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

YENİ SENTEZ PLATİN (II) SAKKARİNAT KOMPLEKSİNİN (TRANS-[PT(SAC)$_2$(PPH$_2$CY)$_2$]) PANC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BEYHAN KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL-2020

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

YENİ SENTEZ PLATİN (II) SAKKARİNAT KOMPLEKSİ (TRANS-$[PT(SAC)_2(PPH_2CY)_2]$) PANC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BEYHAN KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL-2020

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAY

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

Anabilim Dalı Başkanı	Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Engin Ulukaya	Prof. Dr. Semra Sardaş

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

Prof. Dr. Engin Ulukaya

Danışman

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

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

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans olarak sunduğum "YENİ SENTEZ PLATİN (II) SAKKARİNAT KOMPLEKSİNİN (TRANS-[PT(SAC)$_2$(PPH$_2$CY)$_2$]) PANC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Beyhan KILIÇ

…/…/ 2020

ÖZET

YENİ SENTEZ PLATİN (II) SAKKARİNAT KOMPLEKSİNİN (TRANS-[PT(SAC)$_2$(PPH$_2$CY)$_2$]) PANC-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Beyhan Kılıç

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

Pankreas kanseri, agresif ve malign özelliği yüksek olan, erken tanısının zor olması ve hızlı metastaz kabiliyeti ile ölüm oranı yüksek olan bir kanser türüdür. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi pankreas kanserinde de kemoterapik ve radyoterapik uygulamalar, kanser hücrelerinde oluşan direnç mekanizması tedaviyi başarısız kılmaktadır. Son yıllarda klinik olarak kullanılan platin bazlı antikanser ilaçlara alternatif, yeni kemoterapötik metal bazlı komplekslerin keşfedilmesine yönelik araştırmalar, büyük ilgi görmektedir. Çalışmamızda kimyasal araştırma grubu tarafından yeni sentez edilen platin (II) sakkarinat kompleksinin (trans-[Pt(sac)$_2$(pph$_2$cy)$_2$]) PANC-1 pankreas kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik/apoptotik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Amacımız doğrultusunda yeni sentez platin (II) sakkarinat kompleksinin (trans-[pt(sac)$_2$(pph$_2$cy)$_2$]) sitotoksik etkisini belirlemek için MTT ve SRB testi yapılmış, 24 ve 48 saatler için IC_{50} ve IC_{90} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca flow sitometrisi yöntemi ile 12 ve 24 saatler için Anneksin V, Kaspaz 3/7, mitokondri membran potansiyeli ve oksidatif stres parametrelerine bakılarak hücre ölüm metodu değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda yeni sentez platin (II) sakkarinat kompleksinin (trans-[Pt(sac)$_2$(pph$_2$cy)$_2$]) PANC-1 hücreleri üzerinde gösterdiği apoptotik ve sitotoksik etkileri nedeniyle pankreas kanseri tedavisinde ümit vaadedici bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Sitotoksisite, Platin Kompleks, Sakkarinat, PANC-1, Pankreas Kanseri

ABSTRAC

INVESTİGATİON OF CYTOTOXİC / APOPTOTİC EFFECTS OF NEW SYNTHESİS PLATİNUM (II) SACCHARİNATE COMPLEX (TRANS- [PT (II) $_2$ (PPH_2CY) $_2$]) ON PANC-1 PANCREATİC CANCER CELLS

Beyhan Kılıç

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

Pancreatic cancer is a type of cancer that has high aggressive and malignant features, has a high early mortality rate and rapid metastasis, and a high mortality rate. As with other types of cancer, chemotherapeutic and radiotherapeutic applications in pancreatic cancer, the resistance mechanism formed in cancer cells make the treatment unsuccessful. Researches on the discovery of new chemotherapeutic metal-based complexes, which are alternative to platinum-based anticancer drugs, which have been used clinically in recent years, are of great interest. In our study, it was aimed to investigate the cytotoxic / apoptotic effect of the newly synthesized platinum (II) saccharinate complex (trans- [Pt (II) $_2$ (pph_2cy) $_2$]) on PANC-1 pancreatic cancer cells. In line with our aim, MTT and SRB tests were performed to determine the cytotoxic effect of the new synthesis platinum (II) saccharinate complex (trans- [Pt (II) $_2$ (pph_2cy) $_2$]) and IC_{50} and IC_{90} values were calculated for 24 and 48 hours. In addition, cell death method was evaluated by looking at Anneksin V, Caspase 3/7, mitochondrial membrane potential and oxidative stress parameters for 12 and 24 hours with flow cytometry method. As a result of our study, it was thought that the new synthesis platinum (II) saccharinate complex (trans- [Pt (II) $_2$ (pph_2cy) $_2$]) can be evaluated as a promising anticancer agent in the treatment of pancreatic cancer due to its apoptotic and cytotoxic effects on PANC-1 cells.

Keywords: Apoptosis, Cytotoxicity, Platinum Complex, Saccharinate, PANC-1, Pancreatic Cancer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen sayın hocam ve danışmanım Prof. Dr. Engin Ulukaya'ya

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

Deneylerimin her aşamasında yanımda olan, yardımlarını eksik etmeyen, bütün bilgi ve deneyimlerini en içtenlikle güler yüzle ve büyük bir sabırla bana aktaran canım arkadaşlarım Merve ERKISA ve Melda SARIMAN'a

Beni bugünlere getiren, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli babam Cahit KILIÇ, değerli annem Ayşe KILIÇ, değerli ağabeyim Murat KILIÇ, değeli yengem Mükerrem KILIÇ ve sevgili yeğenim Elif KILIÇ'a

Ayrıca canımdan can olan, hiçbir zaman solmasını istemediğim sevgi çiçeklerim, iyikilerim, bana anneliği tattıran çocuklarım Furkan GÖKTAŞ ve Talha GÖKTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER
KABUL ONAY
ETİK BEYANI

ÖZET ..... **i**
ABSTRAC ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
TABLO LİSTESİ ..... **vii**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **viii**
GİRİŞ **1**
1. GENEL BİLGİLER **2**
1.1. KANSER 2
1.2. KANSER HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ 3
1.3. PANKREAS KANSERİ 4
1.3.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi 5
1.3.2. Pankreas Kanseri Görülme Sıklığı ve Risk Faktörleri 6
1.3.3. Hastalık Semptomları 10
1.3.4. Teşhis 10
1.3.5. Evreleme 13
1.3.6. Tedavi 14
1.4. PANKREAS KANSERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ 17
1.5. HÜCRE ÖLÜM MODELLERİ 17
1.5.1. Apoptozis 17
1.5.2. Apoptozisin İndüklenmesi 20
1.5.2.1. Kaspazların Apoptozisdeki Rolü 20
1.5.2.2. Mitokondrinin Apoptozisdeki Rolü 22
1.5.2.3. Bcl-2 Ailesinin Apoptozisdeki Rolü 23
1.5.2.4. P 53 24
1.5.2.5. Fas (APO-1 veya CD95) 25
1.5.3. Apoptozisin Mekanizmaları 25
1.5.3.1. Ekstrinsik (dışsal) Yolak 25
1.5.3.2. İntrinsik (içsel) Yolak 27
1.5.3.3. Endoplazmik Retikulum (ER) Aracılı Apoptozis Oluşturulması 28
1.5.3.4. Kaspaz Bağımsız Apoptozis 29
1.5.4. Nekrozis 29
1.5.5. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar 30
1.6. METAL BAZLI BİLEŞİKLERİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ 31
2. MATERYAL VE METOD **32**
2.1. MATERYAL 32
2.1.1. Kimyasal Maddeler 32
2.1.2. Sarf Malzemeler 32
2.1.3. Cihazlar 33
2.2. METOD 33
2.2.1. Kimyasal Bileşiğin Stok Solüsyonunun Hazırlanması 33
2.2.2. Hücre Kültürü 34

2.2.2.1. Hücre Hattı 34
2.2.2.2. Besiyerinin Hazırlanması 34
2.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması 34
2.2.2.4. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması 35
2.2.2.5. Hücre Soylarının Pasajlanması 35
2.2.2.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 35
2.2.2.7. MTT (Metiltiazotetrazolyum) Canlılık Testi 36
2.2.2.8. SRB ((Sulforhodamine B) Canlılık Testi 37
2.2.2.9. Akım Sitometri Analizleri 38
2.3. KİMYASAL BİLEŞİĞİNİN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ 45
2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 46
3. BULGULAR 46
3.1. MTT VE SRB CANLILIK TESTİ BULGULARI 46
3.2. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI 49
3.2.1. Kaspaz 3/7 Testi Değerlendirilmesi 49
3.2.2. Anneksin-V Değerlendirilmesi 51
3.2.3. Mitokondri Membran Potansiyel Değişiklikleri 52
3.2.4. Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi 54
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 55
KAYNAKÇA 58
ÖZGEÇMİŞ 66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Kanser hücrelerinin özellikleri (Hallmarks, 2011) 4
Şekil 1.2: 50-69 Yaş Gruplarında Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) 6
Şekil 1.3: 50-69 Yaş Gruplarında Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) 7
Şekil 1.4: Apoptotik hücredeki değişiklikler (Karaoğlu ve ark., 2008). 20
Şekil 1.5: Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği noktanın mitokondri olduğunun gösterilmesi (Ulukaya, 2003). 22
Şekil 1.6: Bcl-2 protein ailesinin bazı üyelerinin şematik sınıflandırması (Kuwana & Newmeye, 2003)…….. 23
Şekil 1.7: İçsel ve dışsal apoptotik yolak (Aşık, 2015) 27
Şekil 1.8: Hücrede Apoptoz Oluşum Mekanizmalarının Yolları (Gültekin ve ark., 2008)… ……..……. 28
Şekil 1.9: Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar (Yeni Biyoloji, 2018). …… 30
Şekil 2.1: MTT Tepkimesi…….. 37
Şekil 2.2: Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi (Anonim, 2013). 40
Şekil 2.3: Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark.1998'den değiştirilerek alınmıştır)..... 41
Şekil 2.4: Anneksin-V Boyama (Anonim, 2013)..... 42
Şekil 2.5: Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi (Anonim, 2013). 43
Şekil 2.6: Oksidatif Stres Miktarının (ROS) Ölçülmesi (Anonim, 2014). 45
Şekil 3.1: Pt (II) kompleksiyle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin MTT testi grafikleri……..... 47
Şekil 3.2: Pt (II) kompleksiyle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin SRB testi grafikleri…….47
Şekil 3.3: Pt (II) kompleksiyle muamele edilen PANC-1 hücre soyunda 48 saat faz görüntüleri…… 48
Şekil 3.4: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50 μM (IC_{90}) konsantrasyonunda PANC-1 insan pancreas kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları……..50
Şekil 3.5: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50 μM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları……..51
Şekil 3.6: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50μM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları……53
Şekil 3.7: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50 μM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı……..54

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Pankreas kanseri tanısında kullanılan yöntemler (Göral, 2014) 11
Tablo 1.2:Tümör markerlarının, pankreatik kanser evresine göre tanıdaki yerleri (Göral, 2014). 12
Tablo 1.3: Pankreas kanseri için TNM evreleme sistemi ve pankreas kanseri evreleri (Aşık, 2015)..... 13
Tablo 1.4: İnsanda bulunan kaspazlar (Aşık, 2015)..... 21
Tablo 1.5: Hücre soyunun özellikleri…….. 34
Tablo 3.1: Pt (II) bileşiği uygulanan hücre soylarının IC_{50} ve IC_{90} dozlarının belirlenmesi…….. 49

SİMGE ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
µ	Mikro
7-AAD	:7-Aminoaktinomisin D
AICC	: Amerika Birleşik Kanser Komitesi
AIF	: Apoptozis İndükleyici Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APO-1	: Accumulatıon of Photosystem One1
ATCC	: American Type Culture Collection
ATM	: Ataksi-telanjiektazi mutasyon
ATP	: Adenozin Trifosfat (Adenosine triphosphate)
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutasyonlu Gen
ATR	: Ataxia-Telangiectasia ve Rad3 Related
A1C	: Glikozile Hemoglobin
BRCA 1	: Meme Kanseri 1 (breast 1 cancer)
BRCA 2	: Meme Kanseri 1 (breast cancer 1)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CA 19-9	: Carcinom Antigen
CAD	: Kaspaz Aktive Edici DNaz
CARD	: Kaspaz Takviye Alanı (Caspase recruitment domain)
CEA	: Carcinom Embrionic Antigen
CED	: Cell Death Abnormality
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 A
CDK7	: Sikline Bağımlı Kinaz- 7
CD	: Cluster of Differentiation
Chkl	: Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz-1
DED	: Ölüm Etkileyici Alan (Death effector domain)
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	: Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit (Deoxyribonucleic acid
DNA-PK	: DNA-Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
DR	: Ölüm Reseptörü (Death Receptor)
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

Endo G : Endonükleaz D
ER : Endoplazmik Retikulum
ERK : Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ERCP : Endoscopic Retrograde Cholongiopancreatography
EUS : Endoskopik Ultrasongrafi
FADD : Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associateddeath domain)
FAS : Faktörle İlişkili Apoptoz Protein
FBS : Fetal sığır serumu (Fetalbovine serum)
HIPK2 : Homeomain-Etkileşen Protein Kinaz-2
HNPCC : Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IDDM : Dependent Diabetes mellitus
IAF : İnhibitör Apoptotik Faktör
ICAD : İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
ICE : Interleukin-1β-Converting Enzyme
IL : Interlökin
IPMN : İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi
IRE1 : Inositol Requiring Enzyme 1
JNK : c-Jun NH2-terminal Kinaz
MDM2 : Fare Çift Dakika-2
MRI : Magnetic Resonance Imaging
MYC : Myelositomatosis Karsinomu
MTT : (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
PI : Propidyum iyodür (Propdium iodide)
PETCT : Positron Emission Tomography
PE : Fosfatidiletanolamin
PC : Fosfotidilkolin
PKA : Protein Kinaz A
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
PTK : Perkütan Transhepatik Kolanjiyografi
Pt: : Platin
PS : Fosfatidil Serin (phosphatidylserine
SRB : Sulforhodamine B
STK : Serin/Treonin Kinaz
TGF : Transforming Growth Factor
TNF : Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor)
TNFR : Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TNM : Tümör Nod Metastaz
TRADD : TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteini
TRAIL : Tnf-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand
T2DM : Tip2 Diabetes mellitus
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurum
US : Ultrasongrafi
VIP : Vazoaktif İntestinal Peptid
WCRF :Dünya Kanser Araştırma Fonu

GİRİŞ

Pankreas kanseri dünyada kansere bağlı mortalitede dördüncü ve en yaygın kanserler sıralamasında beşinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda pankreas kanseri gastrointestinal kanserler arasında giderek artan sıklığı ile dikkat çekmekte ve gastrointestinal kanser ile ilişkili ölümlerde ülkemizde mide ve kolon kanserinden sonra gelmektedir. Pankreas kanseri 1 yıllık genel sağkalım oranı % 26 ve 5 yıllık sağkalım oranı % 5'ten daha az olan son derece malign solid bir tümördür (Çetin ve Dede, 2019). Pankreatik kanserinde ölüm oranının yüksek olmasının nedenleri; erken tanı zorluğu, hızlı yayılımı (metastaz kabiliyeti), radyoterapi ve kemoterapiye direnç göstermesi şeklinde sıralanmaktadır. Pankreatik kanseri erken dönemde tanı, pankreasın anatomik konumu, sinsice gelişmesi ve tümör belirteçlerinin olmaması nedeniyle oldukça güçtür (Şahin ve ark., 2007). Tanı anında genellikle hastalığın ileri evresi ve uzak organ metastazı ile karşılaşılır. En önemli etken, hastalığın erken evresinde belirgin spesifik semptomların olmayışıdır. Pankreas kanseri insidansı ve ölüm oranı, ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır. İleri yaşlarda görülmekle birlikte, nadiren 45 yaş öncesi rastlanır ve 50 yaş üstünde görülme oranı çok yüksektir (Çetin ve Dede, 2019).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bir kemoterapötik ajan olan platin kompleksleri; ilaç keşfi için giderek daha popüler olmuş, büyük bir merak ve araştırma konusu haline gelmiştir. Çeşitli kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkilerinin incelenmesi yönünde çalışmalar yoğunlaşmış ve bu maddelerin tamamlayıcı ya da alternatif antikanser ajan olarak kullanılabileceklerini öne sürmüştür.

Bu bilgiler doğrultusunda; bu tez çalışması kapsamında yeni sentez platin (II) sakkarinat kompleksinin (trans-$[Pt(sac)_2(PPh_2Cy)_2]$) PANC-1 pankreas kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik/apoptotik etkisi araştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. KANSER

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında oluşan kompleks bir hastalıktır. İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır. Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temel olarak genlerle ilişkili olan bir hastalıktır. Kromozomlar üzerinde bulunan genlerin fiziksel veya kimyasal değişimleri doğrudan hücrenin işlevini etkileyebilir. DNA tamir sistemleri, gende meydana gelen bir hasarı, yeniden işlev kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı sağlanamaz. Bu sonucunda genlerin ürünü olan proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesi hücresel işlevlerin bozulmasına yol açar. Genin işlevini değiştiren bir diğer etmen ise genin yapısını değiştirmeden işlevinin değişmesine neden olan metillenme, asetillenme, fosforillenme, ribozillenme gibi epigenetik modifikasyonlardır. Bu değişimler sadece özel bir bölge üzerinde etki gösterebileceği gibi kromozomların tamamını veya büyük bir bölünü etkileyen bölgesel delesyonlar, insersiyonlar veya inversiyonlar şeklinde de görülebilir. Kanserin oluşumunda büyük rol oynayan 3 gen grubu vardır. Bunlar tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamir genleridir. Hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan proto-onkogenler, mutasyonlar, artmış gen ifadesi, gen duplikasyonları ve/veya kromozomal düzenlemeler ile etkin hale geçip onkogen haline dönüşebilirler. RAS, Erk, MYC gibi genler en çok bilinen onkogenlerdir. Hücrenin bölünmesini ve çoğalmasını kontrol eden, hasar durumunda DNA tamirini başlatan, tamir girişiminin başarısız olması durumunda apoptozu tetikleyen gruplarına ise tümör baskılayıcı genler denir. TP53 geni en bilineni ve en çok çalışılanıdır. Delesyonlar, nokta mutasyonları, epigenetik susturmalar, kromozomların düzgün ayrılamaması ve mitotik rekombinasyonlar gibi durumlar tümör baskılayıcı genin işlevinin bozulmasına neden olarak hücre döngüsündeki kontrolün kaybolması ile sonuçlanarak

karsinogeneze neden olabilmektedir. Bir diğer önemli gen grubu da DNA tamir genleridir. DNA tamir genlerinin bir diğer işlevi ise tamirin başarısız olması halinde hücrenin apoptotik veya nekrotik yolak üzerinden yok edilmesini sağlamaktır.

