T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN BXPC3 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE PROLİFERE HÜCRE ÇEKİRDEK ANTİJENİ (PCNA)/ İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ 1 RESEPTÖRÜ (IGF-1R) VE AKT SİNYAL YOLU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Dr.Öğr.Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA

KONYA- 2022

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN BXPC3 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE PROLİFERE HÜCRE ÇEKİRDEK ANTİJENİ (PCNA)/ İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ 1 RESEPTÖRÜ (IGF-1R) VE AKT SİNYAL YOLU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Dr.Öğr.Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA

Bu tez projesi Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Tarafından 21202140 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA- 2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri deneyimleri ile bana yol gösteren, her zaman desteğini içten hissettiğim ve fikirlerine ve deneyimlerine her daim ihtiyaç duyacağım danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA' ya ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU' na,

Çalışmamızın deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bu süreçteki katkılarından dolayı Arş. Gör. Fatma GÖKTÜRK' e,

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Duygu DURSUNOĞLU' na,

3 yıla yakın bir zamandır çalıştığım MG Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarı kurucusu Melih GÜLER' e ve laboratuvar kurucu yöneticisi hocam Prof. Dr. Leyla GÜLER 'e,

Tüm bu süreçte yanımda olan değerli arkadaşlarıma,

Ve beni her daim destekleyen, beni bugünlere getiren canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iii**
ÖZET ..... **v**
SUMMARY ..... **vi**
1.GİRİŞ **1**
1.1. Pankreas 3
1.2. Pankreas Kanseri 4
1.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri 5
1.2.2. Pankreas Kanserine Moleküler Bakış 7
1.2.3. Pankreas Kanserinde Tanı ve Prognoz için Belirteçler 14
1.2.4. Pankreas Kanserinde Tedavi Seçenekleri 17
1.3. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) 19
1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü (IGF-1R) 20
1.5. PI3K/AKT Sinyal Yolağı 22
1.6. Juglon 24
2. GEREÇ ve YÖNTEM **26**
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar 26
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 26
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler 26
2.2. Hücre Kültürü 27
2.2.1. Hücre Hattının Dondurulması 28
2.2.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Çözdürülmesi 28
2.2.3. Hücre Hattının Pasajlanması 29
2.3. Juglon Stok Solüsyonun Hazırlanması 29
2.4. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi Juglon ve Uygulama Dozlarının Belirlenmesi 29
2.5. Gen İfade (mRNA) Analizleri 30
2.5.1. Total RNA izolasyonu 30
2.5.2. cDNA Sentezi 31
2.5.3. qPCR Analizi 31
2.6. İmmunohistokimyasal Analiz 32
2.7. İstatistiksel Analiz 33
3. BULGULAR **34**
3.1. BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücre Hattı 34
3.2. Juglonun Gen İfade Düzeylerine Etkileri 35

3.2.1. Juglonun PIK3R1 gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi.....35
3.2.2. Juglonun PCNA gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi 35
3.2.3. Juglonun IGF-1R gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi 36
3.3. BxPC3 hücrelerinde Juglonun PCNA protein düzeyine etkisinin İmmünohistokimyasal Yöntem ile Değerlendirilmesi 37
4. TARTIŞMA.....39
5. SONUÇ.....45
6. KAYNAKLAR.....47
7. EKLER..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK B: TURNİTİN RAPORU

SİMGELER VE KISALTMALAR

α: Alfa

ADM: Asiner Duktal Metaplazi

β: Beta

CA 19-9: Karbonhidrat Antijen 19-9

ceRNA: Rekabetçi Endojen RNA

CEA: Karsinoembriyonik Antijen

DM: Diabetes mellitus

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DPBS: Dulbacco'nın Fosfat Tamponlu Suyu

EPC: Ekzokrin Pankreatik Kanser

GC: Mide Kanseri

IGF-I: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I

IGF-IR: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü

IPMN: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi

IPMN-BD: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi Yan Kanalı

IPMN-MD: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi Ana Kanalı

KRAS: Kristen Virüsü Ras

LnRNA: Uzun Kodlanmayan RNA

MDSC: Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler

MKN: Müsinöz Kistik Neoplazi

MMP: Matris Metaloproteinazlar

MR: Magnetik Rezonans

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

NF-κB: Nükleer Faktör-Kappa B

PanIN: Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi

PBS: Fosfat Tamponlu Su

PCNA: Prolifere Hücre Nükleer Antijen

PDAC: Pankreatik Duktal Adenokarsinom

PI3K: Fosfoinositid 3-Kinaz

qPCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TAM: Tümörle İlişkili Makrofajlar

TME: Tümör mikroçevresi

TGF-β: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β

Treg: Düzenleyici T Hücreleri

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Juglonun BxPC3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)/ İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü (IGF- 1R) Ve AKT Sinyal Yolu Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Büşra KESKİN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2022

Erken tanı konulamaması, erken dönemde yüksek oranda yayılım göstermesi ve radyoterapi, kemoterapi gibi tedavilere yanıt vermemesi gibi nedenlerden dolayı yüksek oranda ölüm görülen pankreas kanserinin günümüzde etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bundan dolayı pankreas kanserinin tanı ve tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu yıkıcı kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynayan düzensiz sinyal yollarının aydınlatılması, bu yolları hedefleyen tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Son yıllarda doğal ürünlerden antikanser ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Cevizgiller familyasına ait bitkisel bir ürün olan juglon antikanser özellikleri bakımından çalışmalara konu olmuş ve bazı kanser türlerinde antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkileri ortaya konmuştur. Çalışmamızda; BxPC3 pankreas kanseri hücrelerinde juglon uygulamasının, hücre proliferasyon belirteci olan PCNA geni ve kanser hücrelerinde apoptozis, anjiyogenezis ve invazyon süreçlerinde etkili olduğu bilinen IGF1R geni ile IGF1 reseptörünün hedefi olan PI3K/Akt sinyal yolunda iş gören PIK3R1 gen ekspresyonları üzerine etkilerinin moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı. BxPC3 insan pankreas kanser hücre hattı uygun besi yeri ortamında çoğaltılarak daha önceki çalışmalarımızda belirtilen MTT analizi ile uygun IC50 dozu dikkate alınarak 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon ile muamele edildi. 24 saat juglon uygulamasından sonra PIK3R1, PCNA ve IGF-1R genlerinin ekspresyon düzeyi belirlendi. PIK3R1 geninde 5 µM juglon uygulamasında azalma ve diğer dozlarda ise ifade artışı tespit edildi. PCNA geninde 15 µM juglon dozunda artış, diğer dozlarda azalış; IGF-1R geninde ise 5 ve 20 µM juglon dozunda azalış, 10 ve 15 µM juglon uygulamasında artış tespit edildi. Kültüre edilmiş hücrelerde PCNA ekspresyonları ayrıca indirekt immunofluoresans yöntemle de değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarına göre; juglon, tüm uygulama dozlarında direkt proliferasyon belirteci olan PCNA protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladı. Sonuç olarak, juglon pankreas kanserinin tedavi edilmesi ve gelişimini önlemek için umut verici bir ajan olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: AKT sinyal yolu, IGF-1R geni, Pankreas kanseri, PCNA geni

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of the effects of juglone on Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) / Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) and AKT signaling pathway in BxPC3 pancreatic cancer cells

Büşra KESKİN
Department of Medical Biology
MASTER THESIS/KONYA-2022

There is no effective treatment method for pancreatic cancer, which has a high mortality rate due to reasons such as not being diagnosed early, spreading at a high rate in the early period and not responding to treatments such as radiotherapy and chemotherapy. Therefore, it is necessary to develop new strategies in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer. Clarifying the irregular signaling pathways that play a role in the development and progression of this devastating cancer will contribute to the development of treatment strategies targeting these pathways. In recent years, studies on the development of anticancer drugs from natural products have gained importance. Juglone, a herbal product belonging to the walnut family, has been the subject of studies in terms of its anticancer properties and its antiproliferative, cytotoxic and apoptotic effects have been revealed in some types of cancer. In our study , it is aimed to investigate the effects of juglone administration the expressions of the PCNA gene, which is a cell proliferation marker and IGF1R gene, know to be effective in apoptosis, angiogenesis and invasion processes in cancer cells, and also PIK3R1 gene, the key molecule in PI3K/AKT signaling pathway, in BxPC3 pancreatic cancer cells by molecular methods. The BxPC3 human pancreatic cancer cell line was reproduced in a suitable fattening environment and treated with juglon at concentrations of 5, 10, 15 and 20 µM, taking into account the appropriate IC50 dose by MTT analysis indicated in our previous studies. Expression level of PIK3R1, PCNA and IGF-1R genes were determined after 24 hours of juglone application. In the PIK3R1 gene, a decrease in 5 µM juglone application and an increase in expression at other doses were detected. Increase at 15 µM juglone dose in PCNA gene, decrease at other doses; A decrease in 5 and 20 µM juglone doses and an increase in 10 and 15 µM juglone doses were detected in the IGF-1R gene. PCNA expressions in cultured cells were also evaluated by indirect immunofluorescence method. According to the results of immunohistochemical evaluation; juglone significantly suppressed PCNA protein expression, a direct proliferation marker, at all administration doses. In conclusion, juglone is emerging as a promising agent for the treatment and prevention of pancreatic cancer.

Keywords: AKT signalling pathway, IGF-1R gene, Pancreatic cancer, PCNA gene

1.GİRİŞ

Kanser, dünya çapında her yıl sayısız ölümler ile birçok insanın hayatında yıkıcı sonuçlara sebebiyet veren zorlu hastalıklardan biridir. Hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan genetik ve dış faktörlere bağlı olarak meydana gelen kompleks bir hastalıktır. Hücrelerin çoğalması ve kontrol edilmesi genlerin himayesi altında olduğu için kanser temelde genlerle sıkı bir bağlantı içerisinde yer alır (Baykara 2016).

Pankreas kanseri (PK) solid tümörler arasında en kötü prognoza sahip olmasıyla gastrointestinal sistemin en ölümcül malignitelerinden birini oluşturur (Mortazavi ve ark 2022). Düşük sağkalım oranı ile hastalık insidansı ve mortalite arasında yakın paralellik içerisindedir (Kamisawa ve ark 2016). Gelişmiş ülkeler içinde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada kendisine yer bulan pankreas kanserinin 2030 yılına kadar bu sıralamada daha yükseklere çıkacağı öngörülmektedir.

Bulunduğu konum itibari ile retroperitonel yerleşime sahip bir organ olan pankreas, tümörlerin saptanması ve patolojilerinin tedavi edilmesi bakımından oldukça sıkıntılı bir yerde karşımıza çıkmaktadır. Asemptomatik bir şekilde ilerleme göstermesi ve bulantı, şişkinlik, kilo kaybı vb. gibi genel belirtiler göstermesi ile hastalık ancak ileri bir aşamaya gelene kadar tespit edilememektedir. Erken tanıdaki bu zorluklar mevcut tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Cerrahi müdahale dışında kalan mevcut tedavi yöntemleri hasta sağkalım oranlarını iyileştirmede yeterli etkiye sahip değildir ve büyük ölçüde yetersiz kalmaktadır (Liu ve ark 2022).

Neoadjuvan kemoterapi ve/veya radyoterapi ile tedaviye devam edilse de büyük ölçüde istenilen sonuç elde edilememektedir. İyileştirmeye karşı oldukça dirençli bir kanser olarak karşımıza çıkan Pancreatic duktal adenokarsinom'un (PDAC), tedavisinde kullanılan güncel yöntemlerin sınırlı olması ve etki düzeylerinin yetersiz olması yeni alternatif tedavi stratejilerine ve ajanlara olan ihtiyacı arttırmaktadır (Hwang ve ark 2022).

Kanserde hücre çoğalması ve büyümesinde; spesifik moleküler değişikliklerin ortaya çıkması ile hastalıkta biyobelirteç olarak hedefli tedavi seçeneklerini sunmaktadır (Mortazavi ve ark 2022). Pankreas kanserinde yer alan moleküler yolları anlamak hastalığa giden süreçte sebep ve tedavi seçenekleri oluşturmak açısından

oldukça önem taşımaktadır. Çünkü kansere giden yolda büyüme faktörlerinin otonom üretimi, büyüme karşıtı sinyallere yanıt eksikliği, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon yeteneği, sürekli anjiyogenez ve doku invazyonu/metastazı gibi birçok olay yer almaktadır (Moniri ve ark 2014).

Yapılan çalışmalar PI3K-Akt sinyal yolunun tümör oluşumunu etkileyen kritik anahtar süreçlerde yer aldığını, hücre büyümesi, hayatta kalması ve çoğalmasındaki rolü ile, PI3K-Akt sinyal yolunun tümör hücrelerinde neden sıklıkla değiştiği konusuna açıklık getirmektedir (Luo ve ark 2003). Özellikle, PI3K/Akt yolunun aşırı aktivasyonu, PK'nin gelişimi ve ilerlemesinde yaygın bir olay olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu durum PI3K/Akt yolunun PK karsinogenezindeki kritik rolünü önemini vurgulamaktadır (Wang ve ark 2022). PI3K-Akt yolunun bileşenleri, kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için umut verici yeni hedefler olarak ortaya çıkmıştır ve bu yolun birinci nesil inhibitörlerinin, hem in vitro hem de in vivo olarak tümör hücresi büyümesini azaltmada etkili olduğu araştırmalarla ortaya konulmuştur (Luo ve ark 2003).

Hücre proliferasyonu, normal hücrelerde çoklu kontrol seviyeleri ile yüksek oranda düzenlenmiş bir süreçtir ve düzensiz proliferasyon, insan kanserleri dahil olmak üzere transforme edilmiş hücrelerin en önemli biyolojik özelliklerindendir (Tsuboi ve ark 2004). Hücrelerin uygun koşullar altında hızlı bir şekilde hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalması sürecinde yer alan PCNA , immünohistokimya ile hücre proliferasyonunu değerlendirmek için evrensel olarak tercih edilmekte ve hücre proliferasyonunun hızlı ve güvenilir bir sonucunu elde etmede kullanılmaktadır (Madhumati ve ark 2012). DNA ve hücre döngüsü düzenlemesinin ana düzenleyicisi olarak kabul edilen PCNA, birçok tümör tipinde yukarı regüle edilmesi ve aşırı ekspresyonu ile kanserle sıkı bir ilişki içerisindedir (Cai ve ark 2022).

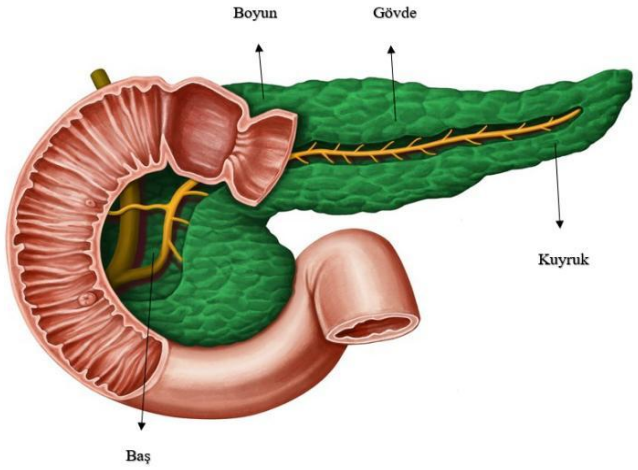
Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, doğal ürünlerin insan kanserlerinden korunmada oldukça faydalı özelliklere sahip olduğunu ve bitkisel ürünlerin apoptozu indükleme ve karsinogenezi önleme gibi farklı mekanizmalarla kanser hücrelerini etkileyebildiklerini ortaya koymaktadır (Avcı ve ark 2016). Doğal bir naftokinon olan juglon ve türevleri hemostatik, antibakteriyel, antiviral ve prooksidasyon etkilerine sahip bir bileşiktir. Kanser hücresi proliferasyonunun önlenmesi, kanser hücresi apoptozunun indüklenmesi, otofajinin indüklenmesi, anti-anjiyogenezin ve

kanser hücresi göçü ve invazyonunun inhibisyonu gibi önemli etkileri bulunmaktadır (Tang ve ark 2022).

Sunulan tez çalışmasında, kanser tedavisi için alternatif teröpatik ajanların arasında öne çıkan bitkisel bileşiklerden olan juglonun, BxPC3 pankreas kanseri hücre hattında hücre proliferasyonu belirteci olan PCNA proteini, IGF1R geni ve kanser hücrelerinde apoptozis, anjiyogenezis ve invazyon süreçlerinde etkili olduğu bilinen PI3K/ AKT sinyal yolunda iş gören PIK3R1 gen ekspresyonları üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

1.1. Pankreas

Pankreas, midenin arkasında, omurganın bel bölümünde, karın arka duvarında bulunan 15-20 cm uzunluğunda ve 75-100 gr ağırlığında olan bir karın bezi organıdır. Baş, boyun, gövde ve kuyruktan oluşan dört kısımdan meydana gelir (şekil 1.1) (Demirtürk ve Bilensoy 2022). Sindirim sistemine enzim salgılayan pankreas, ekzokrin hücreler ve kan dolaşımına hormon salgılayan endokrin hücreler olmak üzere iki farklı hücre popülasyonunu içeren, vücuda çok iyi saklanmış önemli işlevlere sahip bir organdır (Slack 1995).



Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı (BSc 2022).

İki bölümden oluşan pankreasın, ekzokrin pankreas kısmında bulunan asinar hücreleri ve bağırsağa aktarımın sağlandığı kanal sistemleri, sadece salgılamayı değil aynı zamanda bezin hücresel bütünlüğünü de değiştirip düzenleyerek bir dizi nöronal ve hormonal sinyal yolu tarafından kontrol edilir (Chandra ve Liddle 2011, ÖZENOĞLU ve ERDAĞ 2022). Proteinleri sindirmek için tripsin veya kimotripsin;

karbonhidratları sindirmek için amilaz ve yağları sindirmek için lipaz enzimlerini üreterek ekzokrin görevini gerçekleştiren pankreas sindirim için büyük bir ihtiyaçtır. Alınan gıdaların insan için yakıt olarak tüketilmesinde hayati bir rol üstlenir (Demirtürk ve Bilensoy 2022). Langerhans adacıklarını içeren endokrin pankreas ise içerdikleri alfa, beta ve delta hücreleri ile insülin, glukagon, somatostain salgılar, kan glukoz düzeyini düzenler (ERMAYA ve DEMİR 2019). Kan şekerini düşürmeyi sağlayan insülin ve kan şekerini yükseltmeye yardımcı olan glukagon pankreasın en önemli hormonlarıdır (Demirtürk ve Bilensoy 2022).

