiektazi, iyonize radyasyona hassasiyet ve immün yetmezlik ile karakterize edilen nadir görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Bu hastalık *ATM* geninde mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Solomon ve ark 2012, Becker ve ark 2014). Her iki alelinde mutasyon taşıyan bireylerde, yaşamın ilk on yılında AT görülmekte ve bu bireylerde %38 kanser riski bulunmaktadır. Tek bir alelinde mutasyon taşıyan bireylerde, meme ve pankreas kanseri de olmak üzere kanser riski barındırmaktadır. *ATM* gen işlevi ile pankreas kanseri ilişkisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bazı ailesel pankreas kanseri hastalarında *ATM* mutasyonu tespit edilmiştir (Solomon ve ark 2012).

Solunum yollarını engellemenin yanı sıra inflamasyon riskini arttırarak pankreatik kanalların tıkanmasına da neden olan viskoz mukus ürerimi ile karakterize *CFTR* geninde taşınan germline mutasyonun otozomal resesif olarak kalıtıldığı bir hastalık olan kistik fibrozis (CF), artmış pankreatit ve pankreas kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur (Zavoral ve ark 2011).

1.1.3. Pankreas Kanserinin Moleküler Patolojisi

Onkogenler

KRAS2 onkogenindeki mutasyonlar, pankreas kanserinde belirlenmiş en yaygın (>%95) genetik değişikliklerdir ve bu somatik mutasyonlar çoğunlukla 12. kodonu nadir olarak da 13 ve 61. kodonu etkileyen nokta mutasyonlarıdır (Ghaneh

ve ark 2007, Hong ve ark 2011). Kromozom 12'nin p kolunda yerleşik olan *KRAS2* geni, hücre çoğalması, hücre yaşamı, hareket ve hücre iskeleti yapılanması gibi çeşitli hücresel işlevlere aracılık eden RAS ailesine ait bir guanozin trifosfat (GTP) bağlı protein kodlar (Ghaneh ve ark 2007). Hücre zarının hücre içi tarafında yerleşik olan RAS proteini, normal fizyolojik şartlarda GDP'ye bağlı olarak işlevsiz (inaktif) halde bulunur; hücre dışı ya da hücre içi uyarı sonucu aracı moleküllerle GDP/GTP değişimi yaparak aktif haldeki GTP-RAS bileşimi oluşur ve bu bileşim sinyal silsilesinin aktifleşmesini başlatır. RAS/RAF/MAPK sinyal yolağında aktif RAS, mitojen aktiviteli protein kinazları (MAPK) aktifleştirecek RAF'ın kinaz aktivitesini başlatır; böylece hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, migrasyon, doku tamiri ve anjiyogenez gibi temel hücresel yolakları aktive eder (Zavoral ve ark 2011).

Aktif *KRAS* gen mutasyonları, KRAS proteinin GTPaz aktivitesinin düzenlenmesini ortadan kaldırarak sürekli işlevsel halde yani GTP-bağlı kalmasına ve akabinde RAF-MAPK, PI3K-Akt gibi birçok aşağı yönlü (downstream) efektör sinyal yolaklarının kontrolsüz sürekli aktivasyonuna yol açar; böylece kritik karsinojenik süreçler için gerekli transkripsiyon faktörlerinin uyarılması gerçekleşir (Zavoral ve ark 2011, Güngör ve ark 2014).

Pankreas kanserinde onkogenik KRAS mutasyonları yaygın olmasına rağmen bazı hastalarda yabanıl tip KRAS bulunmaktadır (Sakorafas ve Smyrniotis 2012). Bu hastalarda RAF-MAPK yolağında KRAS ile ilişkili B-RAF proteini kodlayan *B-RAF* onkogenindeki aktif mutasyonlar (~%5) ya da RAF-MAPK yolağının alternatif aktivasyonuna neden olan diğer değişikliklerin var olabileceği belirtilmiştir (Cowan ve Maitra 2014).

Apoptozun doğrudan engellenmesini ya da apoptotik inhibitörlerin gen ifadesini arttıracak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu gerçekleştirerek sağ kalımı sağlayan P13K-AKT sinyal yolağına, pankreas kanserinde RAS'ın katkısının yanı sıra bu yolağın sürekli aktif kalmasına yol açan diğer bir genetik anormalik *AKT1* onkogenindeki mutasyondur (Zavoral ve ark 2011, Fulda 2013).

Bu sinyal yolaklarının yanı sıra hücre sağ kalımı, invazyonu, kemoterapi direncini ve anjiyogenez teşvik eden genleri düzenleyen transkripsiyon faktörü NF-κB'nin (Nükleer Faktör kappa B) aracılık ettiği sinyal silsilesinin, bütün pankreas

kanseri hücreleri ve dokularında yapısal olarak aktif olduğu ve ayrıca normalde pankreas organogenezi ve gelişiminde kritik rol oynadığı bilinen Hedhehog ve Notch sinyal silsilelerindeki efektörlerin pankreas kanserinin başlatılmasında rol oynadıkları belirtilmiştir (Abramson ve ark 2007).

Tümör baskılayıcı genler

Pankreas kanserinin ilerlemesinde, genomik kararsızlıkla hücrenin yaşamasına izin veren önemli olaylardan bir diğeri birkaç tümör baskılayıcı genin somatik mutasyonlarla inaktivasyonudur (Cowan ve Maitra 2014).

Kromozom 9'un q kolunda yerleşik olan *CDNKN2A* geni, P16INK4A ve P14ARF tümör baskılayıcı proteinleri kodlar (Saiki ve Horii 2014). P16INK4A proteini retinablastoma proteininin fosforilasyonunu engelleyerek G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünün durmasını sağlarken; P14ARF proteini, MDM2'nin nötralize eder ve böylece p53 tümör baskılayıcı proteininin ubikitinasyonu ve yıkımını engelleyerek p53'ün kararlılığını sağlar (Cowan ve Maitra 2014, Saiki ve Horii 2014). Promotor hipermetileyonu, homozigot delesyonlar gibi farklı mekanizmalar sonucu pankreas kanseri olgularının %95'inde *CDNKN2A* geni en yaygın işlev kaybı gösteren tümör baskılayıcı gendir (Saiki ve Horii 2014).

TP53 geni ise, hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasının düzenlenmesi, G2/M geçiş noktasında tutulmasının sürdürürülmesi ve apoptozun uyarılması, DNA tamiri gibi çoklu işlevli p53 tümör baskılayıcı proteinini kodlar (Cowan ve Maitra 2014). *TP53,* pankreas kanseri olgularının yaklaşık %75'inde işlev kaybı göstermektedir (Güngör ve ark 2014).

Pankreas kanserinde inaktive olan bir diğer tümör baskılayıcı gen 18. kromozomun q kolunda yerleşik olan *SMAD4*'tür. Çoğunlukla homozigot delesyonlar nedeniyle pankreas kanseri olgularının yaklaşık %55'inde işlev kaybı göstermektedir. *SMAD4* işlev kaybı, SMAD4 bağımlı çoğalma karşıtı ve proapoptotik özellikteki TGF-β yolağını ortadan kaldırarak düzensiz hücre çoğalmasına yol açar (Saiki ve Horii 2014).

Somatik gen mutasyonlarının yanı sıra bazı büyüme faktörleri ve onların reseptörlerinin de normal pankreatik doku ile karşılaştırılıdığında pankreas

kanserinde büyüme, invazyon ve anjiyogeneze katkı sağlayacak şekilde çok yüksek bir oranda ifade edildikleri görülmektedir (Sakorafas ve Smyrniotis 2012). Hücresel çoğalma ve yaşamsal uyarılara aracılık eden EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörleri) ve ligandlarının aşırı ifadesi pankreas kanserinde kötü seyrin bir göstergesidir. Ayrıca endotelyal hücre çoğalmasını, sağkalımı ve böylece anjiyogenezi teşvik eden VEGF'nin (vasküler endotelyal büyüme faktörü) pankreas kanseri hücreleri ve dokularında aşırı ifade edildiği bilinmektedir (Abramson ve ark 2007).

Promotor bölgelerinde anormal CpG hipermetilasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı ve onkogenik genlerin hipometilasyonla aktivasyonu gibi epigenetik değişimler de pankreas kanserinde yaygındır (Saiki ve Horii 2014).

1.1.4. Klinik Tablo

Erken evredeki pankreas kanseri genellikle klinik olarak sessizdir ve hastalık yalnızca tümörün çevre dokulara yayılması ya da uzak organlara metaztazı sonrası belirgin hale gelir; pankreas kanseri ile ilişkili belirtileri gösteren çoğu hastalarda kanser ilerlemiş durumdadır (Hijioka ve Yamao 2015). Görülen belirtiler ve bulgular tümör yerleşimi ile ilişkilidir; pankreatik kanserlerin %60-70'i pankreas başında %20-25 ise gövde ve kuyruk kısmında yerleşiktir (Ryan ve ark 2014, Hijioka ve Yamao 2015). Hastaların çoğunda karın ağrısı, kilo kaybı, halsizlik ve anoreksi (iştahsızlık) şikayetleri vardır, hastaların yaklaşık %50'si diyabetlidir (Ryan ve ark 2014).

Sarılık, pankreas başı tümörlerinin en yaygın belirtisidir ve bu yerleşim kaynaklı sarılık genellikle ağrısız ilerleyici ve kaşıntı eşliklidir (Seufferlein ve ark 2012, Pai ve Spalding 2015). Pankreas başında yerleşim gösteren tümörlü hastaların %70'inde epigastrium ve sol üst kadranda yerleşimli ağrı şikayeti mevcuttur (Werner ve Herzig 2010, Pai ve Spalding 2015). %25'inde ise sırt ağrısı şikayeti olabilir; bu ağrı tümörün kesilip çıkarılamayacağını (rezekte edilemeyeceğini) işaret eder. Hastaların %5'inde atipik akut pankreatit görülmektedir. İlerlemiş vakalarda duodenal tıkanıklık sunucu kalıcı kusma, ya duedonal invazyon ya da portal veya splenik venin tıkanması sonucu gastrointestinal kanama görülmektedir. Safra kanalında malign tıkanıklık bulunan sarılıklı hastalarda yaygın olarak palpe edilebilir

safra kesesi (Courvoisier-Terrier bulgusu) bulunmaktadır (Hijioka ve Yamao 2015, Pai ve Spalding 2015). Sinsice gelişen pankreas gövde ve kuyruk tümörleri, erken evrede bulgusuz olmakla birlikte teşhis edildiklerinde pankreas başı tümörlerinden çok daha ilerlemiş haldedir. Hastaların %60'ında sırt ağrısı ile birlikte belirgin kilo kaybı vardır. Sarılık çok nadirdir ve porta hepatise ilerlemiş kanserle ortaya çıkar. Kusma duodeno-jejunal fleksür invazyondan sonraki aşamada meydana gelebilir. Abdominal kitle pankreas başı tümörlerinden daha sık belirmekte ve tümörün kesilip çıkarılamıyacağını (rezekte edilemeyeceğini) işaret etmektedir. Aslen, pankreas başı dışında yerleşim gösteren kanserlerin çoğu, ya karaciğer metastazı ya da çölyak ekseninin ve superior mezenterik damarların yerel invazyonu nedeniyle tanı anında cerrahi tedavinin ötesine geçmiş durumdadır (Pai ve Spalding 2015).

1.1.5. Tanı

Pankreasın anatomik yapısı, erken semptomların yokluğu ve geç bulguların da hastalık için genellikle özgün olmaması tanıyı geciktirir (Seufferlein ve ark 2012). Bu durum kanserin kompleks bir yapıda olmasına neden olarak teşhis konulduğunda hastaların %85'inde; proksimal lemfatik nodlarda, karaciğerde ya da akciğerde metastazik infiltrasyon görülmektedir (Carracedo ve ark 2006).

Kan testleri ve tümör belirteçleri

Rutin kan testleri ile karaciğer işleviyle ilişkili bilirubin, alkalen fosfataz (ALP) serum düzeylerine ve özellikle yüksek düzeyde bulunması bir karaciğer metastazı göstergesi olan gama-glutamil transferaz (GGT) serum düzeylerine bakılması önemlidir (Tewari ve Lobo 2013). K vitamini emilimi bozukluğu, K vitaminine bağlı olarak hepatik salınımın azalmasıyla pıhtılaşma faktörlerinin azalması, hafif anemi ve koagülopati (pıtılaşma bozukluğu) gibi durumlar pankreas kanseri ile ilişkili olabilmektedir (Hijioka ve Yamao 2015). Ancak hastalarda, özellikle pankreas kuyruğunda tümör bulunanlarda laboratuvar bulguları normal olabilmektedir (Tewari ve Lobo 2013).

Bazı tümör belirteçlerinin serum düzeyleri teşhis için önemlidir. Özellikle glikoprotein karbonhidrat antijen 19-9 (CA 19-9), pankreas kanseri için hassasiyeti (%70-92) ve özgünlüğü (%68-92) yüksek olan bir tümör belirtecidir (Tewari ve Lobo 2013). Normal pankreas ve safra kanalı hücrelerinde ifade edilen ve pankreatit, siroz

ve kolanjit gibi hastalıklarda serum düzeyi yükselebilen CA 19-9, pankreas kanserinde tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de önemli bir gözetim aracıdır (Bond-Smith ve ark 2012). Pankreas kanserinde kullanılan diğer karbonhidrat antijen tümör belirteçler CA-50, CA72-4 ve CA-242'dir. Karsinoembriyonik antijen-ilişkili hücre adezyon molekülü 1 (CEACAM1), Makrofaj inhibitör sitokin-1 (MIC-1), gelsolin, metalloproteinaz 1 doku inhibitörü gibi farklı aday tümör belirteçlerin yakın gelecekte kullanılması tahmin edilmektedir (Göral 2014).

Görüntüleme

Pankreas kanserinden şüpheli durumlarda ilk seçenek olarak kullanılan transabdominal ultrasonografi (US), pankreatik kitlelerin boyutu ve bölgesi, safra ve pankreas kanalı dilatasyonu, tümörün ana damara yakınlığı, assit (karında sıvı toplanması), lenf nodu tutulumu ve karaciğer metastazı hakkında bilgi sağlayabilir (Tewari ve Lobo 2013). Doğruluğu %50-70 olmakla birlikte, 3 cm'den küçük tümörler için hassas değildir ve sonuçların operatör bağımlı olması ve obezite, assit ya da bağırsak gazlarından dolayı sonuçlar hatalı olabilir (Tummala ve ark 2011, Muniraj ve ark 2013).

Üçlü faz bilgisayarlı tomografi (BT), pankreas neoplazmlar tespit ve tümörün kesilerek çıkarılıp çıkarılamayacağını (rezektabilite) değerlendirmek için en iyi tekniktir (Bond-Smith ve ark 2012). Görüntüleme arteriyel, pankreas parenkimal ve portal venöz fazda (pankreas protokolü bilgisayarlı tomografi) gerçekleştirilerek tümörün çevre damar ve organlarla birlikte oryantasyonu belirlenmektedir (Tummala ve ark 2011, Bond-Smith ve ark 2012). Çoklu dedektörlü bilgisayarlı tomografi rezektabilitenin belirlenmesinde % 90 etkilidir (Bond-Smith ve ark 2012).

Yeni, daha hızlı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) teknikleri yüksek çözünürlüklü pankreasın görüntülenmesini sağlamasıyla, küçük lezyonların saptanması ve rezektabilitenin belirlenmesinde kullanımı artmaktadır (Tummala ve ark 2011, Bond-Smith ve ark 2012). Pankreas kanseri şüphesi olan hastalarda endoskopik ultrason, BT ve MR'ın tanı rolü karşılaştırıldığında hassasiyetleri sırasıyla % 94, % 69, ve % 83 olarak belirlenmiştir (Bond-Smith ve ark 2012).

Glukoz metabolizmasını gösteren 18-florodeoksiglukoz yaygın olmak üzere radyoaktif işaretli maddeler kullanılarak morfolojik bilgiden ziyade tümörlerin

metabolik bilgileri ise pozitron emisyon tomografisi (PET) ile sağlanmaktadır (Muniraj ve ark 2013, Tewari ve Lobo 2013). PET, BT sonrası yapıldığı için özgünlüğü ve hassasiyeti BT sonuçlarına göre değişmektedir (Tummara ve ark 2011, Muniraj ve ark 2013).

Pankreatik kitlelerin belirlenmesinde ve tümör evrelemesinde en hassas metot olan endoskobik ultrasonografi (EUS), BT ya da MRG ile tam olarak belirlenemeyen özellikle 2 cm'den küçük tümör kitlelerini teşhisinde çok kullanışlıdır (Muniraj ve ark 2013). Pankreas parankiması, pankreas kanalı ve duedonum, mide gibi komşu yapıların yüksek çözünürlüklü görüntüsünü sağlayarak, gerçek zamanlı görüntü anında ince iğne aspirasyonu gibi tekniklerle biyopsi yapılmasına imkan vermektedir. (DiMaio 2015).

Endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP) ise hepatobiliyer sistemi görselleştirerek, biyopsi yapılabilmesine, genetik analizler için pankreatik sıvı alınmasına olanak sağlar (Dabizzi ve ark 2011, Muniraj ve ark 2013). Tanısal rolü düşük olmakla birlikte, pankreas kanseri nedeniyle safra kanalında oluşan tıkanıklığın giderilmesi için stent takılması gibi tedavisel müdahalelere izin vermesi bakımından önemlidir (Dabizzi ve ark 2011).

1.1.6. Pankreas Kanserinde Evreleme

Pankreas kanseri, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi'ne (American Joint Committee on Cancer, AJCC) (2010) göre tümör boyutu, damar katılımı ve varlığı veya lenf nodu metastazı veya uzak metastazın varlığı ya da yokluğunun değerlendirildiği TNM (T: Tümör, N: Nod, Metastaz) sistemi ile evrelendirilmiştir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Pankreas kanseri evreleri (AJCC 2010).