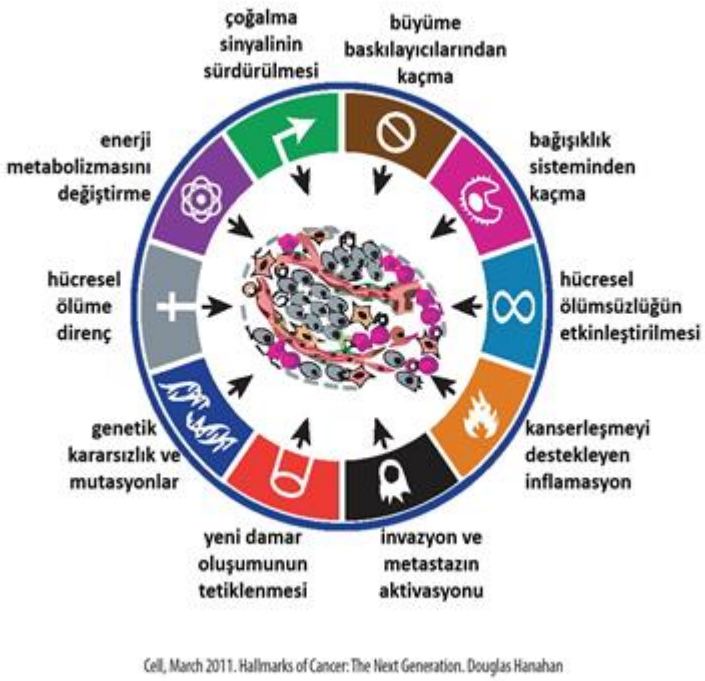
Kanserin görülme sıklığı arttıkça, sosyal ve ekonomik yükü de artmaktadır. Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler birlikte veya tek başına kanser tedavisine kullanılan yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin avantajları olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle bu konvansiyonel yöntemlere ek olarak çeşitli immünolojik ve biyolojik tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Baykara, 2016).

1.2. KANSER HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ

Kanser hücreleri; az oksijen, az yiyecek, zorlu koşullara karşı gösterdiği direnç ve zaman içerisinde bu koşulları kendi lehine çevirmesi ile yaşama tutunan zeki hücrelerdir. Kanser hücreleri zamanla transforme (şekil değişimi) olabilir. Normal hücrelerin belli bir zemine tutunarak büyümesi ve yaşaması mümkünken, kanser hücreleri herhangi bir yere tutunmadan da yaşayabilir ve büyüyüp çoğalabilirler (proliferasyon).

Kanser hücrelerinin bazı özellikleri;

- Hücre yüzeyindeki almaçlar (reseptörler) daha sık sinyal alır.
- Kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemleri vardır.
- Yandaki hücreye temas sonrası bölünmeyi durdurmaz ve büyümeye ve çoğalmaya devam eder.
- Sağlıklı hücreler her tipteki besini kullanabilirken kanser hücreleri sadece glikolizden gelen glukozu kullanabilirler. Şekeri normal hücreler oranla yaklaşık 100 kat fazla olarak kandan alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar (Warburg etkisi).
- Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler (Anjiyogenez).
- Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz aktivitesini koruyarak sonsuz şekilde replike olup çoğalabilirler.
- Başka doku ve organlara göç etme (İnvazyon veya Metastaz).
- Apoptozdan kaçabilirler (Baykara, 2016) (Şekil 1).



Şekil 1.1: Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

1.3. PANKREAS KANSERİ

Pankreas kanseri, erkeklerde kadınlara kıyasla biraz daha yüksek insidansa sahip olan ve ileri yaşlarda (40,85) daha sık görülen, agresif seyirli, ölümcül malign kanserlerden biridir. Tüm kanserlerin % 2'sini ve kansere bağlı ölümlerin %5'ni oluşturmaktadır. Sinsi ilerleyen kanser türleri arasında, ilk sıralarda yer almaktadır (Güral, 2014). Pankreas tümörleri malign-benign ve primer-sekonder (metastatik) ayrımı dışında; pankreas dokusunun yapı ve fonksiyon özelliklerinden dolayı; kistik-solid, ekzokrin-endokrin ya da epiteliyal-nonepiteliyal (mezenkimal) tümörler gibi başka şekillerde de sınıflandırılmaktadır (Coşar, 2018).

Endokrin pankreas tümörleri yaygın değildir. Endokrin pankreas tümörleri aynı zamanda nöroendokrin tümörleri olarak da adlandırılmaktadır. Yaklaşık üçte biri hormon üretir ve hücrenin ürettikleri hormon türüne göre isimlendirilirler. Gastrinoma (gastrin üreten hormonlarda görülür), İnsülinoma (insülin üretilen hücrelerde görülür), Somatostatinoma (somatostatin üreten hücrelerde görülür), VIPoma (vazoaktif intestinal peptid [VIP] üreten hücrelerde görülür) ve Glukagonoma (glukagon üreten hücrelerde görülür).

Pankreatik nöroendokrin tümörlerinin yaklaşık üçte ikisi ise hormon üretmez (işlevsiz tümörler olarak adlandırılır) (Türkiye Kanserle Savaş Vakfı, 2019). Pankreasın malign tümörleri içinde en yaygın ve şiddetli form bir ekzokrin pankreas kanseri olan duktal adenokarsinomdur (Coşar, 2018). Pankreas duktal adenokarsinomlarının % 60-70'i glandın baş bölgesini, % 10-15'i kuyruk kısmını, %10-15'i ise glandı diffüz olarak oluşmaktadır. Tümörün yerleşim yeri, boyutu, derecesi, evresi, perinöral invazyon ve damar invazyonu, bu tümörlerde prognozu belirleyen faktörler arasındadır. Pankreas duktal adenokarsinomunun prognozu gelişmiş cerrahi tekniklere rağmen kötüdür. Cerrahi sonrası 1 yıllık yaşam % 20 iken 5 yıllık yaşam oranı sadece % 5'tir (Warshaw ve Del Castillo C. , 1992).

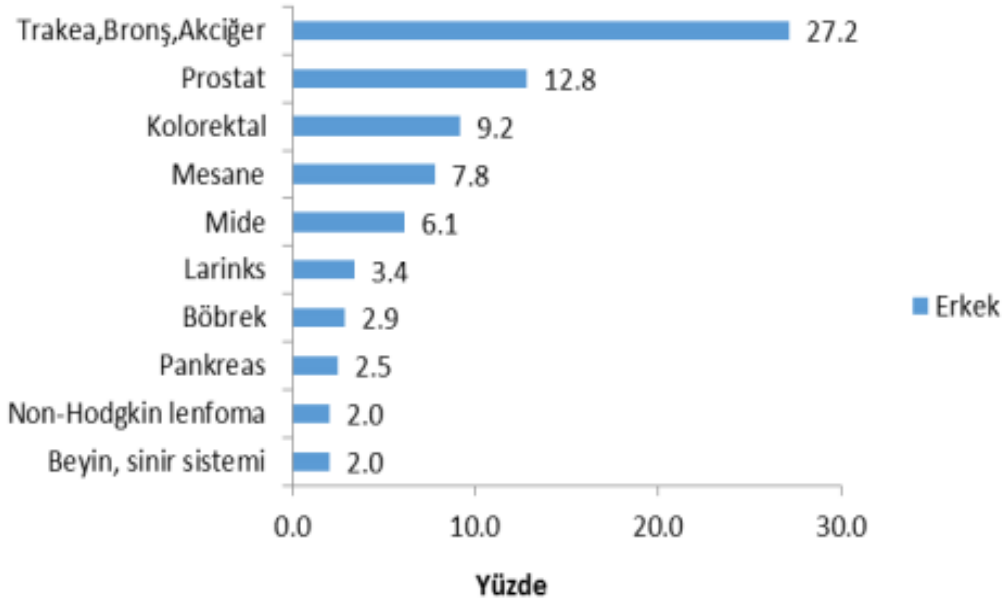
1.3.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri, dünya genelinde ölüm oranı en yüksek kanser türleri arasında 4.sıradadır. Pankreatik kanserin ölüm oranının yüksek olmasının nedenleri; erken tanı zorluğu, sinsi ilerlemesi, hızlı metastaz kabiliyeti, radyoterapi ve kemoterapiye cevap vermemesi şeklinde sıralanabilir. Pankreatik kanseri erken dönemde saptamak, pankreasın anatomik konumu, sinsice gelişmesi ve tümör belirteçlerinin olmaması nedeniyle oldukça güçtür. Türkiye'de, pankreatik kanserin sıklığı hakkında net bir bilgi yoktur.

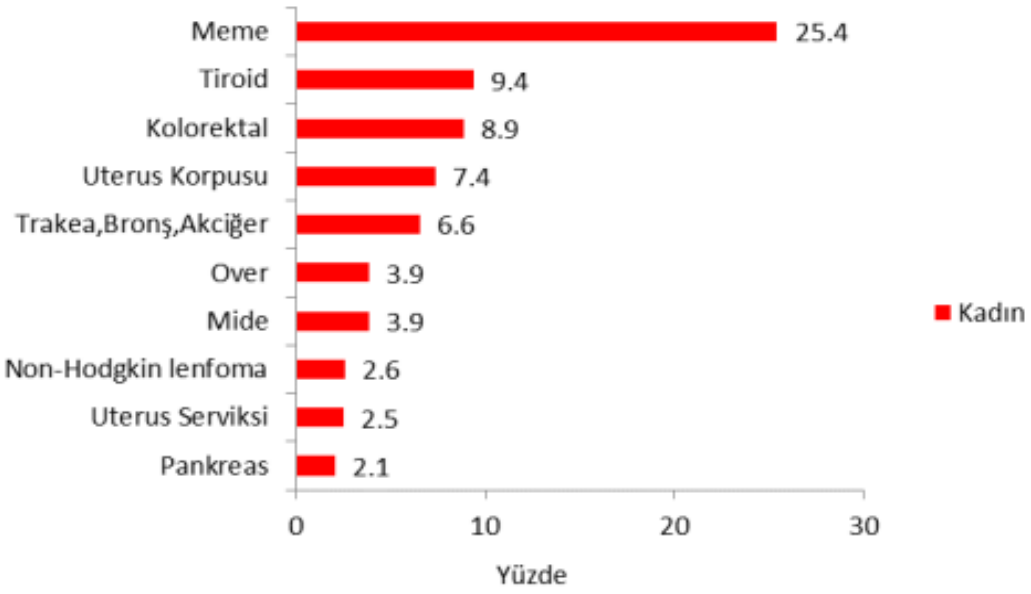
Amerika'da ise her yıl ortalama 30.000 pankreatik kanser tanısı konduğu ve aynı oranda pankreatik kanserden ölüm gerçekleştiği saptanmıştır. Pankreatik kansere neden olan faktörler arasında başta sigara olmak üzere, folat eksikliği, obezite, şeker hastalığı ve farklı karsinojenler yer almaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, pankreatik kanser hastalarında, kalıtsal bir riskin varlığının (%10) olduğunu göstermiştir. Pankreatik kanser tanısında, hastaların birinci dereceden akrabalarında pankreatik kanser riski artmaktadır. Aynı aile içerisinde iki pankreatik kanserli hasta varlığında birinci dereceden akrabalarda pankreatik kanser riski 18 kat, eğer 3 birey varsa 57 kat arttığı tanımlanmaktadır (Şahin ve ark., 2007).

1.3.2. Pankreas Kanseri Görülme Sıklığı ve Risk Faktörleri

Dünya Kanser Araştırma Fonu'nun (WCRF) verilerine göre, nüfus yoğunluğu dikkate alındığında kanser görülme sıklığı gelir seviyesi yüksek olan ülkelerde, orta ve düşük gelirli ülkelere göre daha fazladır. Dünya çapında kanser yükü, 2012 yılında yaklaşık 14 milyon yeni vakaya yükselirken; bu rakamın önümüzdeki 20 yılda 22 milyona yükselmesi tahmin ediliyor (Dünya Kanser Raporu, 2014). Pankreas kanseri, erkeklerde kadınlara kıyasla biraz daha yüksek insidansa sahiptir ve ileri yaşlarda (40,85) daha sık görülmektedir (Şekil 1.2 ve Şekil 1.3). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2014'te paylaştığı rapora göre, Türkiye'de erkeklerde kansere bağlı ölümlerin sayısı 58 bin 400, kadınlarda ise 32 bin 500'dür. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Mayıs 2017 verilerine göre ise, Türkiye'de her 5 ölümden 1'i kanserden kaynaklanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2012 yılı verileri, pankreas kanseri, dünya genelinde erkeklerde en yaygın görülen 12. kanser olduğunu, kadınlarda ise 11. sırada yer aldığını göstermiştir.



Şekil 1.2: 50-69 Yaş Gruplarında Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013).



Şekil 1.3: 50-69 Yaş Gruplarında Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013).

Pankreas Kanseri Risk Faktörleri:

Sigara: Pankreas kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Sigara içenlerin pankreas kanseri olma riski, hiç sigara içmemiş olanlara göre yaklaşık iki kat daha fazladır (Yadav ve Lowenfels, 2013).

Obezite: Obezite, insülin direnci, glukoz intoleransı, dislipidemi ve yüksek kan basıncı gibi çeşitli metabolik bozukluklarla ilişkili olan bir hastalıktır. Bütün bu hastalıklara toplu olarak metabolik X sendromu adı verilir (Reaven, 2002). Obezite, tip 2 diabetes mellitus (T2DM), kardiyovasküler hastalıklar, pankreas, hematolojik, prostat ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde güçlü bir risk oluşturmaktadır (Gumbs, 2008). Kasım 2018'de *Cancer* adlı dergide yayımlanan çalışmada, ergenlik çağında obezitenin pankreas kanseri riskini 4 kat artırdığı tespit edildi. Ayrıca, obez olmadığı halde fazla kiloya sahip ergenlik çağındaki kişilerin de belirli oranda artan pankreas kanseri riskine sahip olduğu belirtildi (Zohar ve ark., 2018).

Diyabet: Dünyada en sık ölüm sebepleri sıralamasında kanser ikinci, diyabet ise altıncı sırada yer almaktadır. Diyabet, birçok malignite gelişimi için risk faktörüdür. Tip 1 Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) diyabetli bireyde servikal ve mide kanseri sık görülürken; Tip 2 diyabetli bireyde ise sıklık sırasına göre meme, endometrium ve pankreas kanseri izlenmektedir. A1C (Glikozile Hemoglobin) artışı ile, birinci sırada kolorektal, ikinci sırada ise pankreas kanseri en fazla korelasyon göstermektedir. Pankreas kanseri saptanan bireylerin %50'sinde tanı esnasında diyabet gözlenmiştir. Ne yazık ki, diyabet varlığı pankreas kanserli hastalarda yaşam süresini % 40-50 azaltmaktadır (Feng ve ark., 2003).

Kronik Pankreatit: Pankreasın uzun süreli iltihaplanması olan kronik pankreatit, pankreas kanseri riskinin artmasıyla bağlantılıdır. Kronik pankreatit nedenleri arasında en çok alkol ve sigara kullanımı görülmektedir (American Cancer Society, 2019). Bir diğer nedenler ise metabolik anormallikler, idiyopatik mekanizmalar, genetik, otoimmün tepkiler ve obstrüktif mekanizmalar şeklinde sıralanabilir (Kleeff ve ark., 2017). Kronik pankreatite, bazen kalıtsal bir gen mutasyonu neden olabilmektedir. Bu kalıtsal (ailevi) pankreatit formuna sahip kişilerin yaşam boyu yüksek pankreas kanseri riski vardır (American Cancer Society, 2019).

Belirli Kimyasallara Maruz Kalma: İşyerinde kuru temizleme ve metal işleme endüstrisinde kullanılan bazı kimyasallara aşırı derecede maruz kalmak, kişinin pankreas kanseri riskini artırabilir (American Cancer Society, 2019).

Yaş: Yaş, pankreas kanseri gelişiminde bir diğer risk faktörüdür. Yaşamın ilk 30 yılında çok nadir görülmekle birlikte, 30 yaşından sonra pankreas kanserine yakalanma riski artış gösterir. Hastaların büyük bir çoğunluğu 60-80 yaşlarındadır ve ortalama tanı konma yaşı ise 72'dir (Harnack ve ark., 1997).

Aile Öyküsü: Pankreas kanserlerinin %3-10'u ailesel pankreas kanseri olarak tanımlayabiliriz. Aile içerisinde etkilenen bireylerin sayısına bağlı olarak risk 4,46-32 kat artmaktadır (Lynch ve ark., 1989). Ailede pankreas kanseri bulunuyor ise kardeşlerde de bulunma olasılığı 2-3 kat artıyor.

Ailesel pankreas kanseri hastalarınında sıklıkla tanımlanan mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarıdır.

BRCA1 mutasyonu varlığı pankreas kanseri riskini 2,26 kat arttırırken, BRCA2 mutasyonu varlığında risk 3,5-8 kat artmaktadır (Ferrone ve ark., 2009).

Kalıtsal Genetik Sendromlar: Kalıtsal gen değişiklikleri (mutasyonlar), pankreas kanserlerinin %10 kadarına neden olabilir. Bazen bu değişiklikler diğer kanserlerin (veya diğer sağlık sorunlarının) artmış risklerini içeren sendromlarla sonuçlanır.

Pankreas kanserine neden olabilecek genetik sendrom örnekleri şunlardır:

- BRCA1 veya BRCA2 genlerindeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromu
- PALB2 genindeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal meme kanseri
- P16 / CDKN2A genindeki mutasyonların neden olduğu ve cilt ve göz melanomları ile ilişkili ailesel atipik multipl mol melanom (FAMM) sendromu
- PRSS1 genindeki mutasyonların neden olduğu ailesel pankreatit
- En sık olarak MLH1 veya MSH2 genlerindeki bir kusurun

neden olduğu kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser (HNPCC) olarak da bilinen Lynch sendromu

- STK11 genindeki kusurların neden olduğu Peutz-Jeghers sendromu. Bu sendrom ayrıca sindirim sistemindeki poliplerle ve diğer bazı kanserlerle de bağlantılıdır. Bu sendromlardan bazılarına neden olan genlerdeki değişiklikler genetik testlerle bulunabilir (American Cancer Society, 2019).

Alkol: Bazı çalışmalar ağır alkol kullanımı ile pankreas kanseri arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Ağır alkol kullanımı, pankreas kanseri riskini arttırdığı bilinen kronik pankreatit gibi durumlara yol açabilir (American Cancer Society, 2019).

Enfeksiyonlar: Bazı çalışmalar, mide ülserine neden olan bakteri Helicobacter pylori (H. pylori) enfeksiyonunun veya Hepatit B enfeksiyonunun, pankreas kanseri riskini artırabileceğini göstermektedir. Daha fazla çalışmaya ihtiyaç var (American Cancer Society, 2019).

1.3.3. Hastalık Semptomları

Pankreas kanserinde, erken evrelerde herhangi bir belirti görülmemesine karşılık hastalık semptomları ortaya çıktığında tümör, ileri bir evreye ulaşmış ve pankreas çevresindeki dokulara ulaşmış seviyededir. Belirtiler, tümörün yerine ve büyüklüğüne göre değişmektedir.

Başlıca belirtiler;

– İştahsızlık (%64)
– Nedensiz kilo kaybı (%66-84)
– Üst karında hissedilen ağrı (%78-82)
– Sırt ağrısı (%48)
– Bulantı (%50-86)
– Erken doyma hissi (%62)
– Depresyon, halsizlik, çabuk yorulma
– Sarılık (%56-80) (Tümörün safra yollarını tıkaması sonucunda ortaya çıkar, göz aklarında sararma, idrarda koyulaşma ve dışkı renginde açılma olur)
– Diabet (Şeker hastalığı) (%97)
– Uyku bozukluğu (%54)

1.3.4. Teşhis

Pankreas kanseri teşhisinde, birçok yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemlerin özellikleri aşağıdaki gibidir.

Ultrasonografi (US): Ultrasonografinin pankreas kanseri tanısında yüzde 94 duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar yüzde 70'ten daha iyi olmayan bir duyarlılık göstermektedir. Bu tutarsızlığın öne sürülen nedenleri arasında sonografi uzmanının deneyimindeki farklılıklar ve metodolojik sınırlamalar bulunmaktadır.