1.2. Pankreas Kanseri

Dünya nüfusunun yaşlanması ve büyümesi ile özellikle ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde kansere neden olan davranışların artması kanser yükünü oldukça artırmaktadır (Jemal ve ark 2011). Pankreas kanseri dünyada kansere bağlı ölümlerin yedincisi olarak sıralanmaktadır ve Amerika Birleşik Devletleri'nde şu an ölümlerin dördüncü, 2030 yılında ise öngörülen ikinci ölüm nedenidir (Mortazavi ve ark 2022). Gastrointestinal kanserler arasında tüm insan malign neoplazmlarının en kötü prognozlarından birine sahip olan pankreas kanseri için hastalığın tanısının konulması ardından ortalama ömür en fazla 5± 6 aydır (Friess ve ark 1999). Hastaların yaklaşık %15-20'si rezektabl hastalığa sahiptir, ancak bunların sadece %20'si 5 yıla kadar hayatta kalır. Lokal ileri, rezeke edilemeyen ve metastatik hastalık için tedavi FOLFIRINOX adlı kemoterapi rejiminin uygulanması ve hastanın tedaviye yanıt vermesi durumuna göre immunoterapi ya da gemsitabin destekli kemoterapi ile devam edilmesidir (Vincent ve ark 2011).

Pankreas kanseri hastalarında kanserin çoğunlukla KRAS (Kirsten rat sarcoma viral onkogen homolog) mutasyonları ve tümör baskılayıcı Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (CDKN2A), SMAD4 ve p53 tümör proteinindeki inaktive edici mutasyonların neden olduğu tespit edilmiştir (Demirtürk ve Bilensoy 2022). Tümör mikroçevresi (TME) durağan değildir ve pankreas kanserinde preneoplastik pankreas intraepitelyal neoplazisi (PanIN) lezyonlarından invaziv pankreas adenokarsinomuna kadar sürekli olarak yol almaktadır. Pankreas tümörleri, bol fibrotik stromal reaksiyonlu desmoplazi ile ayırt edilmektedir (Demirtürk ve Bilensoy 2022).

Pankreas kanseri teşhisi konulan hastaların hemen hemen tümünde metastaz gelişir ve süreç ölümle sonuçlanır (Li ve ark 2004).

1.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Semptom vermeden ileri seviyeye kadar sessiz seyretmesi ile kötü bir prognoza sahip olan pankreas kanseri, erken seviyede tespit edilememektedir. Parkin ve arkadaşları 1999 yılında kanser verilerini karşılaştırarak, dünya genelinde 23 bölgeden insidans ve mortalite için elde ettiği verilerde pankreas kanserinin 168.000 hesaplanmış ölüm ve her iki cinsiyette 13. ölüm nedeni ile kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedeni olarak dokuzuncu sırada yer aldığı sonucuna ulaşmışlardır. Hastalığın yüksek ölüm sonuçları nedeniyle insidans ve mortalite oranı her zaman aynı kalmış ve hesaplanan PK insidansı ve mortalite oranları gelişmiş ülkelerde daha yüksek çıkmıştır. Ancak, erkeklerde kadınlara göre daha yaygın olarak fark edilmiş ve coğrafi olarak ve cinsiyete göre farklı veriler elde edilmiştir. Yüksek ölüm oranı, hastalığın daha ileri aşamalarında teşhis edilmesinden kaynaklanmaktadır. Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER) verilerinden ortaya çıktığı gibi, hastaların sadece %10'u erken lokalize evrelerde teşhis edilirken, %52'sine hastalığın vücudun diğer organlarına metastaz yapmasıyla sadece evre 4'te tanı konulabilmektedir. Bu nedenle, dünya çapında veri kalitesi nedeniyle oran değişse de, yeni teknolojilere rağmen PK için sadece 5 yıllık bir hayatta kalma oranı söz konusudur. Artan yaş, farklı durumlarda görülen risk faktörleri ve bazı biyolojik etkenlere marus kalmaktan kaynaklanan DNA hasarının artması sebebiyle yaşlı popülasyonununda, 55-59 yaş arası hastalarda PK oranı 100.000'de 10.4, 65-69 yaş arasında ise 24.0 olarak ortaya çıkmaktadır. Pankreas kanserinin oluşumu her ırkın genetik yapısındaki farklılıklar nedeniyle ırklar arası farklılıklar göstermekte ve PC'de kaydedilen düşük sağkalım oranı, ileri evre tanıya ek olarak yüksek serum albümin seviyeleri, tedavi modaliteleri, sağlık sistemi farklılıkları ve tümörün boyutundan kaynaklanmaktadır. İnsidans oranındaki artış her zaman risk faktörlerindeki artışla orantılıdır ve risk faktörlerini tespit etmek hiç de kolay olmamaktadır (Dariya ve ark 2019).

Pankreas kanseri ileri evrelerde tespit edilebilmesi nedeniyle agresif seyirli ölümcül bir karakterdedir ve yapılan etiyolojik çalışmalar birçok risk faktörünün etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Sigara, alkol, diyabet, obezite ve kronik pankreatit gibi bazı çevresel faktörler pankreas kanseri için yüksek risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (Feng ve ark 2019).

Sigara, üst solunum-sindirim sisteminden kan dolaşımı yoluyla pankreasa giden tütünden kanserojen üretimine neden olur ve tüketilen tütün de doğrudan pankreas kanallarına geri akıtılarak on iki parmak bağırsağından salınır (Dariya ve ark 2019). Sigara tüketenlerde pankreas kanseri görülme riski, kullanmayanlara göre 2,5 ila 3,6 kat daha fazla risk oluşturmakta, daha fazla tütün kullanımı ve daha uzun süre dumana maruz kalma ile de bu duruma katkıda bulunmaktadır (Hidalgo 2010).

Sigara, Kras ve p53 genlerini mutasyona uğratır ve kronik enflamasyonu indükler, bu da sitokin indüksiyonunu ve büyüme faktörlerinin aktivasyonunu destekleyen mekanizmada patolojik farklılıklara sebebiyet verir (Dariya ve ark 2019). Genetik analizler, sigara içenlerden alınan kanserli pankreas doku örneklerinde sigara içmeyenlerden alınan örneklere kıyasla daha fazla mutasyon bulundurduğu gösterilerek, sigara kullanımı pankreas kanserinde "parmak izi" olarak ifade edilmiştir (Wolfgang ve ark 2013).

Yaş, diğer birçok neoplazm için olduğu gibi pankreas kanseri için de en güçlü risk faktörlerinden birini oluşturmaktadır (Huxley ve ark 2005). Artan yaş ile pankreas kanseri riski de yükselmektedir. %80'den fazlası 60-80 yaşları arasında gelişmekte ve 40 yaştan önce nadir olarak görülebilmektedir. Pankreas adenokarsinomu hastalarının yarısından fazlası 70 yaşın üzerindekilerde semptom vermektedir (Ilic ve Ilic 2016). Pankreas kanserinin erken yaşta kendini göstermesi durumunda dikkatli bir aile öyküsü almak pankreas kanseri için yüksek risk altındaki akrabalar açısından erken yaşta hastalığın gelişimini takip etmek açısından oldukça önem arz etmektedir (Huxley ve ark 2005).

Tip II diyabetinde pankreas kanseri ile ilişkili olduğu düşünülür, ancak pankreas kanserinin nedeni ile mi yoksa sonuç kısmında mı konuya dahil olduğu belirsizliğini sürdürdüğünden bu kısımla ilgili nispeten daha az şey bilinmektedir. Tip II diyabet sıklıkla pankreas kanseri ile birlikte ortaya çıkmasından ötürü , birçok kişi tarafından kötü huylu tümör için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir (Huxley ve ark 2005). Ayrıca yeni başlayan diyabet pankreas kanserinin ilk belirtisi olabilir ve bu durum yeni başlangıçlı diyabetin bazı kişilerde pankreas kanserinin erken teşhisinde bir yol gösterici olabileceği fikrini bize sunabilir. Bu nedenle, uzun süredir devam eden diyabet pankreas kanseri için bir risk faktörü oluşturmaktadır (Wolfgang ve ark 2013). Ailesinde diyabet öyküsü olmayan, önceden sağlıklı, obez

olmayan orta yaşlı veya yaşlı bir kişide ani diyabet başlangıcı, kişinin pankreas kanseri olduğunun ilk ipucu olarak bize yardımcı olabilir (Huxley ve ark 2005).

Alkol tüketimi, kronik inflamasyonu ve genetik dengesizliğe sebep veren metabolizma sonucu ortaya çıkan ara ürünlerin ortaya çıkmasına zemin hazırlayarak pankreas kanseri için risk oluşturur (Dariya ve ark 2019).

Pankreas kanserinin epidemiyolojik verilerine bakıldığı zaman, kırmızı et içeren besin gıdalarının ve yüksek kalorili gıda alımının obeziteye sebep verdiği ve bu kanser için daha yüksek risklere davetiye çıkardığı araştırmalar sonucu verilerle elde edilmiştir (Dariya ve ark 2019). Artan vücut kitle indeksi ile artan bir risk olasılığı ile obez kişilerde fazla miktarda görülen pankreas kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer birçok batılı ülkede, hızla önemli bir sağlık sorunu haline gelmekte bu durum yüksek ihtimalle daha fazla pankreas kanseri ile karşılaşılacağını düşündürmektedir (Lowenfels ve Maisonneuve 2002).

Yapılan birçok araştırma kronik pankreatit ve pankreas kanseri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir (Raimondi ve ark 2010). Kronik pankreatitin kalıtsal olmayan formları pankreas kanseri geliştirme olaslığına sahiptir ve tütün, alkol tüketimi kronik pankreatitte tümör gelişimine katkıda bulunabilmektedir (ÇETİN ve İsa 2019). Kronik pankreatitin etkisiyle uyarılan çok sayıda inflamatuar aracılar, genomik hasara, değiştirilmiş gen ifadesine ve pankreatik intraepitelyal neoplazilerin (PanIN'ler) gelişmesine ve daha fazla büyümeye ve ilerlemeye sebep olan onkojenik sinyal yollarının indüklenmesine neden olmaktadır (Momi ve ark 2012).

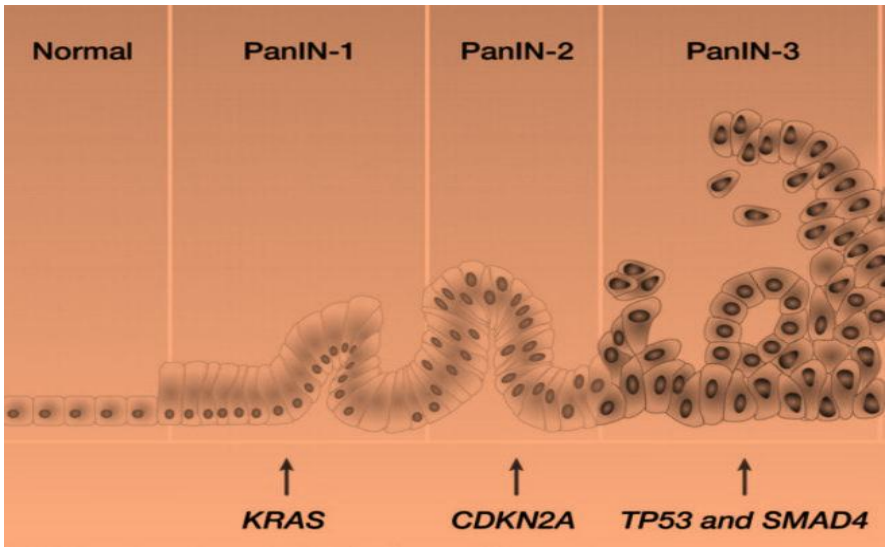
1.2.2. Pankreas Kanserine Moleküler Bakış

Pankreas kanseri, hücre döngüsünün kontrolsüz şekilde hareket etmesi ve ardından onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu ve deaktivasyonu ile ilerleyen kötü prognoza sahip bir malignitedir. Bu malign hücre kitlesi, endotelyal hücreler, immün hücreler ve genetik değişiklikler tarafından yönlendirilen stromal ve hematopoietik hücreleri içeren heterojen bir tümör karmasını içerir (Dariya ve ark 2019). Pankreas kanserinde bu malignitelerinin de çoğunluğu ekzokrindir ve üç temel tipi vardır. Bunlardan; Duktal adenokarsinom (PDAC) pankreas kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturur; nöroendokrin tümörler, nadir olarak görülür ve kistik

neoplazma ise pankreatik kanserlerin %1'inden azını oluşturur (Saif 2011, Amrutkar ve Gladhaug 2017)(Tablo 1.1).

PK'nin tümör mikroçevresi; hücre dışı matris ve stromal hücrelerden (pankreas yıldız hücreleri (psc'ler), düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'LER) ve miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerden (MDSC'LER) den meydana gelir (Martinez-Useros ve ark 2021).

Pankreas kanserinde en fazla görülen tür olan pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), asiner duktal metaplazi (ADM) ve pankreas intraepitelyal neoplazisi (PanIN), intraductal papiller müsinöz neoplazi (IPMN), müsinöz kistik neoplazi ve atipik yassı lezyonlar gibi neoplastik öncü lezyonlar yoluyla ilerler (Eser ve ark 2014). Pan1N, premalign pankreas intraepitelyal neoplazisi olarak PanIN-1, PanIN-2 ve PanIN-3 olarak üç gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.2). PanIN-1 lezyonları, hücresel atipisi olmayan düz (PanIN-1A) veya papiller (PanIN-1B) müsinöz epitele sahip, PanIN-2 lezyonları artan hücresel atipi belirtileri ve prevalans veya papiller mimari özelliktedir ve PanIN-3 lezyonları in situ karsinoma karşılık gelmektedir. SMAD4 kaybı sadece neoplastik progresyonda (PanIN-3) biyolojik olarak geç ortaya çıkmakta ayrıca İnsan IPMN'sinde, SMAD4'ün etkisizleştirilmesi nadir olarak görülmektedir (Xia ve ark 2015).



Şekil 1.2. Normal bir hücreden metastatik pankreas kanserine ilerlemenin modeli (Iacobuzio-Donahue ve ark 2012).

Tablo 1.1. Pankreas tümörlerinin ana tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri (Pelosi ve ark 2017).

Tümör Tipi	Yaygınlık (Pankreas Tümörlerinin %'si)	Hücre farklılaşması	Histopatoloji	İmmünohistokimyasal Belirteçler	Somatik Mutasyonların/Tümörün Ortalaması	Tekrarlayan Genetik Değişiklikler
Pankreas Duktal Adenokarsinomi (PDAC)	%90	Duktal	Duktal ve glandüler yapılar.Bol miktarda desmoplastik stroma varlığı. Kan damarları, lenfatik ve perinöral tümör invazyonu. Genişlemiş pleomorfik çekirdekli ve eozinofilik sitoplazmalı hücresel elementlerin varlığı.	SMAD4 kaybı Anormal TP53 ifadesi MUC1, MUC3, MUC4 ve MUC5AC dahil olmak üzere çeşitli müsinlerin ifadesi.	20-80	KRAS SMAD4 TP53 CDKN2A KDM6A MLL3, TGFBR2, ATM, ARID1A, ROBO1, ROBO2
Pankreas Nöroendokrin Tümörleri (PanNET) Pankreas Nöroendokrin Kanseri (PanNEC) Ailesel Sporadik	%5	Nöroendokrin	PanNET, hücre yuvalarının veya kordonların varlığıyla karakterize edilir; temel bir özellik noktalı bir kromatine (“tuz ve biber” çekirdeği) sahip homojen bir hücre popülasyonu olarak temsil edilir.	Nöroendokrin belirteçlerin ifadesi: sinaptofizin ve kromogranin, peptid hormonları, örneğin insülin ve glukagon. PanNEC'ler için: TP53'ün anormal nükleer ifadesi.	16	Düzensiz PanNET: MEN1, ATRX veya DAXX, VHL ve PHLDA3 silme. ATRX veya DAXX kaybı ,telomerlerin alternatif olarak uzatılmasıyla ilişkilidir . Ailesel PanNET: MEN1. PanNEC'ler: KRAS, TP53 ve RB1.

Tablo 1.1 (Devam). Pankreas tümörlerinin ana tiplerinin histolojik ve moleküler özellikleri (Pelosi ve ark 2017).

Tümör Tipi	Yaygınlık (Pankreas Tümörlerinin %'si)	Hücre farklılaşması	Histopatoloji	İmmünohistokimyasal Belirteçler	Somatik Mutasyonların /Tümörün Ortalaması	Tekrarlayan Genetik Değişiklikler
Pankreas Asiner Hücreli Karsinom (PACC)	%1	Asiner	Asiner birimlerin varlığı. Belirgin nükleoli ve ince granüler sitoplazma ile genişlemiş çekirdeklere sahip hücresel elementler.	Pankreas ekzokrin enzimleri: tripsin, kimotripsin, lipaz. Asiner hücrelerde bulunan CEL proteini ile homoloji nedeniyle anti-BCL10 mAb ile immünreaktivite. PDX1'in ifadesi.	20-149	SMAD4, TP53, APC, BRAF, BRCA2, RB1, ARID1A, GNAS, MLL3, PTEN
Solid-Psödopapiller Neoplazm	%1-2	Asiner	Katı veya psödopapiller yapılar oluşturan, zayıf bir şekilde birleşen hücrelerin tekdüze popülasyonu. Yuvarlak çekirdekli, eozinofilik veya berrak sitoplazmalı hücreler.	β-katenin'in nükleer etiketlemesi. CD10'un ifadesi. CD99 ve LEF-1'in (lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü-1) paranükleer etiketlemesi. Membranöz E-kadherin kaybı	3	CTNBB1 ekson 3 mutasyonu (vakaların %90'ı)
pankreatoblastom	<%1 (yetişkin) %25 (pediatrik)	Asiner	Asiner farklılaşma notları. Tipik squamoid yuvalar. Nöroendokrin ve duktal elementlerin varlığı.	Pankreas ekzokrin enzimleri. β-katenin'in nükleer etiketlemesi. SMAD4 kaybı	10	CTNNB1 Kromozom 11p kaybı

Pankreas adenokarsinomunun en yaygın öncüsü olan PanIN'ın etrafında bulunan pankreas adenokarsinomuna benzer kalıtsal anormalliklerin görüldüğü PanIN'in histolojik ilerlemesinin moleküler anormalliklerin birikimine paralel gittiğini gösteren çalışmalar vardır. Düşük dereceli PanIN lezyonları, KRAS onkogeninde mutasyonlara sahiptir ve telomer kısalması sergiler, bu da bunların

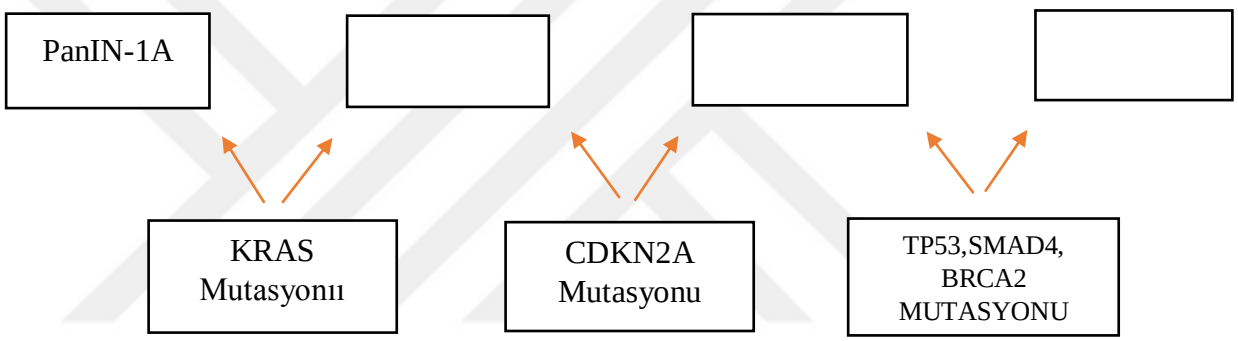
invaziv maligniteye giden yolda erken değişiklikler olduğunu gösterir. p16, CDNK27, p53 ve SMAD4'teki mutasyonlar ise daha sonra ortaya çıkar ve daha yüksek dereceli PanIN ve pankreas adenokarsinomunda bulunur (Şekil 1.3). PanIN derecesine göre KRAS mutasyon oranı da artar (McGuigan ve ark 2018).