Primer Tümör (T)	
TX	Primer tümör değerlendirelemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ1 (PanINIII)
T1	Tümör pankreasla sınırlı, > 2 cm
T2	Tümör pankreasla sınırlı, ≤ 2 cm

Çizelge 1.1 (Devam). Pankreas kanseri evreleri (AJCC 2010).

T3	Tümör, çölyak ekseni ya da superior mezenterik arteri sarmadan pankreasın dışına uzanır
T4	Tümör, çölyak ekseni ya da superior mezenterik arteri sarar (primer tümör cerrahi olarak çıkartılamaz)
Bölgesel Lenf Nodları (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirelemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı
Uzak metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz
Anatomik Evre/Prognostik gruplar	
Evre0	Tis, N0, M0
EvreIA	T1, N0, M0
EvreIB	T2, N0, M0
EvreIIA	T3, N0, M0
EvreIIB	T1, T2 ya da T3; N1; M0
EvreIII	T4; N0 ya da N1; M0
EvreIV	T1, T2, T3 ya da T4; N0 ya da N1; M1

1.1.7. Tedavi

Pankreas kanserinde kullanılan en temel tedavi yöntemi cerrahi operasyondur. Pankreas kanseri tedavisi için ilk başarılı operasyon, günümüzde de standart hale gelmiş Kausch-Whipple prosedürü denen yöntemle gerçekleştirilmiştir (Loos ve ark 2008). Bu yöntemde, hastanın sindirim mekanizmasını destekleyecek kısımlar bırakılarak pankreasın tümörlü bölgesi ile mide, duedonum, safra kesesi ve safra kanalının bir bölümünün kesilip çıkarılması (rezeksiyonu) gerçekleştirilmektedir (Husain 2014). Tüm pankreatik rezeksiyonlar R faktörü olarak adlandırılan rezidüel hastalık düzeyine göre R0, R1 ve R2 olarak sınıflandırılmaktadır (Zakharova ve ark 2012). Cerrahi operasyonun temel amacı, lenf nodu metastazı olduğu durumlarda bile tüm makroskobik ve mikroskobik tümörün tamamen temizlendiği R0 rezeksiyon yapmaktır (Ghaneh ve ark 2007, Tewari ve Lobo 2013). R1 rezeksiyonda makroskobik rezeksiyon tamamen temizlenirken, pozitif mikroskobik rezeksiyon

sınırı bırakılmakta, R2 rezeksiyonda ise makroskobik rezeksiyon kısmi olarak gerçekleştirilmektedir (Ghaneh ve ark 2007). Pankreas başı tümörlerinin rezeksiyonu ya Kausch-Whipple kısmi pankreatoduodenektomi ya da pilor koruyucu pankreatoduodenektomi uygulaması ile gerçekleştirilirken; pankreas kuyruk ve gövde tümörlerinin rezeksiyonu distal pankreatoduodenektomi ile gerçekleştilmektedir (Tewari ve Lobo 2013, Pai ve Spalding 2015). Pankreas kanseri tedavisinde cerrahi operasyon kabul edilebilir sonuçlar sağlasa da hastaların yaklaşık %80'inde kanserin nüksettiği ve 5 yıllık sağ kalım oranının %10-24 olduğu belirtilmiştir (Husain 2014).

Diğer tedavi seçenekleri; tek başına uygulanan sistemik kemoterapi ve radyasyon ile kemoterapinin kombine halde uygulandığı kemoradyoterapi şeklindedir (Husain 2014). Kemoterapi ve kemoradyoterapi, uygulama düzeni ve amacına göre adjuvan (cerrahi sonrası tedavi), neoadjuvan (cerrahi öncesi tedavi) ve palyatif olarak sınıflandırılır. Pankreatik kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları; gemsitabin, 5-fluourasil, kapesitabin, sisplatin, ve oksaliplatindir (Mahalingam ve ark 2009). Bu ilaçlar, reaktif bölgeleri ile DNA ya da RNA nukleotitleri arasında çapraz bağlanma mekanizması ile etkileşime girerek iş görürler; böylece kanser hücrelerinde hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoza yol açarlar (Husain 2014). Genellikle kemoterapi ile birlikte kullanılan radyoterapi uygulamasında, vücudun dışındaki bir makineden (eksternal-ışın radyasyon tedavisi) veya vücudun içinde, kanser hücrelerine yakın bir yere konan radyoaktif maddeden gelen (internal radyasyon tedavisi ya da brakiterapi) radyasyondan yararlanılır (Vennela ve ark 2012). Pankreas kanserinde kemoradyoterapi etkili tedavi yaklaşımı iken, radyoterapinin yalnız başına bir tedavi seçeneği olduğunu destekleyen veri yoktur (Husain 2014).

Pankreas kanseri tedavi seçeneklerinin yetersiz kalması, mevcut tedaviler ile antikanser gen terapi ajanları kombinasyonu uygulamaları ile özellikle onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin işlevlerinin düzenlenmesinin amaç edinen hedeflenmiş terapötik stratejiler geliştirilmesine yol açmıştır (Husain 2014). İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) tirozin kinaz inhinitörü olan erlotinib, EGFR'nin hücre dışı bölgesini bloklayan setuksimab ve seçici olarak vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)' ne bağlanan ve böylece VEGF'nin endotelyal

hücrelerin yüzeyindeki VEGF reseptör 1 ve 2 ile etkileşimlerini engelleyen bir rekombinant hümanize IgG1 monoklonal antikor bevasizumab gibi terapi ajanları birbirleriyle ya da kemoterapik ilaçlarla kullanıldığı çalışmalar yapılmaktadır (Kindler 2007). Klinik çalışmalara göre gemsitabin, erlotinib ve kapesitabin ilerlemiş pankreas kanserinde etkin tedavi stratejileri için temel oluşturmaktadır (Arslan ve Yalcin 2014).

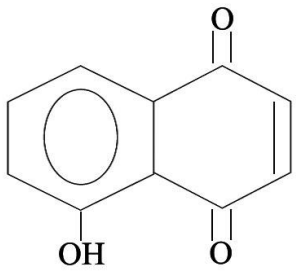
1.2. Juglon

Kanser alanında kullanılan birçok ilacın doğal ürünlerden ve türevlerinden elde edildiği bilinmektedir ve bu kapsamda bitkisel ürünler (fitokimyasallar) daha etkili kanser önleyicilerin ve kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesindeki çalışmaların önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Kitagawa ve ark 2011). Fitokimyasalların, moleküler mekanizmaları kesin olarak açık olmamakla birlikte insan kanser deneysel modellerinde, antikanser aktiviteleri gösterilmiştir (Edderkaoui ve ark 2013). Diğer kanserlerin yanı sıra, birçok çalışmada resveratrol, kurkumin, apigenin, baikalein gibi çeşitli bitki kaynaklı bileşiklerin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki apoptoz uyarıcı ve hücre çoğalmasını engelleyici etkileri incelenmiştir (Wang ve ark 2006, Takahashi ve ark 2011, Zhou ve ark 2011, Donald ve ark 2012, Johnson ve de Mejia 2013a, Johnson ve de Mejia 2013b).

Benzokinon, naftakinon, fenantren kinon ve antrakinon olmak üzere 4 tipe ayrılan bitki sekonder metaboliti kinonlar, antikanser etkileri belirlenmiş önemli bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerdir (Lu ve ark 2013). Metabolik yolakta elektron taşıma zincirindeki yaşamsal bağları sağlayarak çoklu biyolojik oksidatif süreçlere katılan naftakinonların, antiinflamatuar, antifertilite, antibakterial, antifungal, hipolipidemik, antiaterosklerotik, antilayşmaniyal ve antimalaryal'den oluşan çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Pinto ve de Castro 2009, Seshadri ve ark 2011, Lu ve ark 2013). Bu özelliklerin yanı sıra diğer kinon tiplerinde olduğu gibi naftakinonların antikanser özellik gösterdiği belirtilmiştir (Lu ve ark 2013). Antikanser özelliği yaygın olarak çalışılan naftakinon bileşiği plumbaginin, meme kanseri, prostat kanseri, servikal kanser, ovaryum kanseri, akciğer kanseri ve bunların yanı sıra pankreas kanseri hücreleri üzerindeki antikanser özellikleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Srivinas ve ark 2004a,

Srivinas ve ark 2004b, Ahmad ve ark 2008, Gomathinayagam ve ark 2008, Powolny ve Singh 2008).

Önemli bir bitkisel kaynak olan juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon) (Şekil 1.2), Çin, Hint ve Kore gelenkesel tıpbında yaygın olarak kullanılan Juglans (ceviz) cinsindeki ağaçların kök, yaprak, meyve perikarpı, ağaç kabuğu ve ağaç gövdesinde bulunan doğal oluşumlu naftakinon türevi bir bileşiktir ve plumbaginin yapısal analoğudur (Ji ve ark 2011, Xu ve ark 2012, Xu ve ark 2013). Doğal ortamında çok etkili bir allelopatik bileşik olarak rol gösteren juglon, bitki rekabetinde kritik bir işleve sahiptir (Kviecinski ve ark 2012).



Şekil 1.2. Juglonun yapısal formülü
(Thakur 2011).

Juglonun hücreler üzerinde etkilerine bakıldığında, DNA hasarını uyardığı, p53 protein seviyesininin transkripsiyonel olarak baskılanmasını önlediği ve hücre ölümünü uyardığı görülmüştür (Xu ve ark 2012). Juglonun gastrik kanser, lösemi, prostat kanseri olmak üzere farklı kanser hücrelerinde etkilerine bakıldığında Bcl-2/Bax oranında bir azalmaya yol açtığı ve ROS oluşumuna aracılık ederek mitokondriyal yolakla apoptozu uyardığı ve juglonla uyarılan apoptozda ROS'un önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Xu ve ark 2010, Ji ve ark 2011, Xu ve ark 2012).

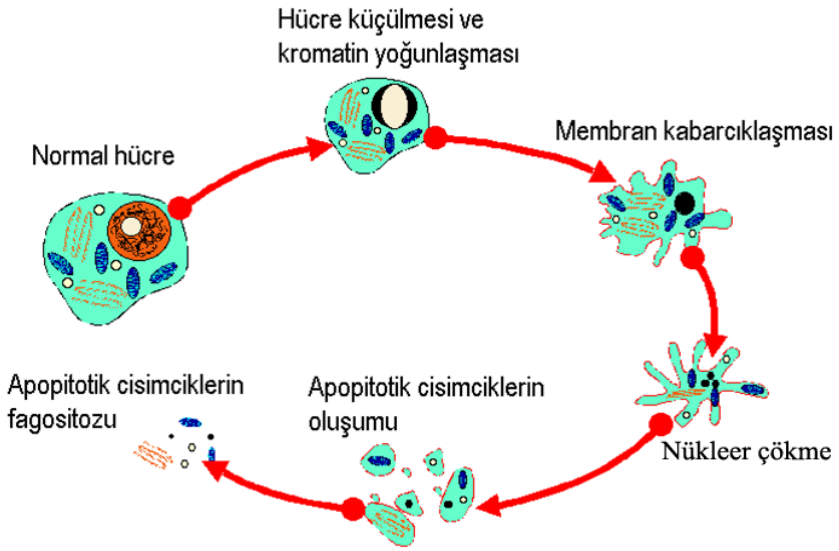
1.3. Apoptoz

Bir canlının yaşamını düzenli bir şekilde sürdürebilmesi, hücre bölünmesi ve programlı hücre ölümü denen bir mekanizmanın hücrelerin yaşamı ve ölümü arasında kurduğu denge ile sağlanmaktadır. Programlı hücre ölümünün, gösterdikleri farklı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri nedeniyle Tip 1 (Apoptoz), Tip 2

(Otofaji) ve Tip 3 (Nekroptoz) olmak üzere üç başlık altında toplanmaktadır (Ouyang ve ark 2012).

Başlıca ve en iyi bilinen programlı hücre ölümü tipi olan apoptoz, embriyonik dönemden yaşlanmaya dek gerçekleşen birçok gelişim aşamasında homeostazinin sürdürülmesini sağlayan önemli fizyolojik olay olmakla birlikte; hücreler bir hastalık ya da zararlı maddelerle hasara uğradığında veya bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkabilmektedir (Elmore 2007).

Apoptotik evrede hücre küçülmesi, plazma zarında kabarcıklar oluşması, hücresel ve nuklear hacimde azalma, nuklear ayrılma, sitoplazmik organellerde küçük değişimler ve hücre parçalanmasını içeren hücre zarına bağlı apoptotik cisimciklerin oluştuğu hücresel yeniden yapılanma meydana gelir (Şekil 1.3) (Şimşek ve Vatansever 2014). Apoptotik cisimcikler halindeki hücre parçacıkları, plazma zarındaki değişikliklerle (aminofosfolipid transferaz enzimiyle dış yaprağa geçen fosfatidil serin) ve hücre dışına salınan kalretikulin adlı özel bir proteinle fagositlerce tanınarak inflamutuar yanıt oluşmadan fagositler ve komşu hücreler tarafından fagositoz ile yok edilmektedirler (Gewies 2003, Şimşek ve Vatansever 2014).

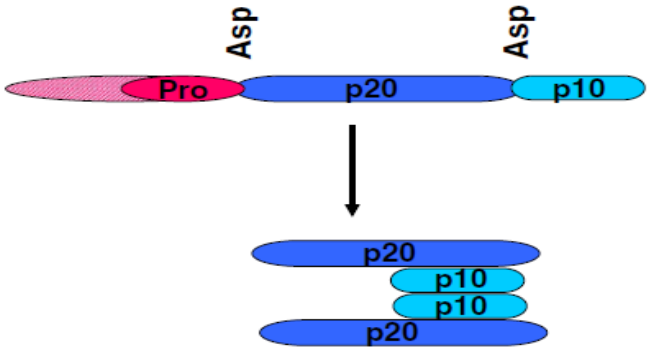


Şekil 1.3. Apoptotik hücredeki değişiklikler (Gültekin ve ark 2008).

Apoptoz yüksek organizmalarda, çoklu sinyal yolaklarıyla başlatılır. Apoptozun düzenlenmesi, hücre dışı ligandların hücre yüzey reseptörlerine

bağlanması, DNA tamir mekanizmasının bozulması sonucu oluşan DNA hasarı, ışın ya da sitotoksik ilaçların kullanımı, yaşam sinyallerinin yokluğu, çelişkili hücre döngüsü sinyalleri ya da ölüm sinyalleri gibi hücre içi ve hücre dışı kaynaklı birçok uyarım ile gerçekleşir (Gewies 2003). Hücrenin ölümü ya da yaşamasını düzenleyen mekanizmanın önemli parçası olan apoptoz, çeşitli sinyal yolakları ile kontrol edilerek sistein proteazlar olarak adlandırılan önemli protein ailesi kaspaza bağımlı ya da bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir (Crawford ve Wells 2011, Hongmei 2012).

Hücre ölümü ve inflamasyonu düzenleyerek homeostazinin korunmasında önemli bir gen ailesi ürünleri olan kaspazlar, aktif bölgelerindeki katalitik sistein amino asitleri ile ilişkili bir reaksiyonla özgün olarak substratlarını aspartik asit amino asitinden kesen endoproteazlardır (Crawford ve Wells 2011, McIlwain ve ark 2013). Kaspazlar, üç alt üniteli aktif olmayan monomerik prokaspaz halinde üretilir ve aktivasyon için özgün proteoliziz ile dimerizasyon gerçekleşmesini gerektirir (Şekil 1.4.) (McIlwain ve ark 2013).



Şekil 1.4. Kaspazların şematik yapısı (Hunter ve ark 2007).

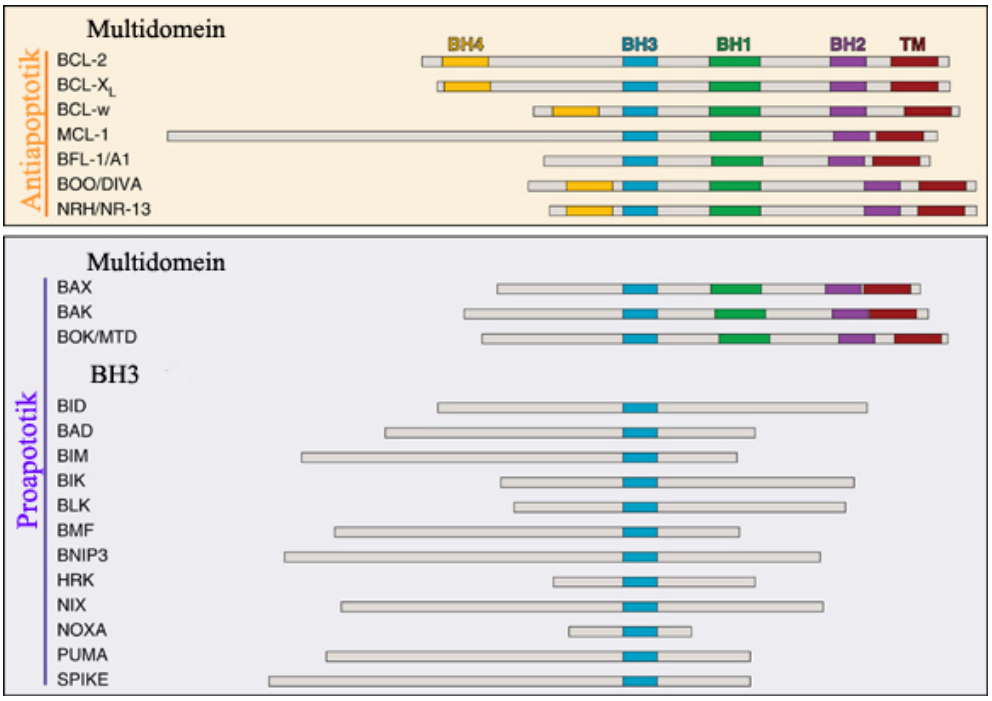
Temelde kaspaz işlevlerine göre apoptotik ve non-apoptotik (apoptotik olmayan) kaspazlar olarak ikiye ayrılır ve apoptotik kaspazlar kendi içinde başlatıcı ve öldürücü kaspazlar olarak iki gruba ayrılır (Pop ve Salvesen 2009. Öldürücü kaspazlar kısa yapıda prodomein (öncül bölge) alt birimine sahipken, başlatıcı kaspazlarda adaptör proteinlerle yapacağı etkileşimler için ölüm efektör bölgesi (DED) ya da kaspaz toplayıcı bölge (CARD) bulunmaktadır (Çizelge 1.2) (Pop ve Salvesen 2009, McIlwain ve ark 2013).