Bilgisayarlı Tomografi (BT): Bilgisayarlı tomografi (BT), vücuttaki alanların ayrıntılı resimlerini veya taramalarını oluşturmak için özel röntgen cihazı kullanan bir görüntüleme prosedürüdür. Bazen bilgisayarlı tomografi veya bilgisayarlı aksiyal tomografi (CAT) olarak adlandırılır. Modern CT makineleri, orijinal CT makinelerinin yaptığı gibi, vücudun tek tek dilimlerinin bir dizi fotoğrafını çekmek

yerine sürekli fotoğraflar sarmal (veya spiral) bir şekilde çeker. Sarmal BT (spiral BT olarak da bilinir), eski BT tekniklerine göre çeşitli avantajlara sahiptir: daha hızlıdır, vücut içindeki alanların daha kaliteli 3 boyutlu resimlerini üretir ve küçük anormallikleri daha iyi tespit edebilir.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI, magnetic resonance imaging): Manyetik rezonans görüntüleme (MRI), radyolojide anatomi ve vücudun fizyolojik süreçlerinin resimlerini oluşturmak için kullanılan tıbbi bir görüntüleme tekniğidir. MRI tarayıcıları, vücuttaki organların görüntülerini oluşturmak için güçlü manyetik alanlar, manyetik alan gradyanları ve radyo dalgaları kullanır. MRI, X-ışınlarını veya CT ve PET taramalarından ayıran iyonlaştırıcı radyasyon kullanımını içermez. MRG, nükleer manyetik rezonansın (NMR) tıbbi bir uygulamasıdır. NMR, NMR spektroskopisi gibi diğer NMR uygulamalarında görüntüleme için de kullanılabilir.

EUS (Endoskopik ultrasonografi): Uzun yıllar boyunca sadece bir görüntüleme yöntemi olmuştur, ancak doğrusal veya sektör tarayıcısı ile yeni elektronik cihazların geliştirilmesi, ekoendoskopun çalışma kanalından çıkan bir iğnenin ekografik alanında görselleştirmeye izin vererek, iğneyi hedefe yönlendirir. Böylece teşhiste kullanılmaktadır.

ERCP (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography): ERCP teşhisten çok pankreastaki tümörün safra yollarına bası yaparak tıkaması sonrasında oluşan sarılığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: Pankreas kanseri tanısında kullanılan yöntemler (Göral, 2014)

TEST	SPESİFİTE	SENSİTİVİTE	EVRELEMEDE FAYDASI
ULTRASON	%80	%90	YOK
EUS	%90	%90	VAR
CT	%90	%95	VAR
ERCP	%90	%90	YOK
MR	%90	%90	YOK
İNCE İĞNE ASPİRASYONU	%90	%98	YOK

PET CT (Positron emission tomography): Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) klinik onkolojide ve demans dahil olmak üzere bazı beyin hastalıklarının teşhisinde kullanılan nükleer tıp fonksiyonel görüntüleme tekniğidir. Pozitron radyoaktif izotoplarla etiketlenmiş çözeltiyi bir hastanın vücuduna enjekte ettikten sonra, fotomultiplier tüpleri (PMT'ler) vücutta salınan bir pozitron bir elektronla imha edildiğinde yayılan imha gama ışınlarını tespit eder. Bilgisayar daha sonra pozitron radyoaktif izotopların dağılımını yansıtan kesit görüntüler oluşturur. Sintilatörlere bağlanan SiPM (MPPC) veya fotoçoğaltıcı tüpler (PMT'ler) bu gama ışınlarını tespit etmek için kullanılır.

Tümör Dokusundan Örnek Alınması (Biyopsi): Biyopsi, bir laboratuvarda analiz edilebilmesi için vücudunuzdan bir doku parçasını veya hücre örneğini çıkarmak için bir prosedürdür.X-ışınları gibi görüntüleme testleri, kitleleri veya anormallik alanlarını tespit etmede yardımcı olsada, kanserli hücreleri kanserli olmayan hücrelerden ayırt edemezler. Kanserlerin çoğunda kesin tanı koymanın tek yolu, daha yakından incelenmek üzere hücreleri toplamak için biyopsi yapmaktır.

Kan Testleri: Kan testleri. Pankreas kanseri olan kişilerde karsinoembriyonik antijen (CEA) ve CA 19-9 gibi bazı maddeler yükselir (Tablo 1.2). Bununla birlikte, kan testleri pankreas kanserinin erken saptanmasına izin vermez, çünkü bu seviyeler pankreas kanseri ilerleyene kadar yükselmeyebilir. Bu testler ayrıca yanlış pozitif sonuç verebilir.

Tablo 1.2: Tümör markerlarının, pankreatik kanser evresine göre tanıdaki yerleri (Göral, 2014).

Serum CA-50, CA 72-4, CA 19-9 ve CA 242 düzeyleri (U/ml)				
Evre	CA-50	CA 72-4	CA 19-9	CA 242
I	15.21±1.12	3.72±0.67	26.31±6.56	15.74±1.87
II	32.42±19.07	17.13±1.97	875.45±329.31	22.54±3.69
III	98.97±30.18	49.55±10.91	1223.43±479.73	67.64±7.73
IV	179.46±24.91	76.15±17.64	2018.19±731.36	93.38±28.71

1.3.5. 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 (Tablo 1.3).

Tablo 1.3: Pankreas kanseri için TNM evreleme sistemi ve pankreas kanseri evreleri (Aşık, 2015)

T	**Primer Tümör**
TX	Primer tümör değerlendirilemedi
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinom in situ
T1	Tümör pankreasa sınırlı, < 2 cm çapında
T2	Tümör pankreasa sınırlı, > 2 cm çapında
T3	Tümör pankreas dışına yayılmış, çölyak ve/veya superior mezenterik arter tutulumu yok
T4	Tümör çölyak ve/veya superior mezenterik arteri infiltre etmiş (rezekte edilemez
N	**Bölgesel Lenf Nodları**
NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı var.
M	**Uzak Metastaz**
MX	Uzak metastaz değerlendirilemedi.
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
Evre	**TNM**
Evre I	T1, N0, M0
Evre I B	T2, N0, M0
Evre II A	T3, N1, M0
Evre II B	T1-3, N1, M0
Evre III	T4, N0-1, M0
Evre IV	T1-4, N0-1, M1

1.3.6. Tedavi

Cerrahi tedavi: Pankreas kanseri olgularının ancak % 20'si teşhis anında radikal cerrahi tedavi adayı olabilmektedir. Pankreasın gövde ve kuyruk kısmında yerleşim gösteren tümörler geç belirti verdikleri için teşhis anında hastalık genellikle ileri evrededir ve rezektabl değildir. Cerrahi tedavide kanserli tümör, tümöre komşu dokular ve yakındaki lenf düğümleri çıkarılır (Pankreatikoduodenektomi, PD). Whipple ameliyatı olarak adlandırılan cerrahi yöntemde pankreas baş kısmında yerleşik tümörlerde pankreasın büyük bir kısmı, midenin bir kısmı, onikiparmak barsağı ve etrafındaki dokular alınır. Semptom süresi (sarılık ve ağrı) 40 günden uzun, CA19-9 seviyesi >200U/ml olan ve histolojik olarak G3-G4 evresi saptanan hastalarda ameliyat öncesi evrelemede hastalık rezektabl olsada prognoz kötüdür. Pankreasın tümüyle çıkarılması (total pankreatektomi) kronik pankreatit, multifokal adacık hücre tümörü veya diffüz IPMN olan vakalarda uygulanır. Bazen asıl tümör kitlesi çıkarılamasa da kanserin yol açtığı kusma, sarılık vb. durumların ortadan kaldırılması için cerrahi tedavi uygulanması gerekebilir. Tümörün safra yollarını tıkamasına bağlı olarak ileri derecede sarılığı olan hastalarda ameliyat öncesinde endoskopik (ERCP) ve/veya radyolojik (PTK) yöntemlerle safra yolları drene edilmelidir (Biliyer dekompresyon).

Radyoterapi: Radyoterapi, radyasyonun kanser hücrelerini öldürmek için kullanıldığı bir tedavidir. Radyoterapiye sahip olmanın birçok farklı yolu vardır, ancak hepsi benzer bir şekilde çalışır. Kanser hücrelerine zarar verirler ve vücutta büyümelerini veya yayılmalarını durdururlar.

Radyoterapi birkaç şekilde verilebilir;

-Bir makine tarafından verilen radyoterapi (harici radyoterapi)- bir makine aracılığıyla kanser hücreleri radyasyon ışınlarıyla hedeflenir

-Radyoterapi implantları (brakiterapi)- burada küçük parçalar radyoaktif metal (genellikle geçici olarak) vücut içerisine kanser hücrelerinin yakınına yerleştirilir.

-Radyoterapi enjeksiyonları, kapsüller veya içecekler (radyoizotop tedavisi)- radyoaktif sıvının yutulduğu veya kanınıza enjekte edildiği radyoterapi yöntemidir.

Kemoterapi: Kemoterapi, vücudunuzda hızlı büyüyen hücreleri öldürmek için güçlü kimyasallar kullanan bir ilaç tedavisidir. Kemoterapi çoğunlukla kanseri tedavi etmek için kullanılır, çünkü kanser hücreleri vücuttaki çoğu hücreden çok daha hızlı büyür ve çoğalır. Birçok farklı kemoterapi ilacı mevcuttur. Kemoterapi ilaçları tek başına veya kombinasyon halinde çok çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılabilir. Kemoterapi, birçok kanser türünü tedavi etmenin etkili bir yolu olmasına rağmen, kemoterapi tedavisi de yan etki riski taşır. Bazı kemoterapi yan etkileri hafif ve tedavi edilebilirken, diğerleri ciddi komplikasyonlara neden olabilir.

Biyolojik Tedavi (Biyoterapi – İmmunoterapi): Biyolojik terapi veya immünoterapi olarak da bilinen biyoterapi, bağışıklık sisteminin kanser, enfeksiyonlar ve diğer hastalıklarla mücadele etme yeteneğini artırmak veya geri yüklemek için bir tedavidir. Bazı kanser tedavilerinin neden olabileceği bazı yan etkileri azaltmak için de kullanılır. Biyolojik / immünoterapide kullanılan ajanlar arasında monoklonal antikorlar, büyüme faktörleri ve aşılar bulunur. Bu ajanlar ayrıca doğrudan bir anti-tümör etkisine sahip olabilir. Biyolojik tepki modifiye edici terapi, biyoterapi, BRM terapisi ve immünoterapi olarak da adlandırılır.

Biyoterapi ile;

– Kanser oluşum süreci durdurulur, kontrol edilir ya da bastırılır.

– Kanser hücreleri bağışıklık sistemimiz tarafından daha kolay farkedilir hale getirilir.

– T-hücreleri, NK-hücreleri ve makrofajları gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin öldürme gücü artırılır

– Normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştüren sürec durdurulur ya da geri döndürülür.

– Vücudun, tedavi süreci içinde ölen ya da hasarlanan hücrelerinin yerine yeni hücre üretmesi hızlandırılır.

– Kanser hücrelerinin vücudun başka yerlerine sıçraması engellenir.

Biyolojik tedavi yöntemleri:

İnterferonlar: İnterferonlar, birkaç virüsün varlığına yanıt olarak konakçı hücreler tarafından yapılan ve salınan bir grup sinyal proteinidir. Tipik bir senaryoda, virüs bulaşmış bir hücre, yakınlardaki hücrelerin anti-viral savunmasını artırmasına neden olan interferonları serbest bırakacaktır (De Andrea M ve ark, 2002).

Monoklonal Antikorlar: Monoklonal antikorlar (mAb veya moAb), benzersiz bir ana hücrenin klonları olan özdeş bağışıklık hücreleri tarafından üretilen antikorlardır. Monoklonal antikorlar, aynı epitopa (bir antijenin antikor tarafından tanınan kısmı) bağlandıkları için tek değerlikli afiniteye sahip olabilirler. Aksine, poliklonal antikorlar çoklu epitoplara bağlanır ve genellikle birkaç farklı plazma hücresi (bağışıklık hücresini salgılayan antikor) soyları tarafından yapılır. Bispesifik monoklonal antikorlar, tek bir monoklonal antikorun terapötik hedeflerinin iki epitopa arttırılmasıyla da tasarlanabilir. Hemen hemen her madde göz önüne alındığında, o maddeye spesifik olarak bağlanan monoklonal antikorlar üretmek mümkündür; daha sonra bu maddeyi tespit etmeye veya arındırmaya yararlar. Bu biyokimya, moleküler biyoloji ve tıpta önemli bir araç haline gelmiştir. İlaç olarak kullanıldığında, tescilli olmayan ilaç isimleri -mab ile biter (bkz. "Monoklonal antikorların isimlendirilmesi") ve birçok immünoterapi uzmanı mab kelimesini anakronimik olarak kullanır.

İnterlökinler: İnterlökinler (IL'ler), ilk olarak beyaz kan hücreleri (lökositler) tarafından eksprese edildiği görülen bir grup sitokin (salgılanan proteinler ve sinyal molekülleri) 'dir. IL'ler yapısal özellikleri ayırt etmeye dayalı olarak dört ana gruba ayrılabilir. Bununla birlikte, amino asit dizisi benzerlikleri oldukça zayıftır (tipik olarak %15-25 özdeşlik). İnsan genomu 50'den fazla interlökin ve ilgili proteini kodlar. İnterlökinlerin çoğunluğu yardımcı CD4 T lenfositleri, ayrıca monositler, makrofajlar ve endotelyal hücreler yoluyla sentezlenir. T ve B lenfositlerinin ve hematopoietik hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını teşvik ederler. Hipokampusta astrositler üzerindeki interlökin reseptörlerinin farelerde uzamsal anıların gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Brocker C ve ark, 2010).

1.4. PANKREAS KANSERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Pankreas kanserinin erken tespiti ve tedavisine yönelik sürekli araştırma çabalarına rağmen, hastalar için görünüm hala olumsuzdur. Çoğu vaka hala hastalığın ilerleyen evrelerinde teşhis edilirken, mevcut tanısal görüntüleme yaklaşımları ile sağkalım prognozunda bir ilerleme sağlanamamıştır. Deneysel moleküler mekanizmalar üzerindeki mevcut çalışmalar, pankreas kanseri gelişiminin moleküler süreçlerinin ayrıntılı olarak anlaşılmasını sağlamıştır (Zavoral ve ark., 2011).

Pankreas kanseri ile ilgili moleküler çalışmalar, bu kanserin birkaç genetik mutasyonla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin, büyüme faktörleri ve DNA uyuşmazlığı onarım genlerinin hepsi pankreatik tümör oluşumunda rol oynar (Choudhuri ve Singh, 2005). Son zamanlarda pankreas kanserine neden olan birçok onkogen tanımlanmıştır. Pankreas kanserinde; genetik değişiklikler, germline ve somatik mutasyonlar sorumlu tutulmuş ve 16 adet mutasyona uğramış onkogen saptanmıştır. Bu onkogenler: KRAS, TP53, CDKNA2A, SMAD4, MLL3, TGFBR2, ARID1A, SF3B1, EPC1, ARID2, ATM, ZIM2, MAP2K4, NALCN, SLC16A4, MAGEA6 şeklinde sıralanmaktadır. KRAS onkogendeki mutasyon, en sık kodon 12'de olup, pankreas kanseri hücrelerinde % 90 oranında saptanırken, tüm vücut kanserlerinde % 20 oranında saptanmıştır. KRAS onkogeni, hücre yaşamı, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu gibi hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler (Göral, 2014).

1.5. HÜCRE ÖLÜM MODELLERİ

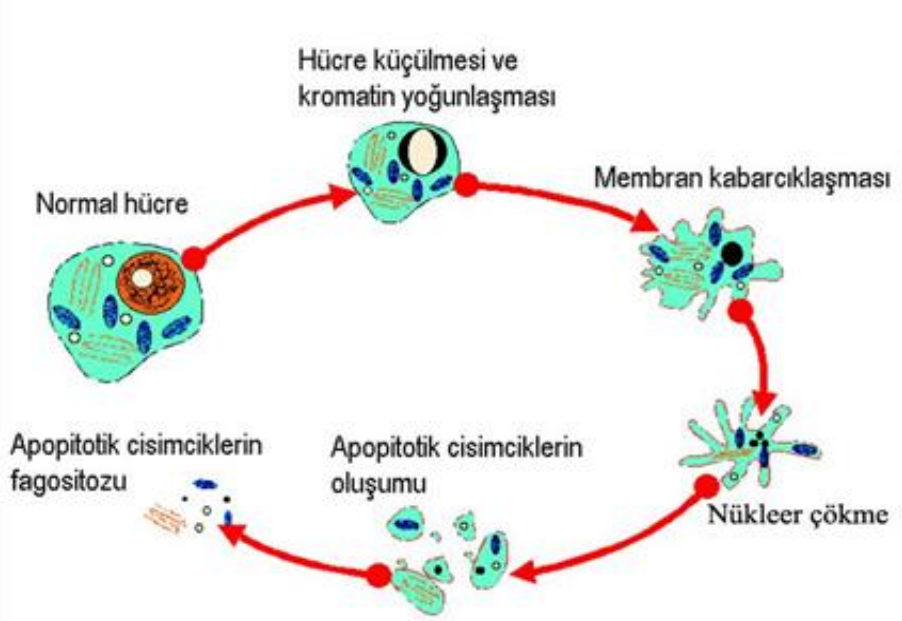
1.5.1. Apoptozis

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda meydana gelen bir programlı hücre ölümü türüdür. Biyokimyasal olaylar karakteristik hücre değişikliklerine (morfoloji) ve ölüme yol açar. Bu değişiklikler arasında kabarcıklanma, hücre büzülmesi, nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA parçalanması ve küresel mRNA bozunması bulunur. Ortalama yetişkin insan, apoptoz nedeniyle her gün 50 ila 70 milyar hücre kaybeder. 8 ila 14 yaşları arasındaki ortalama bir insan çocuğu için günde yaklaşık 20 ila 30 milyar hücre ölür. Akut hücre hasarından kaynaklanan bir tür travmatik hücre ölümü olan nekrozun aksine, apoptoz, bir organizmanın

yaşam döngüsü boyunca avantajlar sağlayan yüksek düzeyde düzenlenmiş ve kontrollü bir süreçtir. Örneğin, gelişmekte olan bir insan embriyosunda parmakların ve ayak parmaklarının ayrılması, basamaklar arasındaki hücreler apoptoza uğradığı için meydana gelir. Nekrozdan farklı olarak, apoptoz, fagositik hücrelerin hücre içeriği çevreleyen hücrelere dökülmeden ve onlara zarar vermeden önce yutup çıkarabildiği apoptotik cisimler adı verilen hücre parçaları üretir. Apoptoz başladıktan sonra duramayacağından, oldukça düzenlenmiş bir süreçtir. Apoptoz iki yoldan biriyle başlatılabilir. İçsel yolda hücre stresini hissettiği için hücre kendisini öldürür, dışsal yolda ise diğer hücrelerden gelen sinyaller nedeniyle hücre kendini öldürür. Zayıf dış sinyaller aynı zamanda apoptozun iç yolunu da aktive edebilir. Her iki yol da proteaz olan kaspazları veya proteinleri parçalayan enzimleri aktive ederek hücre ölümüne neden olur. İki yolun her ikisi de başlatıcı kaspazları aktive eder, daha sonra yürütücü kaspazları aktive eder, daha sonra proteinleri ayrım gözetmeden parçalayarak hücreleri öldürür. Kusurlu apoptotik süreçler çok çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır. Aşırı apoptoz atrofiye neden olurken, yetersiz miktarda kanser gibi kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanır. Fas reseptörleri ve kaspazlar gibi bazı faktörler apoptozu teşvik ederken, Bcl-2 protein ailesinin bazı üyeleri apoptozu inhibe eder. Protoonkojenlerin (c-myc gibi) birçoğunun apoptozun regülasyonunda yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de düşük dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda, hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişsede, bazen apoptoz dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptoz gelişmesine neden olabilir. Apoptoz, DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde ileryebilir. Bu süreçte Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteini bileşenleri, biyokimyasal aktivasyon, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyon ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur.