Pankreas kanseri onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde somatik mutasyonların birikmesi sonucu meydana gelen genetik bir olaydır (Kamisawa ve ark 2016). İlerleme tümör hücresinin genomunda bulunan, KRAS, CDKN2A(p16), TP53 ve SMAD4 olmak üzere dört ana genin sıklıkla mutasyona uğraması sonucu oluşmaktadır. En sık mutasyona uğrayan onkogen olarak karşımıza çıkan KRAS tümörlerin %90'ından fazlasında görülmektedir (Wood ve Hruban 2012) (Tablo 1.2). KRAS, Guanozin trifosfata (GTP) bağlandıklarında çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve hücre göçü gibi hücre aktivitelerini düzenleyen sinyal molekülleri ile etkileşime girer (Di Magliano ve Logsdon 2013). Mutasyona uğrayan KRAS, GTPaz aktivitesinin bozulmasıyla sürekli proliferasyona, metabolik yeniden programlamaya, anti-apoptoza, tümör mikroçevresinin yeniden şekillenmesine, immün yanıtın kaçırılmasına, hücre göçüne ve metastaza yol açarak kanser oluşumuna sebebiyet verir (Eser ve ark 2014). Hücre döngüsü düzenlemesinde önemli görevleri olan P16/CDKN2A, pankreas kanserinde protein fonksiyonu kaybıyla en sık inaktive edilmiş tümör baskılayıcı gendir (Wood ve Hruban 2012). Kromozom 9'un (9p) kısa kolundaki *p16/CDKN2A* geni , homozigot delesyonlar (%40), ikinci alel kaybıyla birlikte intragenik mutasyonlar (%40) ve promotör metilasyonu ile epigenetik susturma dahil olmak üzere birkaç farklı mekanizma ile etkisiz hale gelmektedir (Maitra ve Hruban 2008). Bakıldığı zaman neredeyse tüm pankreas kanserlerinde p16/ CDKN2A geninin genetik inaktivasyonu, hücre döngüsünde döngünün durması ve DNA hasarlarının tamir edilmesine olanak sağlamaktadır (Maitra ve ark 2006).

Tablo 1.2. Pankreas Karsinomunun Ortak Genetik Profili (Moniri ve ark 2014).

Gen	Anomalilik Sıklığı (%)
Onkogenler	
KRAS	95
LSM1	87
AKT	10-20
Tümör Baskılayıcı Genler	
P16/CDKNA2	>90
P53	50-75
DPC4/SMAD4	55

Bir diğer tümör baskılayıcı gen olan TP53, çoğunlukla DNA'ya bağlanma yeteneğini kaybetmesi dolayısıyla gen transkripsiyon aktivasyonuna neden olmaktadır (Cicenas ve ark 2017). p53, hücre döngüsünü önemli bir düzenleyici proteinidir ve hücrelerdeki DNA hasarı, p53 proteininin seviyelerinin artmasına ve WAF-1 / p21 gibi p53'e bağımlı proteinlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu p53 kaynaklı kaskad, G1-S kontrol noktasında hücre döngüsünün durdurur ve hücreyi apoptoza teşvik eder, p53'ün işlevini kaybetmesi kontrol noktasındaki hücre döngüsünün işlevini bozar ve anormal hücre proliferasyonuna yol açar (Hwang ve ark 1998).



Şekil 1.3. Pankreas adenokarsinomunun gelişimindeki etkin mutasyonlar. Pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) derecelendirmesi (Cicenas ve ark 2017).

Düşük dereceli PanIN'lerde genellikle telomer kısalması ve KRAS mutasyonları oluşurken P16 / CDKN2a'nın etkisizleştirilmesi daha sonradır ve TP53, SMAD4 ve BRCA2'deki değişiklikler yüksek dereceli PanIN'de ortaya çıkmaktadır (Kenner ve ark 2021)

Collisson ve arkadaşlar (2011), Moffitt ve arkadaşları (2015) ve Bailey ve arkadaşları (2016), pankreas kanserinin moleküler çalışmalarını yapmış ve farklı alt tiplerine özgü özel tedavi ve ilaç hedefleri ortaya çıkaran çalışmalarda bulunmuşlardır (Martinez-Useros ve ark 2021).

1.2.3.Pankreas Kanserinde Tanı ve Prognoz için Belirteçler

Hastalığın erken evrelerinde belirti göstermeyen pankreas kanseri asemptomatik özelliği ile oldukça düşük sağkalım oranlarına sahip bir kanser türüdür. Kötü bir prognoza sahip olması ve gecikilmiş tanıdan kaynaklanan bu durum alternatif yolların keşfini gerektirmektedir. Çünkü kanserin sadece erken evrede (<2 cm çapında) ve hala pankreas ile sınırlı iken saptanabilmesi hastanın sağkalım oranını %75'e kadar artırabilmektedir. Fakat şu an mevcut tanı ve görüntüleme teknikleri, endoskopi ultrasonografi ve biyopsi, çapı 2 cm'den küçük olan tümörleri saptamada başarılı veriler sunamamaktadır (Daulton ve ark 2021). Aile öyküsünde güçlü pankreas kanseri bulunan vakalarda genellikle EUS veya MRI/MRCP pankreas görüntüleme yöntemlerine başvurularak taramalar yapılabilmektedir. Küçük pankreas kistlerini belirlemede oldukça iyi olan EUS ve MRI/MRCP görüntüleme testleri PanIN'ler in çok küçük olmasından ötürü onları tanımlayamamaktadır (Kanda ve ark 2013).

Hastada kilo kaybı, karın ağrısı, bulantı ve kusma, şişkinlik, hazımsızlık, yeni başlayan diyabet, bağırsak alışkanlığındaki değişiklikler, kaşıntı uyuşukluk, sırt ağrısı, omuz ağrısı ve sarılık semptomları ile bağlantılı süreçlerin gerçekleştiği yapılan tetkiklerde görülmüştür (Kamisawa ve ark 2016). Bu semptomların pankreas kanseri hastaları arasında farklılık gösterdiği kabul görse de, bazı belirtilerin erken teşhis için önemli belirteçler olarak karşımıza çıktığı bilinmektedir (Keane ve ark 2014).

Sıvı biyopsi, kanser hücrelerini tekrar tekrar ve uzunlamasına çapraz incelemeye minimal invaziv ve daha sürdürülebilir bir alternatif yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser hastalarında sıvı biyopsi, özellikle tümör biyopsisinin klinik olarak zor olduğu durumlarda, dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC'LER), tümör DNA'sının (ctDNA) ve ayrıca eksozomlar gibi ek tümör kaynaklı cisimlerin izolasyonu için gerekmektedir (Einoch Amor ve ark 2022). Pankreas kanserinde teşhis ve tedaviye yönelik taramalarda kan, tükürük ve pankreas suyu biyopsileri yapılabilmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan tek belirteç olma özelliğine sahip serum kanseri antijeni 19-9 (CA 19-9), tümörle ilişkili bir protein olan MUC1'den izole edilen bir Lewis antijeni olma özelliğine sahiptir (McGuigan ve ark 2018, Dariya ve ark 2019). Pankreas ve safra yolu tümörleri için

nispeten yüksek bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olan karbonhidrat antijeni 19-9 (CA 19-9), hastanın kilo kaybı, karın ağrısı ve sarılık gibi semptomları olduğunda veya görüntüleme çalışmaları bir tümör varlığını kanıtladığında tanısal bilgi vermekte yardımcı olabilmekteyken hastalıkla ilgili tam bir belirti gösteremediği zamanlar klinik değerlendirmede tek başına tanı koymada yetersiz kalmaktadır (Kim ve ark 2020). İyi huylu tümörlerde ve neoplastik olmayan durumlarda CA 19-9 seviyeleri yükselebilmekte ve ayrıca popülasyonun % 5 ila % 10'u Lewis kan grubu antijenini kodlayan genleri taşımamaktadır (Kenner ve ark 2021).

Yapılan bir araştırma sonucu, CA19-9 ve bilirubin oranının, PDAC'yi dCCA'dan ve iyi huylu hastalıklardan başarılı bir şekilde ayırt etmeye yetebileceğini ve bu sayede hastalığın tanısında yararlı adımlar atabilmeyi sağlayan bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Boyd ve ark 2022).

İnvaziv olmayan başka bir tanı yaklaşımı olarak biyolojik atıklardan kaynaklanan uçucu organik bileşiklerin (VOC'ler) biyobelirteç olarak kullanılması vardır (Daulton ve ark 2021). PDAC varlığında, solunan havadaki normal VOC profilinin değiştiği ve VOC'lerin profilinin, duktal adenokarsinomlu denekler ile hastalığı olmayan denekler arasında ayrım yapmak için bir test olma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (Princivalle ve ark 2018).

Sirtuin (SIRT)-3 ve 7, insülin benzeri büyüme faktörü 2 haberci ribonükleik asit proteini ve çinko/demirle düzenlenen taşıyıcıyla ilgili protein-3 dahil olmak üzere belirli onkojenik proteinler de biyobelirteçler olarak görev alabilirler. Vimentin, CD99 geni, CDCP1, protein içeren K homoloji alanı ve fosforile edilmiş hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar ve MUC proteinleri sayabileceğimiz diğer moleküler belirteçlerdir (Dariya ve ark 2019).

Antijen dizileri kullanılarak tespit edilebilen, dolaşımda serbest veya proteinlerle kompleks oluşturabilen otoantikorlar, biyobelirteç olarak şu an başka bir markör seçeneği olarak araştırılmaktadır. PDAC otoantikorları büyük çoğunlukla eksozomal yüzey proteinlerine karşı hedeflenir ve eksozomlar, bu otoantikorlara bağlanarak kanser hücrelerine karşı hümoral bağışıklık tepkisini azaltır ve onlara karşı bir "yem" işlevini görerek vücut savunmasında neler yapabileceği görülür (Kenner ve ark 2021).

Neoplastik olmayan hücrelerden (çoğunlukla kemik iliği bölmesinden) dökülen DNA ve tümör kaynaklı dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) dahil olmak üzere dolaşımdaki DNA'nın tüm özetini içeren hücresiz DNA, kanser erken teşhis silahlandırmasında önemli bir araç olarak kendini göstermektedir. Erken teşhiste yeni nesil sekanslama ile ctDNA'daki somatik mutasyonların tespiti istisnai olarak yüksek bir özgüllük göstermiş fakat hastalığın asıl erken evresinde istenilen duyarlılık sağlanamamıştır. Dolaşımdaki metillenmiş DNA ve nükleozomal fragmanların tespit edilmesi; nükleozomal parça boyutundaki değişimlerin sağlıklı ve hasta insanlarda farklılık oluşturabilmesi kanser tespitinde yeni bir yaklaşım olabilecek gibi görünmektedir (DeWeerdt 2021).

Pankreas suyundan yapılan yeni nesil dizileme ile yüksek pankreas kanseri riski taşıyan hastalarda displazi derecesi tahmin edilebilir, görüntüleme ve sitolojik bulgularla desteklenerek, tümör oluşumunu sağlayan mutasyonları bulunabilmektedir (Lipner ve Yeh 2018).

Yapılan çalışmalar, uzun kodlanmayan RNA'ların pankreas kanserinde hastalığın kaynağı olabileceğini ya da hastalığın gelişmesinde kritik noktalarda önemli etkilerinin olduğunu göstermiştir. LncRNA'ların ifadesi kanser hücrelerinde değişikliğe uğrayarak miRNA ve ve protein etkileşimlerinde farklılıklar görülmesine neden olmaktadır. Bu durum pankreas kanseri için yeni bir biyobelirteç ve ilaç hedefi olarak şu an umut verici gözükmektedir. Li ve arkadaşları (2016) tarafından, hipoksinin indüklediği lncRNA NUTF2P3-001'in, artan KRAS ekspresyonu ile birlikte PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu desteklediğini ve Gao ve arkadaşları (2016) ise, yeniden programlamanın lncRNA düzenleyicisinin (ROR), hem BxPC-3 hem de Capan-1 hücre hatlarında hücre çoğalmasını ve karsinojenezi teşvik etmek için miR-145'i süngerleyerek Nanog gen ekspresyonunu azaltmak için rekabetçi bir endojen RNA (ceRNA) görevi gördüğünü ortaya çıkarmışlardır (Huang ve ark 2016). Ayrıca pankreas kanserindeki HOTAIR uzun kodlamayan RNA' nın yüksek ekspresyon seviyesinden bulunmasından dolayı "onco-lncRNA" olarak işlev görebilmesi PK' nin duyarlılığı ve ayrıca PK hücrelerinin yayılması ve göçü ile önemli ölçüde alakalıdır. LncRNA'lar kan, tükürük, idrar ve hatta pankreas suyunda yaygın olarak tespit edilebilmektedir bu nedenle, tümör teşhisi, hedefe yönelik tedavi ve hasta prognozunun iyileştirilmesi açısından oldukça önemlidir (Xu ve ark 2022).

1.2.4.Pankreas Kanserinde Tedavi Seçenekleri

Pankreasın bulunduğu konum ve yapısı itibari ile patolojilerinin tedavisi oldukça zordur. Pankreas kanserinin sessizce ilerlemesi ve ileri evrelerde teşhis edilebilmesi mevcut tedavi seçeneğini oldukça indirgemekte ve hastaların sağkalım oranını oldukça düşürmektedir (Demirtürk ve Bilensoy 2022). Pankreas kanseri hastalarında tümör cerrahi müdahalesi sadece %5-25 oranında gerçekleştirilebilmektedir. Pankreas kanserinde potansiyel tek tedavi yöntemi olmaya devam eden cerrahi rezeksiyon, kemoterapinin ve adjuvanın birlikte desteklenmesiyle sağkalım oranında iyileşme göstermektedir (Pliarchopoulou ve Pectasides 2009). Tam rezeksiyon ve adjuvan gemsitabin tedavisiyle sağkalım 13.4 ay, tedavi edilememiş vakalarda ise sağkalım 6.9 ay süre arasında değişebilmektedir (Pliarchopoulou ve Pectasides 2009). Cerrahi rezeksiyonda en önemli olay, pozitif rezeksiyon sınırı (R1 veya R2) nüks ve kötü prognoz ile ilişkili olduğundan, negatif bir rezeksiyon sınırına (R0) ulaşmasını sağlamaktır. Pankreas kanserinde hastalığın sonlarında genellikle semptomları göstermesi cerrahi rezeksiyon için artık geç bir müdahale olmasından ötürü birçok tedaviye engel oluşturmaktır. Cerrahi rezeksiyon kanserden tam olarak kurtulmak için en önemli tedavi olmasına karşılık tümör metaztazından ötürü sınrılı olarak istenilen sonuçlar elde edilebilmektedir. Adjuvan kemoterapi ile desteklenen bu tedavi sonrası gerçekleşen müdahele cerrahi rezeksiyonun nüksetmemesi için oldukça önemli bir rol taşımaktadır ve hayati değerleri oldukça fazladır (Brunner ve ark 2019).

Kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili x-ışınlarının yanı sıra radyasyon tedavisinin kullanılması, tümörlerin ileri evrelerinin tedavisi için kritik önem taşımaktadır (Singh ve ark 2015). Kemoterapi tek başına ya da radyoterapi ile birlikte kemoradyoterapi olarak da tedavi seçeneği olarak tercih edilebilmektedir. Ameliyat sonrası (adjuvan), ameliyat öncesi (neo-adjuvan) ve palyatif bakım olarak çeşitli tedavi kemotarapi seçenekleri mevcuttur. Kemoterapi de kullanılan ilaçlar etkilerini çapraz mekanizmalarda işlev gören kanser hücresinin apoptozuna sebebiyet veren hücre döngüsünü ekarte ederek gösterirler. Bu ilaçlara örnek olarak da en çok tercih edilmelerine göre; gemsitabin (Gemzar), 5-fluourasil (5FU), kapesitabin (Xeloda), sisplatin ve oksaliplatin (Eloxatin) ilaçları gelmektedir (Moniri ve ark 2014). Modifiye edilmiş FOLFIRINOX gibi mevcut çok ajanlı tedavi seçenekleri, pankreas kanserli hastaların uzun süreli sağkalımında iyileştirmeler gösterse de hala

etkili yeni tedavi yöntemleri araştırılmasına ihtiyaç devam etmektedir (Brunner ve ark 2019).

Aktif terapötik yaklaşım olarak sunulan immünoterapi yöntemiyle ise daha önceden var olan bağışıklık tepkisini uyandırmak amacıyla tüm hücre aşıları, peptit aşıları, DNA aşıları ve antijen ile doldurulan dendritik hücreler dahil olmak üzere çeşitli kanser aşıları test edilmiş ve aktif immünoterapi, tümörle ilişkili antijenleri tanımak ve aşılama yoluyla tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için önceden var olan bağışıklığa karşı umut verici sonuçların ortaya çıktığı görülmüştür (Ansari ve ark 2016).

Pankreatik kanserde anormal sinyal yolaklarının ve karmaşık metabolik ağlarının anlaşılması, kanser hücrelerini seçici olarak aç bırakarak pankreas kanserini tedavi etmek ve tümör metabolizmasını hedef alacak diğer tedavi türlerinin geliştirilmesi için bize yeni yollar sunabilir. Pankres kanserine ait kök hücrelerin yok edilmesiyle pankreas kanserinin kötü prognozu ortadan kaldırılabilmektedir ve nanopartiküller de pankreas kanseri tedavisinde umut verici bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Nanoalbümine bağlı paklitaksel (Abraxane), gemsitabin ile kombinasyon halinde metastatik pankreas kanserinin birinci basamak tedavisi olarak kullanılabileceği gerekli onaylardan geçerek tercih edilebilir tedavi seçenekleri arasında şu an yerini alabilmektedir (Ansari ve ark 2016).