Çizelge 1.2. İnsanda bulunan kaspazlar (Pop ve Salvesen 2009).

		Prodomein	İşlev
Apoptotik	Kaspaz-8	DED, DED	Başlatıcı
	Kaspaz-10	DED, DED	Başlatıcı
	Kaspaz-9	CARD	Başlatıcı
	Kaspaz-2	CARD	Başlatıcı
	Kaspaz-3	-	Öldürücü
	Kaspaz-6	-	Öldürücü
	Kaspaz-7	-	Öldürücü
Non-apoptotik	Kaspaz-1	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-4	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-5	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-12	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-14	-	Keratinosit farklılaşması

Apoptoz mekanizması, dışsal (ekstrinsik) ya da ölüm reseptör yolağı, içsel (intrinsik) ya da mitokondriyal yolak ve patojenle enfekte hücrelerin ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması amacıyla sitotoksik T hücrelerinden salınan granzim A ve granzim B ile uyarılan perforin/granzim yolağı olmak üzere üç yolak ile gerçekleşmektedir (Sun ve Peng 2009). Dışsal, içsel ve granzim B uyarılı perforin/granzim yolakları öldürücü fazda kaspaz-3 aktivasyonuyla gerçekleşirken, granzim A uyarılı perforin/granzim yolağı kaspaz bağımsız hücre ölümünü aktive eder (Elmore 2007).

Kanser hücrelerinde anormal işlev göstermesi nedeniyle kansere karşı tedavisel yaklaşımlarda önemli apoptotik hedef olarak belirtilen mitokondri, apoptotik mekanizmada içsel yolağın esas düzenleyicisidir (Indran ve ark 2011). Mitokondriyal apoptotik yolak, yapısal ve işlevsel özelliklerine göre üç gruba ayrılan B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesinin mitokondri dış zar geçirgenliğini düzenlemesiyle kontrol edilmektedir (Lindsay ve ark 2011). Bcl-2 ailesi, antiapoptotik özellik için kilit faktör olan BH4 bölgeleri bulunan dört Bcl-2 homoloji bölgeli (BH1-4) antiapoptotik proteinler, üç (BH1-3) bölgeli proapoptotik proteinler ve yalnızca BH3 bölgesi içeren aktivatör proapoptotik proteinler şeklinde apoptozda zıt işlev gören üyeler içermektedir (Şekil 1.5) (Walensky 2006).



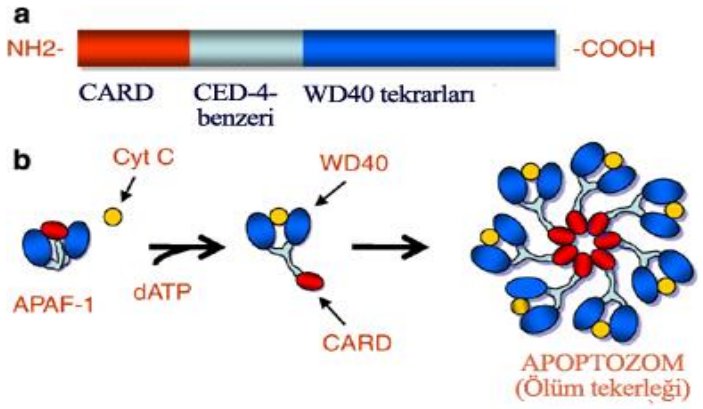
Şekil 1.5. Bcl-2 ailesi proteinleri (Multidomein: Çok bölgeli, TM: Transmembran domein/zar kateden bölge) (Walensky 2006).

Mitokondriyal yolakta DNA hasarı, kemoteröpatik ajanlar, besin yetesizliği, UV radyasyon gibi çeşitli ölüm uyaranlarına cevap olarak hüresel Bcl-2/Bax (antiapoptotik ve proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri oranı) proteinleri oranının azalması ile Bax-Bak bağımlı olarak dış zar geçirgenliği artışı nedeniyle zar potansiyeli bozulur. Bozulan zar potansiyeli nedeniyle ya zarda oluşan yeni permeabilite transisyon porlarla ya da dış zar patlamasıyla apoptozda görevli sitokrom-c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, Endo G isimli deoksiribonukleaz enzim, apoptoz uyarıcı faktör (AIF) gibi çeşitli apoptoz ilişkili mitokondriyal proteinlerin sitoplazmaya kaçışı gerçekleşir (Atagün ve ark 2011).

Başlıca mitokondriyal yolak mekanizması, proapoptotik uyarıcıya bağlı olarak ifade kaybı ve aktivasyonunun baskılanması tümör gelişimi ile ilişkili olabileceği belirtilmiş APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici protein-1) proteini aracılığıyla gerçekleşen sistemdir. APAF-1, C- terminalinde yaklaşık bir düzine WD-40 tekrarı, N- terminalinde kaspaz toplayıcı bölge (CARD) içeren 12. kromozomda yerleşik olan *apaf-1* geni tarafından kodlanan içsel apoptotik yolaktaki başlıca efektör proteindir (Anichini ve ark 2006).

dATP/ATP katılımıyla sitoplazmaya kaçan sitokrom-c APAF-1'e bağlanarak monomerik yapılar meydana gelir ve ardından monomerik birimler birleşerek

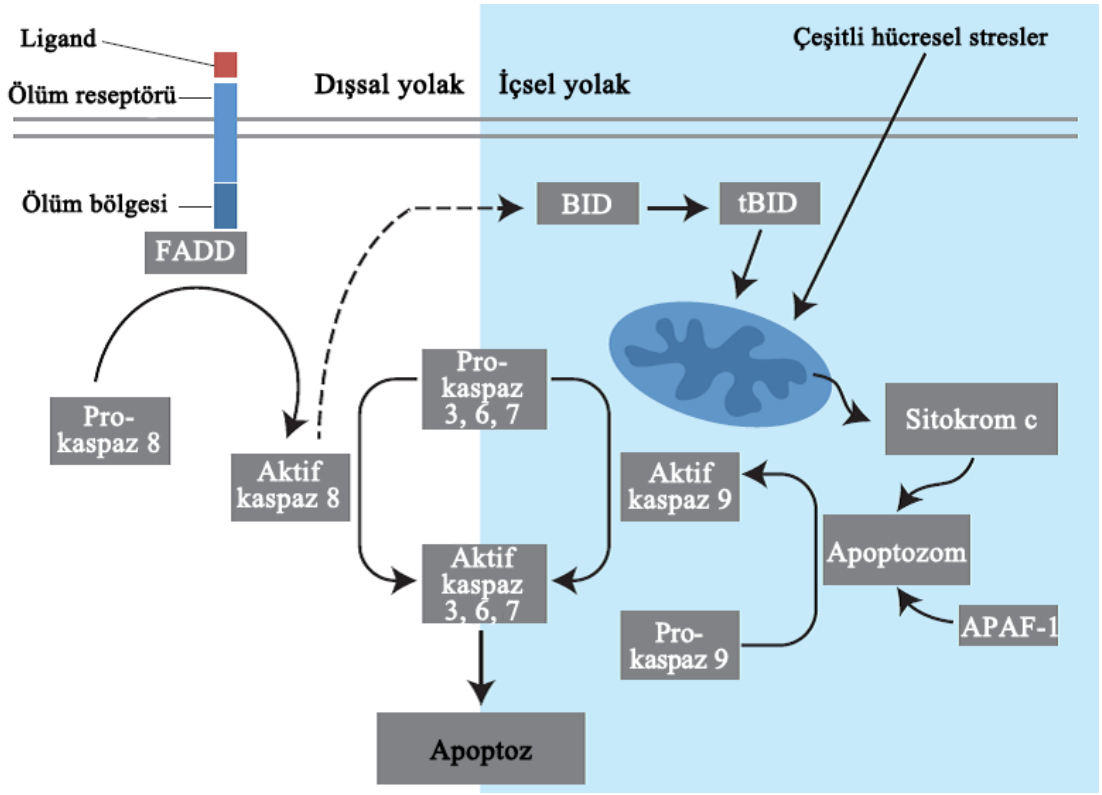
heptamerik yapıdaki apoptozom bileşimi oluşturur (Şekil 1.6.) (Hu ve ark 2013). Apoptozom, APAF-1'deki CARD bölgesi ve kaspaz-9'daki CARD bölgelerinin etkileşimleri ile etkisiz durumdaki başlatıcı prokaspaz-9'un aktivasyonunu gerçekleştirir (Malladi ve ark 2009). Aktif kaspaz öldürücü kaspaz-3'ü etkinleştirir; aktif kaspaz-3, sitoplazmada etkisiz halde bulunan CAD'ı (kaspaz aktiviteli DNaz) aktifleştirerek nuklear DNA'nın parçalara ayrılmasına yol açar ve ayrıca gelsolin ve fosfoinositol bifosfat gibi yapıları bağlayarak hücre iskeleti yapılarını yıkılması, sinyal iletimini bozulmasını gerçekleştirir (Elmore 2007). Aktif kaspaz-3, kaspaz-9'a geri bildirim yapabilir ve diğer öldürücü kaspazları (kaspaz-6/7) aktive ederek ve onların da diğer başlatıcı kaspazları (kaspaz-8/10) aktive etmesiyle hücrede bir kaspaz silsilesi süreci ile apoptoz gerçekleşmiş olur (Atagün ve ark 2011). Başlıca mekanizmanın yanı sıra AIF ile gerçekleşen kaspaz bağımsız mitokondriyal yolak ve endoplazmik retikulum (ER) organelinin katıldığı içsel apoptotik yolaklar da mevcuttur (Wang ve Youle 2009, Seydel ve Aksoy 2012).



Şekil 1.6. APAF-1 proteini ve apoptozom oluşumu
(Fadeel ve ark 2008).

Dışsal yolak hücre zarında hücre dışı ligandların ölüm reseptörleri denilen sitoplazmik bölgelerinde ölüm bölgesi (DD) taşıyan küçük reseptör ailesi (Tümör nekrözis faktör, TNF-reseptör ailesi) üyelerine (TNF-R1, Fas, TRAMP, TRAIL-R1, DR6 ve p75NTR) bağlanması sonucu reseptörlerin aktivasyonuyla başlar (Bruce-Keller 2001, Sankari ve ark 2012). Aktive olan reseptörler sitoplazmik kısımda apoptotik yolağı ya da yaşam sinyallerini başlatabilecek adaptör proteinler ile etkileşebilir (Lavrik 2005). Aktif reseptör, apoptotik yolağı başlatacak adaptör proteinle etkileştikten sonra, zimojen haldeki başlatıcı kaspazlar adaptör proteine bağlanır ve yapısal değişikliğe uğrayarak otoproteolitik aktivasyonla ardışık kaspaz

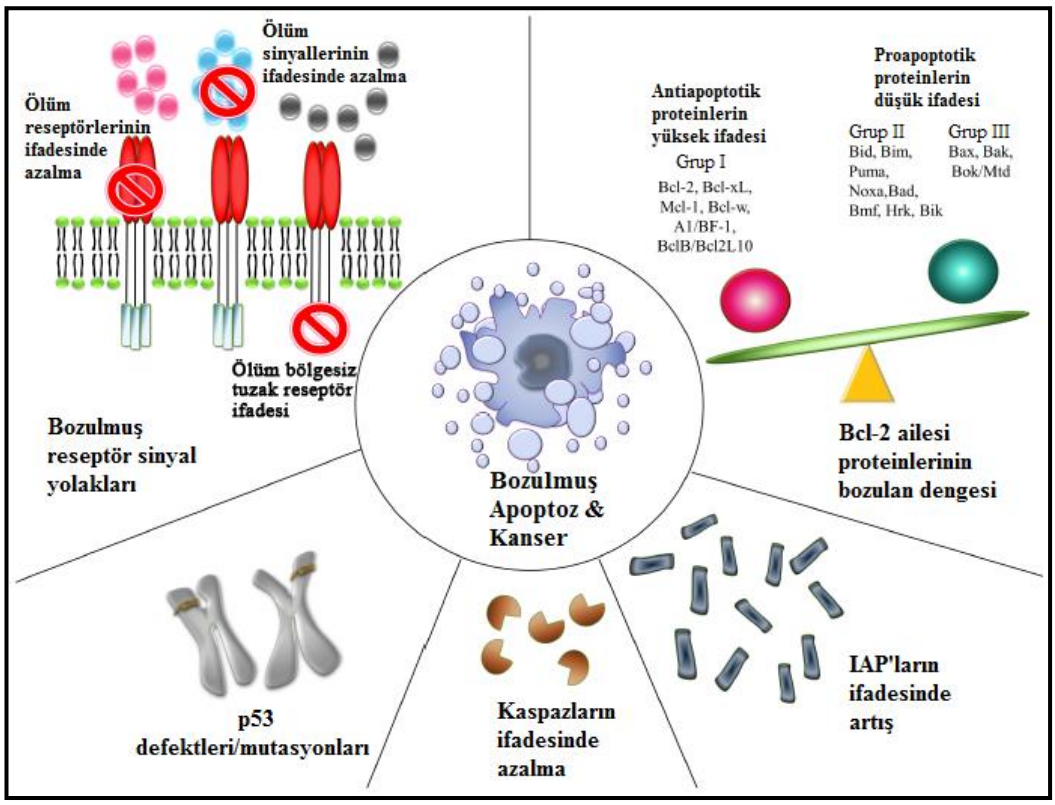
silsilesini yani öldürücü fazı uyararak apoptoz gerçekleşir (Bruce-Keller 2001). Dışsal yolakta bazı durumlarda aktif reseptörden gelen sinyal, bir kaspaz sinyal silsilesini oluşturmak için yetersiz kalabilir bu durumda dışsal yolak antiapoptotik ve proapoptotik olmak üzere apoptozun önemli düzenleyici proteinlerini içeren Bcl-2 protein ailesi üyelerinden proapoptotik Bid ile mitokondriyal apoptotik yolakla devam ettirilir (Şekil 1.7) (Gewies 2003).



Şekil 1.7. İçsel ve dışsal apoptotik yolak (McIlwain ve ark 2013).

Kanser oluşumunda yalnızca onkogenlerin aktivasyonu değil aynı zamanda eş zamanlı olarak apoptoz kontrol noktalarında bozuklukların da var olması gerekmektedir (Şekil 1.8) (Gewies 2003). Antiapoptotik faktörlerin (antiapoptotik Bcl-2 üyeleri, apoptoz inhibitör protein (IAP) gibi) anormal aktivasyonu ya da ifadesi, proapoptotik faktörlerin inaktivasyonu (proapoptotik Bcl-2 üyeleri gibi) ve özellikle hücreyi geri dönüşsüz hasar durumunda apoptoza yönlendiren p53 tümör baskılayıcı proteinin kararlılığının bozulmasını gerçekleştiren P13K/AKT ve RAS/RAF/MAPK sağ kalım sinyal yolaklarının sürekli aktif kalmasına yol açan anormalikler mevcuttur (Gewies 2003, Doğan ve Güç 2004, Sun ve Peng 2009). Kanserli hücreler incelendiğinde ayrıca kaspaz-8'de yaygın olmakla birlikte diğer kaspaz genlerinde de mutasyon olabileceği belirtilmektedir (Ghavami ve ark 2009).

Tümör oluşum ile ilişkisi kesin olarak açıklanamamış olmakla birlikte çalışmamızda incelediğimiz apoptozun başlıca ölüm efektörü kaspaz-3 kodlayan 4. kromozomun q kolunda yerleşik olan *casp-3* geninin de bazı kanser türlerinde mutasyon barındırdığı ve meme kanserinde kaspaz-3 ifade eksikliği bulunduğu belirtilmiştir (Olsson ve Zhivotovsky 2011).



Şekil 1.8. Karsinogeneze ve apoptozdan kaçışa katılan mekanizmalar (Wong 2011).

1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Apoptozla İlişkisi

Hücrelerde oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları (redoks) arasındaki denge, inflamatuar yanıt, apoptoz ve yaşlanma ile ilişkili çoklu uyarı silsilelelerinde başlıca aktördür (Grek ve Tew 2010). Hücresel redoks durumunun önemli katılımcısı reaktif oksijen türleri (ROS), radikal oluşturucu bileşiklere maruz kalma sonucu dış kaynaklı olarak ve normal aerobik metabolizma sonucu iç kaynaklı olarak hücrelerde üretilen ve yıkılan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O^{2-}), hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijenlerin oluşturduğu bileşiklerdir (Grant 2001, Acharya ve ark 2010). ROS, hücre içerisinde NADPH oksidazlar gibi plazma zarında ve peroksizomda lipid metbolizmasına katılan proteinlerin yanı sıra siklooksijenazlar gibi çeşitli sitozolik proteinlerin katılmasıyla çoklu enzim sistemleri tarafından geniş

bir çoğunluğu mitokondride olmak üzere farklı hücresel bölgelerde üretilir (López-Lázaro 2007).