Apoptotik hücre ölümündeki morfolojik değişiklikler; tek bir hücrede, büzülme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzülmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur.

Elektron mikroskobunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur; bu yapı "zeiozis" olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında "transglutaminaz" enzimi etkili olmaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondansasyonunu takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca++ düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Kromatin kondansasyonu, nukleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven (ladder) görüntüsü oluşturur. İnternükleozomal DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" oluşur (Şekil 1.4). İki katlı lipit tabakada fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin (PC) fosfolipitleri asimetrik olarak konumlanmıştır. Normal hücrelerde bu asimetrik yapı ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu hücre zarının iç yüzeyinde bulunan PS'nin dış yüzeye transloke olmasıyla sonuçlanabilir. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarı başlatır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (Tomatır, 2003).



Şekil 1.4: Apoptotik hücredeki değişiklikler (Gültekin ve ark., 2008).

1.5.2. Apoptozisin İndüklenmesi

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO–1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü–1 (TNFR–1)'in ilgili ligandları ile uyarılmaları sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, hücre membranında bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler (Akşit ve Bildik, 2008). Ölüm reseptörlerinin ligantları, reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmesini sağlar. Reseptörlerin oligomerizasyonu özgün adaptör proteinler (FADD, TRADD)'in reseptörlere bağlanması takip eder. Bu durum ise kaspazların aktifleşmesine neden olur (Ulukaya, 2003).

1.5.2.1. Kaspazların Apoptozisdeki Rolü

Kaspazlar (Caspases), programlanmış hücre ölümünü, proliferasyonunu ve iltihaplanmasını ilerleten hücre içi sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. İnflamatuar cevapların aktivasyonunda, hücresel yapıların doğrudan yıkımında, hücresel metabolizmanın bozulmasında, hücre ölüm proteinlerinin inaktivasyonunda ve yıkıcı enzimlerin aktivasyonunda rol almaktadır. Kaspazların programlı hücre ölümündeki rolü ilk defa Nematod solucanlarından Caenorhabditis elegans üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Hücre ölüm defekt geni CED-3 genininin programlı hücre ölümü için önemli olduğunu

göstermiştir. Daha sonraki çalışmalarda ICE'nin (kaspaz-1) memeli apoptozunda anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar benzer proteazların da apoptozise yol açan yolaklarda merkezi rol oynadıklarını göstermiştir (Yuan ve ark., 1993). Proteazlar daha sonra kaspaz olarak isimlendirilmiş ve 14 memeli kaspazının apoptozis ve inflamasyondaki rolleri tanımlanmıştır (Thombery ve Lazebnik, 1998). Kaspaz ailesi 2 gruba ayrılır: apoptozis sırasında aktive olanlar (kaspaz- 2,- 3,-6,-7,-8,-9 ve -10) ve inflamatuar cevapların aktivasyonunda rol alan ICE/kaspaz-1 ile yakından ilişkili olan (kaspaz-1,-4,-5 ve -11) kaspazlardır (Tablo 1.4) (Salvesen ve Dixit, 1999).

Tablo 1.4: İnsanda bulunan kaspazlar (Aşık, 2015).

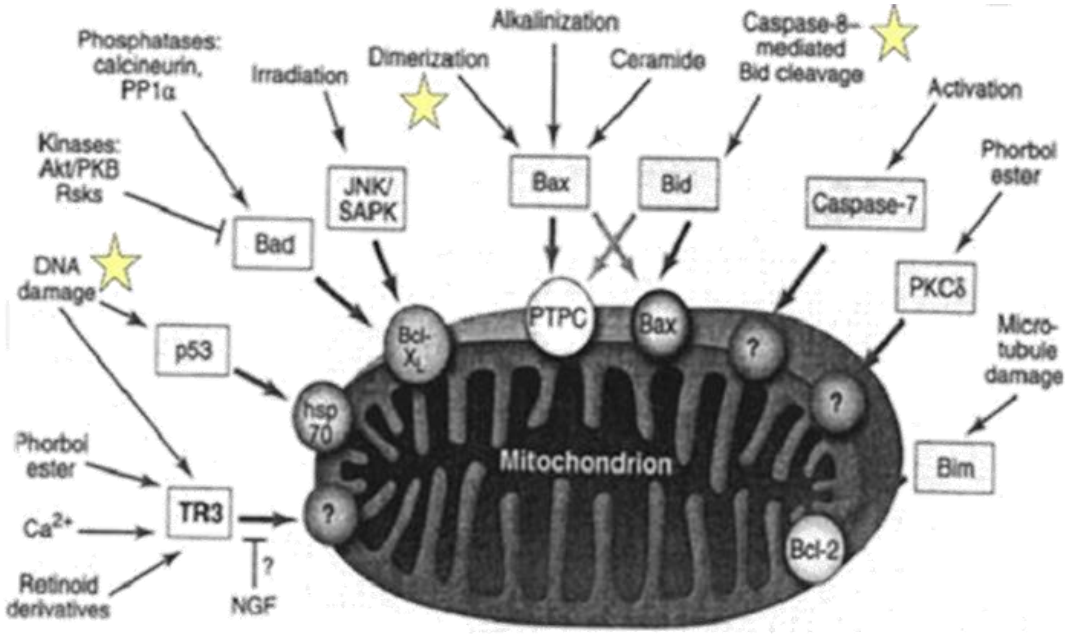
		Prodomein	İşlev
Apoptotik	Kaspaz-8	DED, DED	Başlatıcı
	Kaspaz-10	DED, DED	Başlatıcı
	Kaspaz-9	CARD	Başlatıcı
	Kaspaz-2	CARD	Başlatıcı
	Kaspaz-3	-	Öldürücü
	Kaspaz-6	-	Öldürücü
	Kaspaz-7	-	Öldürücü
Non Apoptotik	Kaspaz-1	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-4	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-5	CARD	İnflamasyon
	Kaspaz-12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

Kaspazlar, birçok hücrede inaktif (zimojen) formda bulunur, kırılarak aktifleşir ve dimerize olurlar. Kaspaz dimerizasyonu ya hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu şeklinde ya da kaspaz -9 bağlayıcı protein olan Apaft-1'in indüklenmesi ile gerçekleşir. Apaft-1 indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Bunun sonucunda aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Kaspaz-3 hemen her dokuda görev alan oldukça üniversal konumda bir kaspazdır (Ulukaya, 2003).

Kaspaz -2, -8, -9 ve -10, kaspaz aktivasyon kaskadının başlamasında birincil rol oynarken, kaspaz -8 ve 10, prodomainlerinde adaptör proteinler ile etkileşimi sağlayan bir öldürücü effektör bölge (DED) taşır. Kaspaz -2 ve kaspaz -9 ise kaspaz toplayıcı domain (CARD) bulundurur ve adaptör molekülün bağlanmasında ve efektör kaspazların aktivasyonunda önemlidir (Salvesen & Dixit, 1999). Kaspaz- 3, -6 ve -7 efektör kaspazlardır ve apoptozis sırasında hücrenin yıkımı ve dökülmesinden (shedding) sorumludur (Slee ve ark., 1999). Efektör kaspaz 3, CAD (caspase activated DNAse) endonükleaz proteininin aktivasyonunu ve bu enzimin DNA'yı parçalamasını sağlar. DNA fragmentasyonu sonucu hücre morfolojik değişikliklere uğrar ve apoptotik cisimcikler oluşur (Stennicke ve ark., 2002).

1.5.2.2. Mitokondrinin Apoptozisdeki Rolü

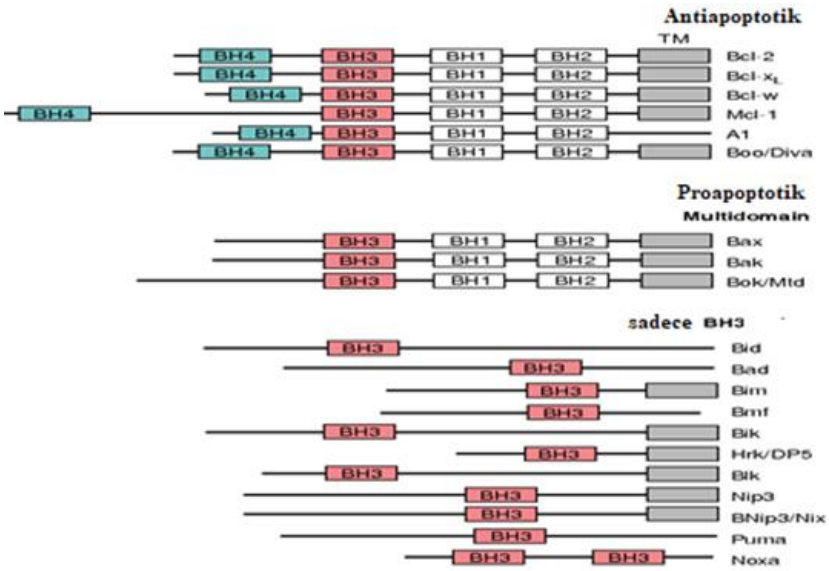
Mitokondri, memeli hücrelerinde apoptozu aktive etmede anahtar rol oynar. Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondriyal iç ve dış zar arasındaki boşluktan, sitozolde bir kez hücreleri parçalayan ve hücre cesetlerinin etkili fagositozunu işaret eden kaspaz proteazlarını aktive eden proteinlerin salınımını düzenler (Wang C. ve ark, 2009).



Şekil 1.5: Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği noktanın mitokondri olduğunun gösterilmesi (Ulukaya, 2003).

1.5.2.3. Bcl-2 Ailesinin Apoptozisdeki Rolü

Bcl-2 protein ailesi, apoptotik yanıta önemli bir kapı bekçisi olarak bilinir. Yapısal olarak ilişkili bu protein grubu, birbirleriyle etkileşime giren pro-apoptotik ve anti-apoptotik elemanları içerir (Şekil 1.6). Bcl-2 ve bu protein ailesinin diğer üyeleri için ortak olan kısa amino asit dizileri, Bcl-2 homolojisi (BH) motifleri olarak bilinir. Bcl-2 ailesinin her birinde en az 1 BH motifi bulunur. Bu motifler kısmen her üyenin işlevine katkıda bulunur. Bcl-2 ailesi üyeleri 3 fonksiyonel gruba ayrılabilir: Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik efektörler ve pro-apoptotik aktivatörler (Şekil 1.6). Klinik öncesi veriler, sadece tek bir BH3 motifi içeren aktivatörlerin, DNA hasarı gibi streslere hücresel yanıtta önemli aracılar olduğunu göstermektedir. Efektörler, mitokondriyal membran ile yakından ilişkili olan Bcl-2 proteinleridir ve sadece BH3 aktivatörleri tarafından uyarıldığında, apoptotik programı başlatan mitokondriyal membranda gözeneklerin oluşumunu teşvik eder. Hem efektörlerden hem de aktivatörlerden apoptoz teşvik edici etkiler, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ile doğrudan etkileşim yoluyla inhibe edilir.9 Klinik öncesi modellerde, Bcl-2 sadece BH3 aktivatörlerini bağlar ve sekester eder ve gözenek oluşturucu efektörlerle etkileşmelerini önler. Benzer şekilde, Bcl-2 mitokondriyal gözenek oluşumunu önlemek için efektörleri doğrudan etkileyebilir. Bcl-2 gibi anti-apoptotik elemanlar ve pro-apoptotik elemanlar arasında oluşan dinamik denge, hücrenin apoptozu başlatıp başlatmayacağını belirler.



Şekil 1.6: Bcl-2 protein ailesinin bazı üyelerinin şematik sınıflandırması. TM: Hidrofobik bölgeyi içerir (Kuwana ve Newmeye, 2003).

1.5.2.4. P 53

Başlıca apoptoz sinyal yollarından biri, p53 tümör baskılayıcıyı içerir. Tümör proteini p53, genotoksik veya hücresel strese tepki olarak apoptoz, büyüme durması veya yaşlanmaya karışan çok çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen nükleer bir transkripsiyon faktörüdür. P53'te korunmuş dört alan vardır: transkripsiyonel transaktivasyon için gerekli olan N-terminal alanı, sekansa özgü bir DNA bağlanma alanı, C-terminal ucunun yakınında bir tetramerizasyon alanı ve tek sarmal ile doğrudan etkileşime giren bir C-terminal alanı DNA. Kısa bir yarılanma ömrüne sahip olan p53, sürekli ubikitilleme ve daha sonra 26S proteazomu tarafından bozunma ile gerilimsiz memeli hücrelerinde normal olarak düşük seviyelerde tutulur. Fosforile edilmemiş p53, MDM2 (Fare Çift Dakika-2) ubikitin ligazı tarafından her yerde bulunur. Hücre, DNA hasarı, hipoksi, sitokinler, metabolik değişiklikler, viral enfeksiyon veya onkogenler gibi stresle karşı karşıya kaldığında, p53 ubiquitylation baskılanır ve p53 stabilize edilir ve çekirdeğinde birikir. P53'ün N-ucu, yoğun bir şekilde fosforile edilebilirken C-ucu, fosforile, asetile veya sumoyile olabilir. P53'ün çeşitli düzenleyici fonksiyonları ortaya çıkarma kabiliyeti, muhtemelen konformasyona bağlı olan fosforilasyon paternine bağlı olacaktır. p53 fosforilasyonuna Chks (Kontrol Noktası Kinazları), CSNK1-Delta (Kazein Kinaz-1-Delta), CSNK2 (Kazein Kinaz-2), PKA (Protein Kinaz A), CDK7 (Sikline Bağımlı Kinaz- 7), DNA-PK (DNA-Aktifleştirilmiş Protein Kinaz), HIPK2 (Homeomain-Etkileşen Protein Kinaz-2) ve JNK (Jun NH2-terminal kinaz). P53 fosforilasyonunda yer alan ana kinazlar arasında Chkl (Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz-1) ve Chk2 (Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz-2) bulunur. DNA hasarına yanıt olarak, sırasıyla ATR (Ataxia-Telangiectasia ve Rad3 Related) ve ATM (Ataxia Telangiectasia Mutasyonlu Gen) tarafından aktive edilen Chk1 ve Chk2, fosforilat p53. Chk2, MD20'nin bağlanmasını önleyen ve p53 stabilizasyonuyla sonuçlanan Ser20 üzerinde p53'ü fosforile edebilir. ATM ayrıca, p53'ün bir transkripsiyon faktörü olarak aktivasyonu için gerekli olan ve Ser20 fosforilasyonu ile sinerjik olarak hareket edebilen Ser15 üzerinde p53'ü fosforile edebilir. Aktive edildikten sonra p53, bir tetramer olarak bir p53-bağlanma yerine bağlanır. Bunu yaparak, programlanmış hücre ölümü ve / veya hücre döngüsü durmasına yol açan aşağı akım genlerinin ekspresyonunu aktive eder, böylece bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür.

P53, spesifik hedef genlerin transaktivasyonu, farklı bir gen grubunun aşağı regülasyonu ve transkripsiyondan bağımsız mekanizmalar dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla apoptozu teşvik eder.

1.5.2.5. Fas (APO-1 veya CD95)

24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden FAS hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur. FAS proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir. Bu şekilde; FAS reseptörünün karboksil ucuna (C) yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. FAS ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (Curtin ve Cotter, 2003; Spierings ve ark., 2004).

1.5.3. Apoptozisin Mekanizmaları

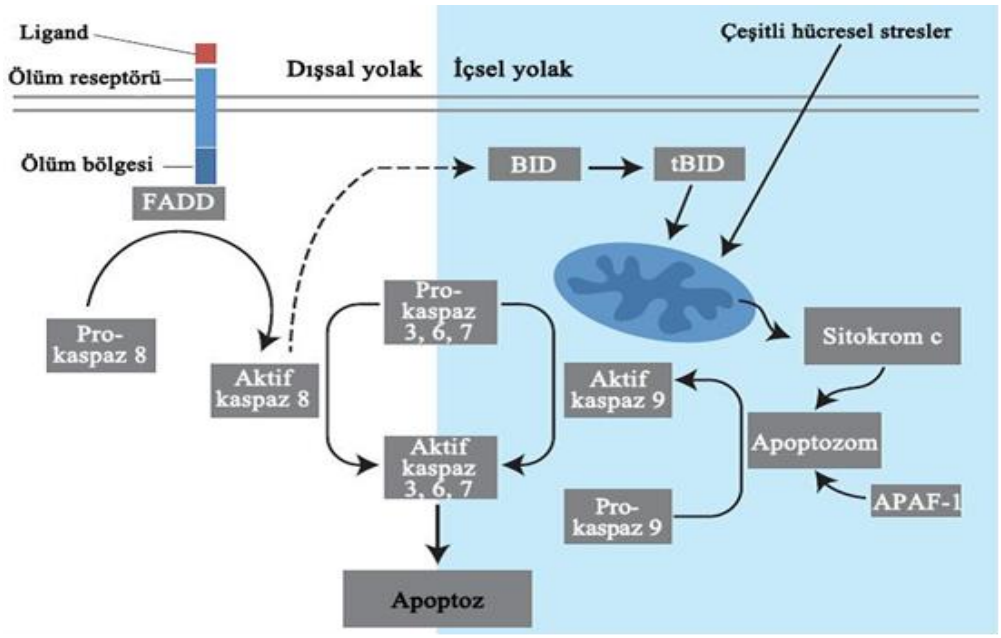
Apoptozisin indüklenmesinde sinyal yolları;

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/ Ekstrinsik (dışsal) yolak
2. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması/ İntrinsik (içsel) yolak
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması
4. Kaspaz bağımsız aracılı apoptozis oluşturulması

1.5.3.1. Ekstrinsik (dışsal) Yolak

Apoptoz, hücrenin silinmesinin fizyolojik bir süreci olarak bilinir ve aynı zamanda programlanmış hücre ölümü sürecidir, bu da morfolojik değişiklik ve DNA parçalanması ile sonuçlanır. Biri ölüm reseptörünün aracılık ettiği dışsal yol olan hücrelerin dış veya iç olayları tarafından uyarılır. Ölüm reseptörleri arasında Fas reseptörleri, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri bulunur. Bir yüzey reseptörü, örneğin TNF reseptörü-1 (TNF-R1) olarak, Fas ile ilişkili protein gibi adaptör proteinlerinin ölüm alanı (FADD) ve Tümör nekroz faktörü reseptörü tip 1 ile alımını indüklemek için TNF ile etkileşime girecektir. Ekstrinsik yolun kritik bir aracısı olan ve sonuçta hücre apoptozuna neden olan kaspaz-8 de dahil olmak üzere bir dizi aşağı yönlü

faktörü bir araya getiren DEATH domain proteini (TRADD).Apoptozu başlatan dışsal yol, TNFR1'e TNF-a gibi bir ölüm reseptörüne bağlanan bir ölüm ligandı ile tetiklenir. TNFR ailesi, homotrimerlerde düzenlenen ve ilgili ligand (lar) ın bağlanmasıyla aktive edilen 29 transmembran reseptör proteininden oluşan büyük bir ailedir. Benzer sistein bakımından zengin hücre dışı alanları paylaşırlar ve "ölüm alanı" (DD) adı verilen yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik alana sahiptirler. Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar. TNF ligand ailesinin 19 üyesi vardır ve bağlanma, aktive edilmiş reseptör ile ilişkili adaptör proteinlerine bağlı olarak proliferasyon, enflamasyon ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi yanıta neden olabilir. TNFR ayrıca RIP alımı yoluyla NFKB'nin aktivasyonuna yol açan pro-enflamatuar yolları da uyarabilir. Ölüm bölgesi kinaz RIP, TRAIL ile indüklenen IκB kinaz (IKK) aktivasyonu için gereklidir. TNF-a ve TNFR1'in bağlanmasının, hücre tipine ve biyolojik bağlama bağlı olarak hem hücre hayatta kalmasını hem de apoptozu tercih eden NFkB yolunu aktive ettiği tespit edilmiştir. TNFR1'in yanı sıra Fas ve DR4 / DR5 de sırasıyla ölüm reseptörleri ve bağ CD95 ve TRAIL olarak yola çıktılar. Reseptörlere bağlanan ligandın tamamı, adaptör proteinlerin (FADD / TRADD) yardımıyla bir kaspaz kaskadının alınması, dimerizasyonu ve aktivasyonuna ve sonunda hem sitoplazmik hem de nükleer substratların yarılmasına yol açacaktır. Bugüne kadar en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında CD95 / Fas, TNF-a / TNFR1, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5 bulunur. Reseptör trimerizasyonu, birkaç ölüm alanının işe alınmasına ve nihayetinde kaspaz-8 ve kaspaz-10'un işe alınmasına ve aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-8 ve kaspaz-10 daha sonra ya klivaj yapılarak doğrudan apoptozu başlatır ve böylece uygulayıcı kaspaz-3/6 / 7'yi aktive eder) ya da etkin hücre ölümünü indüklemek için BID'nin yarılması yoluyla içsel apoptotik yolu aktive eder. İmmüno-leke analizi ayrıca kaspaz-6 inhibitörünün lamin A / C'nin yarılmasını bloke ederken kaspaz-3/7 inhibitörünün poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) yarılmasını bloke ettiğini ortaya çıkarmıştır. Kaspaz-8'in aktivasyonu FLICE inhibitör proteini (FLIP) ile önlenebilir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar kaspazların aktivasyonunun, müteakip lamin A / C ve PARP yarılmasının ve NFkB yolunun hücre apoptozunun dışsal yolunda rol oynadığını düşündürmektedir.