Pankreas kanserinde hastaya özel terapötik tedavilerin belirlenebilmesi için moleküler testler yapılabilir ve hastanın prognozuna özel mevcut uygun kemoterapötik seçenekler belirlenip hastanın sonucunun iyileşmesinde daha iyi sonuçlar elde edilebilir (Brunner ve ark 2019).

Çeşitli kanserlere karşı koruma için bitkisel bileşenlerin önemi sıklıkla araştırılma konusu olurken triterpenler, flavonoidler veya polifenoller gibi birçok bitkisel ürün yakın zamanda güçlü kemopreventif ajanlar olarak dikkatleri üzerlerine çekmektedir. Yapılan çalışmalar, fenolik bileşiklerin kanserin başlaması, ilerlemesi ve ilerlemesi aşamalarındaki moleküler olayları engelleme kabiliyetine sahip olduğunu, proliferatif hücrelerde proapoptotik bileşenlerin ifadesini artırabileceğini ve tümör gelişimini önleyebileceğini ya da geciktirebileceğini göstermektedir. Resveratrol, kurkumin, epigallokateşin gallat (EGCG), genistein, sülforafan, sarımsak, benzil izotiyosiyanat (BITC), piperlongumine ve juglon dahil birçok

bitkisel ürün, kanseri önlemede ve pankreas kanserinde apoptozu indüklemede, hücre sağkalımı, anjiyogenez, metastaz ve farklılaşmanın diğer anahtar yollarının hedeflenmesinde yeni umut verici terapötik ajanlar olarak dikkatleri üzerine çekmektedirler (Singh ve ark 2015).

1.3.Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA)

Genomdaki stabiliteyi korumak ve devamını getirmek için canlının tüm DNA'sındaki kalıtımsal şifrelerin uygun bir şekilde duplikasyonu, bakımı ve onarımının gerçekleşmesi gerekmektedir. Aksi takdirde akıştaki bu işlemlerin herhangi birinde görülen hatalar, kanserin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir (Essers ve ark 2005). Hücrenin yaşam ve ölüm kararlarından sorumlu merkezi moleküllerden biri olan Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) proteini nükleik asit metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (Paunesku ve ark 2001). Replikasyondaki yeri ve önemi sebebiyle de proliferasyon için önemli bir markör görevi görmektedir (Wang 2014).

İki farklı grup tarafından ayrı olarak tanımlanan PCNA, Miyachi ve arkadaşları tarafından 1978'de sistemik lupus eritematozlu hastalarda proteinin bölünen hücrelerin çekirdeğinde görülmesi sebebiyle otoantijen olarak ifade edildi. 1980 de ise Bravo ve Celis, hücre döngüsünde S fazda meydana gelen siklin adı verdikleri proteini ifade etmek için jel elektroforezini yöntemine başvurdular. Daha sonra, PCNA ve siklinin aynı 29 kDa proteini olduğu ortaya çıktı ve bu protein PCNA olarak isimlendirildi. Siklin ifadesi ise hücre döngüsünde kullanılmaya devam etti (Essers ve ark 2005).

Ökaryotlardan ve arkebakteriden izole edilen PCNA proteini kodlayan genler, aminoasit dizilerinde yüksek oranda korunmaktadır. Halka şekilli protein olan PCNA, DNA'yı çevreler ve çift zincir boyunca kayabilir. En iyi bilinen işlevlerinden birisi de, DNA polimeraz d ve e için işlenebilirlik faktörü olarak görevde bulunabilmesidir (Kelman 1997). PCNA'nın, işlemsel kromozomal DNA sentezi için gerekli olan DNA polimeraz d (Pold) ve DNA polimeraz e (Kutup) için yardımcı protein olarak DNA replikasyonunda temel bir görevi vardır. Genetik materyalin bir zincirinin kırılması ve sonrasında farklı bir DNA molekülüne katılmasıyla oluşan süreçte ve onarımda da kendisine ihtiyaç olduğu gibi bunun yanısıra hücre döngüsü

düzenlenmesi ve kontrol noktasında yer alan hücresel proteinlerle ile de bir ilişki içerisindedir (Essers ve ark 2005).

Hücrenin yaşamı ve ölümü gibi kritik kararlarda etkili olan PCNA proteini, hücre kaderine karar verme sürecinde p53 kontrollü proteinler olan Gadd45, MyD118, CR6 ve en önemlisi p21 ile etkileşime girer. PCNA proteini, p53'ün yokluğunda hücrede bol miktarda bulunursa, genetik materyalin tamamen kendi benzeri yeni bir molekül oluşumu meydana gelir. p53 varlığında hücrede PCNA protein seviyeleri yüksek olması durumunda da, DNA onarımı istenen bir durumdur. PCNA'nın görevini yerine getirememesi veya hücrede varlığının olmaması veya az miktarlarda bulunması durumunda programlanmış hücre ölümü görülür (Essers ve ark 2005).

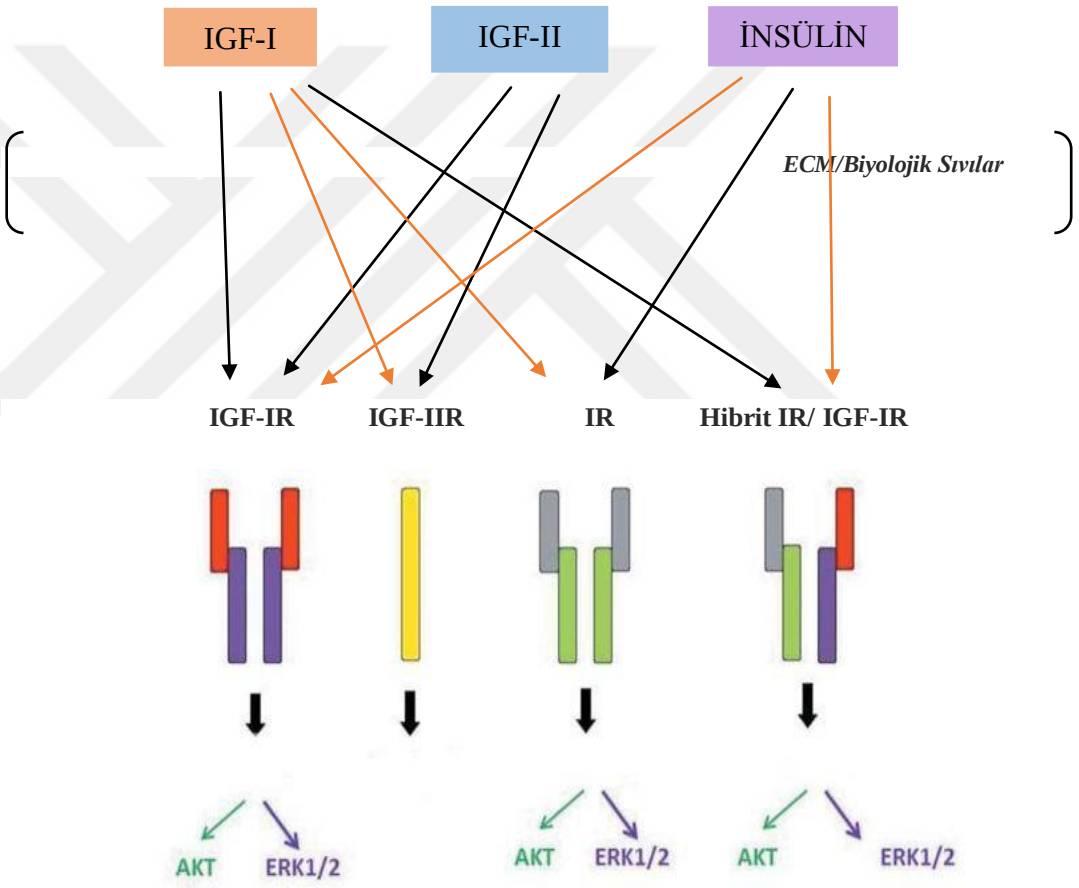
1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü (IGF-1R)

Tip 1 IGF reseptörü (IGF1R), tümörler tarafından sıklıkla ifade edilen ve proliferasyon ve apoptoz korumasında rol alan bir transmembran tirozin kinazdır. IGF sinyali, hipoksi sinyalleşmesini, proteaz salgılanmasını, tümör hücresi hareketliliğini ve yapışmasını etkiler ve bu nedenle istila ve metastaz eğilimini değiştirebilir. Bu nedenle, IGF-1R çekici bir kanser karşıtı tedavi hedefi olarak dikkatleri üzerine çekmektedir (Riedemann ve Macaulay 2006).

Hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde güçlü bir etkiye sahip olan IGF1, güçlü bir apoptoz engelleyicidir (Fürstenberger ve Senn 2002). Tip 1 insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGF-IR), ligandları tarafından aktive edildikten sonra hücre proliferasyonunu; mitojenik bir sinyal göndererek, hücreleri çeşitli apoptotik yaralanmalardan koruyarak, hücre boyutunda büyümeyi destekleyerek, dönüştürülmüş fenotipin kurulmasında ve sürdürülmesinde çok önemli roller oynayarak, hücre yapışmasını ve hücre hareketliliğini düzenleyerek ve terminal farklılaşmasını indükleyerek kontrol altına alır (Valentinis ve Baserga 2001).

IGF'lerin karsinojenezde önemli bir yerde olduğu ve yüksek konsantrasyonların artan kanser riskinin işareti olduğu bilinmektedir (Fürstenberger ve Senn 2002). İnsülin benzeri büyüme faktörünün, diğer birçok büyüme faktörlerinden farkı, IGF peptitlerinin dolaşımda büyük konsantrasyonlarda bulunabilmesi ve hücre davranışı üzerinde sistemik, hormonal ve lokal parakrin etkilere sahip olabilmesidir (Renehan ve ark 2004).

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sistemi, ligand (IGF-I, IGF-II ve insülin), hücre yüzey reseptörleri [IGF-I reseptörü (IGF-IR), mannoz 6-fosfat/IGF-II reseptörü (M6P/IGF-IIR)], insülin reseptörü (IR) ve hibrid IR/IGF-IR], altı yüksek afiniteli bağlayıcı protein (IGFBP-1 ila 6) ve proteazları içermektedir. Ayrıca, insülin reseptör substratı (IRS) ailesi ve AKT gibi IGF-1R'ye distal hücre içi sinyalleşmede rol oynayan proteinleri de içinde barındırmaktadır (Annunziata ve ark 2011) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. IGF biyo-regülasyon sistemi, IGF-I, IGF-II, insülin, tip I (IGF-1R) ve tip II (IGF-IIR) IGF reseptörleri, insülin reseptörü (IR) ve IR / IGF-IR hibrid reseptörlerinin yanı sıra en az altı yüksek afiniteli IGF bağlayıcı proteinden (IGFBP) oluşur. IGF ligandları, IGF reseptörlerine diferansiyel bağlanma afinitesi gösterir (siyah oklar, turuncu oklara kıyasla daha yüksek bir bağlanma afinitesini gösterir) ve ERK1/2 ve Akt dahil olmak üzere çoklu sinyal yollarını ve hücre içi mediatörleri paylaşır (Gkioka ve ark 2015).

15q26.3 kromozom bandında bulunan yaklaşık 315 Kbp uzunluğuna sahip insan IGF1R geni, 11,242 bp'lik bir mRNA'yı kodlamaktadır (Klammt ve ark 2011).

α- ve β- alt birimlerinden oluşan, heterotetramer yapıda olan IGF-IR, α-alt birimleri ligand bağlanmasında işlev görürken β-alt birimleri plazma zarını kaplamada ve hücresel sinyalleri iletmesinde görev almaktadır. (Tanno ve ark 2001). α-alt birimleri bütünüyle hücre dışında yer alırken β-alt birimleri membran üzerine yerleşmiştir ve birbirlerine disülfüt bağları ile bağlanmışlardır. IGF-I reseptörünün IGF nin alfa alt birimine bağlanmasıyla beta alt birim otofosforilasyona uğrar bu durum kinaz akyivitesinin artmasına sebep olur (Keleş ve Türkeli 2005).

1.5. PI3K/AKT Sinyal Yolağı

PI3K'ler, ökaryotik hücre zarlarının bileşeni olan fosfatidilinositolün inositol halkasının 3'-OH'sinin fosforile eden bir lipid kinaz enzim ailesidir (Karar ve Maity 2011, Huang ve ark 2018). Sekans homolojisindeki farklılıklar ve lipit substrat tercihlerine bağlı olarak PI3K; PI3KI, PI3KII ve PI3KIII olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Huang ve ark 2018) (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Farklı PI3K enzim sınıfları ve bunların alt birimleri (Mortazavi ve ark 2022).

PIK3 Sınıfı	**Alt birim**	**Gen**	**Protein**	**Takma Ad**
Sınıf I	**1A Katalitik**	PIK3CA PIK3CB PIK3CD	PI3K, katalitik, α polipeptit PI3K, katalitik, β polipeptit PI3K, katalitik, δ polipeptit	p110a p110β p110δ
	Düzenleyici	PIK3R1 PIK3R2 PIK3R3	PI3K, düzenleyici alt birim 1 (α) PI3K, düzenleyici alt birim 2 (β) PI3K, düzenleyici alt birim 3 (γ)	p85α p85β p55γ
	1B Katalitik	PI3K3CG	PI3K, katalitik, γ polipeptit	p110γ
	Düzenleyici	PIK3R5 PIK3R6	PI3K, düzenleyici alt birim 5 PI3K, düzenleyici alt birim 6	p101 s87/s84
Sınıf II	**Katalitik**	PIK3C2A PIK3C2B PIK3C2G	PI3K, sınıf 2, α polipeptit PI3K, sınıf 2, β polipeptit PI3K, sınıf 2, γ polipeptit	PI3K-C2α PI3K-C2β PI3K-C2 ϒ
Sınıf III	**Katalitik** **Düzenleyici**	PIK3C3 PIK3R4	PI3K, sınıf 3 PI3K, düzenleyici alt birim 4	Vps34 Vps15/p150

Kanserde önemli işlevleri bulunduğu için en çok çalışılan ve bu durumda da en iyi anlaşılan grup olan Sınıf I PI3K, 110-kDa'lık bir katalitik alt birim (p110) ve bir düzenleyici alt birimden (p85) oluşan heterodimerlerden meydana gelir. Düzenleyici alt birimler, PI3K protein heterodimerlerini stabilize eden, bazal koşullar altında kinaz aktivitesini inhibe eden ve PI3K'yi aktivasyon için yukarı akış düzenleyicilere yönlendiren p110 katalitik alt birimlerine bağlanma gösterirler (Guo ve ark 2015). Heterodimer yapıda olan sınıf I PI3K da kendi içerisinde moleküler yapısına göre sınıf IA ve sınıf IB olarak gruplandırılır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonları da içine katan ligandlar, reseptör tirozin kinazları (RTK'ler) ve G-protein-bağlı reseptörleri (GPCR) aktive ederek sırasıyla sınıf lA ve IB PI3K izoformlarını uyarır (Huang ve ark 2018). Sınıf I PI3K, büyük elementlerin metabolizması, hayatta kalması, çoğalma, otofaji, hücre büyümesi, kemotaksi ve fagositoz gibi hücre içi önemli rollerde oynar (Noorolyai ve ark 2019).

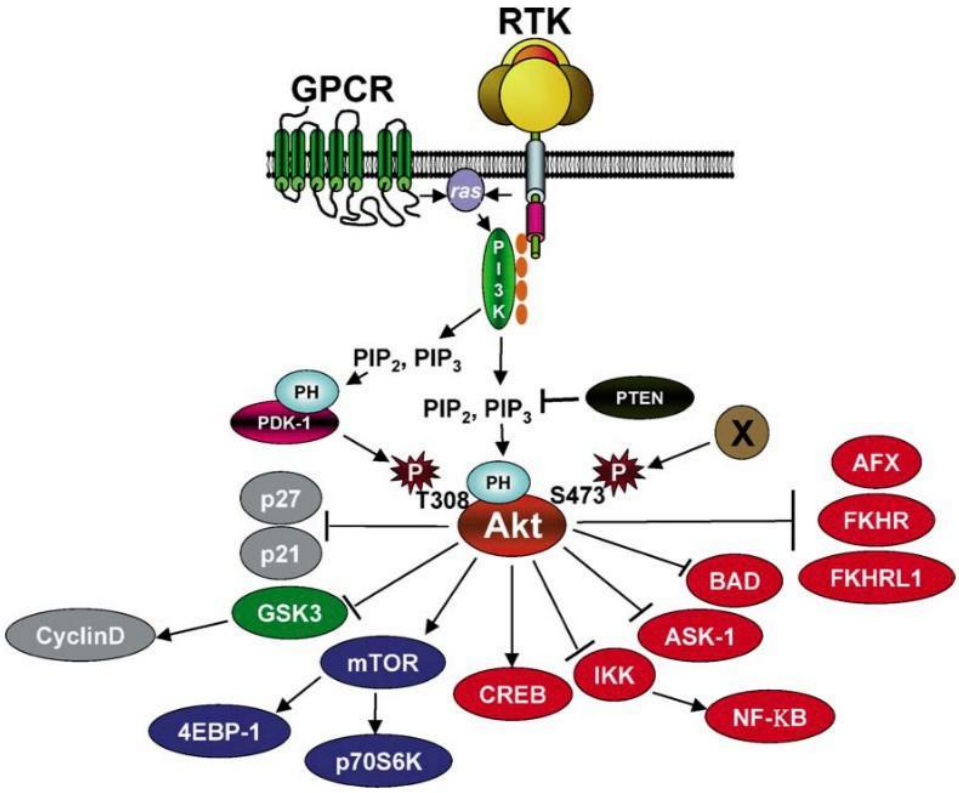
PI3K ailesi üyelerinin temel görevi, inositol halkasının 3 konumunda fosfatidilinositol lipidlerinin fosforilasyonunu katalize etme görevidir. Bu, D3 fosforile fosfoinosititlerin, en önemlisi fosfatidilinositol-4,5 bifosfat (PIP2) ve fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfatın (PIP3) üretilmesiyle; PIP2 ve PIP3,'ün PI3K'nın aşağısında bulunan çeşitli sinyal proteinlerine bağlanmalarıyla ikinci haberciler olarak işlev görmesiyle devam eder (West ve ark 2002). Tümör baskılayıcı PTEN tarafından fosforilasyonla negatif olarak düzenlenen PIP3, kritik bir ikinci habercidir.