Fizyolojik olarak düşük seviyede normal hücre işlevi için gerekli iken, fazlası oksidatif stres oluşturarak hücresel proteinlerde, zar lipidlerinde, nükleik asitlerde hasara neden olur ve böylece meydana getirdiği genetik kararsızlıkla ya kansere ya da aksi bir durum olan hücre ölümüne yol açabilir (Acharya ve ark 2010, Wu ve ark 2010).

Reaktif oksijen türleri (ROS), hem dışsal hem de içsel yolakla apoptozu uyarabilme özelliğine sahiptir (Marchi ve ark 2012). Mitokondriyal apoptotik yolakta ROS'un rolü mitokondriyal porların oksidasyonunu gerçekleştirerek mitokondriyal zar potansiyelinin bozulmasına neden olabileceği ve böylece mitokondriden sitokrom-c salınmasına katkı sağlayabileceği şeklinde bildirilmiştir (Simon ve ark 2000).

ROS'un hasar oluşturma özelliğine karşı hücrelerde redoks homeostazisi için, glutatyon-S transferaz (GST), NADP(H) kinon oksidoreduktaz (NQO1), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), ekpoksit hidrolaz, hem oksijenaz (HO-1), UDP-glukuronozil transferaz, gamaglutamilsistein sentataz gibi birkaç faz II detoksifikasyon enzimlerinden oluşan bir hücresel savunma mekanizması mevcuttur (Acharya ve ark 2010).

İnsanlarda üç tip SOD bulunur; hücre içinde sitoplazmada SOD1 (CuZnSOD), mitokondride SOD2 (mangan SOD/MnSOD) ve hücre dışı matrikste SOD3 (CuZnSOD/EcSOD). SOD, süperoksit radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşümünü katalizler, oluşan H_2O_2 ise katalazla ya da GPx ile toksik olmayan ürün haline getirilir (Fukai ve Ushio-Fukai 2011). Mitokondriyal solunum zincirinden dolayı hücrelerde en fazla süperoksit üretimi mitokondride gerçekleştiği için, MnSOD hücresel redoks homeostazisinin sürdürülmesinde önemli role sahiptir (Teoh ve ark 2007). Tümör oluşum mekanizmasını inceleyen bazı çalışmalarda tümör hücrelerinin süperoksit radikalleri üretebildiğinin gösterilmesi çoğu araştırmacıyı, zarar görmüş tümör hücrelerinde temel antioksidan olan SOD, GPx ve katalaz enzimlerinin düzeyini araştırmaya yöneltmiştir (Kaynak 2002).

Bu çalışmadaki temel amacımız juglonun, pankreas kanseri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisini değerlendirebilmektir. Bu amaç doğrultusunda juglon uygulamaları ile insan pankreas kanser hücre hattı PANC-1 ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda juglonun sitotoksik etkisi, redoks homeostazisinin önemli düzenleyicilerinden MnSOD düzeyi üzerindeki etkisi ve mitokondriyal apoptoz mekanizmasında işlev gören *casp-3* ve *apaf-1* genlerinin ifade düzeyleri üzerindeki etkileri incelenerek apoptoz süreci bakımından değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve markaları.

Cihaz	**Marka**
Sınıf II biyogüvenlik kabini	Metisafe
CO_2'li inkübatör	Thermo Scientific
Inverted mikroskop	Leica
Işık mikroskobu	Olympus
Floresan mikroskop	Olympus
Mikroplate okuyucu	Biotech
Real-Time PCR	Roche
Nanodrop spektrofotometre	Thermo Scientific
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific
Su banyosu	WiseBath
Vorteks	Nüve
Manyetik karıştırıcı	Stuart
Çalkalyıcı	WiseShake
Hassas terazi	KERN
Otomatik pipet	Thermo Scientific
-20 Derin dondurucu	Arçelik
-80 Derin dondurucu	Haier
+4 Buzdolabı	Uğur

2.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler ve markaları.

Malzeme	**Marka**
DMEM	Biochrome
Penisilin-streptomisin	Biochrome
Dulbacco'nun fosfat tamponlu suyu (DPBS)	Sigma
Fetal sığır serumu (FBS)	Gibco
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applicem
%0,05 Tripsin-EDTA	Gibco
Tripan mavisi	Sigma
Fosfat tamponlu su (PBS)	Sigma
Juglon	Sigma
MTT	Sigma
TRidity G	Applichem
cDNA sentez kiti	Vivantis
Etanol	Dop Organik Kimya
Kloroform	Merck
2-Propanol	Merck
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
Apoptoz analiz kiti	Abcam
İnsan SOD2 ELISA kiti	Abcam
BCA protein analiz kiti	Abcam
T-75 Flask	Cellstar
T-25 Flask	Cellstar
6-Kuyucuklu plate	Costar
24-Kuyucuklu plate	Costar
96-Kuyucuklu plate	Costar
Hücre sayım lamı	Neubauer

2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan PANC-1 hücre hattı (Çizelge 2.3) ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edildi. PANC-1 hücreleri %10 fetal sığır serum (FBS) ve uygun miktarda antibiyotik (penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/ml) eklenmiş DMEM besiyerinde 37 °C'de %5'li CO2'li etüvde inkübasyona bırakılarak kültür edildi.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan hücre tipi.

Hücre	PANC-1
ATCC Kodu	CRL-1469
Organizma	*Homo sapiens*
Doku	Pankreas kanalı
Hastalık	Epiteloid karsinoma
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Erkek
Yaş	56
Büyüme özelliği	(Aderent)

2.2.1. Hücrelerin Dondurulması

Yapışık haldeki hücreleri kaldırmak için 1-2 ml %0,05 Tripsin/EDTA uygulandı. Hücrelerin flasktan ayrılması için 37 °C'de %5'li CO2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası flaska bir miktar taze hücre besiyeri ilave edildi. Hücreler bir falkon tüpe alındıktan sonra, 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1-2 ml 1/9 oranında DMSO ve besiyerinden oluşan dondurma solüsyonu ilave edildi. Hücreler kriyotüpe alındı ve -20^{o}C'de dondurulduktan sonra, -80^{o}C'ye kaldırılarak muhafaza edildi.

2.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

Dondurulmuş hücreleri içeren kriyotüpler kapaklarından tutularak 37^{o}C'deki su banyosunda eritildi. Çözülen hücreler, içerisinde 10 ml taze besiyeri bulunan falkon tüplerine yavaşça aktarıldıktan sonra 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti, uygun miktarda taze besiyeri ile çözündürüldükten sonra uygun büyüklükteki kültür flaskına alındı ve 37 °C'de %5 CO2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İki günde bir flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ilave edildi.

2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flask içerisindeki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştıktan sonra kültürün devamı için hücrelerin pasajlandı. Flask içerisindeki eski besiyeri, uzaklaştırılıp, flaska ilave edilen 1-2 ml 1X DPBS ile hücreler yıkandı. Flaska yapışık haldeki

hücrelere 1-2 ml %0,05 Tripsin/EDTA uygulandı ve hücrelerin flasktan ayrılması için 37 °C'de %5 CO2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin kalktığından emin olmak için inverted mikroskop altında inceleme yapıldı. Hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra, uygun miktarda taze besiyeri ilave edildi. Hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirildikten sonra bir falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süprnatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti yaklaşık 10 ml taze besiyeri ile yavaşça pipetaj yapılarak çözdürüldü. Tripan mavisi boyası ile hücre sayım lamın kullanılarak ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılıp, belirlenen hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü. Hücre gelişimi için hücreler 37 °C'de %5 CO2'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.3. Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Katı kimyasal madde şeklinde ticari satın alınan juglon (MA: 174,15, Sigma H47003) konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan bu stok solüsyon steril ortamda 0,22 μm' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C' de saklandı. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki solüsyonlar stok solüsyondan DMEM besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

2.4. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Juglonun PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlemek için, hücrelerin metabolik aktiviteleri ile formazan tuzlarının indirgenmeleri sonucu formazan kristallerinin kolorometrik yöntemle ölçülerek hücre canlılığının belirlenmesi esasına dayanan MTT (3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolym bromid) testi uygulandı. 96 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta 100 μl besiyeri içerisinde yaklaşık 5-10x10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası eski besiyeri uzaklaştırıldı. Juglon konsantrasyonları 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 μM olacak şekilde hazırlanan besiyerlerineden kuyucuklara 100 μl ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 1X DPBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 μl MTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT solüsyonu uzaklaştırılarak yerine 100 μl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan

kristallerinin sarı renge dönüşümü mikroplate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Juglon uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı.

2.5. Gen İfadeleri Analizleri

5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulamalarının PANC-1 hücrelerinde *apaf-1* ve *casp-3* genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Roche LightCycler 1.2 cihazı kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) çalışması yapıldı.

2.5.1. Total RNA izolasyonu

6 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta 3 ml besiyeri içerisinde yaklaşık $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 5, 10, 15, ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. RNA izolasyonu TRidity G solüsyonu (Applichem, A4051) kullanılarak gerçekleştirildi.

- Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 1 ml TRidity G solüsyonu eklenip pipetaj yapılarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Hücre-TRidity G süspansiyonu 1,5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 200 µl kloroform eklendi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında karışım 12000 g'de 15 dk +4°C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
- Karışım üzerine 250 µl 2-propanol ilave edilmiş 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında karışım, 12000 g'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve pellete 1 ml %70'lik etanol eklendikten sonra 12000 g'de 5 dk +4°C'de tekrar santifüj yapıldı.

- Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan RNA pelleti kurumaya bırakıldı.
- Kuruma işleminden sonra RNA pelleti 50 µl nukleaz içermeyen dH_2O ile çözdürüldü.
- Nanodrop spektrofotometrede RNA konsantrasyonu belirlendi.
- RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

2.5.2. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi, 2-adımlı RT-PCR Kiti (Vivantis, RTPL12) kullanılarak, kitin mevcut protokolüne göre gerçekleştirildi. Bir tüp içerisine 1µg RNA, 1 µl 40 µM oligo d(T)18 primer, 1 µl 10 mM dNTP miks ve 10 µl'ye tamamlayacak miktarda nukleaz içermeyen dH2O eklenerek denatürasyon için 65°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 2 dk buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda karışım içerisine 10 µl cDNA sentez miksi (2 µl 10X Buffer M-MuLV, 100 ünite M-MuLV Reverse Transcriptase enzimi, 10 µl'ye tamamlayacak miktarda nukleaz içermeyen dH2O) ilave edildikten sonra sentez için 42°C'de 60 dk inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla karışım 85°C'de 5 dk inkübe edildi ve elde edilen cDNA sonrasında PCR için kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

2.5.3. PCR

qPCR, SYBR Green qPCR Master Miks (Thermo scientific, K0251) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada ifadesi araştırılan hedef genler ve referans olarak kullanılan *β-actin*'e özgü primerler Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. *apaf-1*, *casp-3*, *β-actin* genleri için kullanılan özgün primer dizileri.

Gen	**Primer dizileri**	**Referans**
apaf-1	İ: 5-TTGCTGCCCTTCTCCATGAT-3	Xiong ve ark 2009
	G: 5-TCCCAACTGAAACCCAATGC-3	
casp-3	İ: 5-AACTGGACTGTGGCATTGAG-3	Lu ve ark 2014
	G: 5-ACAAAGCGACTGGATGAACC-3	

Çizelge 2.3 (Devam). *apaf-1*, *casp-3*, *β-actin* genleri için kullanılan özgün primer dizileri.

β-actin	İ: 5-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3	Hsu ve ark 2005
	G: 5-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3	

İ: İleri, G: Geri

Hedef genler ve referans gen için qPCR reaksiyon karışımı Çizelge 2.4.'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.4. *apaf-1*, *casp-3*, *β-actin* genleri için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon bileşenleri	**Hacim**
SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Forward primer (50 µM)	0,25 µl
Reverse primer (50 µM)	0,25 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen dH_2O	10 µl
Toplam	**25 µl**

Hazırlanan reaksiyon karışımı Roche Light Cycler 1.2 cihazına uygun kapiler tüplere aktarılarak cihaz içerisine yerleştirildi. Hedef genlerin ve referans genin amplifikasyonu Çizelge 2.5.'de belirtilen protokole gerçekleştirildi.

Çizelge 2.5. *apaf-1*, *casp-3*, *β-actin* genleri için uygulanan 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

apaf-1, *casp-3* genlerinin ifade düzeyleri real time PCR'da elde edilen Ct değerleri üzerinden yorumlandı. *β-actin* housekeeping gen ifade düzeyine göre normalizasyon işlemi gerçekleştiridi. Juglon uygulanmamış kontrol grubu ve juglon uygulanmış gruplarda gen ifade düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak karşılaştırıldı.

2.6. Apoptoz Tayini

Normal fizyolojik şartlarda hüzre zarının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin apoptotik süreçte hücre zarı dış yüzeyine transloke olmaktadır. Annexin V floresans işaretli proteininin, fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanabilmesi esasına dayanarak apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Juglonun PANC-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini değerlendirmek amacıyla Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit'i (Abcam, ab14085) kullanıldı ve kitin mevcut protokolüne göre analiz gerçekleştirildi.

Analiz için öncelikle içerisine 12 mm lamel yerleştirilmiş 24 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta yaklaşık 1-5x10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 5, 10, 15, ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası juglonlu besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 500 µl 1X "Binding Buffer" eklendi. İçerisinde Binding Buffer bulunan her bir kuyucuğa 5 µl kit içerisindeki Annexin V-FITC ve apoptotik hücrelerden nekrotik hücreleri ayırabilmek 5 µl propidium iyodür ilave edildi ve plate bir karıştırıcı üzerine konulup karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Süre sonunda boya ve buffer karışımı uzaklaştırılıp kuyucuk içerisindeki lameller lam üzerine alınarak preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskop altında incelenerek değerlendirildi.

Kontrol grubu ile 5, 10, 15, ve 20 µM juglon uygulanmış gruplar arasında apoptotik hücre miktarındaki farklılıklar değerlendirilerek juglonun PANC-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi yüzde olarak hesaplandı.

2.7. MnSOD Protein Analizi

Juglonun PANC-1 hücrelerinde önemli redoks düzenleyicilerinden biri olan MnSOD proteininin hücredeki düzeyine gösterdiği etkiyi değerlendirmek amacıyla SOD2 Human ELISA Kit'i (Abcam, ab119694) kullanıldı. Analiz için örnek olarak kullanılacak hücre lizatının hazırlanması ve analiz, kitin mevcut protokolüne göre gerçekleştirildi.

SOD2 Human ELISA Kit, hücre ve doku lizatlarında insan SOD2 proteininin kantitatif ölçümünü sağlayan in vitro enzim-bağlı immünosorbent testtir. Deneyde, kuyucukları insan SOD2 proteinine özgü antikor kaplı bir plate kullanılmaktadır.

2.7.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Hücrelerin hazırlanması için öncelikle 6 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta yaklaşık $1x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5, 10, 15, ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası juglonlu besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra tripsinizayon işlemiyle hücreler kuyucuk yüzeyinden kaldırılarak bir falkon tüpe alındı ve kit protokolüne geçildi.

- Hücreler, 500 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası hücreler iki kez PBS ile muamele edildi.
- 500 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti $2x10^7$/ml oranına uygun miktarda "Extraction Buffer" ile çözdürüldü.
- Süspansiyon, 20 dk buz üzerinde inkübe edildive sonrasında 16,000 g'de 20 dk 4°C'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası hücre lizatını oluşturan süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve -80°C'de muhafaza edildi.

2.7.2. Bisinkoninik Asit (BCA) Protein Tayini

Elde edilen hücre lizatının protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla BCA Protein Quantification Kit (Abcam, ab102536) kullanıldı.

Kit, proteinlerin (Cu^{2+}) tuzlarını indirgeme özelliğine dayalı olup Cu^{2+} iyonları, bisinkoninik asit (BCA) ile 562 nm'de çok güçlü absorbans gösteren yoğun mavi renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Bu yoğunluğu, lizattaki protein miktarı ile doğru orantılıdır.

Kuyucuklara seri dilüsyonları oluşturulmuş BCA standartlarından ve örneklerden 50 μl ilave edildi. Standart ve örnekler üzerine 100 μl çalışma

solüsyonundan (Bakır reaktifi ve BCA reaktifi) ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 562 nm'de ölçüm yapıldı.

2.7.3. MnSOD Protein Analizi

- Kuyucuklara seri dilüsyonları oluşturulmuş insan SOD2 standartlarından ve örneklerden 50 µl ilave edildi.
- Plate'in üzeri kapatılarak 2 saat çalkalayıcı üzerinde 300 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 300 µl 1X yıkama tamponu ile 2 kez kuyucuklar yıkandı ve yıkama işleminden sonra kalan sıvı, plate iyice kuru kalacak şekilde uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklara kullanım öncesi yeterli miktarda taze olarak hazırlanan 1X belirleyici antikordan 50 µl ilave edildi. Plate'in üzeri kapatılarak 1 saat çalkalayıcı üzerinde 300 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 300 µl 1X yıkama tamponu ile 2 kez kuyucuklar yıkandı ve yıkama işleminden sonra kalan sıvı, plate iyice kuru kalacak şekilde uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklara 50 µl kullanım öncesi taze olarak hazırlanmış 1X HRP etiketi içeren 1X inkübasyon tamponundan ilave edildi. Plate'in üzeri kapatılarak 1 saat bir çalkalayıcı üzerinde 300 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 300 µl 1X yıkama tamponu ile 3 kez kuyucuklar yıkandı ve yıkama işleminden sonra kalan sıvı, plate iyice kuru kalacak şekilde uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklara 100 µl geliştirme solüsyonu eklenip mavi renk gelişimi gözlendi, reaksiyon hidroklorik asit ilave edilerek durduruldu (mavi renk sarıya döner) ve yoğunluk mikroplate okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.