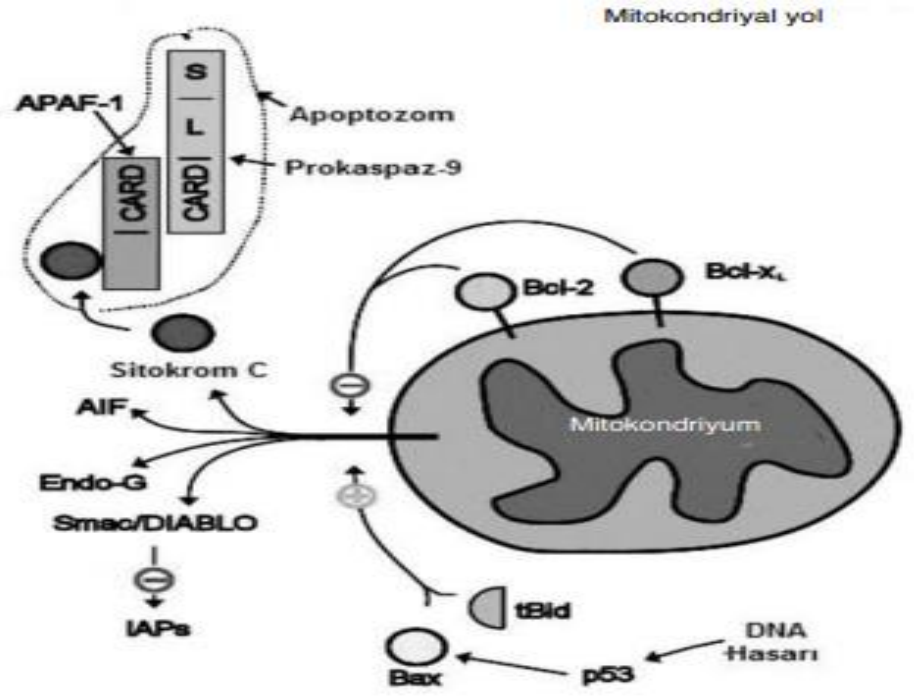


Şekil 1.7: İçsel ve dışsal apoptotik yolak (Aşık, 2015).

1.5.3.2. İntrinsik (içsel) Yolak

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir (Coşkun ve Özgür, 2011). Böylelikle mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, SMAC (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca++ ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur (Strasser ve ark., 2000; Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001). Apoptozom kaspaz 9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz 9'da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 Dendo ge ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir.

CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmante olmasına neden olur (Palmer ve ark., 2000; Smaili ve Hsu, 2000; Adams ve Cory, 2001).



Şekil 1.8: Hücrede Apoptoz Oluşum Mekanizmalarının Yolları (Gültekin ve ark., 2008).

1.5.3.3. Endoplazmik Retikulum (ER) Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Memeli hücrelerinde iki önemli IRE1(Inositol Requiring Enzyme 1) proteini; (IRE1α ve IRE1β) vardır. Bunlar ER stres-sinyal iletim yollarında rol alırlar. Son yıllardaki çalışmalar β hücrelerindeki ER stresinin hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin gelişiminde etkili olduğunu göstermiştir. β hücreleri yoğun olarak insülin sentezlemesi ve salgılaması sebebiyle sıklıkla ER stresiyle karşı karşıya kalırlar. ER stresi ile ilişkili apoptosisin gelişiminde rol alan üç ayrı yolak tespit edilmiştir. Bunlar; Transkripsiyonel uyarı yolağı, c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK) yolağı ve Kaspaz-12 aktifleşmesiyle gerçekleşen yolaktır (Çelik ve ark., 2015).

1.5.3.4. Kaspaz Bağımsız Apoptozis

Kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bir mekanizma da kaspaz bağımsız yolak olarak bilinir. Bu mekanizmada AIF (Apoptozis İndükleyici Faktör) rol oynar. AIF mitokondriden salınır ve nukleusa geçerek bazı nükleazların aktifleşmesini sağlar. Bu durum DNA degredasyonuna yol açar (Ulukaya, 2003).

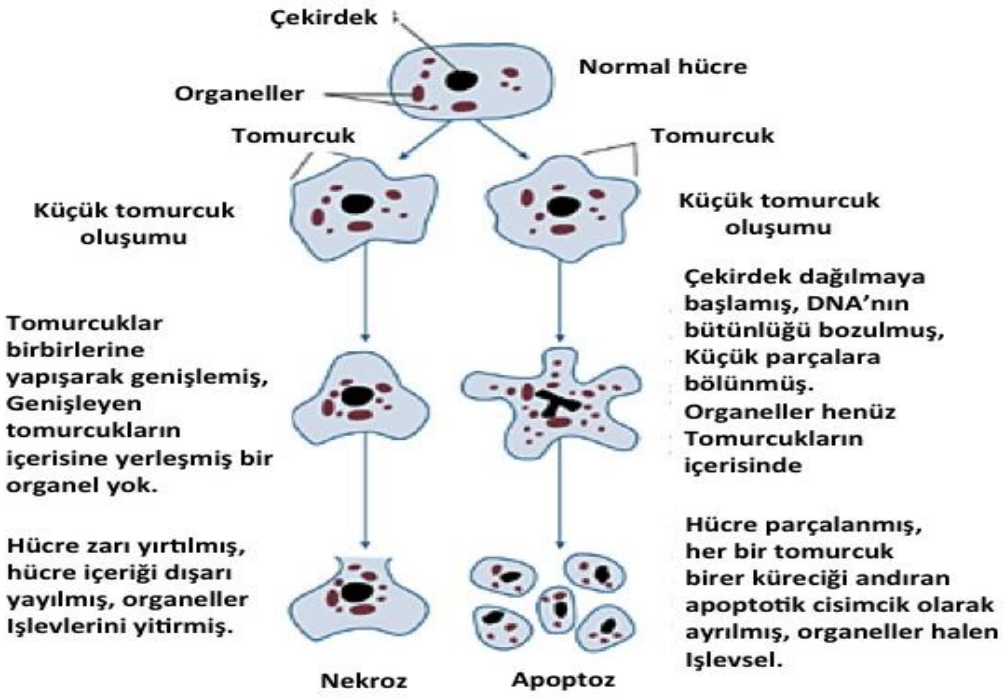
1.5.4. Nekrozis

Nekroz, canlı dokudaki hücrelerin otoliz ile erken ölümüyle sonuçlanan bir hücre hasarı türüdür. Nekroza, hücre bileşenlerinin düzensiz sindirimi ile sonuçlanan enfeksiyon, toksinler veya travma gibi hücre veya doku dışındaki faktörler neden olur. Bunun aksine, apoptoz, doğal olarak meydana gelen ve hücresel ölümün programlanmış ve hedeflenmiş bir nedenidir. Apoptoz genellikle organizmaya faydalı etkiler sağlarken, nekroz neredeyse her zaman zararlıdır ve ölümcül olabilir.

Nekroza bağlı hücresel ölüm, apoptotik sinyal iletim yolunu takip etmez, bunun yerine çeşitli reseptörler aktive edilir ve hücre zarı bütünlüğünün kaybına ve hücre ölümü ürünlerinin hücre dışı boşluğa kontrolsüz bir şekilde salınmasına neden olur. Bu, çevre dokuda ölü hücreleri fagositozla ortadan kaldıran lökositleri ve yakındaki fagositleri çeken inflamatuar bir tepki başlatır. Bununla birlikte, lökositler tarafından salınan mikrobiyal zarar verici maddeler, çevre dokularda kollateral hasar yaratacaktır, bu aşırı kollateral hasar iyileşme sürecini engeller. Böylece, tedavi edilmeyen nekroz, hücre ölümü bölgesinde veya yakınında ölü doku ve hücre döküntülerinin ayrışmasına neden olur. Klasik bir örnek kangrendir. Bu nedenle, debridman olarak bilinen bir prosedür olan nekrotik dokunun cerrahi olarak çıkarılması gerekir (Proskuryakov. S ve ark, 2003).

1.5.5. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

- ► Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir.
- ► Nekrozisde hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekroziste kromatin patterni hemen hemen normaldir.
- ► Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır.
- ► Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder. Apoptotik hücre membranı sağlamdır. Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar. Apoptik hücre küçük cisimciklere parçalanır.
- ► Nekroziste inflamasyon uyarılır. Apoptoziste inflamasyon oluşmaz (Barisic ve ark., 2003)



Şekil 1.9: Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar (Yeni Biyoloji, 2018).

1.6. METAL BAZLI BİLEŞİKLERİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ

Metal iyonlarının biyolojideki birçok aktivitesi, metal bazlı terapötiklerin keşfedilmesine yönelik araştırmaları teşvik etmiştir. Önde gelen metal bazlı ilaçlardan biri olan sisplatin, testis, over, mesane, baş-boyun, akciğer ve meme gibi birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Bununla birlikte, önemli yan etkiler ve ilaç direnci klinik uygulamalarını sınırlandırmıştır. Antikanser ilaçların mekanizmasında ve sitotoksisitesinde, DNA'ya bağlanma özellikleri ve metal komplekslerinin DNA oligonükleotidleri ile yaptıkları çapraz bağlar önemli faktörlerdir (Zhang ve Lippard, 2003). Platin komplekslerin sisplatinden farklı DNA bağlama modlarına sahip olması, birçok kanser türüne karşı etkili bir sitotoksik ajan olduğunu göstermiştir. Yeni geliştirilen platin veya palladyum tabanlı kanser ilaçları, etkinliği arttırılmış, daha az toksik ve sağlıklı hücreye zarar vermeyecek şekilde tasarlandı. Fakat bunlardan sadece birkaçı faz çalışmalarında başarılı olup klinikte tedavi de yerlerini almıştır (Wilson ve ark., 2013; Halper ve ark., 2015).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar paladyum ve yeni platin sakkarinat komplekslerinin sentezine olan ilgiyi attırmaktadır. Bu komplekslerin bazılarının in vitro ve in vivo sitotoksik aktiviteleri üzerinde cesaret verici sonuçlar bulunmuştur. Ek olarak, güçlü antikanser aktivitesine sahip birkaç yeni platin (II) sakkarinat kompleksi araştırma grupları tarafından da bildirilmiştir. Sitotoksisitesi en yüksek komplekslerin apoptoz indüksiyon kabiliyeti, ROS üretimindeki etkileri, mitokondriyal potansiyel değişikliği; M30, Annexin-V ve kaspaz 3/7 aktivite analizleri ile belirlendiği ve bu komplekslerin meme ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlendi. Mekanik çalışmalar, güçlü komplekslerin aşırı reaktif oksijen türlerine (ROS) neden olduğunu ve aynı anda hem mitokondriyi hem de genomik DNA'yı hedef alan çift bir etki bulunduğunu gösterdi (Yılmaz ve ark., 2018).

Bu tez kapsamında anlatılan bilgilerin ışığında, kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilaç adayı olabileceğini düşündüğümüz yeni sentez Pt (II) sakkarinat kompleksinin **(**trans-[$Pt(sac)_2(pph_2cy)_2$]), pankreas kanseri ve sağlıklı pankreas hücreleri üzerine olan sitotoksik/ apoptotik etkileri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kimyasal Maddeler

-Platin (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
-SRB (Sulforhodamine B), Santa Cruz, ABD
-Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore
-Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore
-Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore
-Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore
-Muse® Cell Cycle Kit, Merck Millipore
-Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
-Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, USA
-L-glutamin, Gibco
-Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, USA
-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza
-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA) ", Gibco, USA
-Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
-Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries
-Triz bazı (Tris base), Scharlau, İspanya
-Sodyum klorür (NaCl), Merck, Almanya

2.1.2. Sarf Malzemeler

-25cm2 ve 75cm2'lik flask, Corning
-6 kuyulu plate, Corning
-96 kuyulu flat plate", Corning
-5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
-10µl'lik pipet uçları, Biohit
-100µl'lik pipet uçları, Biohit
-1000µl'lik pipet uçları Biohit
-Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific

-Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest

-Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest

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

-Kriyovial, Corning

2.1.3. Cihazlar

-Spektrofotometre, BGM Labtech

-Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D

-CO2 inkübatörü, Panasonic

-Buzdolabı, Panasonic

-Steril kabin, Telstar

-Muse Cell Analyzer, MerckMillipore Sigma, Toronto

-Multipipet cihazı, Multipette eppendorf

-Inverted mikroskop, Nikon, Japonya

-Santrifüj, Hitachi, Japonya

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

-0,5-5ml pipet, Brand

-10ml pipet, Eppendorf

-5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific

-Pipet boy, ISO fill

-20-200µl Transferpipet, Brand, Alma

2.2. METOD

2.2.1. Kimyasal Bileşiğin Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentez edilen Pt (II) sakkarinat kompleksinin moleküler ağırlığı 1096.10 g/mol olup, ana stok 50mM olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı. Hazırlanan bu stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C' de saklandı. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki solüsyonlar stok solüsyonda RPMI 1640 besiyerinde ile seyreltilerek hazırlandı.

2.2.2. Hücre Kültürü

2.2.2.1. Hücre Hattı

Çalışmamızda kullanılan PANC-1 hücre hattı (Tablo 1.5). ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edildi. PANC-1 hücreleri % 10 Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific), ve uygun miktarda antibiyotik (penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/ml) eklenmiş RPMI 1640 besiyerinde 37 °C'de % 5'li CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılarak kültür edildi.

Tablo 1.5: Hücre soyunun özellikleri

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)

2.2.2.2. Besiyerinin Hazırlanması

PANC-1 hücre hattı, içerisinde %1 L-glutamin, % 10 FBS ve % 1 penisilin/streptomisin bulunan RPMI 1640 besiyeri ortamında kültüre edildi.

2.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması

Yapışık haldeki hücreleri kaldırmak için 1-2 ml % 0,05 Tripsin/EDTA uygulandı. Hücrelerin flasktan ayrılması için 37 °C'de % 5'li CO_2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası flaska bir miktar taze hücre besiyeri ilave edildi. Hücreler bir falkon tüpe alındıktan sonra, 800 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1-2 ml 1/9 oranında DMSO (dimetil

sülfoksit) ve besiyerinden oluşan dondurma solüsyonu ilave edildi. Hücreler eppendorfa alındı ve -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi.

2.2.2.4. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Dondurulmuş hücreleri içeren kriyotüpler kapaklarından tutularak 37°C'deki su banyosunda eritildi. Çözülen hücreler, içerisinde 5ml taze besiyeri bulunan falkon tüplerine aktarıldıktan sonra 800 rpm'de 5 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 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İki günde bir flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ilave edildi.

2.2.2.5. Hücre Soylarının 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 CO_2'li etüvde 3-4 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 800 rpm'de 5 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 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak üzerine eşit miktarda % 0,5 tripan mavisi eklendi. Homojen şekilde karışmaları sağlandı ve bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamı

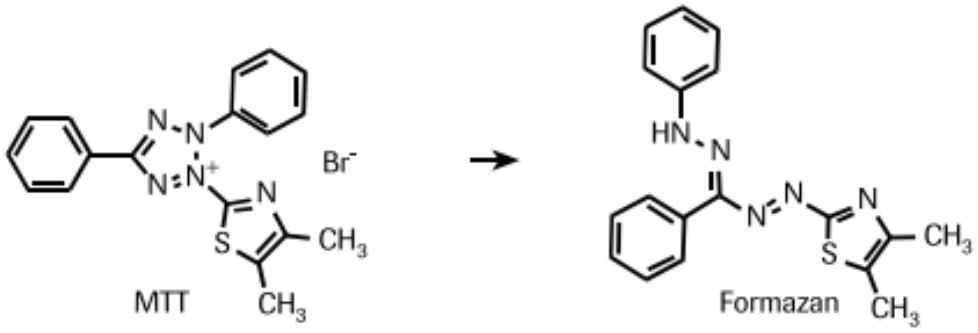
üzerinde beş farklı alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde bulunan hücre sayısı belirlendi.

2.2.2.7. MTT (Metiltiazotetrazolyum) Canlılık Testi

MTT yöntemi, ilk kez Mosmann ve ark. tarafından 1983 yılında belirlenen ve hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossman 1983). Mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi canlı olan hücrelerde gözlenirken, ölen hücrelerde ise gözlenmemektedir. Ortama konulan bileşiğe yanıt olarak enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğunun görülmesi hücrelerin öldüğünü göstermektedir. Bundan dolayı hücreler mitokondriyal dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine maruz bırakılırlar (Şekil 2.1). MTT, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazoliumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Bunun sonucu; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanırken, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS (%10 sodyum dodesil sülfat+steril distile su + 0,01N HCl) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür. Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmış olur.