Kanserde PI3K sinyalinin yolu, ilk olarak büyüme faktörlerinin RTK'lar tarafından bağlanmasıyla başlar. Plazma zarına bağlı reseptörlere alınan PI3K aktive edilir ve PIP3 oluşturmak için PIP2' yi fosforile eder. Plekstrin homoloji (PH) alanı aracılığıyla, nodal kinaz AKT, PIP3' e bağlanır, burada iki fosforilasyon olayı tarafından aktive edilir ve büyümeyi, çoğalmayı, hayatta kalmayı ve hareketliliği düzenleyen karmaşık bir sinyal dizisini tetikler. Lipid fosfataz PTEN, AKT'nin aktivasyonunu inhibe etmek için PIP3 'ü defosforile ederek süreci engeller (Yuan ve Cantley 2008).

Hücresel sinyali iletme, büyüme, çoğalma ve göç gibi birçok temel işlevleri düzenleyen lipit kinaz olan Sınıf I PI3K, bu görevleri nedeniyle birçok kanser, diyabet, birincil immün yanıt bozuklukları gibi ve iltihaplanma gibi hastalıklarda

etkin roller üstlenmektedir (Burke ve Williams 2015). 2004 yılında yapılan bir çalışmada p110 alfanın kanserde en sık mutasyona uğrayan genlerden biri olarak bulunmasıyla kanser gelişimindeki rolü oldukça önemli hale gelmiştir (Burke ve Williams 2015).

PI3K'nın en önemli aşağı akış efektörü olan protein kinaz B veya PKB olarak da bilinen serin/ treonin kinaz Akt, PI3K aracılığıyla çok çeşitli büyüme faktörlerine yanıt olarak aktive edilir (West ve ark 2002).



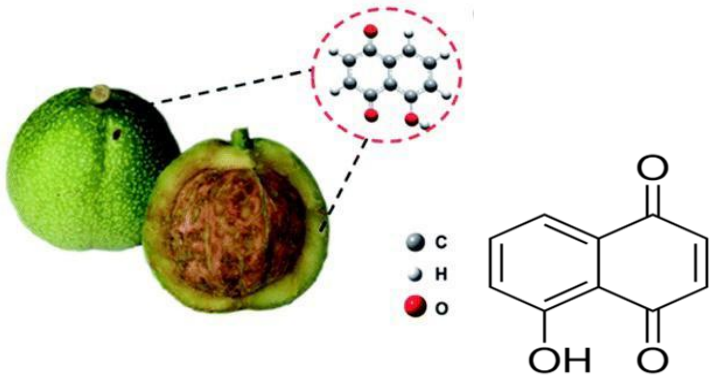
Şekil 1.5. AKT sinyal yolağına genel bakış (West ve ark 2002).Reseptör tirozin kinazlar (RTK), aktive edilmiş Ras, G proteinine bağlı reseptörlerin aktivasyonu (GPCR) veya tümör baskılayıcı PTEN'in etkisizleştirilmesi ile PI3K/Akt nun aktivasyonu gerçekleşir. PI3K, PIP2 ve PIP3 ürünleri, Akt'ın fosforilasyonunu ve aktivasyonunu uyarır. Aktif hale geldiğinde Akt, apoptoz (kırmızı ile gösterilmiştir), protein sentezi (mavi ile gösterilmiştir), metabolizma (yeşil ile gösterilmiştir) ve hücre döngüsü (gri ile gösterilmiştir) ile ilgili substratları fosforile ederek anahtar hücresel süreçleri kontrol edebilir. Ok uçları, alt tabakaların uyarılmasını gösterir; dikey çizgiler aşağı akış substratlarının inhibisyonunu gösterir (West ve ark 2002).

1.6. Juglon

Birçok bitki türünde bulunan allelokimyasallar, kalıntıların ayrışması, uçucu duruma gelmesi ve herhangi bir mekanik etkiyle darbe alması sonucu yaşarma gibi

çeşitli mekanizmalarla rizosfere salınır. Salınan bu kimyasallar doğada bulunan birçok bitki türünün çimlenmesini, büyümesini, gelişmesini, çevreye olan dağılımını ve üremesini etkiler (Terzi 2008). Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar salınan bu kimyasalların aslında birçok kanser tedavisinde yeni stratejiler doğurabileceğini ve bizim için yeni antikanser ajanlar olabileceğini göstermektedir (Avcı ve ark 2016).

5-hidroksi-1,4-naftokinon formülüne sahip (Şekil 1.6), doğal bir naftokinon olan Juglon, ceviz ağaçlarının taze olgun meyve kabuğunda, köklerinde ve yapraklarında bulunur (Avcı ve ark 2016). Juglans nigra (siyah ceviz), Juglans regia, Juglans sieboldiana (Japon cevizi) ve Juglans cinerea (beyaz ceviz) dahil olmak üzere çok sayıda ceviz ağacı türü tarafından üretilir ve moleküler ağırlığı 174.14 ve 155 °C erime noktasına sahiptir. Alkol, aseton, asetik asit, kloroform, benzen, DMSO'da çözünür ve sıcak suda az çözünen kimyasal bir bileşendir (Verma 2006, Karki 2016, Ahmad ve Suzuki 2019).



Şekil 1.6. Ceviz kabuğundan elde edilebilen juglon biyomoleküllerinin kimyasal yapısal formülü (Guo ve ark 2018).

Doğal bir naftokinon olan juglonun kanser hücrelerinin çoğalmasında önemli bir direnç faktörü olarak, apoptozun ve otofajinin indüklenmesinde, antianjiyogenez ve kanser hücre göçünün inhibisyonunda önemli bir rol üstlendiği son araştırmalarda görülmektedir (Tang ve ark 2022). Juglonun birçok özelliği ile etki ettiği çeşitli farmakolojik olaylar ve cilt hastalıkları üzerine, antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan etkisi şu an bazı hastaklıları iyileştirmeye yönelik tedavi yöntemi olarak dikkatleri üzerine çekmektedir (Ahmad ve Suzuki 2019). Çeşitli kanser türlerinde

karşımıza çıkan Pin1'i (Peptidil-prolil izomeraz) inhibe ettiği ve bu sayede de kanserde kemoterapötik ilaç olarak birçok çalışmada araştırıldığı görülmektedir (Zhang ve ark 2015).

Juglon, çeşitli kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini, apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne sebebiyet veren reaktif oksijen türlerini indükleyerek gösterir (Zhang ve ark 2015). Juglonun sitotoksisitesinin redoks döngüsü ve glutatyon (GSH) ile reaksiyon olmak üzere iki farklı mekanizmadan kaynaklandığı çalışamalarda kabul görmektedir (Ahmad ve Suzuki 2019).

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çizelge 2.1. Kullanılan Cihazlar ve Markaları.

Cihaz	**Marka**
Güvenlik Kabini Sınıf II	Metisafe
Karbondioksitli İnkübatör	Thermo Scientific
Işık Mikroskobu	Olympus
Inverted Mikroskop	Nikon Eclipse TS100
Flouresan Mikroskop	Olympus
Su Banyosu	WiseBath
Multiplate Okuyucu	Biotech
Thermal Cycler	Bio-Rad
Vorteks	Heidolph
Real-time PCR	Roche
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj (soğutmalı)	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı (ısıtıcılı)	Stuart
Çalkalayıcı	WiseShake
Hassas Terazi	Kern
Otomatik Pipet	Thermo Scientific
Nanodrop Spektrofotometri	Thermo Scientific
-80 Derin Dondurucu	Haier
-20 Derin Dondurucu	Arçelik
+4 Buzdolabı	Uğur

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler ile markaları.

Kimyasal/Sarf Malzeme	**Marka**
RPMI 1640	Gibco

DMEM	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Biochrome
Fosfat Tamponlu Su (PBS)	Sigma
Dulbacco'nın Fosfat Tamponlu Su (DPBS)	Sigma
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Gibco
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applicem
Tripsin-EDTA (%0.05)	Gibco
Juglon	Sigma
MTT	Sigma
Tridity G	Applicem
Tripan Mavisi	Sigma

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

Kristal Viyole	Sigma
Kloroform	Merck
Asetik asit	Merck
Ethanol	Dop Organik Kimya
2-propanol	Merck
SYBR Green Qpcr Master Mix	Thermo Scientific
cDNA Sentez Kiti	Vivantis
Thoma Lamı	Superior Marienfeld
T75 Flask	Isolab
T25 Flask	Isolab
6-kuyucuklu plate	Costar
96-kuyucuklu plate	Costar
Steril 0.22 mikronluk enjektör filtresi	Chromlab
15 ml falkon tüp	Isolab
50 ml Falkon Tüp	Isolab
RNAaz	Fermentas
DAPI	santa cruz biotechnology
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
6 Well Hücre Kültürü Plate	Costar
PCNA Antikoru	Santa Cruz Biotechnology

2.2. Hücre Kültürü

BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücre hattı; tip 1 kollajene afinite göstermesi, çeşitli ekstra hücresel matriks proteinleri ile yapışma yeteneği ve de adezyon özelliği ile diğer hücre hatlarından ayrılmaktadır (Arao ve ark 2000, Deer ve ark 2010). Çalışmamızda kullanılan BxPC-3 kanser hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)' den (ATCC® CRL1687™) kodu ile temin edildi.

BxPC-3 hücre hattının temel özellikleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. BxPC3 pankreas kanseri hücrelerinin özellikleri.

Organizma	Homo Sapiens, İnsan
Doku	Pankreas
Hastalık	Adenokarsinom
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Kadın
Yaş	61
Büyüme Özelliği	Yapışarak Çoğalan (aderent)

BxPC-3 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve 100 IU/ mL penisilin ve 100 mg/ml streptomisin ile hazırlanmış RPMI 1640 besiyerinde, kendisine uygun kültür ortamı olan 37 ˚C'de % 5 CO2'li etüvde kültüre edilerek çoğaltıldı.

2.2.1. Hücre Hattının Dondurulması

Aderent özelliğe sahip hücre hattı BxPC-3, %0.05'lik Tripsin-EDTA ile etkileşime girdikten sonra 37˚C'de %5 CO2'li etüvde 1 ila 2 dakika arasında inkübasyona bırakıldı ve böylece flasktan uzaklaştırılmaları sağlandı. Ardından hücrelerin kalktığından emin olabilmek için inverted mikroskop ile kontrol edildi ve sonra flaska taze besiyeri eklendi, hücre besiyeri karışımı falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 4 dk santrifüj işlemi yapıldı, santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldı.Falkon tüpe 9 da 1 oranında besiyeri ve DMSO'dan oluşan dondurma çözeltisinden alınarak belirlenen hücre sayısı doğrultusunda kriyotüplere aktarıldı. Hazırlanan kriyotüpler önce -20˚C de ilk dondurma işleminin ardından -80˚C de depolanmak üzere kaldırıldı.

2.2.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Çözdürülmesi

Sağlıklı bir çözdürme işlemi gerçekleştirmek için hızlı bir şekilde -80˚C'den alınan kriyotüpler, 37˚C'ye ısıltımış su banyosu içerisinde kapaklarından tutularak 1 dakika içinde çözülecek şekilde eritildi. Eriyen kriyotüp içerisindeki hücreler taze hazırlanmış 6 ml besiyeri bulunan falkon tüpe yavaşça aktarıldı, 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin 1 kez daha tekrar edilmesi işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti, uygun miktarda ısıtılmış taze besiyeri ile pipetaj yapılarak çözdürüldü. Sonra kriyotüplerin etiketlerinde belirtilen hücre sayılarına göre uygun büyüklükteki kültür flaskına alındı ve 37 °C'de %5 CO2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İki günde bir besiyeri değişimi yapılarak

hücrelerin sağlıklı şekilde beslenmeleri sağlandı. Kontrol edilen hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında canlılıklarının devamını sağlamak amacıyla pasajlandı.

2.2.3. Hücre Hattının Pasajlanması

Flasklardaki hücre miktarı %80-90 yoğunluğa ulaştığında hücrelere pasajlama işlemi yapıldı. İlk adım olarak eski besiyeri uzaklaştırıldı ve ardından 1-2 ml 1X'lik DPBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak amacıyla flaska 1-2 ml %0.05'lik Tripsin-EDTA eklendi, hücreler 37˚C'de %5 CO2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnverted mikroskopta hücrelerin durumu kontrol edildikten sonra, flaska Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık üç katı kadar taze besiyeri ilave edildi, hücre-besiyeri içeriği pipet ile homojenize edildikten sonra falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk santrifüj işleminden sonra, süpernatant atıldı. Bu aşama tekrar edildi. Pellet 5 ml besiyeri ile homojenize edildi. Ardından ışık mikroskobu altında thoma lamı kullanılarak tripan mavi boyası ile hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı sonrasında hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü, inverted mikroskobu altında hücreler incelendi ve çoğalmaları için 37 ˚C'de % 5 CO2'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.3. Juglon Stok Solüsyonun Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen Juglon (Sigma, St Louis, Amerika, Katalog 54 No: H47003) katı halde oda sıcaklığında muhafaza edilmesi gereken kimyasal bir bileşendir. 174.15 molekül ağırlığına, 5-hidroksi-1-4- naftakinon açık kimyasal formülüne sahiptir. Çalışmamız için juglonun DMSO içinde çözdürülerek 20mM konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlandı, stok solüsyon 0,22 µm'lik filtreden geçirerek steril edildi ve -20˚C'de saklandı. Hazırlanan bu stok solüsyondan RPMI 1640 besiyeri ile seyreltmeler yapılarak çalışmada kullanılan farklı konsantrasyonlar elde edildi.

2.4. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi Juglon ve Uygulama Dozlarının Belirlenmesi

Daha önceki çalışmalarımızda BxPC3 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda juglon muamelesi yapılarak MTT analizi ile juglonun IC 5O dozu 21,05 µM belirlendi. Buna göre IC 5O dozunun altında olacak şekilde 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarda juglon uygulaması ile deneylere devam edilmesi kararlaştırıldı.

2.5. Gen İfade (mRNA) Analizleri

5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon uygulamalarının BxPC-3 kanser hücrelerinde PCNA, IGF-1R ve IGF1R'nin hedefi olan PI3K/Akt sinyal yolağında anahtar rol oynayan PIK3R1 gen ifade düzeyleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Roche LightCycler96 cihazı kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) işlemi yapıldı.

2.5.1.Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu TRidity G solüsyonu (Applicem, A4050) kullanılarak gerçekleştirildi. 6-kuyuklu plate'e her bir kuyucuğa $2x10^5$ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı ve 1 gün inkübe edildi. Kontrol grubu dışındaki hücreler inkübasyon sonrasında 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarında juglon ile muamele edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerindeki medyum çekilip PBS ile yıkama işlemi yapıldı. %0,05'lik Tripsin-EDTA ile muamele edilen plate'ler 3-5 dakikalık inkübasyon sonunda medyum eklenerek Tripsin-EDTA'nın inhibisyonu gerçekleştirildi. Kalkan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 1500 rpm de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellete 1ml TRidity G eklenerek pipetaj yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Falkondan ependorfa alınan her örneğin üzerine 200 µl kloroform eklendi, tüpler ters düz edilerek karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme işlemi sonrasında soğutmalı santrifüjde 12000 g'de +4˚C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatantlar yeni ependorflara alındı, üzerlerine 250 µl 2-propanol eklendi ardından oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 12000 g'de +4˚C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında her bir tüpteki süpernatant uzaklaştırılarak %70'lik etanol ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi sonrasında tüpler 12000 g'de +4˚C'de 5 dk santrifüj edildi. Her bir tüpteki supernatant atıldı ve RNA pelletleri 5 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletlerin üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklenerek çözdürülmesi sağlandı. RNA izolasyonları bittikten sonra kalite ve konsantrasyonunun belirlenmesi için Nanodrop cihazı ile spektrometrik analiz yapıldı. Bunun için 1µl RNA örneği alınarak ölçüm yapıldı ve her örnek için bu işlem tekrar edilerek RNA konsantrasyonları ng/µl olarak elde edildi.1 µg RNA örneği cDNA sentezi için kullanılırken kalan örnekler -80˚C'de muhafaza edildi.

2.5.2. cDNA Sentezi

Vivantis "2-steps RT-PCR Kiti" (Vivantis, RTPL2) kullanılarak total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. 2 adımlı olan sentez basamağında ilk olarak, bir tüp içerisinde 1 µg RNA, 1ul oligo (dT) 18 primer (40 uM), 1µl 10 mM dNTP miks'ten oluşan karışım nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımları denatürasyon için thermal cycler (Mycycler, Bio-rad) cihazında 65˚C'de 5 dk inkübe edildikten sonra, buz kabının üzerine alınarak 2 dk bekletildi. Süre sonunda tamamlanan birinci aşamayı, her bir tüp içerisine 10µl cDNA sentez miks (2µl 10X Buffer M-MuLV, 100 ünite MMuLV Reverse Transcriptase enzimi, son hacmi 10µl'ye tamamlayacak miktarda nükleaz içermeyen dH2O) ilave edildikten sonra sentez için 42°C'de 60 dakika inkübe edilmesiyle gerçekleşen ikinci adım takip etti. Ardından reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her tüp 85°C'de 5 dk inkübe edildi ve elde edilen cDNA'lar qPCR analizlerinde kullanılıncaya kadar -20'de muhafaza edildi.

2.5.3. qPCR Analizi

qPCR analizi, "SYBR Green qPCR Master Mix" (Thermoscientific, K0251) kullanılarak gerçekleştirildi. PCNA, IGF-1R ve PIK3R1 hedef genleri ile referans olarak kullanılan β-aktin genine ait primerler Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. PCNA, IGF-1R, PIK3R1ve β-aktin genleri için kullanılan spesifik primer dizileri. (İ: İleri primer dizisi G: Geri primer dizisi).

Gen	Primer Dizisi	Referans
PIK3R1	İ: 5- ACCACTACCGGAATGAATCTCT-3 G: 5-GGGATGTGCGGGTATATTCTTC-3	Wu ve ark 2016
PCNA	İ: 5′-TGA AGCACCAAACCAGGAG-3′ G: 5′-GAGGCATCTTTACTACACAGC-3′	Ma ve ark 2021
IGF1R	İ: 5'- CTCCTG TTTCTCTCCGCCG -3' G: 5'- ATAGTCGTTGCGGATGTCGAT -3'	Haffez ve ark 2022
β-aktin	İ: 5-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3 G: 5-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3	Hsu ve ark 2005

PIK3R1, PCNA, IGF1R genlerinin ifade düzeyleri analizi için, Çizelge 2.5.'te gösterilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 2.5. qPCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Bileşeni	**Hacim**
SYBR Green qpcr Master Mix(2x)	12,5 µl
İleri Primer (50 uM)	0,25 µl
Geri Primer (50 uM)	0,25 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen su	10 µl
Toplam	**25 µl**

qPCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı, 96'lık plate'lere aktarılarak gerçek zamanlı PCR (Light Cycler96, Roche) cihazına yerleştirildi ve denatürasyon, amplifikasyon ve soğuma basamaklarından oluşan qPCR protokolü uygulandı (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. qPCR protokolü.