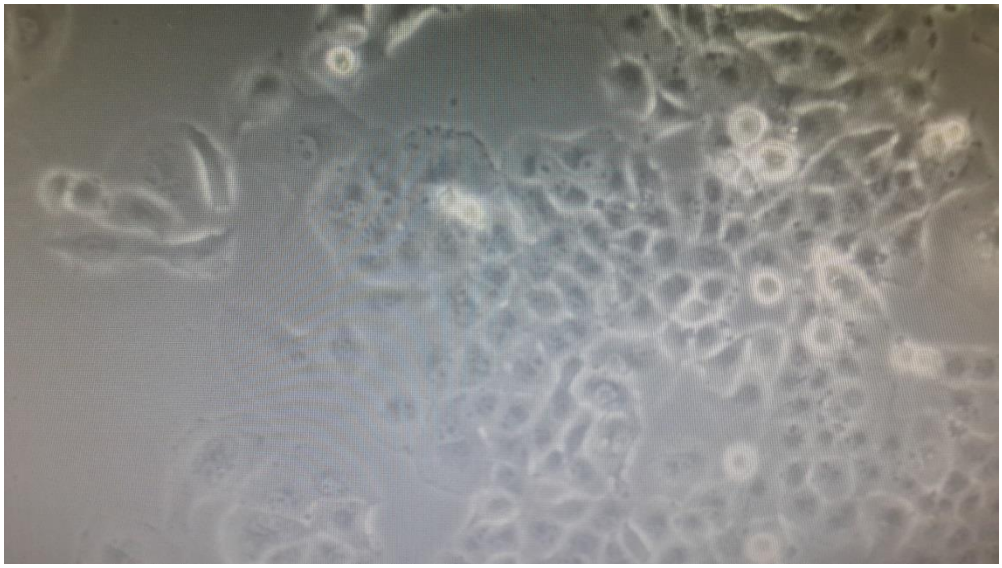
2.8. İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistiksel analizi için SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı, $p<0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Farklı konsantrasyonda juglon uygulanmış gruplar ile negatif kontrol olarak juglon uygulanmamış grup arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı.

3. BULGULAR

3.1. PANC-1 Hücre Morfolojisi

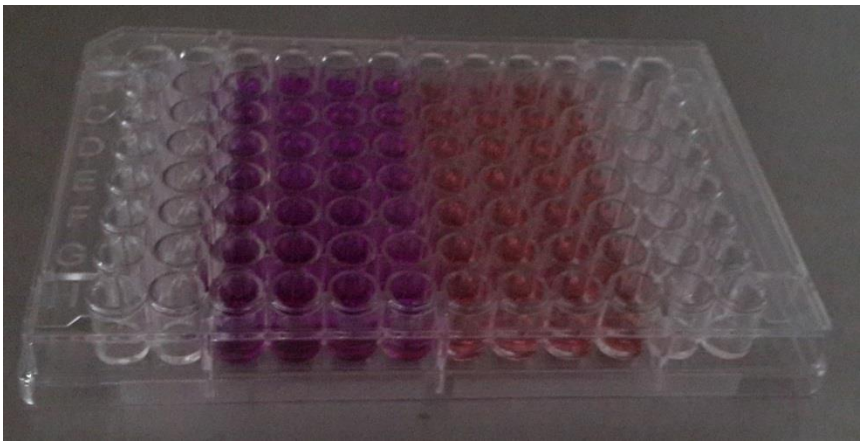
Kültür flaskına alınan ve 37 °C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılan PANC-1 hücrelerinin, inkübasyon sonrası iki günde bir flask yüzeyindeki görüntüsü inverted mikroskopta kontrol edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PANC-1 hücre morfolojisi (X10 büyütme).

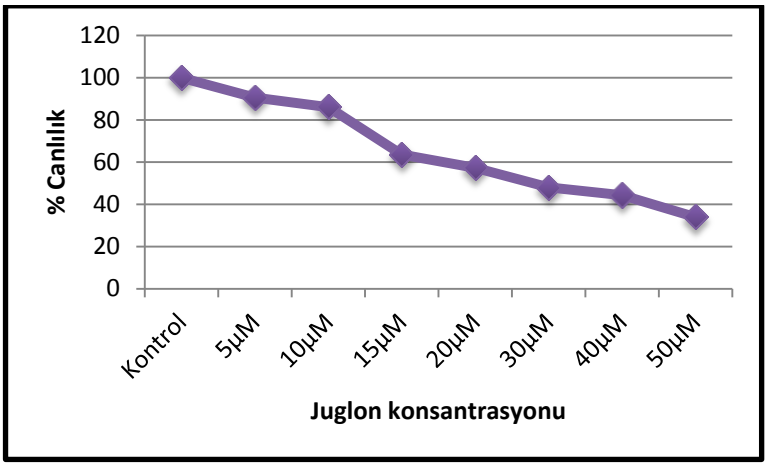
3.2. Juglonun Sitotoksik Etkisi

Juglonun 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 μM konsantrasyonlarının PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi uygulanmıştır (Şekil 3.2).



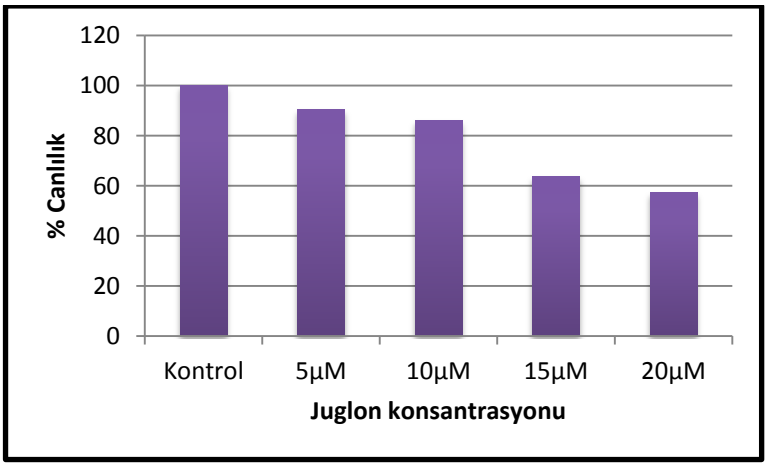
Şekil 3.2. MTT testinde gözlenen renk değişimi.

MTT testi verileri ile 24 saatlik uygulama sonrasında PANC-1 hücrelerinde juglonun IC_{50} değeri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak 21,25 µM olarak hesaplanmıştır ($p<0.05$).



Şekil 3.3. Juglon uygulamasının PANC-1 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.

PANC-1 hücrelerinde 24 saatlik juglon uygulamasından sonra juglon konsantrasyonlarında hücre canlılığı yüzdeleri 5 µM için %90,62, 10 µM için %86,05, 15 µM için %63,63 20µM için %57,33, 30µM için 48,06, 40µM için 44,36 ve 50 µM için 33,95 olarak tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 3.3).

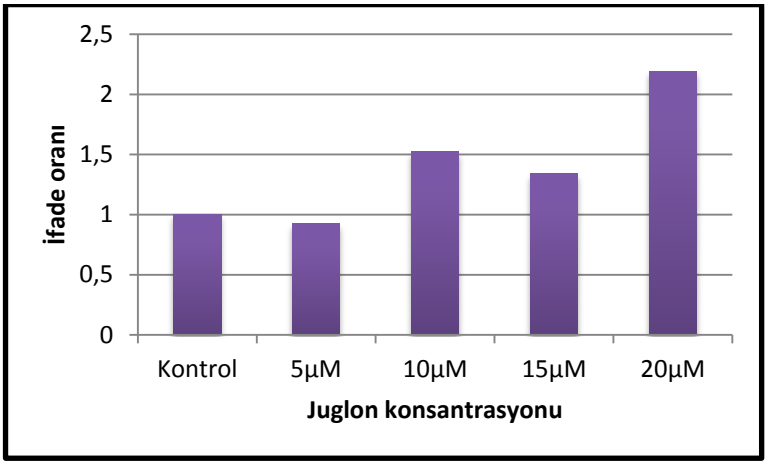


Şekil 3.4. Çalışma konsantrasyonlarındaki hücre canlılık yüzdeleri.

3.3. Juglonun *casp-3* ve *apaf-1* Genlerinin İfadeleri Üzerindeki Etkisi

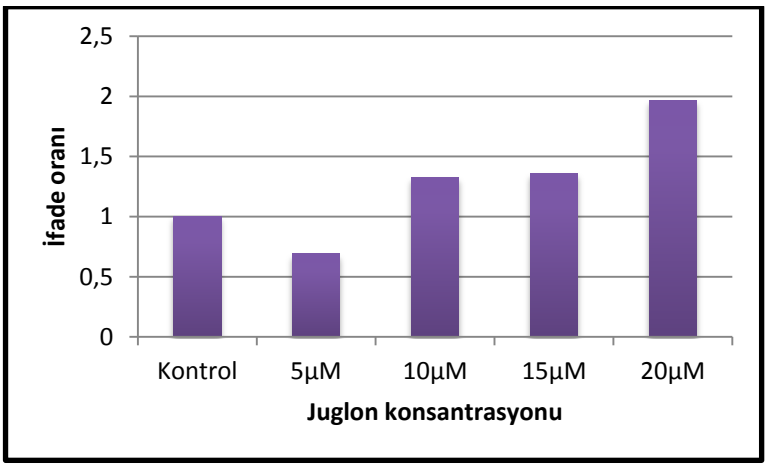
Kantitatif PCR verileri REST (Relative Expression Software Tool) programı ile değerlendirildi. PANC-1 hücrelerinde *casp-3* geni ifade düzeyi 24 saatlik 5 µM juglon uygulaması sonrası kontrol grubuna göre 0,01 kat azalış ($p>0,05$), 10 µM'da

1,52 kat artış (p>0,05), 15 µM'da 1,52 kat artış (p>0,05) ve 20µM'da 2,19 kat artış (p<0,05) göstermiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Juglon uygulamasının casp-3 geni ifadesi üzerine etkisi.

PANC-1 hücrelerinde *apaf-1* geni ifade düzeyi 24 saatlik 5 µM juglon uygulaması sonrası kontrol grubuna göre 0,31 kat azalış (p>0,05), 10 µM'da 1,32 kat artış (p<0,05), 15 µM'da 1,36 kat artış (p<0,05) ve 20 µM'da 1,97 kat artış (p<0,05) göstermiştir (Şekil 3.6).

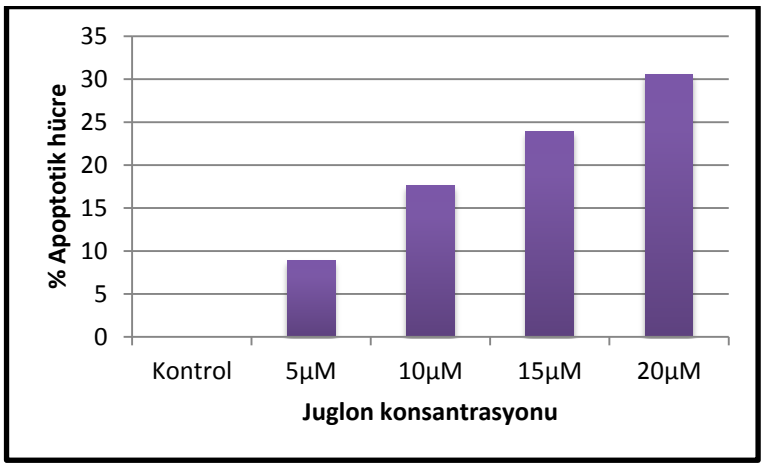


Şekil 3.6. Juglon uygulamasının *apaf-1* geni ifadesi üzerine etkisi.

3.4. Juglonun Apoptotik Etkisi

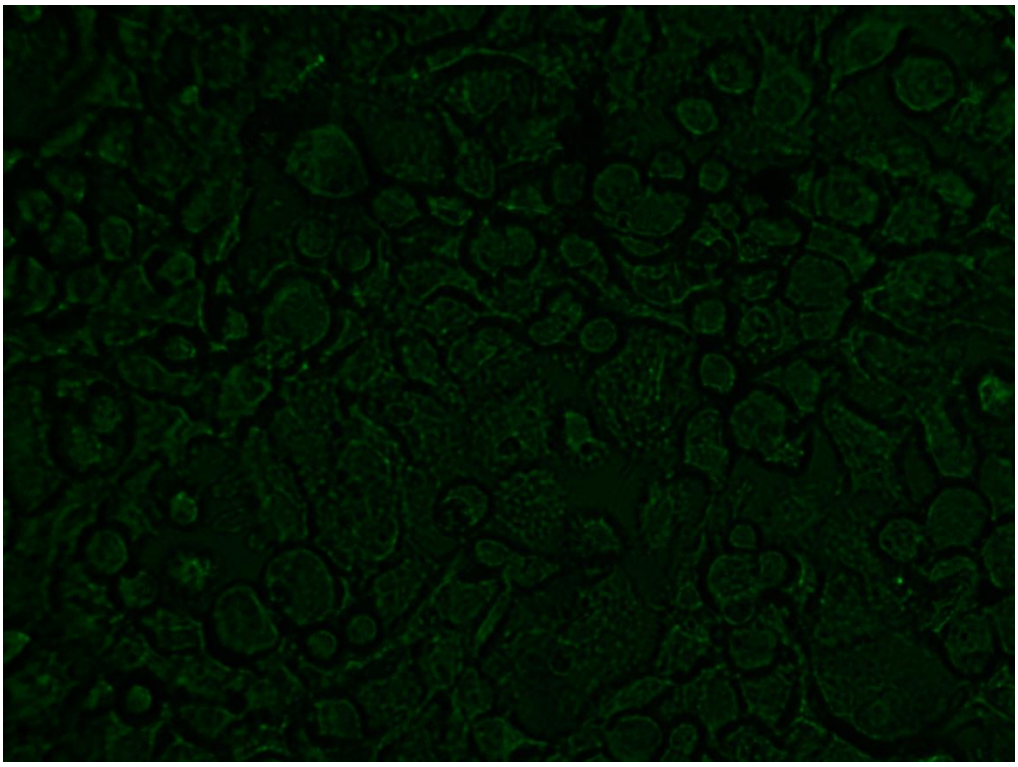
Annexin V-FITC ile boyanan PANC-1 hücrelerinde apoptotik hücre oranı floresan mikroskop sayım sonuçlarına göre kontrol grubunda %0, 24 saatlik 5 µM

juglon uygulaması sonrası %8,89, 10 µM'da %17,66, 15 µM'da %23,91 ve 20µM'da %30,57 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.7).

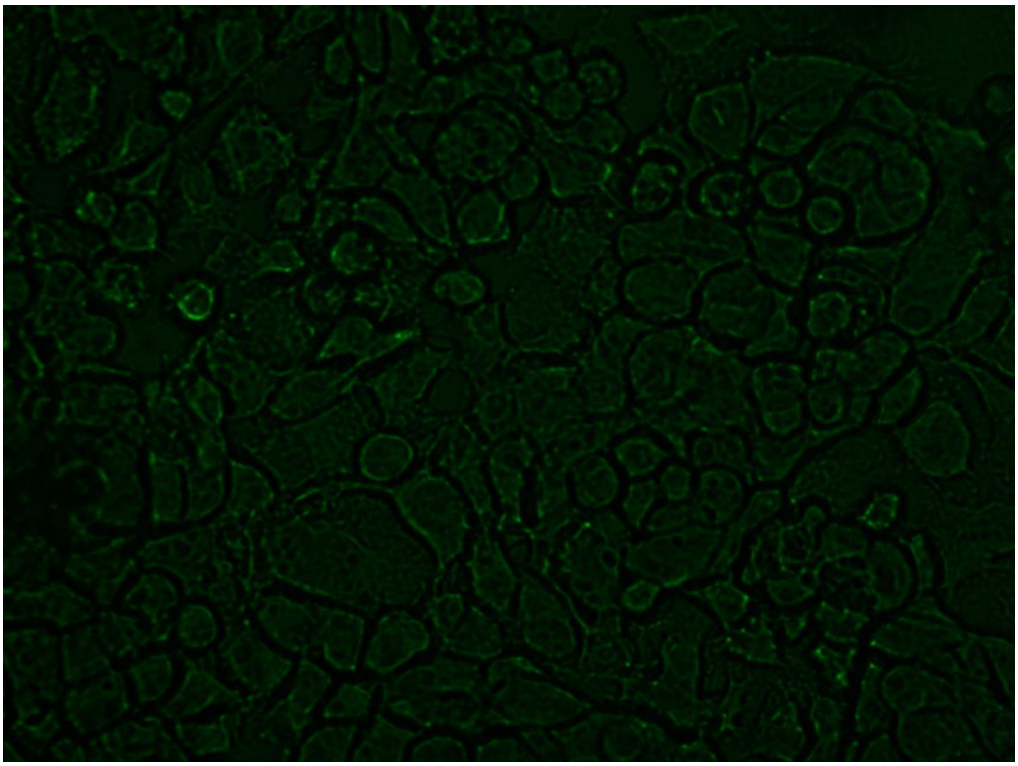


Şekil 3.7. 24 saat juglon uygulamasının PANC-1 hücrelerindeki apoptotik etkisi.