Çalışma için; hücrelerin hemositometre ile sayımı yapıldıktan sonra 100 µl besiyeri içerisinde PANC-1 hücre hattı 5-10x10^3 hücre olacak şekilde hazırlandı ve 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak için 24 saat inkübe edildikten sonra eski besiyeri uzaklaştırıldı. Pt (II) kompleksi konsantrasyonları 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM olacak şekilde hazırlanan solüsyondan kuyucuklara 100 µl ilave edilerek 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. İnkübasyon sonrası etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 1X DPBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 100 µl MTT solüsyonu eklenerek pleyt 37° C,

% 5 CO_2'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT solüsyonu uzaklaştırılarak yerine 100 µl DMSO eklenerek ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan mikroplate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Pt (II) kompleksi uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı.



Şekil 2.1: MTT Tepkimesi

2.2.2.8. SRB ((Sulforhodamine B) Canlılık Testi

SRB metodu, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (National Cancer Institute)'nün de kabul gören hücre canlılık metodudur. Yöntemin prensibi Sülforadamin B (SRB) molekülünün asidik ortamda proteinlere stokiyometrik olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır.

Çalışmada hücreler, 3-7×10^3 arası değişen yoğunlukta, kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak üzere, hücreler 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra Pt (II) kompleksi (2ml besiyeri içine/8 µl ilaç) konsantrasyonları 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM olacak şekilde hazırlanan solüsyondan kuyucuklara 100 µl ilave edilerek 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi.

Tedavi süresi sonunda kuyulara 50 µl TCA (Trikloroasetik asit) eklenerek 1 saat in situ fikse edildi ve ardından kuyulardaki TCA distile su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Sonra kuyulara 50 µl SRB boyası ilave edildi. Oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dk inkübasyona bırakıldı.

Boyama süresi sonunda hücrelere bağlanmamış SRB boyasını uzaklaştırmak için %1'lik Asetik asitle kuyular yıkanır. Proteinlere bağlanan boyayı uzaklaştırmak amacıyla tamponlanmamış 10 mM Tris bazı (150 µl/ kuyu) eklendi ve mikroplate okuyucusunda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak değerlendirildi.

% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı. % Canlılık= [100 × (Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama) / (Kontrol hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)] olarak hesaplandı.

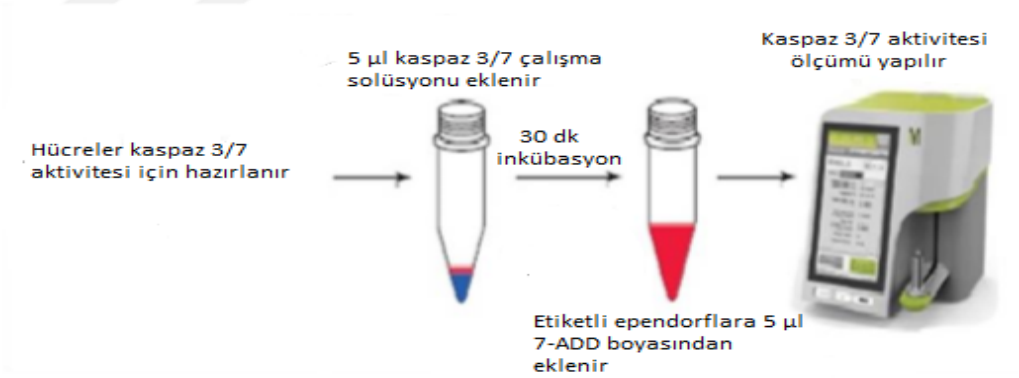
2.2.2.9. Akım Sitometri Analizleri

Akım sitometresindeki analizler için hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerekmektedir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, lazer ışını ile karşılaştıkları''flow cell'' adı verilen bölümden geçer ve hücreler lazer ışığı ile uyarılırlar. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. İlgili boya ya da antikor ile işaretlenen hücre lazer ışınıyla uyarıldığında floresan ışıması cihaz tarafından belirlenir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (Karaboz ve ark. 2008).

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

Kazpaz 3/7 Testi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptozis sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan effektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir. Kaspaz 3/7 testi için, 1×10^5/ 1ml PANC-1 hücreleri sayılarak 6 kuyulu kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat boyunca 37ºC, % 5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. Sonrasında, hücreler Pt (II) kompleksinin IC_{90} dozları ile 1 ml besiyeri içerisinde muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, % 5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0.5 ml % 0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, % 5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1 ml'sinde 2×10^4-5×10^5 hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz 3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şeklide 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler oda sıcaklığından karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı ve sonrasında Muse cihazında kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 2.2).

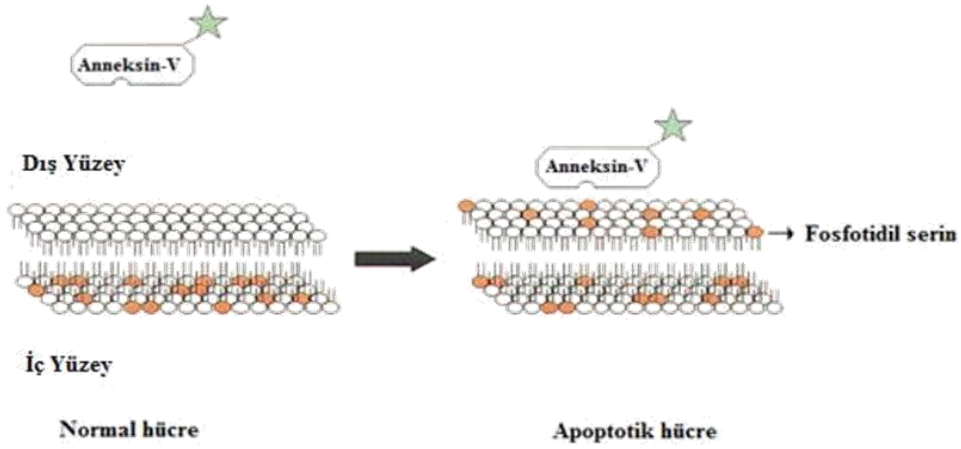


Şekil 2.2: Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi (Anonim, 2013).

Anneksin-V Testi

Hücre zarının iç yüzeyinde zar lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) yer alır. Hücre apoptoza gittiğinde normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan PS'nin dış yüzeye doğru yer değiştirir (Şekil 2.3). Bu yer değiştirme hücre zarının membran bütünlüğünün değişime uğramadığı apoptotik hücre ölümünün ilk döneminde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde olan FITC (greenfluorescence) ile işaretlenerek apoptotik hücreler belirgin hale getirilir ve floresan mikroskobu ile incelenir. FITC-Anneksin-V komplesinin hücre zarı yüzeyindeki PS'ye bağlanma oranı flow sitometri ile de ölçülebilinmektedir. Nekroza uğramış hücrelerde de Anneksin-V bağlanma bölgeleri olabildiği için farklı bir boya olan 7-AAD eklenmektedir. 7-AAD, sadece membranı hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan bir boyadır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nukleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları erken apoptozda (intakt) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin

bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla canlı hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-); Erken apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-), Geç apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+); Nekrotik hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+) boyanır ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Güleş ve Eren 2008, Ulukaya ve ark. 2011).

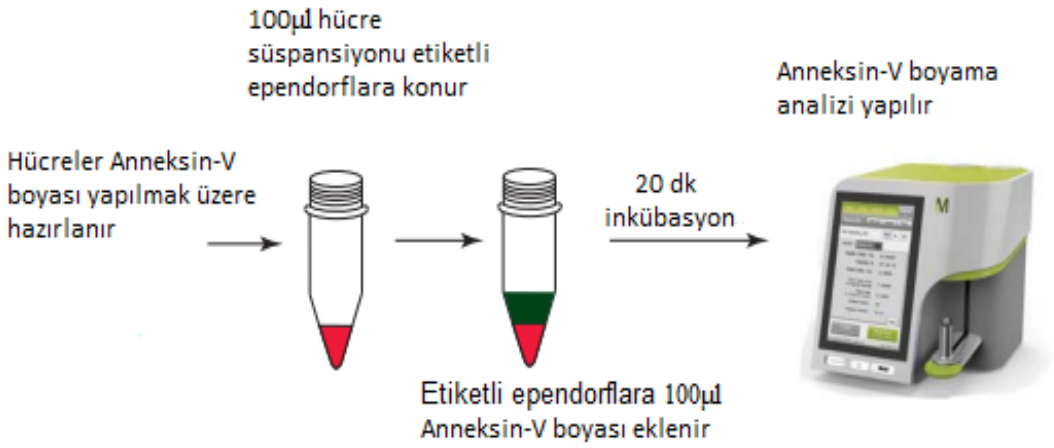


Şekil 2.3: Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark.1998'den değiştirilerek alınmıştır).

MuseTM Annexin V & Dead Cell Kiti kullanmak için, 1×10^3/ 1ml PANC-1 hücre leri sayılarak 6 kuyulu kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat boyunca 37ºC,%5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. Sonrasında, hücreler Pt (II) kompleksinin IC_{90} dozları ile 1 ml besiyeri içerisinde muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, % 5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, uzaklaştırıldıktan sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı. İlgili falkon tüplere toplandı ve sonra 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı ve 100 µl %1 FBS içeren besiyeri pleyt üzerine eklendi ve pleyt süspanse edildi. Etiketli ependorflara 100µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı.

Karanlık ortamda 20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı. 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve negatif kontrol

kuyularının süpernatantı tedavi süreleri sonunda kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100 µl % 1 FBS içeren besiyeri eklendi ve etiketli ependorflara 100µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi (Şekil 2.4).



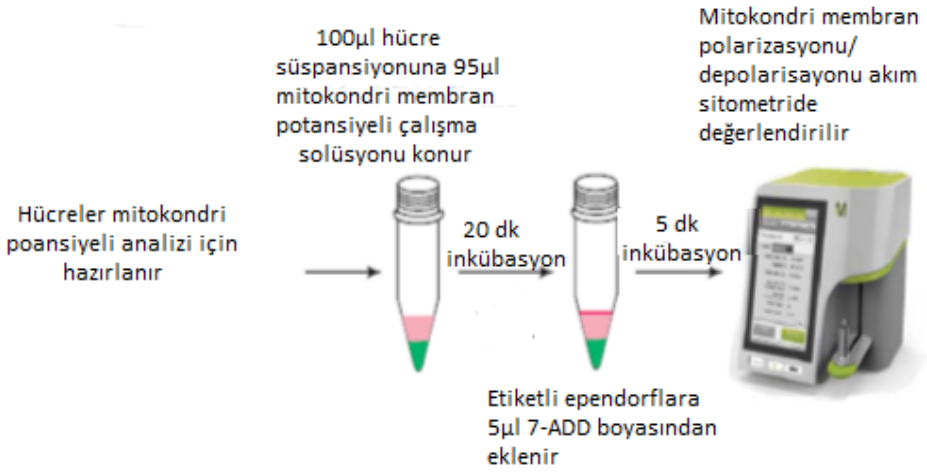
Şekil 2.4: Anneksin-V Boyama (Anonim, 2013).

Mitokondri Membran Potansiyeli Testi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler, hücre sağlığı ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir. Mitokondri apoptoz sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Finkel, 2001). Bu nedenle apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir. Mitokondri membran potansiyeli testi için PANC-1 hücreleri başlangıç hücre sayısı 1 ml içerisinde 1×10^5 olacak şekilde ayarlanarak, 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, % 5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben hücreler Pt (II) kompleksinin IC_{90} dozları ile 1 ml besiyeri içerisinde

muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, % 5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml % 0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantları uzaklaştırıldı ve % 1 FBS içeren besiyeri ile hücre pleytleri süspanse edildi. Ardından 95 µl çalışma solüsyonu eklendi pipetleme ile kısa süre karıştırıldıktan sonra hücreler 20 dk 37ºC'de, % 5 CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere 5 µl 7-AAD (7-Aminoaktinomisin) boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 2.5).



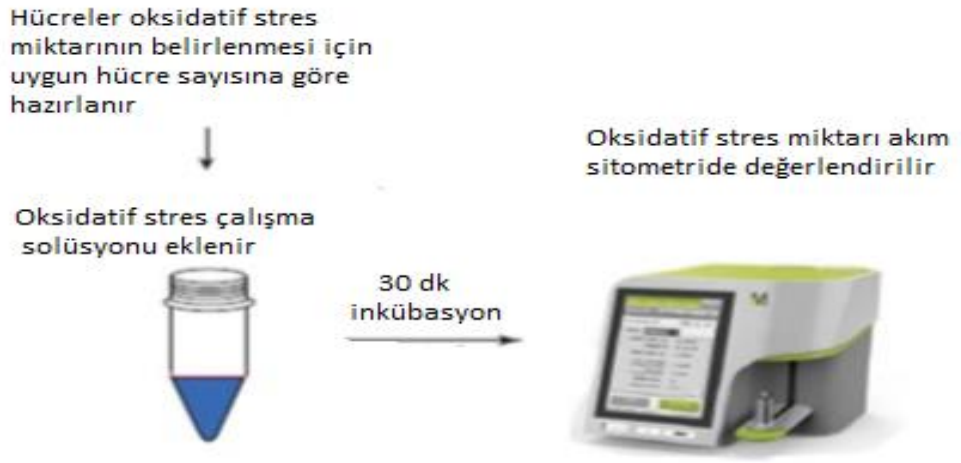
Şekil 2.5: Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi (Anonim, 2013).

Oksidatif Stres Belirlenmesi

ROS (Reaktif oksijen türleri) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2•^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH•)'dir. ROS, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı serbest radikaller oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit ($NO_2•$), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Kanser, alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Dumont ve Beal, 2011; Pelicano, 2014).

Kullanılan Muse® Oksidatif Stres kiti de hücre içi süperoksit radikallerini saptayarak hücrelerde görülen oksidatif stres yüzdesi hakkında bilgi vermektedir. Kit içeriğindeki oksidatif stress solusyonuda hücrelerdeki ROS seviyesini saptamaktadır. Oksidatif stres testi için, PANC-1 hücreleri başlangıç hücre sayısı 1 ml içerisinde 1×10^5 olacak şekilde ayarlanarak, 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben hücreler Pt (II) kompleksinin IC_{90} dozları ile 1 ml besiyeri içerisinde muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml % 0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, % 5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pleyt ml'sinde 1×10^6-1×10^7 hücre olacak şekilde kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu ile muamele edilerek kısa pipetleme ile karıştırıldı ve 30 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Oksidatif Stres Miktarının (ROS) Ölçülmesi (Anonim, 2014)

2.3. KİMYASAL BİLEŞİĞİNİN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Pt (II) sakkarinat MP6 kompleksinin PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlemek için, hücrelerin metabolik aktiviteleri ile formazan tuzlarının indirgenmeleri sonucu formazan kristallerinin kolorimetrik yöntemle ölçülerek hücre canlılığının belirlenmesi esasına dayanan MTT (3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolym bromid) testi uygulandı. 96 kuyucuklu pleyt'e her bir kuyucukta 100 µl besiyeri içerisinde yaklaşık 5-10x10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Pt (II) bileşiği konsantrasyonları 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM olacak şekilde hazırlanan besiyerinden kuyucuklara 100 µl ilave edilerek 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 1X DPBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 20 µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT solüsyonu uzaklaştırılarak yerine 100 µl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan kristallerinin sarı renge dönüşümü mikroplate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Pt (II) bileşiği uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı.

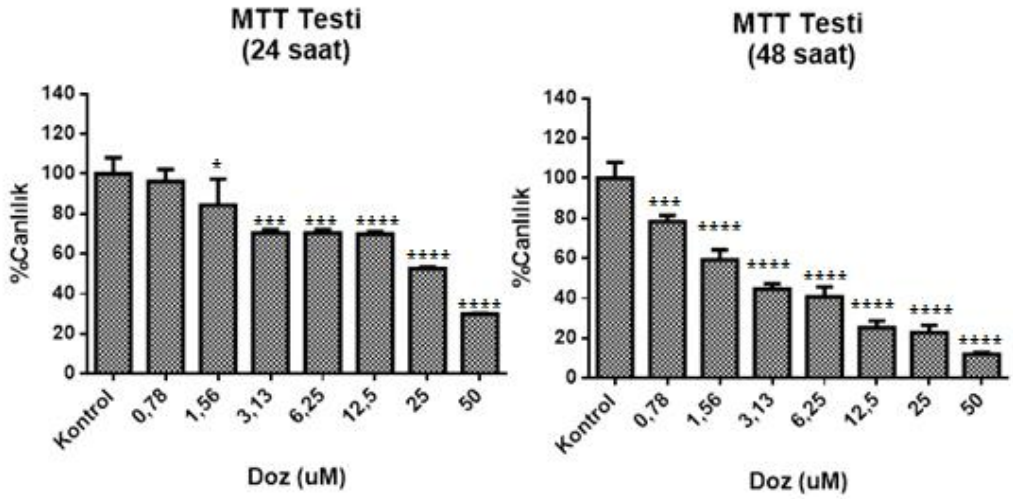
2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

MTT ve SRB testi canlılık deneyleri sonuçlarının grafikleri "GraphPad Prism" programı kullanılarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler ANOVA testi ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,0001$ değerine göre belirlendi.