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

BxPC-3 insan pankreas kanseri hücrelerine juglon uygulaması sonrasında PCNA, IGF1R ve PIK3R1 genlerinin ifade düzeyi qPCR ile elde edilen Ct değerleri üzerinden yorumlandı. β-aktin gen ifade düzeyine göre normalizasyon işlemi gerçekleştirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırılan 5,10, 15 ve 20 µM konsantrasyonda juglon uygulanan gruplardaki gen ifade farklılıkları 2-ΔΔCt metodu ile değerlendirildi.

2.6. İmmunohistokimyasal Analiz

24 saat kültür sonrasında, juglon ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde PCNA ekspresyonlarındaki değişiklikler immunofluresans yöntem ile analiz edildi.

Bunun için boyamada; PCNA için primer antikorlar, FITC ve Texas Red işaretli sekonder antikorlar ve nukleus boyası olarak DAPI kullanıldı. İlk gün aşaması için önce hücreler metanol ile 5 dakika fikse edildikten sonra PBS ile üç defa yıkandı. Daha sonra PCNA için hücreler well'lere gruplandırılarak ayrıldı. % 0,25 Triton X-100'de permabilize edildi ve ardından non-spesifik boyanmayı bloke etmek için serum blok solüsyonunda 50 dakika inkübasyona bırakıldı. 1:50 oranında hazırlanan primerler ile muamele edilen hücreler 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Boyamanın son gün adımı için PBS ile yıkama işlemi gerçekleşti ve bu adım üçer defa tekrarlandı. Ardından 1:100 oranında FITC ve Texas Red işaretli sekonder antikorlar ile muamele işleminden sonra 1 saat inkübasyona bırakıldı. Tekrar PBS ile yıkama aşamasından sonra preparatlar hücre nukleusunu boyamak için DAPI içeren kapatma medyumu ile kapatıldı.

İmmunofluoresans boyama sonuçları, fluoresan mikroskop (Olympus; BX51) altında değerlendirildi ve görüntüleri (Olympus; DP72) kaydedildi. Immunfloresans boyama sonrasında, en az 10 farklı sahada PCNA pozitif hücreler sayıldı ve PCNA ifade düzeyleri PCNA pozitif hücre sayısı total hücre sayısına oranlanarak belirlendi.

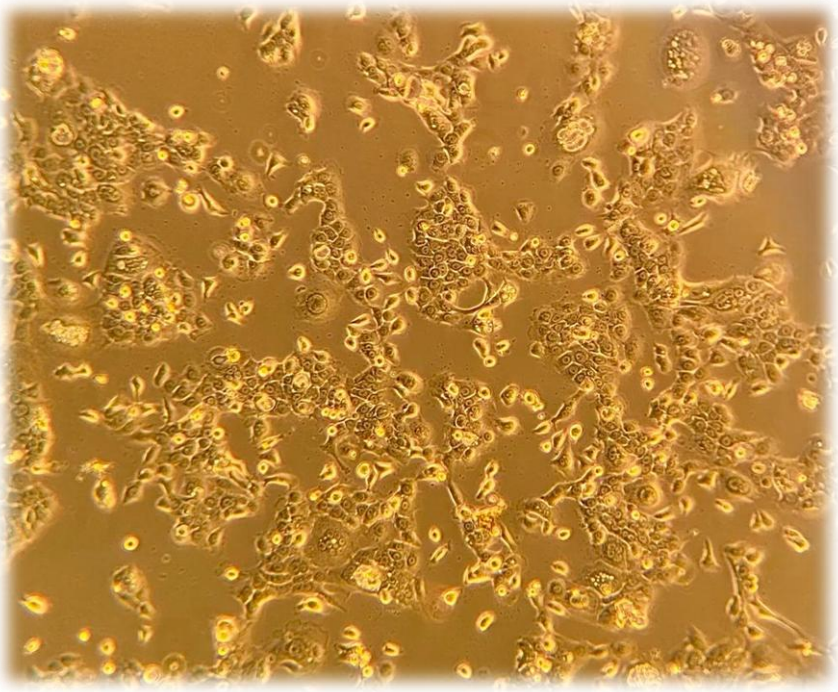
2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, Statistical Package for Social Sciences version 16.0 (SPSS-16.0, for windows) paket programı ile yapıldı. Sonuçlar ortalama± standart sapma olarak verildi. Kontrol grubu ve farklı dozlarda juglon uygulanan gruplar arasındaki karşılaştırmalarda one-way ANOVA testi, anlamlı fark bulunduğu zaman ikili grup karşılaştırmalarında ise Newman-Keuls testi kullanıldı. $P < 0, 05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücre Hattı

BxPC-3 pankreas kanseri hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde, 37˚C'de % 5 CO2'li etüvde kültüre edildi. Kültüre edilen BxPC-3 hücreleri, inkübasyon sonrasında iki günde bir kontrol edilerek inverted mikroskopta takibi yapıldı (Şekil 3.1).

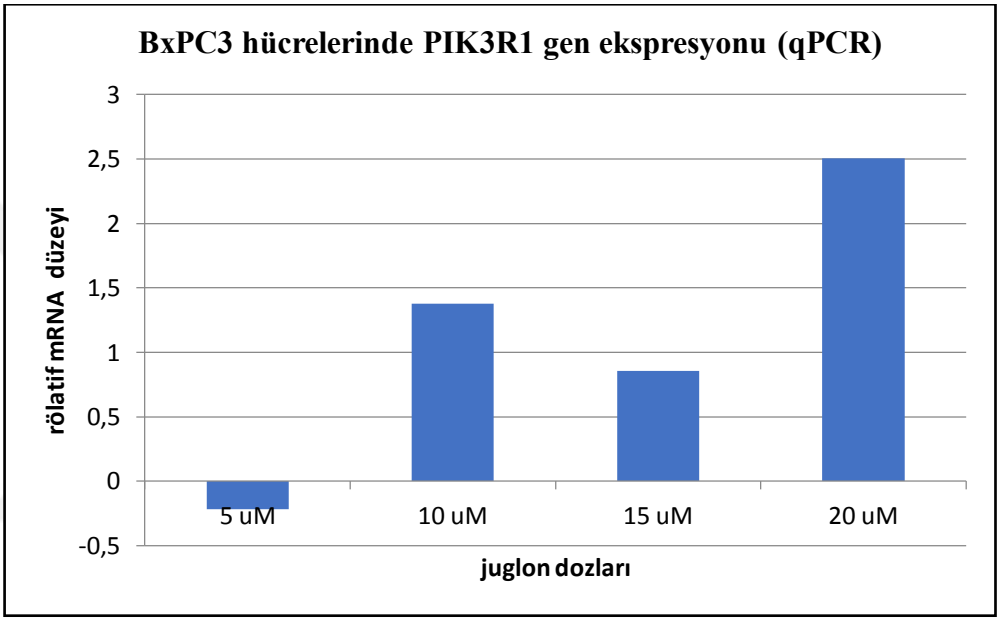


Şekil 3.1. BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattının görüntülenmesi (X10 büyütme).

3.2. Juglonun Gen İfade Düzeylerine Etkileri

3.2.1. Juglonun PIK3R1 gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi

BxPC-3 hücre hattına 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saat juglon uygulamasının, PIK3R1 geninin ifade düzeyine etkisi qPCR yöntemi ile analiz edildi. Juglon uygulanmayan hücre grubu ile çalışma grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

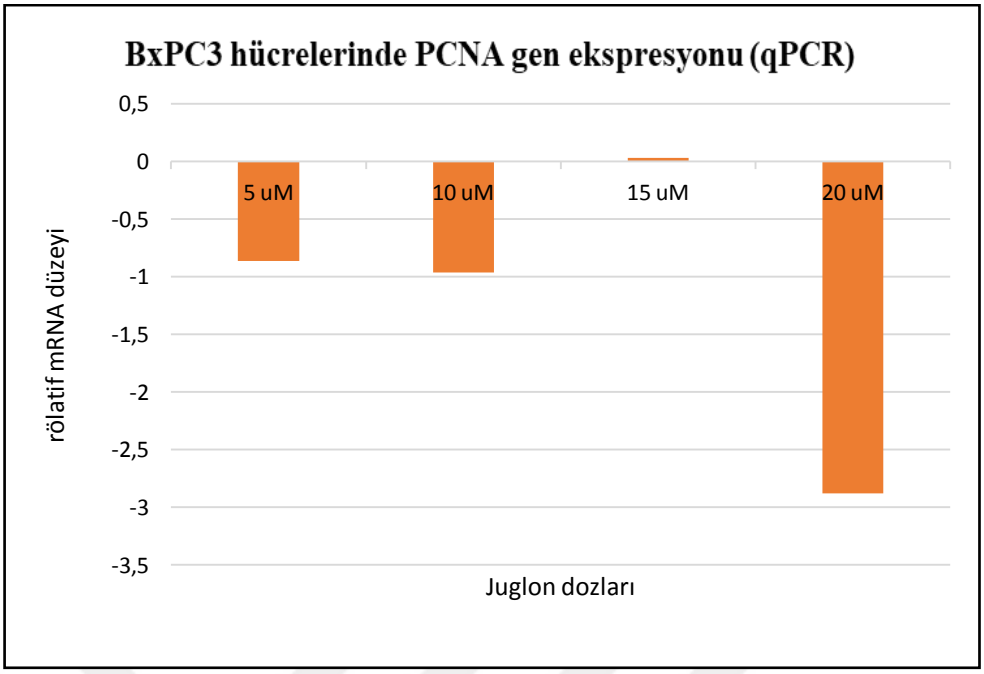


Şekil 3.1 .BxPC3 hücrelerinde PIK3R1 gen ekspresyonu.

BxPC hücrelerinde 24 saat juglon muamelesi sonrasında 5 uM dozda 0,2 kat azalış görülürken, diğer tüm dozlarda PIK3R1 gen ifadesi düzeyinde sırasıyla 1,4-0,8 ve 2,5 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

3.2.2. Juglonun PCNA gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi

BxPC-3 hücre hattına 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saat juglon uygulamasının, PCNA geninin ifade düzeyine etkisi qPCR yöntemi ile analiz edildi. Juglon uygulanmayan hücre grubu ile çalışma grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

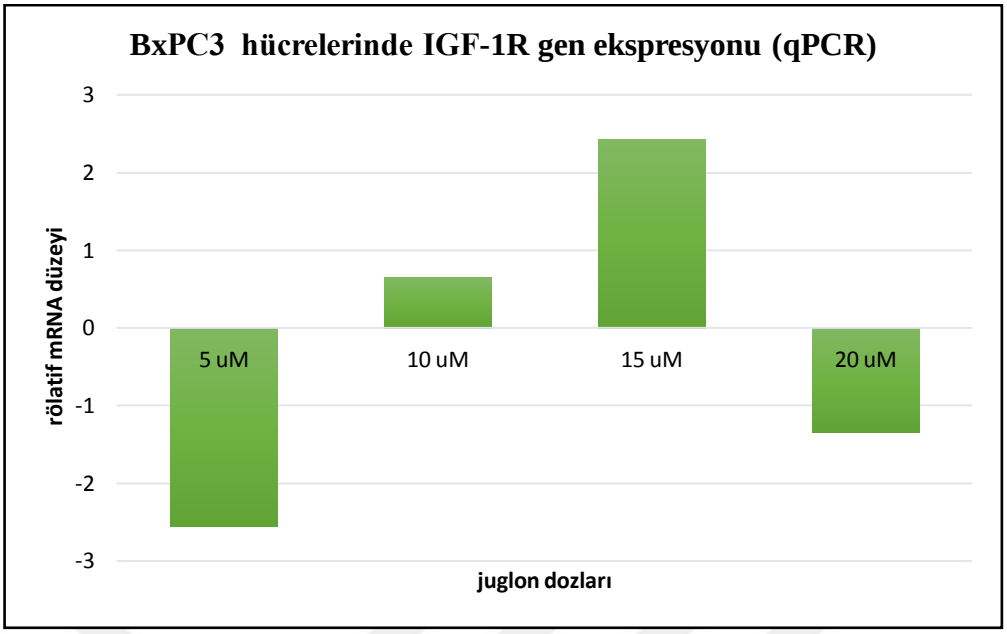


Şekil 3.2 .BxPC3 hücrelerinde PCNA gen ekspresyonu.

BxPC hücrelerinde 24 saat juglon muamelesi sonrasında PCNA gen ekspresyonunda 15 µM dozda 0,03 kat bir artış varken; 5 µM dozda 0,9; 10 µM dozda 1 ve 20 µM dozda 3 kat azalış tespit edildi (Şekil 3.2).

3.2.3. Juglonun IGF-1R gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi

BxPC-3 hücre hattına 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saat juglon uygulamasının, IGF-1R geninin ifade düzeyine etkisi qPCR yöntemi ile analiz edildi. Juglon uygulanmayan hücre grubu ile çalışma grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

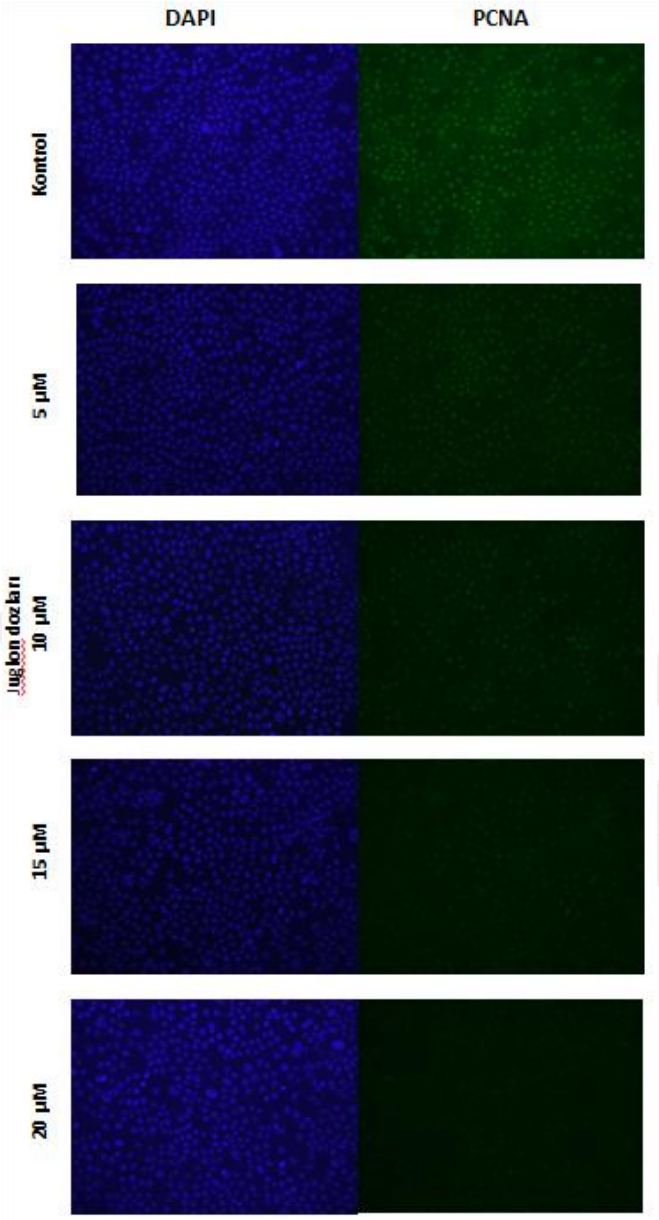


Şekil 3.3 .BxPC3 hücrelerinde IGF-1R gen ekspresyonu.

BxPC hücrelerinde 24 saat juglon muamelesi sonrasında IGF-1R gen ekspresyonunda 5 uM dozda 2,5 ve 20 uM dozda 1,3 kat azalış varken; 10 uM dozda 0,6 ve 15 uM dozda 2,4 bir artış tespit edildi (Şekil 3.3).

3.3. BxPC3 hücrelerinde Juglonun PCNA protein düzeyine etkisinin İmmünohistokimyasal Yöntem ile Değerlendirilmesi

İmmunofluoresans boyama sonuçları, fluoresan mikroskop (Olympus; BX51) altında değerlendirildi ve görüntüleri (Olympus; DP72) kaydedildi. Immunfloresans boyama sonrasında, en az 10 farklı sahada PCNA pozitif hücreler sayıldı ve PCNA düzeyleri PCNA pozitif hücre sayısı total hücre sayısına oranlanarak belirlendi.



Resim 3.1. Immunohistokimyasal analiz sonucu elde edilen floresans mikroskop görüntüsü (X200 büyütme).

BxPC3 hücrelerinde 24 saat juglon muamelesi sonrasında yapılan immünofloresan boyama sonuçlarına göre 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM tüm uygulama dozlarında direkt proliferasyon belirteci olan PCNA protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı görüldü (Resim 3.1)

4.TARTIŞMA

Sindirim sisteminin malign tümörlerinden olan pankreas kanseri, hastalığın ileri evrelerde kendisini göstermesi, sinsi bir başlangıç yapması, kanser hücrelerinin de hızlı invazyonu ve metastazı ile beraber tedaviye oldukça geç kalınması sonucu kötü prognoz ile sonuçlanan bir hastalıktır (Xu ve ark 2022). Medyan sağkalım süresi 3 ila 6 ay arasında değişmektedir ve dünya üzerinde en zorlu kanser türlerinden birini oluşturmaktadır (Seyed Hosseini ve ark 2021). Tedavideki en büyük zorluk semptomların geç evrede görülmesinden kaynaklanmaktadır. Tanı sırasında hastalık metastatik evrede ise hayatta kalma oranı %5' lerde iken; metastatik yayılım göstermeyen hastalarda cerrahi rezeksiyon ile sağkalım oranı %25'lere çıkabilmektedir (King ve ark 2017). Bu sebeple uygun biyobelirteçlerin tanımlanması hedefe yönelik tedavilerin bulunması, immünoterapi gibi yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması; sağkalım oranlarının yükseltilmesi ve prognozunun sevindirici yönde ilerlemesi açısından oldukça önem taşımaktadır (Cao ve ark 2021, Xu ve ark 2022).

Çeşitli bitki türlerinden elde edilen doğal özütler, genel yaralanmalarda, yara iyileşmesi ve ağrı dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için eskiden beri tercih edilen yöntemler arasında kendisine yer bulmaktadır. Doğal ürünlerin, çeşitli hastalık patolojilerine yol açan mitojenik, sitotoksik ve genotoksik reaksiyonlara neden olan çeşitli hayati hücre sinyal yollarını düzenleyen önemli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Ramana ve ark 2014). Antiinfilamatuar, antibakteriyel, antifungal ve antiviral gibi birçok farmakolojik etkiye sahip olan kinonlar, hem hücre hatlarında hem de hayvan modellerinde çok sayıda kanser türüne karşı ümit verici antiproliferatif ve antimetastatik etkiler ile yeni tedavi yöntemleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Narayanan ve ark 2022).