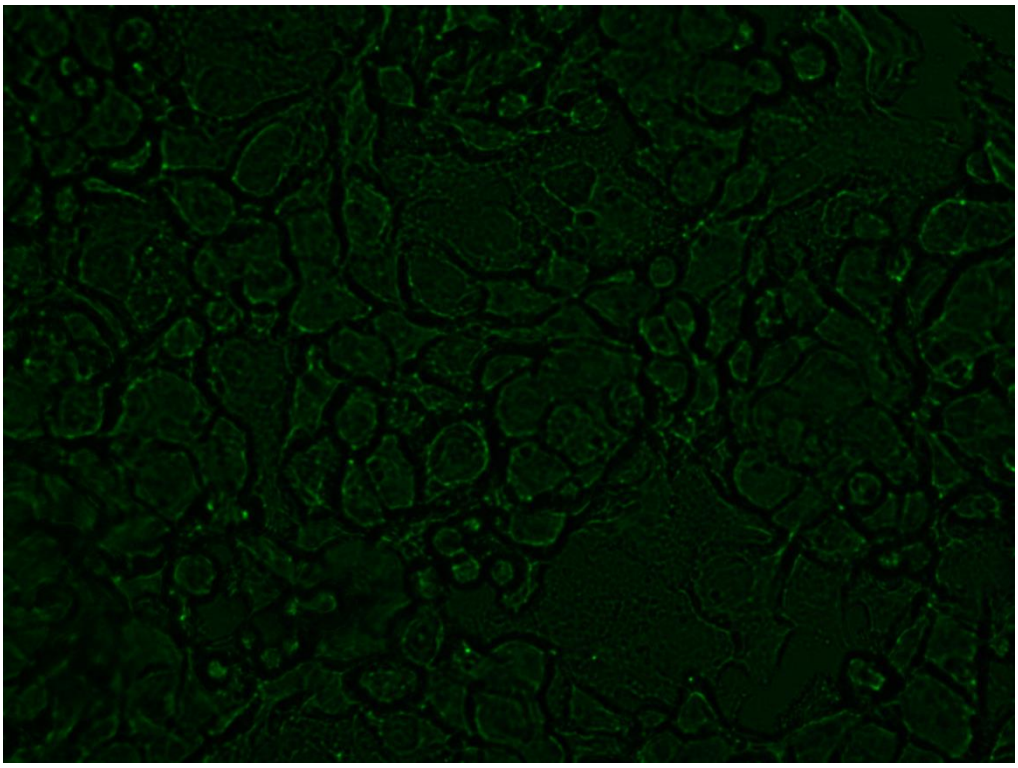
Floresan mikroskop altındaki PANC-1 hücre görünümü kontrol grubu ve 5, 10, 15 ve 20µM juglon uygulama gruplarında sırasıyla Şekil 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 ve 3.12'de görüldüğü gibidir.



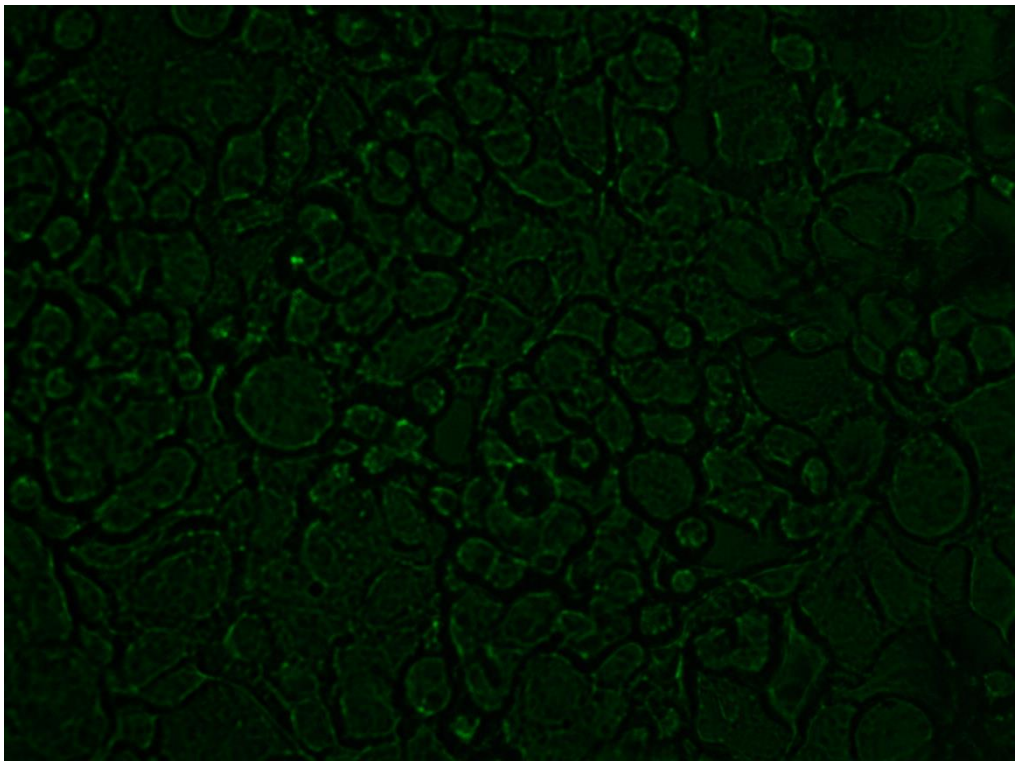
Şekil 3.8. PANC-1 pankreas kanser hücre hattında Anneksin V-FITC boyama-Kontrol grubu (X40 büyütme)



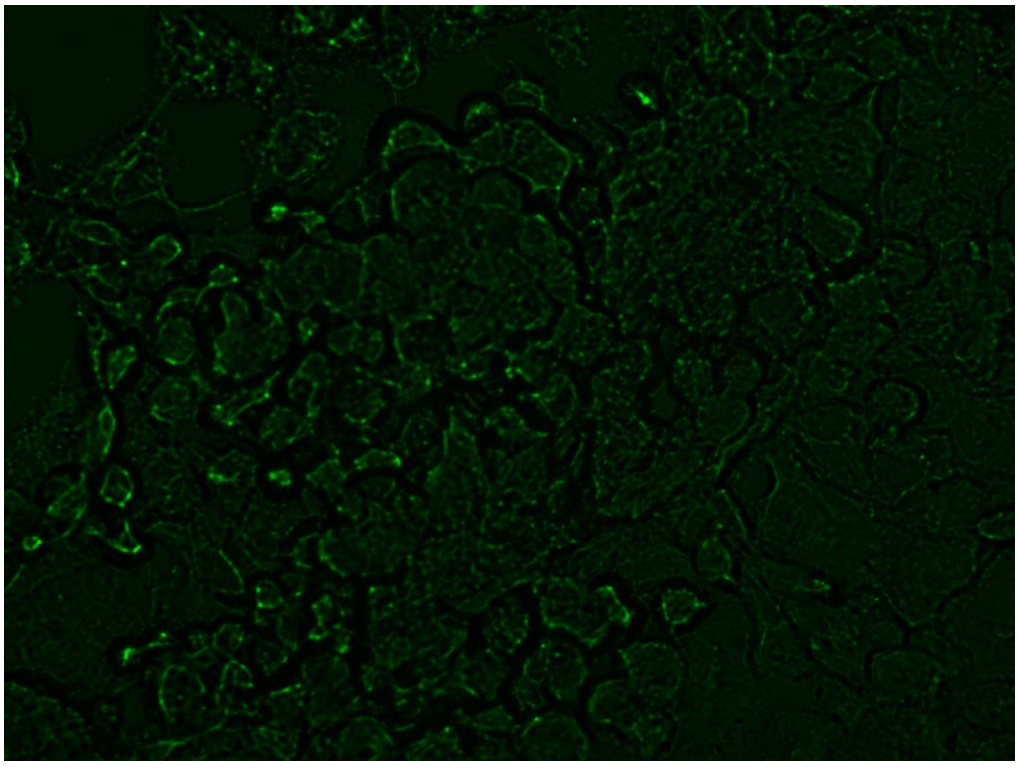
Şekil 3.9. PANC-1 pankreas kanser hücre hattında Anneksin V-FITC boyama-5µM juglon uygulaması (X40 büyütme).



Şekil 3.10. PANC-1 pankreas kanser hücre hattında Anneksin V-FITC boyama-10µM juglon uygulaması (X40 büyütme).



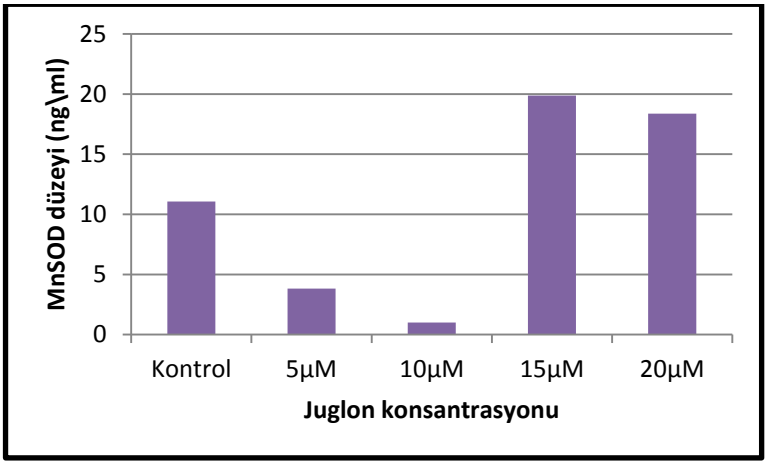
Şekil 3.11. PANC-1 pankreas kanser hücre hattında Anneksin V-FITC boyama-15μM juglon uygulaması (X40 büyütme).



Şekil 3.12. PANC-1 pankreas kanser hücre hattında Anneksin V-FITC boyama-20μM juglon uygulaması (X40 büyütme).

3.5. Juglonun MnSOD Protein Düzeyine Etkisi

ELISA yöntemi ile belirlenen PANC-1 hücrelerinde MnSOD protein düzeyleri kontrol grubunda ortalama 11,07 ng/ml, 24 saatlik 5 µM juglon uygulamasında 3,82 ng/ml, 10 µM'da 1 ng/ml, 15 µM'da 19,87 ng/ml ve 20 µM'da 18,87 ng/ml olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Juglon uygulamasının PANC-1 hücrelerindeki MnSOD protein düzeyine etkisi.

4. TARTIŞMA

Pankreas kanseri, genellikle belirtisiz seyirli, ileri evrelerde iken tanısı konabilen ve bu nedenle "sessiz katil" gibi ifadeler kullanılan agresif malignant özellikli bir kanser tipidir (Kaur ve ark 2013). Pankreas kanseri hücrelerinin çeşitli genetik değişiklerle apoptozdan kaçmak için kemoterapi/radyoterapi gibi sitotoksik geleneksel tedavilere karşı yüksek oranda *de novo* direnç mekanizması geliştirmiş olduğu bilinmekle birlikte; son yıllarda, metastatik pankreas kanseri tedavisindeki ilerlemenin asgari düzeyde olduğu belirtilmekte ve mevcut standart tedavilerin sınırlı başarısı nedeniyle yeni tedavi stratejileri ve terapötik ajanların tanımlanmasının gerekliliğinin vurgusu yapılmaktadır (Donald ve ark 2012, Hafeez ve ark 2012, Boreddy ve Srivastava 2013).

Biyoaktif antikanser ajanlar için önemli kaynak teşkil eden doğal ürünler, geleneksel kemo-ilaçlara kıyasla daha düşük toksisiteye sahip olma avantajı ile bu ilaçların toksisitesini azaltıcı ve etkilerini arttırıcı özellikleri nedeniyle, son yıllarda yaygın olarak araştırılmaktadır (Alshatwi ve 2012, Yu ve ark 2013). Ayrıca halen kullanılmakta olan kemoterapötik ilaçların %60'tan fazlasının doğal ürünlerden köken alarak geliştirildiği bilinmekte ve birçok kanser tipinde olduğu gibi pankreas kanserinde de bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin, kanserden koruyucu ya da terapötik ajan olarak değerlendirilmesi amacıyla antikanser özellikleri çalışılmaktadır (Li ve Leung 2014).

Antikanserojen etkileri yaygın olarak araştırılmış, bitkisel kaynaklı doğal bir bileşik olan flavonoidlerden genistein, daidzein, resveratrol, baikalein, flavopridol, apigenin ve katesinlerin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkileri gösterilerek pankreas kanseri tedavisinde ve korunulmasında önemli terapötik ajan olabilecekleri belirtilmiştir (Roginsky ve ark 2005). Flavonoidlerin yanı sıra diterpenoid bileşik oridonin, doğal fenolik bileşiklerden kurkumin gibi çeşitli bileşiklerin pankreas kanserinde apoptotik direncin üstesinden gelecek yeni stratejiler sağlayacağı da ifade edilmiştir (Li ve Leung 2014). Bu doğal bileşiklerin pankreas kanserindeki antikanserojenik etkilerinin incelenmesi amacıyla PANC-1 hücrelerinin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.

Cui ve ark (2010); pankreas kanseri hücrelerinde resveratrolün antitümör etkilerini incelemek amacıyla BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında yaptıkları çalışmada; resrevatrolün PANC-1 hücrelerinde önemli derecede konsantrasyon bağımlı olarak apoptotik hücre sayısında artışa, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunda artışa, antiapoptotik Bcl-2, Bcl-xL ve XIAP proteinlerin ifadesinde azalmaya, proapoptotik Bax proteininin ifadesinde artışa yol açtığını göstermişlerdir.

Johnson ve de Mejia (2013); apigeninin GSK-3β/NF-κβ sinyal silsilesinin baskılanması aracılığıyla BxPC-3 ve PANC-1 hücrelerinde apoptozu uyardığını bildirmişlerdir. Çalışmalarında PANC-1 hücrelerinde antiapoptotik protein XIAP'ın ve prokaspaz-3'ün protein ifadesinde önemli derece azalma görüldüğünü ve sitozolik sitokrom-c düzeyinde aynı oranda artış gösterdiğini belirtmişler ve apoptotik mekanizmanın mitokondriyal yolakla gerçekleştiğini vurgulamışlardır.

Wang ve ark (2006); BxPC-3 ve PANC-1 hücrelerinde kurkuminin Notch-1 geni ifadesini ve NF-κβ aktivasyonunu azaltarak apoptozu uyardığını ve hücre büyümesinin engellendiğini göstermişlerdir.

Literatürde kinonların geleneksel kemoterapötik ilaçların antitümör aktivitelerini arttırdığını gösteren çalışmalar da yer almaktadır. Örneğin benzokinon türevli timokinon bileşiğinin pankreas kanserinde *in vitro* olarak kanser hücrelerinin gemsitabin ve oksaliplatin'e karşı daha hassaslaştırarak apoptotik düzeyde önemli derecede bir artışa ve *in vivo* olarak tümör büyüklüğünde önemli bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Banerjee ve ark 2009). Antrakinon türevli emodinin pankreas kanserinde NF-κβ baskılanması aracılığıyla gemsitabine karşı apoptotik direnci azalttığı gösterilmiş olup bu bileşiğin yalnız başına kullanıldığı *iv vivo* çalışmada pankreas kanseri dokularında anjiyogenez ilişkili faktörlerin (VEGF, MMP-2, MMP-9 ve eNOS) ve NF-kB'nin ifadesini önemli derecede azaltarak anjiyogenezi baskıladığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Liu ve ark 2011, Lin ve ark 2012). Naftakinon bileşiklerine bakıldığında juglonun yapısal analoğu olduğu plumbaginin yanı sıra, şikonin, beta-lapakon ve bir naftakinon türevi olan vitamin K3'ün (menadion) de apoptotik uyarıcı etkileriyle antikanser özelliklerini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Akciğer kanseri hücrelerinde integrin β1 ifadesini ve ERK1/2 sinyal yolağını baskılayarak adezyonu ve metastazı azalttığı gösterilmiş olan şikoninin, hepatoselüler karsinoma hücreleri ve prostat kanseri hücrelerinde ROS-bağımlı apoptozu uyardığı bildirilmiştir (Gong ve Li 2011, Wang ve ark 2013, Gara ve ark 2015).

Menadionun, insan oral kanser hücrelerinde epitelyal mezenşimal geçiş belirteçlerinin (vimentin, fibronektin, E-kaderin) ifadesini düzenlediği, migrasyonu engellediği ve antiapoptotik (Bax) ve apoptotik (Bax, p53) protein ifadelerini düzenleyerek apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Suresh ve ark 2013).

β-Lapakonun, insan kolon kanseri HCT-116 hücrelerinde apoptoz düzenleyici transkripsiyon faktörü NF-κB'nin protein ifadesini ve DNA-bağlanma aktivitesini önemli derecede azaltırken, apoptotik efektör kaspaz-3'ün aktivitesini arttırarak apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Choi ve ark 2003).

Juglonun pankreas kanseri hücrelerinde antikanser etkileri bilinmemekle birlikte sitotoksik ve apoptotik etkileri benzer yapısal analoğu olan plumbaginin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki apoptoz uyarıcı ve antiinvaziv gibi tümör büyümesini baskılayıcı özellikteki antikanser etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Plumbaginin BxPC-3, PANC-1 hücrelerinde ve ksenogref modellerde EGFR, Stat3 ve NF-κB aracılı sinyal yolaklarını baskılayarak kanser hücrelerinin invazyonunu azaltıcı etkileri gösterilmiştir (Hafeez ve ark 2012).