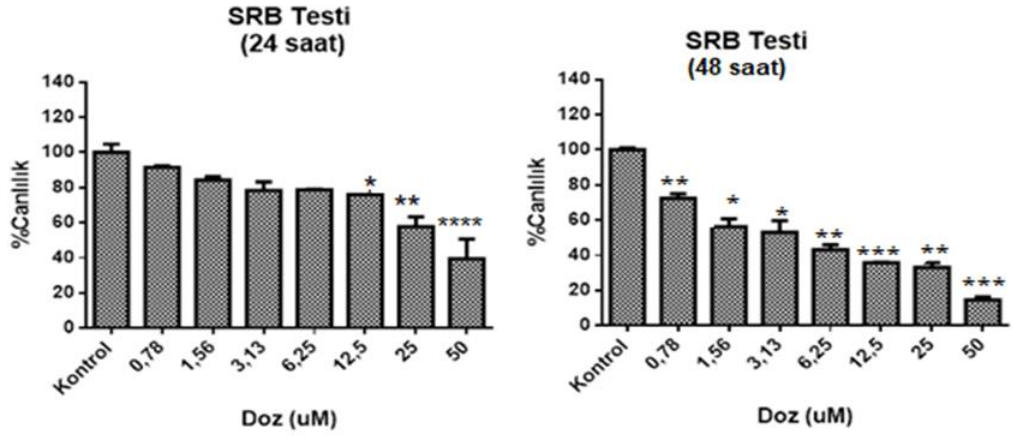
3. BULGULAR

3.1. MTT VE SRB CANLILIK TESTİ BULGULARI

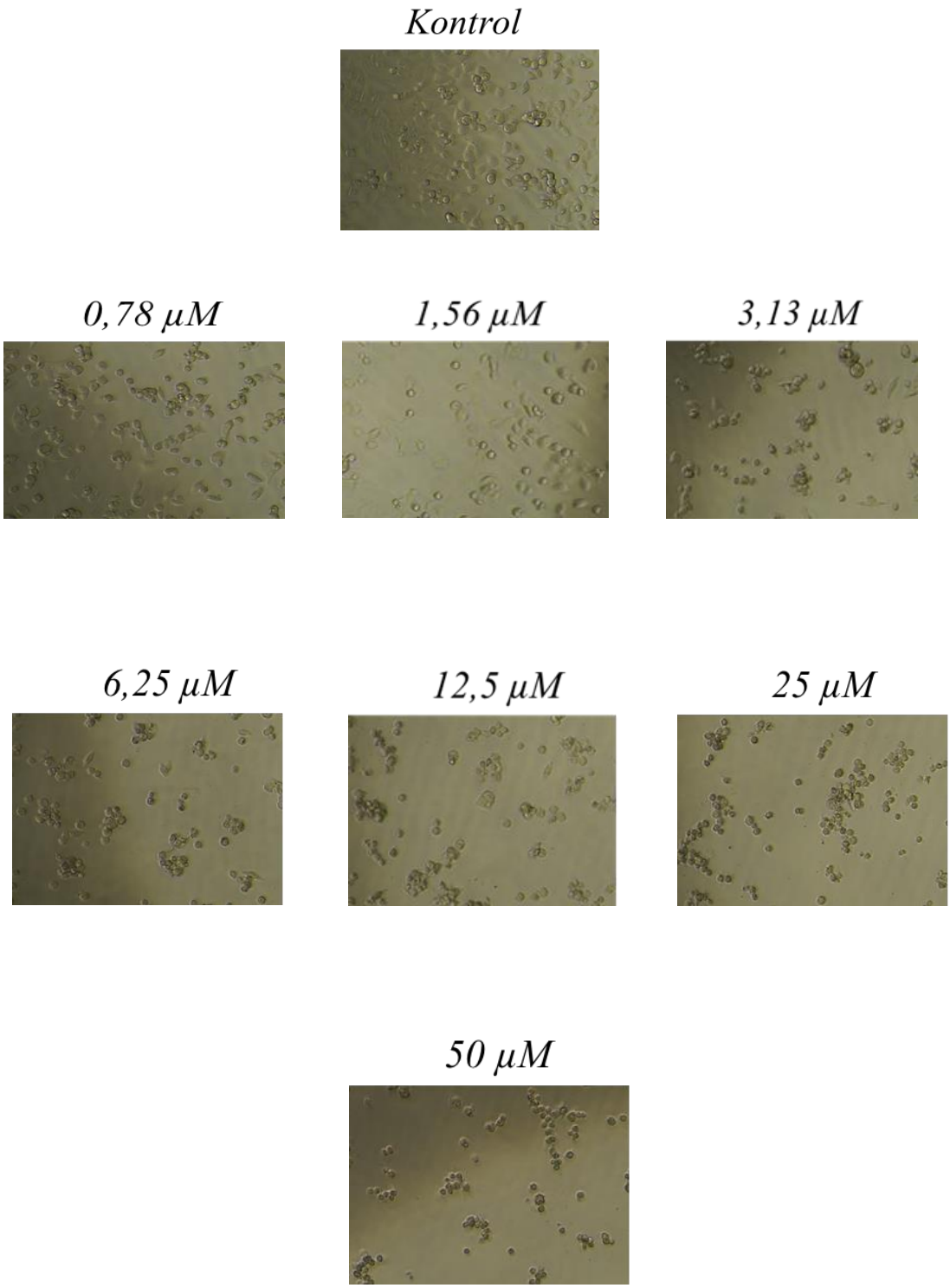
Pt (II) kompleksinin 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarının PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT ve SRB testi uygulanmıştır. Hücre soylarında 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Pt (II) kompleksi ile muamele edilerek ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterildi. Bileşiğin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde, uygulanan konsantrasyonlarda hem istatistiksel olarak hem de faz fotoğrafları ile uyumlu bir şekilde anlamlı azalmalar (*: $p<0,05$ **:$p<0,01$ ***:$p<0,001$ ****:$p<0,0001$) gözlendi. Faz fotoğrafları incelendiğinde hücre yoğunluğunun, kontrole kıyasla, azaldığı ve hücre bağlantılarının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.1: Pt (II) kompleksiyle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin MTT testi grafikleri. 24 ve 48 saatlerde (0.78-50 µM) farklı dozlarının uygulaması sonucu hücre canlılıkları ölçülmüştür. Aynı zaman periyodu (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001 **** :p<0,0001) ifade etmektedir



Şekil 3.2: Pt (II) kompleksiyle muamele edilen PANC-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin SRB testi grafikleri. 24 ve 48 saatlerde (0.78-50 µM) farklı dozlarının uygulaması sonucu hücre canlılıkları ölçülmüştür. Aynı zaman periyodu (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001 **** :p<0,0001) ifade etmektedir.



Şekil 3.3: Pt (II) kompleksiyle muamele edilen PANC-1 hücre soyunda 48 saat faz görüntüleri.

MTT verilerine göre; PANC-1 hücre soylarında Pt (II) bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla Pt (II) bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{90} (kontrol hücrelerine kıyasla Pt (II) bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin % 90'ını öldüren konsantrasyon) değerleri ise Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1: Pt (II) bileşiği uygulanan PANC-1 hücre soylarının IC_{50} ve IC_{90} dozlarının belirlenmesi

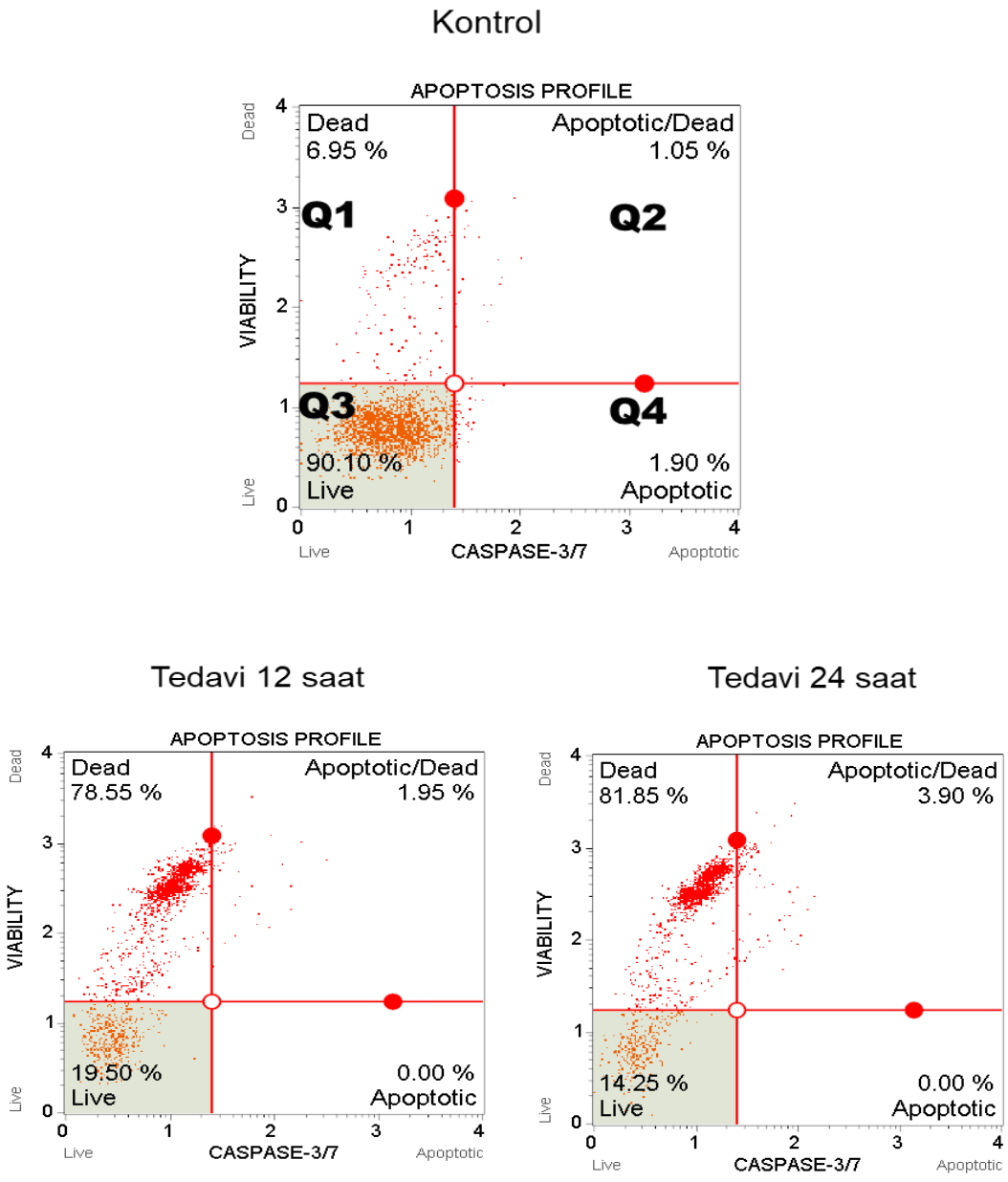
IC_{50}	MTT Testi	SRB Testi
24 saat	27,8 µM	35,4 µM
48 saat	2,5 µM	4,1 µM
IC_{90}	MTT Testi	SRB Testi
24 saat	>50 µM	>50 µM
48saat	>50 µM	>50 µM

3.2. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI

3.2.1. Kaspaz 3/7 Testi Değerlendirilmesi

Apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde, kaspaz proteazların aktifleşmesi önemli rol oynamaktadır. Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve apoptotik hücre ölümü hakkında bilgiler veren apoptotik belirteçlerdendir. Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi sonucunda; 12 saatlik tedavi sonrasında Pt (II) kompleksi uygulanmış 50 µM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 hücrelerinde apoptotik oranı % 1,95 (Q2+Q4)' dir. 24 saatlik tedavi sonrasında Pt (II) kompleksi uygulanmış 50 µM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 hücrelerinde apoptotik oranı ise % 3,90 (Q2+Q4)'dır (Şekil 3.4). Pt (II) kompleksinin 50 µM (IC_{90}) konsantrasyonunun uygulanması sonucu PANC-1 hücre ölümü oranı

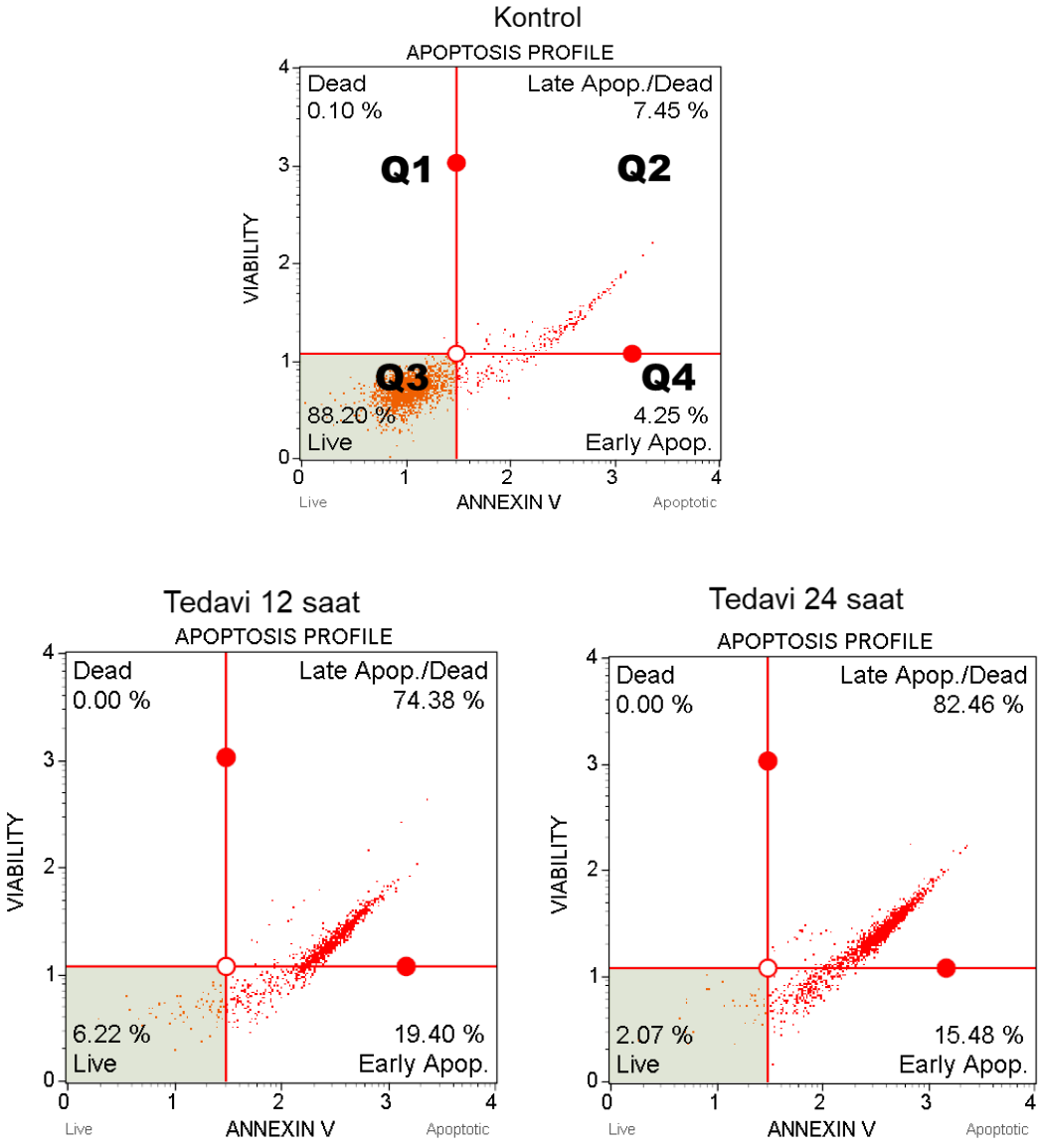
12 ve 24 saatler için, sırasıyla, % 78,55 ve % 81,85 (Q1) olarak belirlendi ve PANC-1 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivasyonunun olmadığı sonucuna varıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50 µM (IC_{90}) konsantrasyonunda PANC-1 insan pancreas kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1(Dead)=Nekroz, Q2(Apoptotic/Dead)=Geç Apoptoz, Q3(Live)=% Canlılık, Q4(Apoptotic)=Erken Apoptoz)

3.2.2. Anneksin-V Değerlendirilmesi

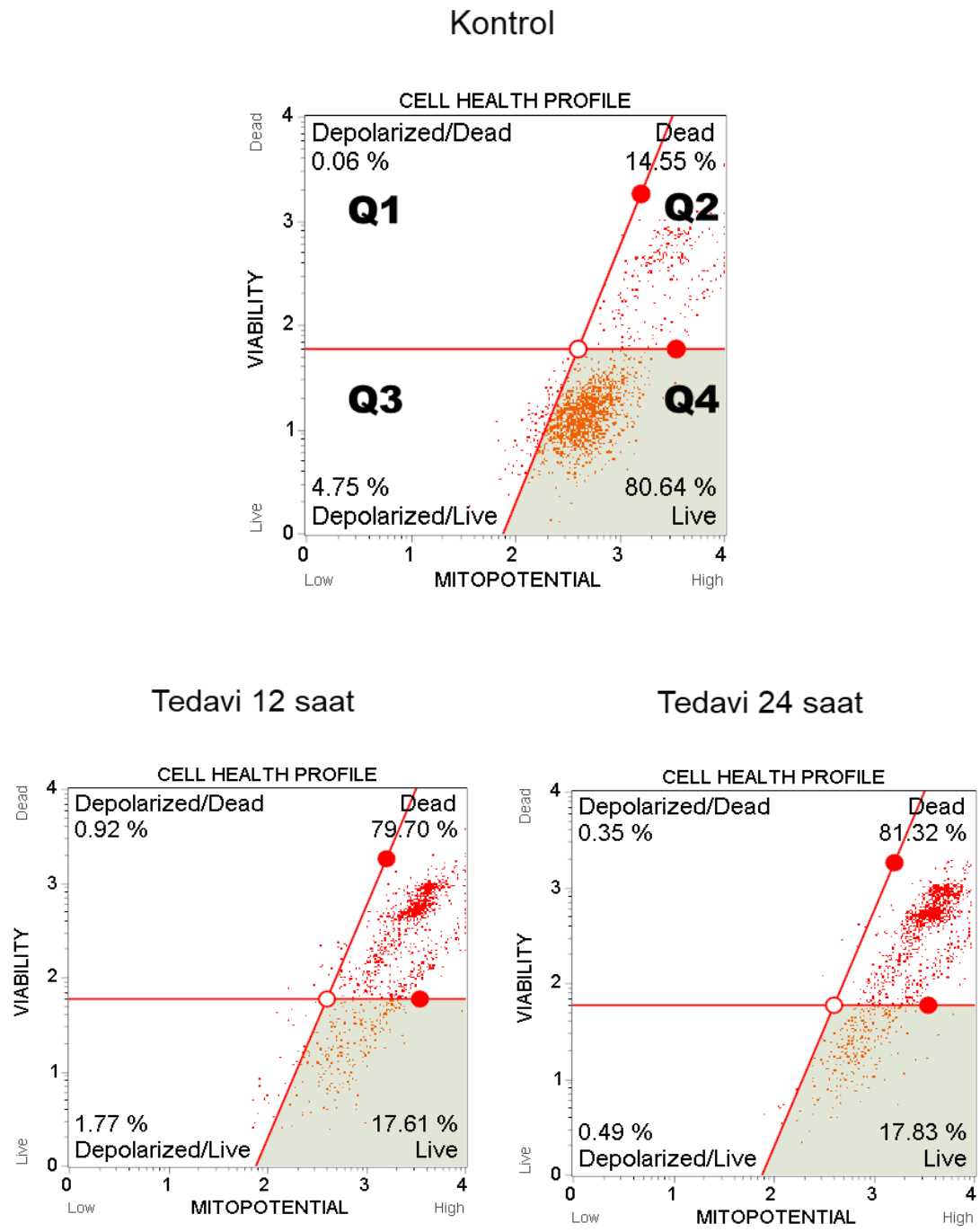
Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; 12 saatlik tedavi sonrasında Pt (II) kompleksi uygulanmış 50 µM (IC_{90}) konsantrasyonunu PANC-1 hücrelerinde apoptotik oranı % 93,78 (Q2+Q4)'dir. 24 saatlik tedavi sonrasında ise Pt (II) kompleksi uygulanmış 50 µM (IC90) konsantrasyonunun PANC-1 hücrelerinde apoptotik oranı ise % 97,94 (Q2+Q4)'dir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50 µM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1(Dead)=Nekroz, Q2(Apoptotic/Dead)=Geç Apoptoz, Q3(Live)=% Canlılık, Q4(Apoptotic)=Erken Apoptoz