Aloe-emodin, lösemi, akciğer kanseri, kolon kanseri, nöroektodermal tümör, nazofaringeal karsinom, insan karsinoma hücrelerinde antikanser özelliğe sahiptir. Kanser hücrelerinde ise DNA hasarını indükleyebilmekte ve DNA onarım gen ekspresyonunu inhibe edebilmektedir. Bir başka kinon olan şikonin; kanser hücrelerinin proliferasyonunu tümör büyümesini engelleyebilme özelliğine sahiptir. Antioksidan, anti inflamatuar ve anti kanser aktiviteleri açısından araştırılan timokinon ise bitki kaynaklı sekonder metabolitlerden biridir ve karsinojenez, metastaz ve anjiyogenez gibi çok çeşitli tümörijenik süreçlere müdahale

edebilmektedir (Lu ve ark 2013). Mu ve arkadaşları, kemoterapi ilacı olarak pankreas kanserinde kullanılan gemsitabinin antikanser aktivitesini timokinon ile arttırmayı amaçladılar. Bunun için; PANC-1, AsPC-1 VE BxPC-3 pankreas kanseri hücre hatlarına uygun dozlarda timokinon ile gemsitabin uygulamasında bulundular. Doza bağlı olarak timokinonun, Bcl-2 ve Bcl-xL'nin aşağı regülasyonlarını ve Bax'in ise yukarı regülsayonlarını indüklediğini gördüler. Western blotlama ile Kaspaz-3 ve kaspaz-9'un bölünmüş aktif bileşenlerinin timokinon muamelesiyle büyük ölçüde yükseldiğini ortaya çıkardılar. İmmünofloresan analiz sonucunda ise timokinonun, P65'in çekirdeğe yer değiştirmesini ve TNF-a tarafından indüklenen fosforilasyonu kısıtladığını gördüler. Timokinon ile yapılan bu ön tedavi işlemi sonrasında gemsitabinin pankreas kanser hücrelerinde apoptotik ve büyüme inhibisyonu üzerine etkilerini önemli ölçülerde güçlendirdiğini ve gemsitabin tarafından baskılanan PTEN'i önemli ölçüde geri kazandırdığını, pankreas kanserinde Akt/mTOR'un aşağı akış aktivasyonunu kısıtladığını raporladılar (Mu ve ark 2015). 5-hidroksi-2-metil-1,4-napthoquinone molekül yapısına sahip bir başka kinon olan Plumbagin ise yine doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe edebilen başka bir kinondur. β-Lapakon; geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesiyle anti-fungal, anti-bakteriyel, anti-tripanosidal ve anti-kanser etkiler göstermektedir (Lu ve ark 2013). β-lapakonun; T24 mesane kanseri hücrelerindeki Bax ekspresyonunu arttırırken Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak kaspaz 9 ve kaspaz 3 ü aktive ettiği böylece apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (Rahman ve ark 2022). Mide kanserinde karakterize edilmiş hücre yüzeyi reseptör proteini olan Toll benzeri reseptör 2 (TLR2); proliferasyon, adezyon, migrasyon ve invazyon gibi süreçlerde rol almasından ötürü bu hastalığın terapötik hedeflerinden biridir. Li ve arkadaşları, bir naftokinon olan Shikonin antikanser özelliğinden yola çıkarak GC hücre dizisi MGC-803'te nasıl bir etkiye sahip olabileceğini araştırdılar. İnsan mide kanseri hücre hattına Shikonin muamelesi işleminden sonra yapılan Western blot analizi ve RT-PCR sonuçlarına göre metastaz için tanısal belirteç olan MCG-803 hücrelerindeki MMP' lerin ve TLR2, p65 NF-κB ekspresyonlarında azalmaolduğu görüldü. Sonuçlar Shikonin'in, mide kanseri hücrelerinde, canlılığı ve metastazı inhibe etme özelliğine sahip olduğunu gösterdi (Liu ve ark 2015).

Narayanan ve arkadaşları (2022); doğal kinonlar olan timokinon, plumbagin ve juglonun, PANC-1 hücrelerinde hücre büyümesini büyük miktarda inhibe ettiğini, özellikle juglonun inhibasyonda diğer iki kinona göre daha başarılı olduğunu ve

ROS aracılı apoptozu indüklediğini, insan pankreatik kanser hücrelerine karşı kuvvetli antimetastatik ajanlar olabileceklerini gösterdiler. Floresan AO/EB çift boyama sonrası PANC-1 hücrelerini, floresan mikroskop altında incelediklerinde morfolojik değişikliklerinden yola çıkarak kromatin yoğunlaşması ve parçalanma farklılıklarının apoptoz için anlamlı değişiklikler olduğunu gördüler. Kinon bileşikleri ile tedavinin ROS seviyelerinde artışa sebebiyet verdiğini, bu yüksek ROS seviyelerininde, hücre ölümüne duyarlılığını artırabileceğini yönünde çıkarımlar rapor ettiler (Narayanan ve ark 2022). Daha önce yapılan çalışmalarda farklı dozlara bağlı olarak meme kanseri, mide kanseri, lösemi, kolon karsinomu ve prostat kanseri gibi farklı kanser hücrelerinde juglonun apoptozu indükleyebilme kabiliyetine sahip olduğu gösterildi (Fang ve ark 2015). Juglonun antimetastatik etkisi, BxPC-3 ve PANC-1 pankreas kanseri hücre hatlarına juglon uygulaması yapılarak; MMP-2, MMP-9 ve Phactr-1 ekspresyon düzeylerinde önemli bir azalma görülmesi sonucu tespit edilmiştir. Avcı ve arkadaşlarının (2016) bu çalışması hücre invazyonunu ve metastazını inhibe etmesi ve pankreas kanserinde etkili bir antikanser ajan olarak juglonun değerlendirilebileceğini göstermiştir. Juglonun insan yumurtalık kanseri SKOV3 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisi Fang ve arkadaşları (2015) tarafından değerlendirilmiş ve juglonun, Bcl-2 seviyelerini düşürürken, Bax ve sitokrom c (Cyt c) seviyelerini arttırdığı ve MMP-2 ifadesini açıkça azalttığı görülmüştür. Juglonun önemli bir antitümör etkiye sahip olduğu, anti-kanser tedavisi için potansiyel bir aday olarak kabul edilebilir özelliğe sahip olduğu sonucu vugulanmıştır. Juglonun başka bir çalışmada Wnt/β-katenin sinyalini hedefleyerek pankreas kanseri hücrelerinde anjiyogenezi ve metastazı inhibe edebilir etkiye sahip olduğu Göktürk ve arkadaşları (2021) tarafından ortaya konulmuştur. BxPC-3 ve PANC-1 insan PK hücre hatları üzerinde juglonun antimetastatik ve antianjiyogenik etkileri; CCND1, MMP-7 ve TCF7L2'nin ekspresyonlarında doza bağlı olarak değişikliklerin değerlendirilmesiyle gösterilmiştir.

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmaların sonuçları; doğal ürünlerin insan kanserlerinden korunmada çeşitli yönlerde etkileyerek fayda sağladığını ve son çalışmaların doğal kaynaklardan yeni antikanser ajanları keşfetmeye yönelik atılımlar olduğunu göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda juglonun pankreas kanseri hücrelerinde, doz bağlı olarak apoptozu tetiklediği, adhezyon ve invazyon moleküllerini inhibe ederek antimetastatik etkiye sahip olduğunu yapılan deneyler sonucunda ortaya koyulmuştur (Tang ve ark 2022). Biz bu çalışmamızda ise

pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini, hücre proliferasyon belirteçleri olan PIK3R1, PCNA ve IGF-1R düzeylerini analiz ederek değerlendirdik.

Kanser hücrelerinin temel özellikleri arasında yer alan proliferasyon, normal dokuların hücre büyümesini kontrol edememesi ve hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi yönlendiren, büyümeyi teşvik eden sinyal üretiminin kontrolden çıkması sonucu oluşur ve homeostazın sağlanamaması durumuyla sonuçlanır. Kanser hücreleri, proliferatif sinyali sürdürme kabiliyetini, kendileri büyüme faktörü ligandları üreterek ya da kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak karşılık veren, destekleyici tümörle ilişkili stroma içindeki normal hücreleri uyararak yapar. Bu sinyaller de büyük ölçüde hücre içi tirozin kinaz alanlarını içeren hücre yüzeyi reseptörlerini bağlayan büyüme faktörleri tarafından iletilir (Hanahan ve Weinberg 2011).

PI3K/Akt, yalnızca tümör gelişiminde değil aynı zamanda tümörün kanser tedavisine potansiyel yanıtını anlamada da önemli olan bir sinyal yoludur (Vara ve ark 2004). Fosfoinositid-3-OH kinazın (PI3K), hücrenin hayatta kalması, büyümesi, çoğalması ve hareketliliği dahil olmak üzere birçok hücresel süreçlerde yer aldığı bilinmektedir. PI3K'nin PIK3R1 tarafından kodlanan düzenleyici alt birimi (p85), PI3K/Akt sinyali üzerinde pozitif veya negatif düzenleyici olarak işlev görmektedir (Jaiswal ve ark 2009).

PI3K yolunun merkez üyelerinden olan PIK3R1geni, kanser türleri arasında en sık mutasyona uğrayan 12. gendir. PIK3R1 mutasyonlarının işlevsel sonuçlarını araştıran birçok çalışma, PIK3R1 mutasyonlarının bir alt kümesinin işlevsel görevi olduğunu ve bu sürücü mutasyonları hedeflemenin kanserde tedavi sağlama potansiyeline sahip olduğunu ortaya çıkardı (Liu ve ark 2022).

Cizkova ve arkadaşları (2013) meme, Sanchez-Carbayo ve arkadaşları (2006) mesane, Li ve arkadaşları (2019) ise yumurtalık kanserinde PIK3R1 ekspresyonunun azaldığını gösterdiler. Chakraborty ve arkadaşları (2022), prostat kanserinde PIK3R1 mutasyonlarının ve insülin-PI3K-glikolitik yol düzenlemesinin etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, Prostat kanseri hücre hatlarında, PIK3R1 yıkımı ile hücre proliferasyonunun ve AKT aktivitesinin artmasına neden olduğunu gösterdiler . Zhu ve arkadaşları 2019 yılında, 547 Çinli pankreas kanseri hastasında genel sağkalım ile PKN1/FAK/PI3K/AKT yolağına ait 16 genin genetik varyantları arasındaki ilişkiyi SNP genotipleme ile incelediler. Yapılan analiz sonucu genetik

varyantların, PIK3R1 ekspresyonunu düzenleyerek pankreas kanseri hastalarının genel sağkalımı üzerinde etkili olabileceğini savundular (Zhu ve ark 2019).

Çalışmamızda da BxPC-3 hücre hattında yapılan 24 saatlik juglon uygulamasında PIK3R1 gen ifadesinde; 5 µM juglon uygulamada azalma ve diğer dozlarda ise ifade artışına neden olduğu tespit edildi. PI3K/Akt yolağının düzenlenmesinde PIK3R1'in (p85α), pozitif ve negatif etkisinin olması yolağın aktivasyonu karmaşık hale getirmektedir ve tümörigeneze nasıl katkı yaptığı belirsizdir. Bununla birlikte, pankreas kanserini de içeren birçok kanserde genin mutant olduğu ya da upregüle olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda 5 µM'de azalma etkisi, bu dozlarda geni inhibe ederek antiproliferatif etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte yapılan bazı fonksiyonel çalışmalarda, PIK3R1' in aktivasyonuna bağlı aşırı p85α üretiminin de PI3K aktivitesini inhibe edebileceğini ve bu şekilde de AKT yolunun proliferasyon etkisini azaltabileceğini önermektedir. 10, 15 ve 20 µM juglon konsantrasyonlarında PIK3R1 gen ifadesindeki artışı bu yönde değerlendirmemiz mümkün olabilir.

Prolifere hücre çekirdek antijeni PCNA, DNA'yı sararak DNA polimerazlar için kofaktör görevi üstlenir. Replikasyon sırasında önemli düzenlemeler yaparak birçok işlevin sorumluluğunu yerine getirir ve DNA sentezinin büyük bölümünde görev alan enzimlerin işlenebilirlik seviyesini yükseltir (Moldovan ve ark 2007). Kısaca DNA replikasyon, onarım ve hücre döngüsü kontrolünde yer alarak hücrenin yaşam ve ölüm kararlarından sorumlu merkezi moleküllerden birisi olur ve PCNA'nın, hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde artış göstermesi ve çoğalan hücrelerinde G1/S fazında uzun süre kalması onu hücre proliferasyonunda önemli bir biyomarker yapar (Bologna-Molina ve ark 2013, Jurikova ve ark 2016).

Lee ve arkadaşları (1993), pankreas karsinomu ve kronik pankreatit arasındaki ayrımı değerlendirmek için, immünohistokimyasal boyama yaptılar ve PCNA düzeyleri arasındaki farkın pankreatik adenokarsinomda kronik pankreatite göre anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettiler. Smith ve arkadaşları (2020), normal pankreastan ve pankreatik duktal adenokarsinomdan mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ederek verileri karşılatırdılar. PCNA'nın pankreas kanserlerinde normal pankreasla karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek şekilde ifade edildiğini gösterdiler.

Farklı dozlarda juglon muamelesinde bulunduğumuz BxPC-3 kanser hücre hatlarında hücre profilerasyonu değerlendirmek için PCNA proteini için immün boyama yapıldı. Çalışma sonuçlarımıza göre juglonun, tüm uygulama dozlarında direkt proliferasyon belirteci olan PCNA protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskılayabildiği görüldü. qPCR yöntemi ile PCNA'ın ifade düzeyi değerlendirildiğinde ise, 15 μM doz haricindeki diğer tüm dozlarda juglonun PCNA ifadesinde azalmaya neden olduğu görüldü.

Malign tümörlerdeki önemli rolleri kanıtlanan insülin büyüme faktörü 1 reseptörü, kanser tedavisi için umut verici bir hedeftir. Birçok fizyolojik süreçte kilit rolde bulunan IGF1-R, artan IGF-1R aktivitesi sonucunda, kanser hücresi proliferasyonunu, göçünü ve istilasını desteklemektedir. İnsülin büyüme faktörü 1 reseptörünün aşırı ekspresyonu; akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, glioma, gastrointestinal kanser (yemek borusu, mide, pankreas , karaciğer, kolon, rektum ve anüs gibi sindirim sistemi içinde herhangi bir yerde meydana gelen kanserler) dahil olmak üzere birçok kanser türünde rapor edilmiş ve kanser hastalarının kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir (Sun ve ark 2017).

Maor ve arkadaşları (2007), BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarından ve taşıyıcı olmayan hastaların birincil meme tümörlerinden IGF-IR 'nin immünohistokimyasal analizini gerçekleştirdiler. IGF1-R'nin BRCA1 mutasyonu taşıyıcı hastaların meme tümörlerinde oldukça fazla ifade edildiğini ve meme kanserinde moleküler hedef olabileceği sonucuna vardılar (Maor ve ark 2007). Hirakawa ve arkadaşları (2013), IGF-1R pozitif ifadeye sahip olan PDAC hastalarının, IGF-1R negatif gruba kıyasla kötü bir şekilde hayatta kaldığını immunohistokimyasal çalışma ile gösterdi ve insülin benzeri büyüme faktörü-I reseptörünün aşırı ekspresyonunun, PDAC'li hastalarda kötü prognoz ile ilişkilendirdiler (Hirakawa ve ark 2013).

Pankreas kanseri tümörlerinin etrafını kaplayan stromal hücrelerde de eksprese edilen IGF-1R, pankreas tümörlerini hedeflemek için uygun bir biyolojik faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Lu ve ark 2019). Çalışmamızda BxPC-3 hücre hattında yapılan 24 saatlik juglon uygulamasında IGF-1R ifadesini değerlendirdik ve IGF-1R gen ekspresyonunda 5 uM dozda 2,5 ve 20 uM dozda 1,3 dozda bir azalış varken; 10 uM dozda 0,6 ve 15 uM dozda 2,4 bir artış olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlar, yapılacak daha hassas doz ayarlamaları ile juglonun; pankreas kanseri

hücrelerinde IGF-1R gen ekspresyonunun azaltılması ve genin etkinliğinin baskılanmasıyla pankreas kanseri tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ

Çalışmamızda; BxPC3 pankreas kanseri hücrelerinde juglon uygulamasının, hücre proliferasyon belirteci olan PCNA geni ve kanser hücrelerinde apoptozis, anjiyogenezis ve invazyon süreçlerinde etkili olduğu bilinen IGF1R geni ile IGF1R reseptörünün hedefi olan PI3K/Akt sinyal yolunda iş gören PIK3R1 gen ekspresyonları üzerine etkileri moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

Çalışma sonunda, BxPC-3 pankreas kanseri hücre hattında 24 saat süresince 5, 10, 15 ve 20 μM konsantrasyonlarında juglon uygulaması sonucunda 5 uM doz (0,2kat azalış) dışındaki tüm dozlarda PIK3R1 gen ifadesi sırasıyla 1,4-0,8 ve 2,5 kat artmıştır. Juglonun 5 μM'daki azalma etkisi, bu dozlarda geni inhibe ederek antiproliferatif etki gösterebileceğini bununla birlikte 10, 15 ve 20 μM juglon konsantrasyonlarında PIK3R1 gen ifadesindeki artışı ise PIK3R1 in aktivasyonuna bağlı aşırı p85α üretiminin de PI3K aktivitesini inhibe edebileceğini ve bu şekilde de AKT yolunun proliferasyon etkisini azaltabileceğini düşündürmektedir.

BxPC3 hücrelerinde 24 s juglon muamelesi sonrasında, PCNA protein düzeyinin immunofluoresans analizi ve qPCR analizi ile belirlenen gen ifade düzeyleri hem gen hem protein düzeyinde juglonun tüm uygulama dozlarında PCNA önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edildi.

IGF-1R ifadesine bakıldığında ise; IGF-1R gen ekspresyonunda 5 uM dozda 2,5 ve 20 uM dozda 1,3 dozda bir azalış varken; 10 uM dozda 0,6 ve 15 uM dozda 2,4 bir artış olduğu tespit edildi.