Chen ve ark (2009); BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında plumbaginin apoptotik etkilerini inceledikleri çalışmada; 24, 48, 72 saatlik ve her bir zaman için 0,625 μM, 5 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında plumbagin uygulaması yapılması sonucunda maksimum hücre çoğalmasının baskılanması 72 saatlik 10 μM'lık uygulama ile PANC-1 hücrelerinde gerçekleştiğinden apoptotik etkiyi bu hücre üzerinde 10μM'lık plumbagin uygulamasının zamana bağlı etkisini araştırmışlardır. Apoptoz tayini için Anneksin V/FITC-PI yöntemi ile flow sitometrik analizi gerçekleştirmiş ve sonucunda erken apoptotik hücrelerde artışa yol açtığını göstermişlerdir. Plumbagin uygulamasının PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal zar potansiyelini düşürdüğünü ve mitokondriyal apoptotik yolakla ilşkili Bax, sitokrom-c

ve AIF proteinlerinin ifadesini arttırdığını göstererek plumbaginin etki mekanizmasının mitokondriyal apoptotik yolakla ilişkilendirmişlerdir. Apoptoz ilşkili prokaspaz-9 ve PARP protein ifadesine bakıldığında ise bir azalma ile bu proteinlerde kesim olduğu ve kaspaz-3 aktivasyonunda da bir artışa yol açtığı gösterilmiş; ancak kaspaz proteinlerin inhibitörleri kullanılarak tekrar ettikleri çalışmada apoptotik etkinin yine var olduğunu görülmesi ve AIF'ın ifadesindeki artıştan dolayı plumbaginin apoptotik etkisinin kaspaz bağımlı olabileceği gibi kaspaz bağımsız olabileceği de vurgulanmıştır.

Xu ve arkadaşları (2010); insan lösemi hücresi HL-60'ta juglonun hücre çoğalmasını engelleyici etkilerini inceledikleri çalışmada farklı konsantrasyonlarda juglonun 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonucu bu hücrelerdeki IC_{50} değerleri sırasıyla 1,47 μg/ml, 0,86 μg/ml ve 0,71 μg/ml olarak tespit ederek ileri deneyleri 0,5 μg/ml, 1 μg/ml ve 1,5 μg/ml konsatrasyonlarında 24 saatlik juglon uygulaması olacak şeklinde çalışmışlardır. Morfolojik incelemeler ile apoptotik hücre yapısının varlığı ve Anneksin V/FITC-PI yöntemi ile flow sitometrik analizi sonucu kontrol ve uygulamalarda sırasıyla %7,81, %35,46 %49,11 ve %35,46 olmak üzere konsantrasyon bağımlı olarak erken apoptotik hücrede artışının olduğunu göstermişlerdir. Juglonun mitokondri zar potansiyelinin konsantrasyon bağımlı olarak önemli derecede azalttığı; antiapoptotik protein Bcl-2'nin ifadesinde azalma, proapoptotik protein Bax'ın ifadesinde artmaya yol açtığı ve bu moleküllerin mRNA ifade düzeyinde de paralel sonuçlar elde edildiği; sitokrom c, Smac-Diablo ve AIF mitokondriyal proteinlerin sitoplazmik düzeylerinde artışa yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca prokaspaz-9, prokaspaz-3 ve öldürücü kaspaz subtratı PARP protein düzeylerinde azalışa ve eş zamanlı olarak kaspaz-9 ile kaspaz-3 aktivasyonunda artışa yol açtığı ve kaspaz-9 inhibitörü kullanılarak tekrar edilen apoptotik analiz sonucu anlamlı bir apoptotik etkinin görülmediğini göstermişler ve apoptotik etkinin mitokondriyal bağımlı ve özellikle kaspaz-9 aracılı sinyal silsilesiyle gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Ji ve arkadaşları (2011); insan mide kanseri SGC-7901 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, juglonun sitotoksik etkisi incelendiğinde farklı konsantrasyonlardaki 24 ve 48 saatlik juglon uygulamalarında GI_{50} değerleri sırasıyla 36,51 μM ve 25,37 μM olarak belirlemiş, 24 saatlik 5, 10, 15 ve 20 μM'lık juglon uygulamaları sonrası

Anneksin V/FITC-PI yöntemi ile flow sitometrik analizi sonucu kontrol ve konsantrasyonlarda sırasıyla %0,17, %7,27, %10,47, %16,13 ve %27,60 olmak üzere konsantrasyon bağımlı erken apoptotik hücrede artışının olduğunu göstermişlerdir. Mitokondriyal zar potansiyelinin önemli derecede konsantrasyon bağımlı olarak azaldığı gösterilmiş, Bcl-2 protein ifadesinde anlamlı bir azalış, Bax protein ifadesinde ise anlamlı bir artış ve mitokondriyal protein sitokrom-c'nin sitoplazmik düzeyinde anlamlı bir artışın görüldüğü belirlenmiştir. DCFDA floresans yöntemi kullanılarak yaptıkları incelemede hücrelerde juglon konsantrasyonu arttıkça önemli derecede ROS düzeyinde artış olduğunu göstermişler ve araştırmacılar juglonun bu hücrelerdeki apoptotik mekanizmasının ROS üretimi aracılığıyla mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Xu ve arkadaşları (2013); insan prostat kanseri LNCaP hücrelerinde juglonun AR (Androjen reseptörü) ifadesinin azaltılmasıyla apoptozu uyardığını bildirmişlerdir. Juglonun sitotoksik etkilerine baktıklarında 24 saatlik farklı konsantrasyonlarda juglon uygulaması sonucu IC_{50} değerini 13,8 μM olarak bulmuşlardır. Anneksin V/FITC-PI yöntemi ile flow sitometrik analizi sonucu konrol grubuna göre 24 saatlik juglon uygulamalarının konsantrasyon bağımlı olarak apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı bir artışın olduğunu göstermişlerdir. Mitokondri zar potansiyelinde azalma olduğu, prokaspaz-9 ve prokaspaz-3 proteinlerin ifadesinde azalış ve aktivitelerinde özellikle 15 μM'lık juglon uygulamasında 2,5 kattan fazla bir artışın olduğunu göstermişlerdir.

Juglonun PANC-1 hücrelerindeki etkilerini incelediğimiz bu çalışmada apoptotoz tayini Annexsin V/FITC-PI yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve diğer çalışmalardan farklı olarak flow sitometrik bir analiz değil floresan mikroskopta hücre sayımı yapılarak değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda, yapılan diğer çalışmalara benzer olarak PANC-1 hücrelerinde konsantrasyon bağımlı bir şekilde apoptotik hücre oranında anlamlı bir artış belirlenmiştir.

Juglonun apoptotik etki mekanizmasını değerlendirmek amacıyla kaspaz-3 ve apaf-1 moleküllerinin gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Juglonun doğrudan *casp-3* gen ifadesi üzereine etkisini belirten herhangi bir çalışma olmamakla birlikte, juglonun elde edildiği Juglans cinsi bitkilerinden *Juglans regia* L.'den elde edilen özütlerin, insan prostat kanser hücrelerinde apoptozla ilşikili *Tp53*, *bax*, *bcl2*

genlerinin yanı sıra *casp-3* geninin ifadesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada *casp-3* geni ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Alshatwi ve 2012).

Çalışmamızda, *casp-3* gen ifadesinde 5 μM'lık juglonun istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalışa yol açtığı belirlendi. Konsantrasyon arttıkça gen ifadesinde bir artış görülmekle birlikte yalnızca 20 μM'lık juglonun istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığı tespit edildi. Hücrelerde uyarı olmadığı sürece zimojen halde bulunan kaspaz moleküllerinin aktivasyonunu incelemek amacıyla diğer çalışmalarda yaygın olarak kaspaz aktivasyonu analizi gerçekleştirilmiş ve juglonun kaspaz-3 aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Juglonun kaspaz-3 molekülünün gen ifadesi üzerinde yalnızca yüksek konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açması tespitine bağlı olarak, juglonun düşük konsantrasyonlarda öncelikli olarak kaspaz aktivasyonuna neden olabiliceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, *apaf-1* gen ifadesinde 5 μM'lık juglon uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalışa yol açtığı, ancak konsantrasyon arttıkça gen ifadesi düzeyinde anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edildi. Juglonun apoptotik etkisinin araştırıldığı diğer çalışmalarda, juglonun *apaf-1* gen ifadesi üzerine etkisi gösterilmemiş olmakla birlikte mitokondriyal zar potansiyelinin bozulduğunun belirlenmesi, sitokrom-c gibi apoptotik mitokondriyal yapıların sitozolik düzeylerinin artmış olduğunun gösterilmesi ve çalışmamızda mitokondriyal apoptotik yolağın kilit molekülü Apaf-1'in gen ifadesindeki artışın belirlenmesi juglonun mitokondriyal apoptotik yolağı uyardığı görüşünü desteklemektedir.

Normal hücrelerde antioksidan sistem enzimleriyle redoks dengesi kurularak ROS seviyesi bazal seviyede tutulurken, kanser hücrelerinde antioksidan enzimlerin ifadelerindeki değişiklikle yüksek ROS seviyesi sağlayan anormal bir redoks durumu bulunmaktadır (Verrax ve ark 2011). Antioksidan enzimlerin ifadesindeki bozulma malignant hücrelerde kronik oksidatif stres yaratarak ROS'un antiapoptotik NF-kB transkripsiyon faktörünü ve MAPK, pI3-K yaşamsal sinyal yolaklarını sürekli uyararak malignant hücrelerde karsinojenik etkilere katkıda bulumaktadır (Grek ve Tew 2010). Kanser hücrelerinde belirli seviyede iken hücre çoğalmasına katkı gösteren ROS'un dış kaynaklı olarak üretimi arttırıldığında hücresel ölümü uyardığı belirtilmekte ve cisplatin, oksaplatin gibi geleneksel terapötik ajanların kanser

hücrelerinde ROS üretimi ile uyarılan apoptoza yol açarak etki gösterdikleri ifade edilmektedir (Conklin 2004).

Yaşamsal genlerin transkripsiyon faktörü olan NF-κβ'yi baskılayarak ve p53 tümör baskılayıcı geninin ifadesini arttırarak antikanser özellik gösteren naftakinonların genellikle, kanser hücrelerinde NAD(P)H oksidaz, siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi redoks döngüsünde rol alan enzimlerin ifadesini arttırmasıyla ROS aracılı apoptotik hücre ölümünü uyardığı belirtilmektedir (Lu ve ark 2013).

Antikanser ajanların terapötik hedeflerini oluşturan antioksidan enzimlere bakıldığında tiyoreksin redüktaz gibi bazı antioksidan enzimlerin kanser hücrelerinde ifadesinde artış görülmekle birlikte süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinde ise genellikle azalma görülmektedir (Verrax ve ark 2011, Ivanova ve ark 2013). Mitokondriyal ROS dengeleyicilerinden olan antioksidan MnSOD'un seviyesi kanser hücrelerinde çeşitlilik göstermektedir; normal dokulara göre gastrik, özofagial, akciğer, over kanseri ve kolorektal kanser hücrelerinde kanser agresifliği ve metastatik potansiyeli ile ilişkilendirilerek bir artış gösterirken meme kanseri ve pankreas kanserinde ise azalış gösterdiği belirtilmiştir (Izutani ve ark 1998, Malafa ve ark 2000, Chung-man ve ark 2001, Soini ve ark 2001, Hu ve ark 2005, Borrelli ve ark 2014).

Cullen ve ark (2003), pankreas kanseri hücrelerinde MnSOD'un hücre büyümesine etkilerini inceledikleri çalışmada; BxPC-3, MIA PaCa-2 ve AsPC-1 hücrelerinde MnSOD protein ifadesinin normal pankreas dokularına göre küçük bir farklılıkla daha az olduğunu, yüksek metastatik özellikteki Capan-1'de ise daha fazla olduğunu göstermişler; bununla birlikte Cu/ZnSOD'un ifadesinin yalnızca BxPC-3 hücrelerinde azalmış iken diğer hücrelerde artmış olduğunu göstermişlerdir. Gen transferi ile MnSOD protein ifadesini arttırıldığı MIA PaCa-2 hücrelerinde tümör büyümesinin yavaşladığını göstermişlerdir. Araştırmacılar ksenogreft model oluşturarak yaptıkları diğer çalışmaları ile MnSOD'un pankreas kanserinde tümör büyümesi üzerinde baskılayıcı etkisini vurgulamışlardır (Weydert ve ark 2003).

ROS üretimini arttırarak hücre ölümünü uyardığı belirtilen juglonun MnSOD protein seviyesi ya da aktivitesi üzerine etkileri hakkında literatür bulunmamaktadır. Juglonun yapısal analoğu plumbaginin, ROS üretimi ile prostat kanseri hücrelerinde

apoptozu uyardığı bildirilen bir çalışmada plumbaginin ROS kaynaklı antikanser etkisi için SOD aktivitesinde ve MnSOD protein seviyesinde azalmaya yol açarak redoks durumunu düzenlediği belirtilmiştir (Powolny ve Singh 2008).

Çalışmamızda juglonun pankreas kanseri hücresinde MnSOD'un protein düzeyi üzerine etkisi araştırılmıştır. 5 μM ve 10 μM'lık juglon uygulamalarında kontrol grubuna göre MnSOD düzeyinin önemli ölçüde azaldığı, 15 μM ve20 μM juglon uygulamalarında ise önemli derecede arttığı tespit edildi. Literatürlerde beilirtildiği üzere ROS, kanser hücrelerinde mevcut düzeyine göre prokanser ya da antikanser etkiler gösterebilmekte ve bu nedenle redoks sistemi düzenleyicisi olan antioksidan enzim düzeylerinde zıt etkiler gösterebilmektedir. Çalışmamızda, PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyondaki juglon uygulamalarına bağlı olarak, ROS'un hücrelerde farklı düzeyde üretilmiş olabileceği ve bu düzey farklılığından dolayı da juglonun antioksidan enzim MnSOD'un düzeyinde düşük konsatrasyonda azalmaya yüksek konsantrasyonlarda ise artışa yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız, juglonun PANC-1 hücrelerinde apoptozu uyarıcı etkisinin varlığını göstermiş olmakla birlikte; MnSOD düzeyinde belirlenen değişiklikler nedeniyle juglonun sitotoksik ve apoptotik etkilerini hücresel redoks durumunu değiştirerek gerçekleştirmiş olabileceğini göstermiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada önemli bitki sekonder matabolitilerinden naftakinon yapıdaki bileşik juglonun PANC-1 hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik özellikleriyle pankreas kanserindeki antikanser etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamız sonucunda siotoksik analiz ile juglonun PANC-1 hücrelerinde 24 saatlik uygulama için IC_{50} 21,25 μM olarak belirlenmiş; juglonun konsantrasyon bağımlı olarak Annexin V/FITC floresans yöntemle apoptotik hücre oranını arttırdığı ve mitokondriyal apoptotik yolağın kilit molekülü apaf-1'in tüm konsantrasyonlarda, apoptotik efektör molekül kaspaz-3'ün ise yalnızca yüksek konsantrasyonda anlamlı olarak gen ifadesini arttırdığı bulunarak juglonun PANC-1 hücrelerinde apoptozu uyarıcı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda apaf-1 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artışın bulunması, juglonun mitokondriyal yolakla apoptozu uyardığı görüşünü desteklemektedir. İleri bir çalışma ile PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal zar potansiyeli analizleri ve bu potansiyeli düzenleyen proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 gibi moleküller ile sitokrom-c ve AIF gibi mitokondriyal apoptotik proteinlerin ifade analizleri yapılarak bu görüş daha da kuvvetlendirilebilir. Ayrıca kaspaz-3 molekülünün gen ifadesi analizinin paralelinde kaspaz aktivitesi analizleri ve XIAP, survivin gibi kaspaz inhibitörlerinin gen ya da protein ifadeleri analizleri gerçekleştirilerek juglon aracılı apoptotik mekanizmada kaspazın rolü daha anlaşılır bir düzeye getirilebilir.

Juglonun ROS üretimi aracılığıyla redoks durumunu düzenleyerek sitotoksik ve apoptotik etki oluşturduğu bilgisine dayanarak juglonun PANC-1 hücrelerindeki bir mitokondriyal redoks düzenleyicisi olan MnSOD antioksidan enziminin protein düzeyi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda düşük konsantrasyondaki juglon uygulamalarında (5 ve 10 μM) MnSOD düzeyinde anlamlı bir şekilde azalış, yüksek konsantrasyonlarda (15 ve 20 μM) ise anlamlı bir artış bulunarak juglonun PANC-1 hücrelerinde antioksidan enzim MnSOD düzeyi üzerinde konsantrasyona bağlı olarak zıt etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Juglonun, MnSOD düzeyi üzerine olan zıt etkisini değerlendirebilmek amacıyla MnSOD protein düzeyi

analizlerinin paralelinde yapılacak bir çalışma ile PANC-1 hücrelerinde ROS düzeyleri belirlenebilir.

Çalışmamız ile önemli bir naftakinon bileşiği olan juglonun pankreas kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk kez araştırılmış ve PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkinin belirlenmesiyle juglonun pankreas kanseri tedavisi için yeni bir terapötik ajan adayı olabileceği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Abramson MA, Jazag A, van der Zee JA, Whang EE, 2007. The molecular biology of pancreatic cancer. Gastrointest Cancer Res, 1, 7-12.

Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T, 2010. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. Oxid Med Cell Longev, 3, 23-34.

Ahmad A, Banerjee S, Wang Z, Kong D, Sarkar FH, 2008. Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kB and Bcl-2. J Cell Biochem, 105, 1461-71.

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.

Alshatwi AA, Hasan TN, Shafi G, Syed NA, Al-Assaf AH, Alamri MS, Al-Khalifa AS, 2012. Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of Juglans regia L. on PC-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 103026.

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

Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M, 2006. APAF-1 signaling in human melanoma. Cancer Lett, 238, 168-79.

Arslan C, Yalcin S, 2014. Current and future systemic treatment options in metastatic pancreatic cancer. J Gastrointest Oncol, 5, 280-95.