3.2.3. Mitokondri Membran Potansiyel Değişiklikleri

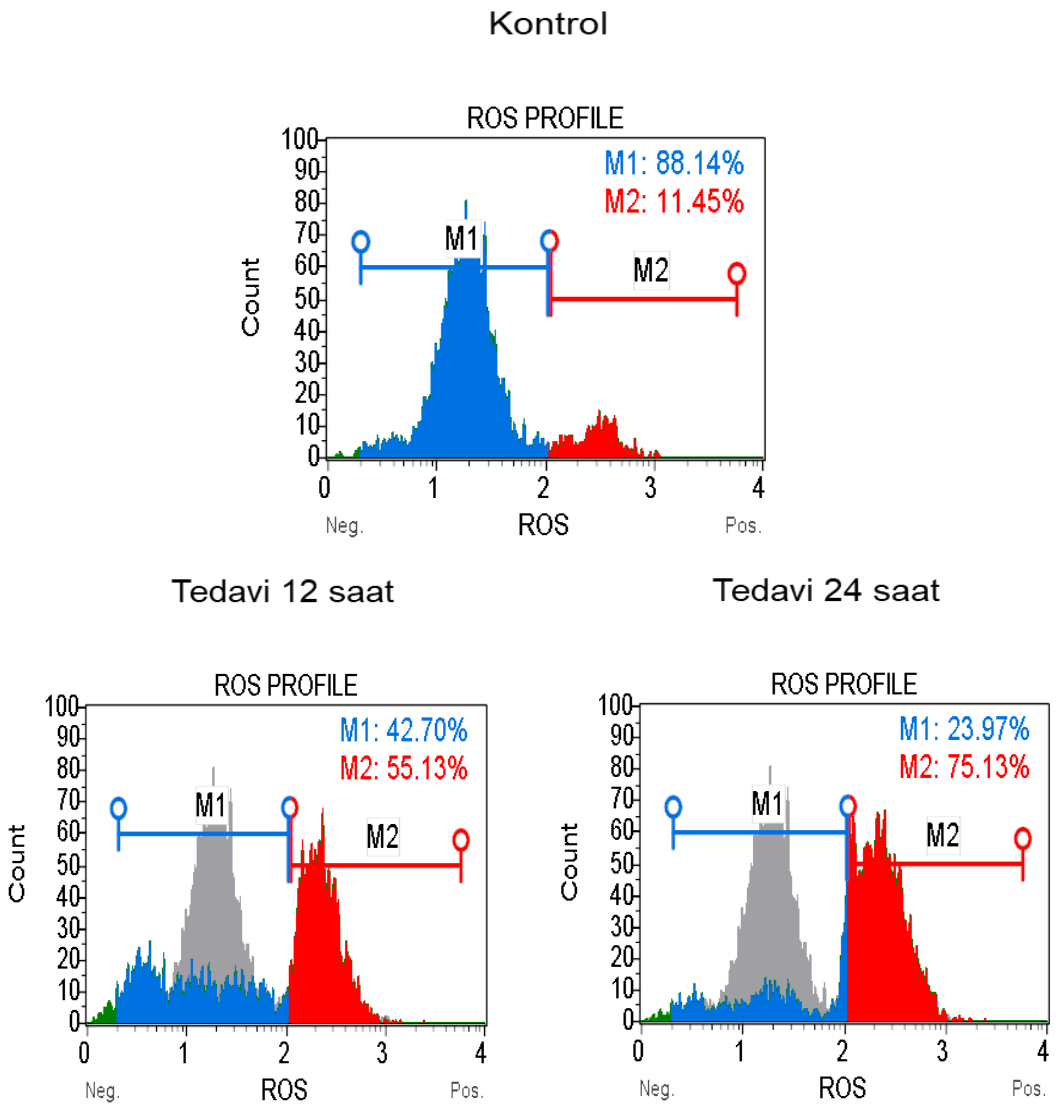
Mitokondriyal membran permeabilitesinin değişimi apoptotik süreçde gözlenen önemli değişikliklerideni biridir. 12 saatlik tedavi sonrasında Pt (II) kompleksi uygulanmış 50 μM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi % 2,6 (Q1+Q3)'dir. 24 saatlik tedavi sonrasında Pt (II) kompleksi uygulanmış 50 μM (IC_{90}) konsantrasyonunun PANC-1 hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi ise %0,84 (Q1+Q3)'dür (Şekil 3.6). Bununla birlikte, ölü hücrelerin yüzdesi (mitokondri membranı intakt; hücre membranı intakt değil) 12 ve 24 saat için, sırasıyla, % 79.70 ve % 81,32 (Q2) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.6: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50µM (IC 90) konsantrasyonunun PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)

3.2.4. Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi

DNA hasarının ROS kaynaklı mı yoksa değil mi sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı incelendi. 50 µM IC_{90} konsantrasyonunda tedavi uygulanan PANC-1 hücrelerindeki ROS miktarları, kontrol hücreleri ROS miktarı: % 11,45 ve 12 saat Pt (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin ROS miktarı: % 55,43' dür. 24 saatlik tedavi görmüş hücrelerin ROS miktarı: % 75,13 şeklinde artış göstermiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Pt (II) kompleksiyle tedavi sonrasında 50 µM (IC 90) konsantrasyonunun PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler (–); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tezde PANC-1 insan pankreas kanseri hücre hattında yeni sentezlenen Pt (II) sakkarinat kompleksinin (trans-[Pt(sac)$_2$(PPh_2Cy)$_2$]), antikanser etkinliği araştırılmış sitotoksik/ apoptotik etkilerine bakılmıştır. Çalışmanın başlıca özelliği bu çalışmada kullanılan bileşiğin yeni ve dolayısıyla daha önce üzerinde çalışılmamış olmasıdır. Bu açıdan ele alınacak olursa, bu çalışma Pt (II) bileşiğinin insan pankreas hücre hattında sitotoksik/ apoptotik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri kanserdir ve her yıl milyonlarca insan kanserden yaşamını kaybetmektedir. Güncel olarak kanser tedavisinde, kemoterapide kullanılan 60' dan fazla sitotoksik ilaç bulunmaktadır. Tedavi sürecinde ve sonrasında karşılaşılan en önemli sorun ise kanser hücresinin bu ilaçlara karşı gösterdiği dirençtir. Bu nedenle, kemoterapi rejimlerinde bu direnç mekanizmalarını hedeflemek, araştırmacılar için önem taşımaktadır. Metal bileşikler klinikte anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır. İlaçların başarılı sonuçlar vermesine rağmen yol açtığı ciddi yan etkiler ve hücrelerde gelişen platin direnci araştırmacıları yeni metal bileşiklerin sentezine yöneltmiştir (Reedijk 2003, Alderden ve ark., 2006; Dasari ve ark., 2014). Platin komplekslerin sisplatinden farklı DNA bağlama modlarına sahip olması, birçok kanser türüne karşı etkili bir sitotoksik ajan olduğunu göstermiştir. DNA ve bu bileşikler arasında stabil komplekslerin oluşumu, DNA çoğalmasını ve transkripsiyonunu bloke ederek kanser hücrelerinin ölümünü tetikler. Yeni geliştirilen platin tabanlı kanser ilaçları, etkinliği arttırılmış, daha az toksik ve sağlıklı hücreye zarar vermeyecek şekilde tasarlandı. Fakat bunlardan sadece birkaçı faz çalışmalarında başarılı olup klinikte tedavide yerlerini almıştır (Wilson ve ark., 2013; Harper ve ark., 2015).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü araştırma grubu tarafından, umut vaadeden Pt (II) sakkarinat bileşiği geliştirildi ve bileşiğin bu tez

kapsamında insan pankreas hücresi olan PANC-1 üzerindeki sitotoksik/ apoptotik etkileri araştırıldı. MTT ve SRB canlılık testi sonuçlarına göre, PANC-1 hücrelerinde 24 ve 48 saat Pt (II) sakkarinat kompleksinin uygulanması sonucu 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar görüldü.

V.T. Yılmaz ve ark. (2018) tarafından Pt (II) sakkarinat kompleksinin farklı hücre hatlarında sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada Pt (II) sakkarinat kompleksinin antikanser aktivitesi, insan meme (MCF-7), akciğer (A549), kolon (HCT116) ve prostat (DU145) normal bronşiyal epitel (BEAS-2B) hücrelerine karşı test edilmiştir. Ayrıca D. Karakaş ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada DU145, LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücre dizilerinde Pt (II) kompleksinin ER stres aracılı apoptotik hücre ölümünde ROS üretiminin yukarı yönlü bir rol oynadığını göstermiştir. Çalışmalarda pankreas kanseri hücre hattına yer verilmediği tespit edilerek bu tez çalışmasında insan pankreas kanseri hücre hattı seçildi ve Pt (II) sakkarinat kompleksi ile bu hücre hattı üzerinde çalışıldı. MTT ve SRB canlılık testleri sonuçlarına göre kullanılan Pt (II) sakkarinat kompleksi tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırıldı. İlk olarak bir apoptozis belirteç olan Anneksin-V-FITC boyaması yapılarak, erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Buna neden olan Anneksin-V'nin fosfotidilserine bağlanması membran hasarlanmadan önce nüklear kondensasyon safhasına denk gelmektedir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 1997). Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfotidilserine bağlanarak pozitif sonuç verir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için non-vital boyalar ile birlikte kullanılır (Hammill ve ark. 1999). PANC-1 hücrelerinin Pt(II) sakkarinat kompleksi ile tedavisi sonucunda Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde 7-ADD' de pozitif sonuç verdi (geç apoptotik). Pt(II) sakkarinat kompleksinin uygulanması sonucunda "PANC-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi" kaspaz 3/7 testi ile akım sitometride değerlendirildiğinde; 12 ve 24 saat tedavilerin sonunda hücre canlılık yüzdesinde azalma görülürken, nekrotik hücre oran yüzdesinde artış belirlendi. Annexin-V ve kaspaz 3/7 testi sonuçlarına göre membran asimetrisinin bozulduğu fosfotidilserinlerin membran üzerinde translokasyona uğradığı belirlendi.

Ayrıca kaspaz 3/7 aktivasyonunun olmaması nedeniyle kaspazdan bağımsız apoptoz ölüm modunun aktif olabileceği düşünüldü. Bu çalışmaları takiben hücre soyunda mitokondri membran potansiyelindeki değişimler incelendi. Pt(II) sakkarinat kompleksinin uygulanması sonucunda hücre soyunda 12 ve 24 saatlik tedavide mitokondri membran potansiyelinin intakt (bozulmamış) olduğu hücrelerin öldüğü belirlendi. Çalışmamızda, PANC-1 hücrelerinde görülen DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı mı sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı saptandı. Hücre soyunda Pt(II) sakkarinat kompleksiyle tedavi sonucunda kontrole kıyasla ROS miktarının belirgin derecede arttığı görüldü. Bulgularımız, Pt(II) sakkarinat kompleksinin tedavi sonunda hücre soylarında oluşturduğu yüksek seviyedeki DNA hasarının nedeninin ROS kaynaklı gerçekleştiğini önermektedir.

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, Pt(II) sakkarinat kompleksinin insan pankreas hücre hattı olan PANC-1 hücre hattında apoptotik hücre ölümünün kaspaz bağımsız uyarılmış olabileceği düşünülmektedir. Bir sonraki inceleme basamağı olarak daha geniş kapsamlı analizlarin yapılması gerektiği ve bu bileşiğin kliniğe uyarlanabilmesi için in vivo olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Adams ve Cory . (2001). Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Science , 26,* 61-66.

Adrian, C., & Martin, S. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome. *The mitochondrial apoptosome: Trends Biochem Science 2001; 26:390-7. 15.*

Akşit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *YYÜ vet fak derg, 19*(1), 55-63.
American Cancer Society. (2019). Aralık 10, 2019 tarihinde Pancreatic Cancer Risk

Anonim, 2013. Muse™ Caspase-3/7 Kit El Kitapçığı. Almanya, Erişim tarihi: 30.10.2019. 134

Anonim, 2013. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2019.

Anonim, 2013. Muse™ Mitopotential Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2019.

Anonim, 2013. Muse™ Oxidative stress El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2019

Aşık, A. (2015). Juglonun Panc-1 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. KONYA: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Barisic , K., Petrik , J., & Rumora, L. (2003). Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm, 53,* 151-164.

Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5*(3), 154

Boersma, A. W. M., Nooter, K., Oostrum, R. G., Stoter, G. 1996. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24: 123–130.

Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V (Oct 2010). "Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family". *Human Genomics*. **5** (1): 30–55.

Choudhuri, G., & Singh, D. (2005). Molecular mechanisms of pancreatic cancer. *Trop Gastroenterol, 26*, 111-114.

Coşar, A. M. (2018). Pankreasın Malign Tümörleri. *Turkiye Klinikleri Gastroenterohepatology - Special Topics, 11*(1), 7-12.

Curtin , J., & Cotter, T. (2003). Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal, 15:*, 983-992.

Çelik, S., Şen, S., & Hazman, Ö. (2015, Temmuz). Endoplasmik Retikulum Stresine Cevap Yolakları ve Tip 2 Diyabet Patogenezinde Endoplasmik Retikulum Stres Aracılı Beta HücreApoptosisinin Rolü. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 227-237.

Çetin, Ş., & Dede, İ. (2019). Pankreas Kanserinde Progrostik Faktörler. *26*(1), 30-34.

Dasari, S., Tchounwou, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740: 364-378

De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S (2002). "The interferon system: an overview". *European Journal of Paediatric Neurology*. 6 Suppl A (6): A41–6,

Dumont, M., & Beal, M. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine, 51*(5), 1014-1026.

Dünya Kanser Raporu. (2014). Aralık 12, 2019 tarihinde Artan Küresel Kanser Yükü: https://www.esmo.org/Oncology-News/World-Cancer-Report-2014 adresinden alındı

Dünya Sağlık Örgütü: Dünya 'kanser dalgasıyla' karşı karşıya. (2014, Şubat). Aralık 11, 2019 tarihinde News: https://www.bbc.com/turkce/haberler/2014/02/140204_who_kanser adresinden alındı

Feng , W., Margery , H., & Jörgen , L. (2003). The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Molecular Cancer, 2*(4), 1-5.

Ferrone , C., Levine , D., Tang , L., Allen, P., Jamagin, W., Brennan, M., et al. (2009). BRCA germline mutations in Jewish patients with pancreatic adenocarcinoma. *Journal Clinical Oncology, 27*, 433-438.

Finkel, E. (2001). The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science, 292:*, 624-626.

Göral, V. (2014, Aralık). Pankreas kanseri: Patagonez ve Tanı. *güncel gastroentoloji, 18*(4), 407-414.

Gumbs, A. (2008). Obesity, pancreatitis, and pancreatic cancer. *Obesity Surgery, 18*(9), 1183-1187.

Güleş, Ö., & Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2:*, 73-78.

Gültekin, N., Karaoğlu, K., & Küçükate, E. (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi veyeni potansiyel tedavi stratejileri. *Turk Kardiyol Dern Ars, 36*(2), 120-130.

Hammill, A. K., Uhr, J. W., Scheuermann, R. H. 1999. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Experimental Cell Research*, 251(1): 16-21.

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*(144), 646-674.

Harnack, L., Anderson, K., Zheng, W., Folsom, A., Sellers, T., & Kushi, L. (1997). Division of Epidemiology Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study. *School of Public Healty University of Minnesota, 6*, 1081-1086.

Harper, B., & Aldrich-Wright, J. (2015). The synthesis, characterisation and cytotoxicity of bisintercalating (2, 2′: 6′, 2″-terpyridine) platinum (ii) complexes. *Dalton Transactions, 44*(1), 87-96.

Karaboz, İ., Kayar. , E., & Akar , S. (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 6*(2), 1-18.

Karakas, D., Cevatemre, B., Oral, A., Yılmaz, V., & Ulukaya, E. (2019). Unfolded Protein Response is Involved in Trans-Platinum (II) Complex-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells via ROS Accumulation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 19*, 1184-1195.

Kleeff, J., Whitcomb, D., Shimosegawa, T., & Esposito, I. (2017). Chronic pancreatitis. *Nature Reviews Disease Primers, 3*, 1-18.

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., van Oers, M. H. J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84: 1415–1420

Kuwana, T., & Newmeye, D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology, 15*(6), 691-699.

Lynch, H., Lanspa, S., Fitzgibbons , R., Smyrk, T., Fitzsimmons, M., & McClellan, J. (1989). Familial Pancreatic Cancer(Part 1): Genetic Patology Review. *The Nebraska Medical Journal, 74*, 109-112.

Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of lmmunological Methods, 65:*, 55-63.

Palmer, A., Greengrass , P., & Cavalla, D. (2000). The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives, 13*(6), 378-384.

Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates, 7*(2), 97-110.

Piret , J., Arnould , T., Fuks , B., Chatelain , P., Remacle, J., & Michiels, C. (2004, April 1). Caspase activation precedes PTP opening in TNF-a-induced apoptosis in L929 cells . *Mitochondrion, 3*(5), 261-278.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., & Gabai, V. L. (2003). *Necrosis: a specific form of programmed cell death? Experimental Cell Research, 283(1), 1–16.*

Reaven, G. (2002). Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation, 106*(3), 286-288.

Reedijk, J. 2003. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3611-3616.

Riedl, S., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5*(11), 897-907.

Ross MH, M., & Pawlina, W. (2011). Histology a text and atlas. *6th edition. London: Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins; 2011.p.93-97.*, 93-97.

Sağlıkta Yenilikler. (2019). Aralık 5, 2019 tarihinde Pankreas Kanseri Belirtileri ve Tedavisi: https://sagliktayenilikler.com/pankreas-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi adresinden alındı.

Salvesen, G., & Dixit, V. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci., 96*(20), 10964-10967.

Slee , E., Harte , M., & Kluck , R. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a. *Journal of Cell Biology, 144*(2), 281-292.

Smaili, S., & Hsu , Y. (2000). Mitochondria in Ca+2 signaling and apoptosis. *J. Bioener and Biomem., 32*(1), 35-46. .

Spierings , D., de Vries , E., & Vellenga, E. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAİL and its receptors. *J Histochem Cytochem, 52*(6), 821-831.

Stennicke., H., Ryan, C., & Salvesen, G. (2002). Reprieval from execution:the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Science, 27*(2), 94-101.

Strasser, A., O'Connor , L., & Dixit , V. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem , 69:*, 217-245.

Şahin, F., Taşpınar, M., & Sunguroğlu, A. (2007). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 27*(4), 560-6.

Thombery, N., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science, 281*, 1312-1316.

Tomatır, A. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri , 23*, 499-508.

Ulukaya, E. (2003). Apoptozisin İndüklenmesi. *Apoptozis Ders Notları*.

Ulukaya, E., Arif, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Güney, e., Sakellaridis, N., et al. (2011). Cell death-inducing effect of novel palladium (II) and platinum (II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., GuCell death-inducing effect of novel palladium (II) and platJournal of cancer research and clinical oncology, 137*(10), 1425-1434.

Vousden, K., & Lu , X. (2002). Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer, 2:*, 594-604.

Wang, C., & Youle, R. J. (2009). *The Role of Mitochondria in Apoptosis. Annual Review of Genetics, 43(1), 95–118.*

Warshaw , A., & Del Castillo C. , F. (1992). Pancreatic carcinoma. *New England Journal Medical, 326*(7), 455- 465.

Wilson , J., & Lippard, S. (tarih yok). Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. *Chemical reviews, 114*(8), 4470-4495.

Wrong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.Journal of Experimental & Clinical Cancer Research volume.30:87 1-14

Xin Zhang, C., & J Lippard, S. (2003). New metal complexes as potential therapeutics. Current Opinion in Chemical Biology.

Yadav, D., & Lowenfels, A. (2013). The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenteroloji, 144*(6), 1252-1261.

Yeni Biyoloji. (2018). 2020 tarihinde Apoptoz Nedir?: https://www.yenibiyoloji.com/apoptoz-nedir-4017/?amp adresinden alındı

Yılmaz, V., Icsel, C., Turgut, O., Aygun, M., Erkisa, M., Turkdemir, M., et al. (2018). Synthesis, structures and anticancer potentials of platinum(II) saccharinate complexes of tertiary phosphines with phenyl and cyclohexyl groups targeting mitochondria and DNA. *European Journal of Medicinal Chemistry , 155:*, 609-622.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., & Ellis, H. (1993). The C.elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian. *Cell, 75*(4), 641-52.

Zavoral , M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World Journal Gastroentology, 17*(24), 2897-2908.

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

Zohar , L., Yakir , R., Gilad , T., Lior , K., & Adi , L. (2018). Adolescent Overweight and Obesity and the Risk for Pancreatic Cancer Among Men and Women: A Nationwide Study of 1.79 Million Israeli Adolescents. *Cancer, 125*(1), 118-126.