Atagün G, Eren Z, Gürkanlı İ, 2011. Apoptoziste mitokondrinin rolü. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 4, 49-53.

Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM, 2009. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. Cancer Res, 69, 5575-83.

Bardeesy N, DePinho RA, 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. Nature Reviews Cancer 2, 897-909.

Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL, 2014. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. World J Gastroenterol, 20, 11182-98.

Bhardwaj N, Lloyd DM, 2013. Pancreatic and biliary cancer. In: Handbook of gastrointestinal cancer. Eds: Jankowski J, Hawk E, 1th ed. John Wiley & Sons, p. 182-210.

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 Lett, 334, 86-94.

Brosens LAA, Offerhaus GJ, 2013. Molecular Pathology of Pancreatic Cancer Precursor Lesions. In: Molecular Genetics of Pancreatic Cancer. Eds: Simeone DM, Maitra A. New York: Springer New York, p. 27-47.

Bruce-Keller AJ, 2001. Death domain signaling and its role in the central nervous system. In: Programmed cell death volume 1 cellular and molecular mechanism. Eds: Mattson MP, Estus S, Rangnekar VM, 1th ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V, p. 39-65.

Campbell F, Verbeke CS, 2013. Pathology of the pancreas a practical approach. London: Springer-Verlag, p. 3-20.

Capella C1, Albarello L, Capelli P, Sessa F, Zamboni G; Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD); Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP), 2011. Carcinoma of the exocrine pancreas: the histology report. Dig Liver Dis 4, 282-92.

Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, Iovanna JL, 2006. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. Cancer , 66, 6748-55.

Chen CA, Chang HH, Kao CY, Tsai TH, Chen YJ, 2009. Plumbagin, isolated from Plumbago zeylanica, induces cell death through apoptosis in human pancreatic cancer cells. Pancreatology, 9(6), 797-809.

Choi BT, Cheong J, Choi YH, 2003. beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. Anticancer Drugs, 14, 845-50.

Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC, 2001. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. Cancer Res, 61, 8578-85.

Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. Integr Cancer Ther, 3, 294-300.

Cowan RW, Maitra A, 2014. Genetic progression of pancreatic cancer. Cancer J, 20, 80-4.

Crawford ED, Wells J A, 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. Annu Rev Biochem, 80, 1055-87.

Cui J, Sun R, Yu Y, Gou S, Zhao G, Wang C, 2010. Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. Phytother Res, 24, 1637-44.

Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM, Ritchie J, Domann FE, Spitz D, Oberley LW, 2003. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res, 63, 1297-303.

Dabizzi E, Assef MS, Raimondo M, 2011. Diagnostic management of pancreatic cancer. Cancers, 3, 494-509.

DiMaio CJ, 2015. Pancreatic cysts and tumors. In: Mount sinai expert guides: Gastroenterology. Ed: Sands BE. 1th ed. John Wiley & Sons, p. 304-22.

Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R, 2014. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. Biomed Res Int. 2014, 11.

Doğan AL, Güç D, 2004. Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser. Hacettepe Tıp Dergisi, 35, 34-42.

Donald G, Hertzer K, Eibl G, 2012. Baicalein – an intriguing therapeutic phytochemical in pancreatic cancer. Curr Drug Targets, 13, 1772-6.

Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol, 35, 495-516.

Fadeel B, Ottosson A, Pervaiz S, 2008. Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. Cell Death Differ, 15, 443-52.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer, 136, E359-86.

Fukai T, Ushio-Fukai M, 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid Redox Signal, 15, 1583-606.

Fulda S, 2013. Modulation of mitochondrial apoptosis by PI3K inhibitors. Mitochondrion, 13, 195-8.

Gara RK, Srivastava VK, Duggal S, Bagga JK, Bhatt M, Sanyal S, Mishra DP, 2015. Shikonin selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic pathway. J Biomed Sci, 22, 26.

Gewies A, 2003. Introduction to apoptosis. ApoReview, 26 p. Erişim tarihi, 30 Mayıs 2015. Erişim adresi, http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm.

Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP, 2007. Biology and management of pancreatic cancer. Gut, 56, 1134-52.

Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M, 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. J Med Genet. 46, 497-510.

Gomathinayagam R, Sowmyalakshmi S, Mardhatillah F, Kumar R, Akbarsha MA, Damodaran C, 2008. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. Anticancer Res, 28, 785-92.

Gong K, Li W, 2011. Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: a potential new treatment for hepatocellular carcinoma. Free Radic Biol Med, 51, 2259-71

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

Grant CM, 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. Mol Microbiol, 39, 533-41.

Grek CL, Tew KD, 2010. Redox metabolism and malignancy, 10, 362-8.

Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E, 2008. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. Turk Kardiyol Dern Ars, 36, 120-30.

Güngör C, Hofmann BT, Wolters-Eisfeld G, Bockhorn M, 2014. Pancreatic cancer. Br J Pharmacol, 171, 849-58.

Hafeez BB, Jamal MS, Fischer JW, Mustafa A, Verma AK, 2012. Plumbagin, a plant derived natural agent inhibits the growth of pancreatic cancer cells in in vitro and in vivo via targeting EGFR, Stat3 and NF-κB signaling pathways. Int J Cancer, 131, 2175-86.

Hijioka S, Yamao K, 2015.Clinical, laboratory, and radiologic presentation of pancreatic cancer. In: Pancreatic cancer, cystic neoplasms, and endocrine tumors: Diagnosis and management. Eds: Beger HG, Nakao A, Neoptolemos JP, Peng SY, Sarr MG, 1th ed. John Wiley & Sons, p. 23-8.

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

Hongmei Z, 2012. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In: Apoptosis and medicine. Ed: Ntuli TB, 1th ed. Croatia: Intech, p. 3-22.

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

Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M, 2007. Precursors to pancreatic cancer. Gastroenterol Clin North Am, 36, 831-49.

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.

Hu Q, Wu D, Chen W, Yan Z, Shi Y, 2013. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. J Biol Chem, 288, 15142-7.

Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, Huang P, 2005. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. J Biol Chem, 280, 39485-92.

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG, 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis, 12, 1543-68.

Husain K, 2014. Pancreatic cancer treatment. J Drug Metab Toxicol, 5, 162.

Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C, 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. BBA Bioenergetics, 1807, 735-45.

Ivanova D, Bakalova R, Lazarova D, Gadjeva V, Zhelev Z, 2013. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. Adv Clin Exp Med, 22, 899-908.

Izutani R1, Asano S, Imano M, Kuroda D, Kato M, Ohyanagi H, 1998. Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers. J Gastroenterol, 33, 816-22.

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

Jiao L, Li D, 2010. Epidemiology and prospects for prevention of pancreatic cancer. In: Pancreatic Cancer. Eds: Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese J, Büchler MW, 1th ed. New York: Springer, p. 3-25.

Johnson JL, de Mejia EG, 2013a. Flavonoid apigenin modified gene expression associated with inflammation and cancer and induced apoptosis in human pancreatic cancer cells through inhibition of GSK-3β/NF-κB signaling cascade. Mol Nutr Food Res, 57, 2112-27.

Johnson JL, de Mejia EG, 2013b. Interactions between dietary flavonoids apigenin or luteolin and chemotherapeutic drugs to potentiate anti-proliferative effect on human pancreatic cancer cells, in vitro. Food Chem Toxicol, 60, 83–91.

Kastrinos F, Syngal S, 2011. Inherited colorectal cancer syndromes. Cancer J, 17, 405-15.

Kaur M, Deep G, Jain AK, Raina K, Agarwal C, Wempe MF, Agarwal R, 2013. Bitter melon juice activates cellular energy sensor AMP-activated protein kinase causing apoptotic death of human pancreatic carcinoma cells. Carcinogenesis, 34, 1585-92.

Kaynak K, 2002. Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. Solunum, 4, 468-73.

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

Kitagawa RR, Vilegas W, Carlos IZ, Raddi MSG, 2011. Antitumor and immunomodulatory effects of the naphthoquinone 5-methoxy-3, 4-dehydroxanthomegnin. Rev bras farmacogn, 21, 1084-88.

Krejs GJ, 2010. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. Dig Dis, 28, 355-8.

Kviecinski MR, Pedrosa RC, Felipe KB, Farias MS, Glorieux C, Valenzuela M, Sid M, Benites J, Valderrama JA, Verrax J, Buc Calderon P. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. Biochem Biophys Res Commun, 421, 268-73.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH, 2005. Death receptor signaling. J Cell Sci, 118, 265-7.

Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP, 2011. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. Biochim Biophys Acta, 1813, 532-9.

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

López-Lázaro M, 2007. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. Cancer Lett, 252, 1-8.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, 2006. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 20, 197-209.

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

Lu JJ, Bao JL, Wu GS, Xu WS, Huang MQ, Chen Xp, Wang YT, 2013. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. Anticancer Agents Med Chem, 13, 456-63.

Lu Y, Zhu M, Chen W, Yin L, Zhu J, Chen N, Chen W, 2014. Oleanolic acid induces apoptosis of MKN28 cells via AKT and JNK signaling pathways. Pharm Biol, 52, 789-95.

Mahalingam D1, Kelly KR, Swords RT, Carew J, Nawrocki ST, Giles FJ, 2009. Emerging drugs in the treatment of pancreatic cancer 14, 311-28.

Maisonneuve P, Lowenfels AB, 2010. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. Dig Dis, 28, 645-56.

Malafa M, Margenthaler J, Webb B, Neitzel L, Christophersen M, 2000. MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. J Surg Res, 88, 130-4.

Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead HO, Bratton SB, 2009. The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. EMBO J, 28, 1916-25.

Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F, La Vecchia C, Negri E, 2015. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? Ann Oncol, 26, 779-86.

Marchi S1, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P, 2012. Mitochondria-ROS crosstalk in the control of cell death and aging. J Signal Transduct, 2012, 329635.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW, 2013. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol, 5, a008656.

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

Muniraj T, Jamidar PA, Aslanian HR, 2013. Pancreatic cancer: a comprehensive review and update. Dis Mon, 59, 368-402.

Olsson M, Zhivotovsky B, 2011. Caspases and cancer. Cell Death Differ, 18, 1441-9.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK, 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif, 45, 487-98.

Pai M, Spalding D, 2015. Pancreatic cancer. Medicine, 43, 329-33.

Pandol S, Gukovskaya A, Edderkaoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A, 2012. Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. J Gastroenterol Hepatol, 2, 127-34.

Pinto AV, de Castro SL, 2009. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. Molecules, 14, 4570-90

Pop C, Salvesen GS, 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. J Biol Chem, 284, 21777-81.

Poruk KE, Firpo MA, Adler DG, Mulvihill SJ, 2013. Screening for pancreatic cancer: why, how, and who?. Ann Surg, 257, 17-26.

Powolny AA, Singh SV, 2008. Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. Pharm Res, 25, 2171-80.

Reid MD1, Bagci P, Adsay NV, 2013. Histopathologic assessment of pancreatic cancer: does one size fit all? J Surg Oncol, 107, 67-77.

Roginsky AB, Ujiki MB, Ding XZ, Adrian TE, 2005. On the potential use of flavonoids in the treatment and prevention of pancreatic cancer. In Vivo, 219, 61-7.

Rustgi AK, 2014. Familial pancreatic cancer: genetic advances. Genes & Dev, 28, 1-7.

Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N, 2014. Pancreatic adenocarcinoma. N Engl J Med, 371, 2140-1.

Saiki Y, Horii A, 2014. Molecular pathology of pancreatic cancer. Pathol Int, 64, 10-9.

Sakorafas GH1, Smyrniotis V. Molecular biology of pancreatic cancer: how useful is it in clinical practice? JOP, 13, 332-7.

Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M, 2012. Apoptosis in cancer--an update. Asian Pac J Cancer Prev, 13, 4873-8.

Seicean A, Seicean R, 2012. Risk factors in pancreatic cancer. In: Pancreatic cancer-molecular mechanism and targets. Ed: Srivastava SK. Croatia: InTech, p. 1-16.

Seshadri P, Rajaram A, Rajaram R, 2011. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. Free Radic Biol Med, 51, 2090-107.

Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P, ESMO Guidelines Working Group, 2012. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol, 7, vii33-40.

Seydel G, Aksoy K, 2012. Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Mechanisms. Archives Medical Review Journal, 21, 221-35.

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F, 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis, 5, 415-18.

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

Soini Y, Vakkala M, Kahlos K, Pääkkö P, Kinnula V, 2001. MnSOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in in situ carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. J Pathol, 195, 156-62.

Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC 2012. Inherited pancreatic cancer syndromes. Cancer J, 18, 485-91.

Søreide K, Sund M, 2015. Epidemiological-molecular evidence of metabolic reprogramming on proliferation, autophagy and cell signaling in pancreas cancer. Cancer Lett. 356, 281-8.

Srinivas G, Annab LA, Gopinath G, Banerji A, Srinivas P, 2004b. Antisense blocking of BRCA1 enhances sensitivity to Plumbagin but not tamoxifen in BG-1 ovarian cancer cells. Mol Carcinog, 39, 15-25.

Srinivas P, Gopinath G, Banerji A, Dinakar A, Srinivas G, 2004a. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. Mol Carcinog, 40, 201-11.

Sun Y, Peng ZL. Programmed cell death and cancer. Postgrad Med J, 85, 134-40.

Suresh S, Raghu D, Karunagaran D, 2013. Menadione (Vitamin K3) induces apoptosis of human oral cancer cells and reduces their metastatic potential by modulating the expression of epithelial to mesenchymal transition markers and inhibiting migration. Asian Pac J Cancer Prev, 14, 5461-5.

Şimşek F, Vatansever HS, 2014. Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon. Yeni Tıp Dergisi, 31, 6-11.

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

Takahashi H, Chen MC, Pham H, Angst E, King JC, Park J, Brovman EY, Ishiguro H, Harris DM, Reber HA, Hines OJ, Gukovskaya AS, Go VLW, Eibl G, 2011. Baicalein, a component of Scutellaria baicalensis, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells. Biochim Biophys Acta, 1813, 1465-74.

Teoh ML, Sun W, Smith BJ, Oberley LW, Cullen JJ, 2007. Modulation of reactive oxygen species in pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 13, 7441-50.

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

Thakur A, 2011. Juglone: a therapeutic phytochemical from Juglans regia L. J Med Plants Res, 5, 5324-30.

Tummala P, Junaidi O, Agarwal B, 2011. Imaging of pancreatic cancer: An overview. J Gastrointest Oncol, 2, 168-174.

Vennela B, Shirisha V, Rao CB, Gullapalli V, Mahesh B, 2012. Current and future strategıes for therapy of pancreatıc cancer. IJRPC, 2, 728-40.

Verrax J, Beck R, Dejeans N, Glorieux C, Sid B, Pedrosa RC, Benites J, Vásquez D, Valderrama JA, Calderon PB, 2011. Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. Anticancer Agents Med Chem, 11, 213-21.

Walensky LD, 2006. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. Cell Death Differ. 2006 Aug, 13, 1339-50.

Wang C, Youle RJ, 2009. The role of mitochondria in apoptosis. Annu Rev Genet, 43, 95–118.

Wang H, Wu C, Wan S, Zhang H, Zhou S, Liu G, 2013. Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin β1 expression and the ERK1/2 signaling pathway. Toxicology, 308, 104-12.

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.

Werner, Herzig, 2010. Paraneoplastic Syndromes in Pancreatic Cancer. In: Pancreatic Cancer. Eds: Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese J, Büchler MW, 1th ed. New York: Springer, p. 651-73.

Weydert C, Roling B, Liu J, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Oberley LW, Cullen JJ, 2003. Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase. Mol Cancer Ther, 2, 361-9.

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH, 2013. Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin, 63, 318-48.

Wong RS, 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res, 30, 87.

Wörmann SM1, Algül H, 2013. Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. Front Oncol, 3, 282.

Wu H, Xing K, Lou MF, 2010. Glutaredoxin 2 prevents H_2O_2-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1797, 1705-15.

Xiong H, Qiu H, Zhuang L, Xiong H, Jiang R, Chen Y, 2009. Effects of 5-Aza-CdR on the proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 and on the expression of Apaf-1 gene. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 29, 498-502.

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. Bioorg Med Chem Lett, 23, 3631-34.

Xu HL, Yu XF, Qu SC, Qu XR, Jiang YF, Sui DY, 2012. Juglone, from Juglans mandshruica Maxim, inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species-dependent mechanism. Food Chem Toxicol, 50, 590-96.

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.

Yadav D, Lowenfels AB, 2013. The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. Gastroenterology, 144, 1252-61.

Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Goto M, 2008. Precursor lesions of pancreatic cancer. Gut Liver, 2, 137-54.

Yu J, Drisko J, Chen Q, 2013. Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. Oncol Rep, 30, 149-56.

Zakharova OP, Karmazanovsky GG, Egorov VI, 2012. Pancreatic adenocarcinoma: outstanding problems. World J Gastrointest Surg, 4, 104-13.

Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M, 2011. Molecular biology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol, 17, 2897-908.

Zhou JH, Cheng HY, Yu ZQ, He DW, Pan Z, Yang DT, 2011. Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Chin Med J (Engl), 124, 1695-9.

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 2015/171 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Hilal ARIKOĞLU'nun, "Juglonun PANC-1 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle 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 PANC-1 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması" adlı araştırmanın kabulüne oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
12/05/2015

Mahmut KESİK
Sekreterya

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında RİZE'nin Aredeşen ilçesinde doğdu. İlköğretimi Ümraniye İstiklal İlköğretimi Okulu'nda, orta öğretimini Ümraniye Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 2009 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olarak tamamladı. 2013 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı ve yüksek lisans eğitimi için Selçuk Üniversitesi'ne araştırma görevlisi olarak görevlendirildi. Halen daha Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.