Daha önceki yapılan çalışmalarda juglonun pankreas kanseri hücrelerinde, doz bağlı olarak apoptozu tetiklediği, adhezyon ve invazyon moleküllerini inhibe ederek antimetastatik etkiye sahip olduğunu gösterilmişti. Biz bu çalışmamızda Juglonun pankreas kanserindeki antiproliferatif etkisini immunohistokimya ile PCNA proteinindeki ekspresyon azalışını ve qPCR ile gen ifadesindeki azalışı göstererek tespit ettik. Farklı dozlarda yapılan gen ekspresyonu analizi sonucu;

PIK3R1 ve IGF1R genlerindeki ifadelerin yine juglonun proliferasyon üzerine etkisini desteklemiş olduk. Çalışmamız bu konuda yapılan çalışmalar arasında, BxPC3 insan pankreas kanseri hücrelerinde Juglon uygulamasının, IGF1R, PCNA ve PI3K/Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisinin belirlenmesi, tümör büyümesini, invazyon ve metastazını ne yönde etkilediğinin ortaya koyulabilmesi açısından yapılan ilk çalışma niteliğindedir. Pankreas kanserinde proliferasyon ve sonrasında invazyon ve metastazı inhibe etme özelliği gösteren kemoterapötik ajanlar büyük önem taşıdığından çalışmamız bu anlamda önemlidir. Elde edilen veriler juglonun, bu agresif kanserin proliferasyonu ve invazyonununun baskılanabilmesi ve pankreas kanserinde alternatif bir tedavi seçeneği olabilmesi için potansiyeline dair sonuçlar ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, juglon pankreas kanserinin tedavi edilmesi ve gelişimini önlemek için umut verici bir ajan olarak karşımıza çıkmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Ahmad T, Suzuki YJ, 2019. Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. Antioxidants, 8, 4, 91.

Amrutkar M, Gladhaug IP, 2017. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. Cancers, 9, 11, 157.

Annunziata M, Granata R, Ghigo E, 2011. The IGF system. Acta diabetologica, 48, 1, 1-9.

Ansari D, Tingstedt B, Andersson B, Holmquist F, Sturesson C, Williamsson C, Sasor A, Borg D, Bauden M, Andersson R, 2016. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. Future oncology, 12, 16, 1929-46.

Arao S, Masumoto A, Otsuki M, 2000. β1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. Pancreas, 20, 2, 129-37.

Avcı E, Arıkoğlu H, Kaya DE, 2016. Investigation of juglone effects on metastasis and angiogenesis in pancreatic cancer cells. Gene, 588, 1, 74-8.

Baykara O, 2016. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşimlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 3, 154-65.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G, 2013. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal, 18, 2, e174.

Boyd LN, Ali M, Kam L, Puik JR, Rodrigues SMF, Zwart ES, Daams F, Zonderhuis BM, Meijer LL, Le Large TY, 2022. The Diagnostic Value of the CA19-9 and Bilirubin Ratio in Patients with Pancreatic Cancer, Distal Bile Duct Cancer and Benign Periampullary Diseases, a Novel Approach. Cancers, 14, 2, 344.

Brunner M, Wu Z, Krautz C, Pilarsky C, Grützmann R, Weber GF, 2019. Current clinical strategies of pancreatic cancer treatment and open molecular questions. International journal of molecular sciences, 20, 18, 4543.

BSc AR, 2022. Pancreas. https://www.kenhub.com/.

Burke JE, Williams RL, 2015. Synergy in activating class I PI3Ks. Trends in biochemical sciences, 40, 2, 88-100.

Cai D, Ma X, Guo H, Zhang H, Bian A, Yu H, Cheng W, 2022. Prognostic value of p16, p53, and pcna in sarcoma and an evaluation of immune infiltration. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 17, 1, 1-14.

Cao D, Song Q, Li J, Jiang Y, Wang Z, Lu S, 2021. Opportunities and challenges in targeted therapy and immunotherapy for pancreatic cancer. Expert Reviews in Molecular Medicine, 23.

Chandra R, Liddle RA, 2011. Recent advances in pancreatic endocrine and exocrine secretion. Current opinion in gastroenterology, 27, 5, 439.

Cicenas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicenas Jr J, 2017. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 mutations in pancreatic cancer. Cancers, 9, 5, 42.

ÇETİN Ş, İsa D, 2019. Pankreas Kanserinde Progrostik Faktörler. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 26, 1, 30-4.

Dariya B, Alam A, Nagaraju GP, 2019. Biology, pathophysiology, and epidemiology of pancreatic cancer. In: Theranostic Approach for Pancreatic Cancer. Eds: Elsevier, p. 1-50.
Daulton E, Wicaksono AN, Tiele A, Kocher HM, Debernardi S, Crnogorac-Jurcevic T, Covington JA, 2021. Volatile organic compounds (VOCs) for the non-invasive detection of pancreatic cancer from urine. Talanta, 221, 121604.
Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ, 2010. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. Pancreas, 39, 4, 425-35.
Demirtürk N, Bilensoy E, 2022. Nanocarriers targeting the diseases of the pancreas. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 170, 10-23.
DeWeerdt S, 2021. The origins of ovarian cancer. Nature, 600, 7889, S42-S4.
Di Magliano MP, Logsdon CD, 2013. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. Gastroenterology, 144, 6, 1220-9.
Einoch Amor R, Zinger A, Broza YY, Schroeder A, Haick H, 2022. Artificially Intelligent Nanoarray Detects Various Cancers by Liquid Biopsy of Volatile Markers. Advanced Healthcare Materials, 11, 17, 2200356.
ERMAYA M, DEMİR H, 2019. Pankreas Kanserinin Beslenme ile İlişkisi. Tıp ve Sağlık Bilimleri, 45.
Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D, 2014. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. British journal of cancer, 111, 5, 817-22.
Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W, 2005. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. Molecular and cellular biology, 25, 21, 9350-9.
Fang F, Qin Y, Qi L, Fang Q, Zhao L, Chen S, Li Q, Zhang D, Wang L, 2015. Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells. Iranian journal of basic medical sciences, 18, 6, 544.
Feng Y, Liu H, Duan B, Liu Z, Abbruzzese J, Walsh KM, Zhang X, Wei Q, 2019. Potential functional variants in SMC2 and TP53 in the AURORA pathway genes and risk of pancreatic cancer. Carcinogenesis, 40, 4, 521-8.
Friess H, Kleeff J, Klockow N, Ebert M, Malfertheiner P, Büchler M, 1999. Molekulare Veränderungen bei Pankreas-und periampullären Karzinomen. Visceral Medicine, 15, 2, 150-7.
Fürstenberger G, Senn H-J, 2002. Insulin-like growth factors and cancer. The lancet oncology, 3, 5, 298-302.
Gkioka E, Msaouel P, Philippou A, Vlachogiannis NI, Vogkou CT, Margiolis A, Koutsilieris M, 2015. The role of insulin-like growth factor-1 signaling pathways in uterine leiomyoma. in vivo, 29, 6, 637-49.
Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, Qi X, Lou H, Liang J, Jonasch E, Mills GB, 2015. The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma. Journal of genetics and genomics, 42, 7, 343-53.
Guo L, Wang A, Hu P, Tian A, Hao R, Yu D, Yang J, Chen D, Wang H, 2018. Renewable juglone nanowires with size-dependent charge storage properties. RSC advances, 8, 4, 2077-81.
Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144, 5, 646-74.
Hidalgo M, 2010. Pancreatic cancer. New England Journal of Medicine, 362, 17, 1605-17.
Hirakawa T, Yashiro M, Murata A, Hirata K, Kimura K, Amano R, Yamada N, Nakata B, Hirakawa K, 2013. IGF-1 receptor and IGF binding protein-3

might predict prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. BMC cancer, 13, 1, 1-9.
Huang X, Liu G, Guo J, Su Z, 2018. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. International journal of biological sciences, 14, 11, 1483.
Huang X, Zhi X, Gao Y, Ta N, Jiang H, Zheng J, 2016. LncRNAs in pancreatic cancer. Oncotarget, 7, 35, 57379.
Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M, 2005. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. British journal of cancer, 92, 11, 2076-83.
Hwang RF, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D, 1998. Gene therapy for primary and metastatic pancreatic cancer with intraperitoneal retroviral vector bearing the wild-type p53 gene. Surgery, 124, 2, 143-51.
Hwang WL, Jagadeesh KA, Guo JA, Hoffman HI, Yadollahpour P, Reeves JW, Mohan R, Drokhlyansky E, Van Wittenberghe N, Ashenberg O, 2022. Single-nucleus and spatial transcriptome profiling of pancreatic cancer identifies multicellular dynamics associated with neoadjuvant treatment. Nature Genetics, 54, 8, 1178-91.
Iacobuzio-Donahue CA, Velculescu VE, Wolfgang CL, Hruban RH, 2012. Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. Clinical cancer research, 18, 16, 4257-65.
Ilic M, Ilic I, 2016. Epidemiology of pancreatic cancer. World journal of gastroenterology, 22, 44, 9694.
Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, Kan Z, Dbouk HA, Peters BA, Waring P, 2009. Somatic mutations in p85α promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. Cancer cell, 16, 6, 463-74.
Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D, 2011. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 61, 2, 69-90.
Jurikova M, Danihel Ľ, Polák Š, Varga I, 2016. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. Acta histochemica, 118, 5, 544-52.
Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K, 2016. Pancreatic cancer. The Lancet, 388, 10039, 73-85.
Kanda M, Sadakari Y, Borges M, Topazian M, Farrell J, Syngal S, Lee J, Kamel I, Lennon AM, Knight S, 2013. Mutant TP53 in duodenal samples of pancreatic juice from patients with pancreatic cancer or high-grade dysplasia. Clinical gastroenterology and hepatology, 11, 6, 719-30. e5.
Karar J, Maity A, 2011. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. Frontiers in molecular neuroscience, 4, 51.
Karki N, 2016. In vitro investigation on therapeutic potential of juglone, a naphthoquinone from walnuts against pancreatic cancer.
Keane M, Horsfall L, Rait G, Pereira S, 2014. A case–control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. BMJ open, 4, 11, e005720.
Keleş M, Türkeli M, 2005. İnsülin benzeri büyüme faktörü sistemi ve kanser. Tıp Araştırmaları Dergisi, 3, 2, 39-43.
Kelman Z, 1997. PCNA: structure, functions and interactions. Oncogene, 14, 6, 629-40.
Kenner B, Chari ST, Kelsen D, Klimstra DS, Pandol SJ, Rosenthal M, Rustgi AK, Taylor JA, Yala A, Abul-Husn N, Andersen DK, Bernstein D, Brunak S,

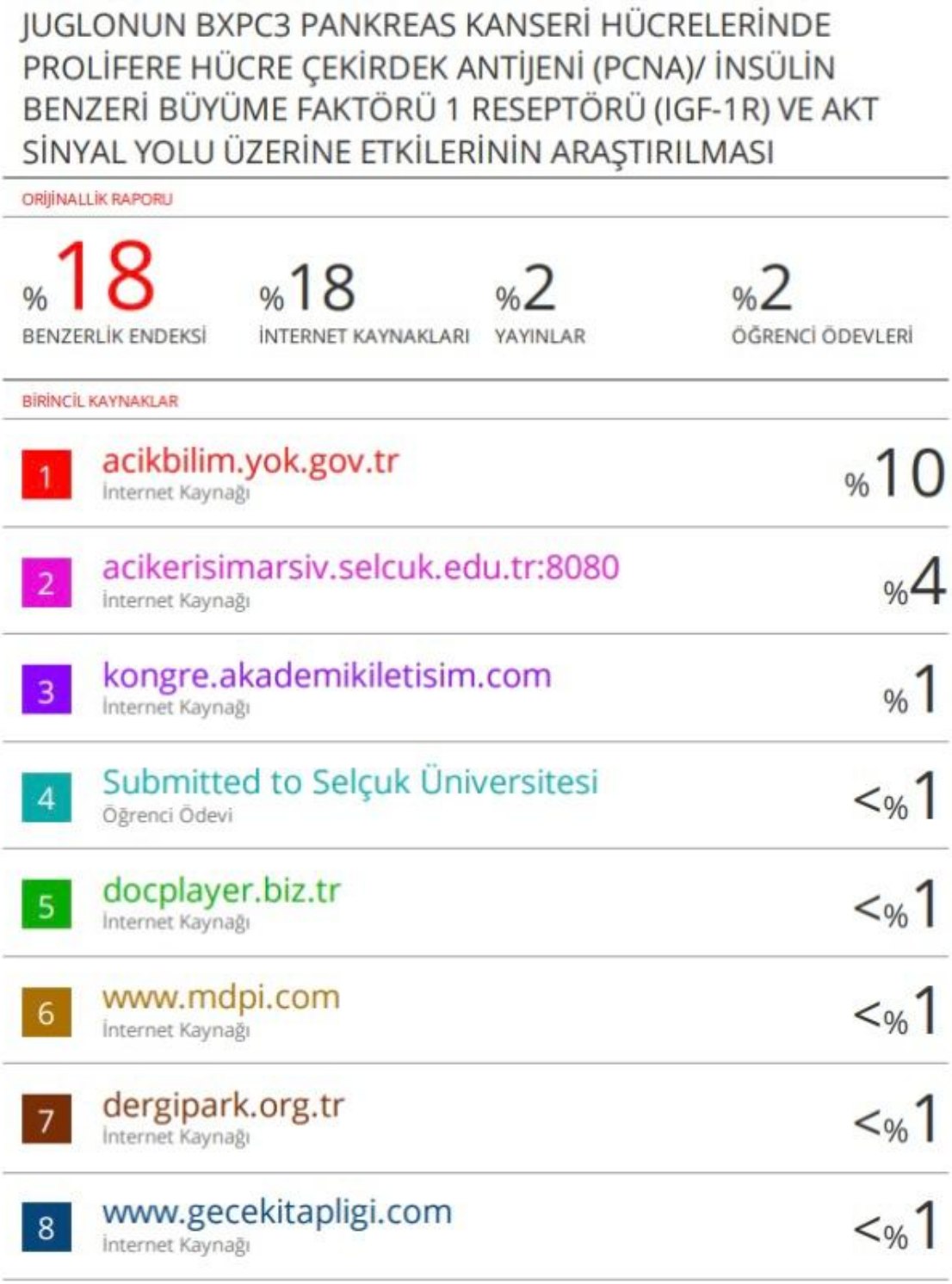
Canto MI, Eldar YC, Fishman EK, Fleshman J, Go VLW, Holt JM, Field B, Goldberg A, Hoos W, Iacobuzio-Donahue C, Li D, Lidgard G, Maitra A, Matrisian LM, Poblete S, Rothschild L, Sander C, Schwartz LH, Shalit U, Srivastava S, Wolpin B, 2021. Artificial Intelligence and Early Detection of Pancreatic Cancer: 2020 Summative Review. Pancreas, 50, 3, 251-79.
Kim S, Park BK, Seo JH, Choi J, Choi JW, Lee CK, Chung JB, Park Y, Kim DW, 2020. Carbohydrate antigen 19-9 elevation without evidence of malignant or pancreatobiliary diseases. Scientific reports, 10, 1, 1-9.
King J, Bouvet M, Singh G, Williams J, 2017. Improving theranostics in pancreatic cancer. Journal of surgical oncology, 116, 1, 104-13.
Klammt J, Kiess W, Pfäffle R, 2011. IGF1R mutations as cause of SGA. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 25, 1, 191-206.
Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL, 2004. Pancreatic cancer. The Lancet, 363, 9414, 1049-57.
Lipner MB, Yeh JJ, 2018. Sequencing pancreatic juice: squeezing the most out of surveillance. Clinical Cancer Research, 24, 12, 2713-5.
Liu JP, Liu D, Gu JF, Zhu MM, Cui L, 2015. Shikonin inhibits the cell viability, adhesion, invasion and migration of the human gastric cancer cell line MGC-803 via the Toll-like receptor 2/nuclear factor-kappa B pathway. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 67, 8, 1143-55.
Liu L, Kshirsagar PG, Gautam SK, Gulati M, Wafa EI, Christiansen JC, White BM, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Kumar S, 2022. Nanocarriers for pancreatic cancer imaging, treatments, and immunotherapies. Theranostics, 12, 3, 1030.
Liu Y, Wang D, Li Z, Li X, Jin M, Jia N, Cui X, Hu G, Tang T, Yu Q, 2022. Pan-cancer analysis on the role of PIK3R1 and PIK3R2 in human tumors. Scientific reports, 12, 1, 1-12.
Lowenfels AB, Maisonneuve P, 2002. Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer. Hematology/Oncology Clinics, 16, 1, 1-16.
Lu G-H, Shang W-T, Deng H, Han Z-Y, Hu M, Liang X-Y, Fang C-H, Zhu X-H, Fan Y-F, Tian J, 2019. Targeting carbon nanotubes based on IGF-1R for photothermal therapy of orthotopic pancreatic cancer guided by optical imaging. Biomaterials, 195, 13-22.
Lu J-J, Bao J-L, Wu G-S, Xu W-S, Huang M-Q, Chen X-P, Wang Y-T, 2013. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 13, 3, 456-63.
Luo J, Manning BD, Cantley LC, 2003. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer cell, 4, 4, 257-62.
Madhumati G, Kavita S, Anju M, Uma S, Raj M, 2012. Immunohistochemical expression of cell proliferating nuclear antigen (PCNA) and p53 protein in cervical cancer. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India, 62, 5, 557-61.
Maitra A, Hruban RH, 2008. Pancreatic cancer. Annual review of pathology, 3, 157.
Maitra A, Kern SE, Hruban RH, 2006. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. Best practice & research Clinical gastroenterology, 20, 2, 211-26.
Maor S, Yosepovich A, Papa MZ, Yarden RI, Mayer D, Friedman E, Werner H, 2007. Elevated insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) levels in primary breast tumors associated with BRCA1 mutations. Cancer letters, 257, 2, 236-43.

Martinez-Useros J, Martin-Galan M, Garcia-Foncillas J, 2021. The match between molecular subtypes, histology and microenvironment of pancreatic cancer and its relevance for chemoresistance. Cancers, 13, 2, 322.
McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS, 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World journal of gastroenterology, 24, 43, 4846.
Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S, 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. Cell, 129, 4, 665-79.
Momi N, Kaur S, Krishn S, Batra SK, 2012. Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer. Minerva gastroenterologica e dietologica, 58, 4, 283.
Moniri M, Dai L, Warnock G, 2014. The challenge of pancreatic cancer therapy and novel treatment strategy using engineered mesenchymal stem cells. Cancer gene therapy, 21, 1, 12-23.
Mortazavi M, Moosavi F, Martini M, Giovannetti E, Firuzi O, 2022. Prospects of targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in pancreatic cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 103749.
Mu G-g, Zhang L-l, Li H-y, Liao Y, Yu H-g, 2015. Thymoquinone pretreatment overcomes the insensitivity and potentiates the antitumor effect of gemcitabine through abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR regulated signaling pathways in pancreatic cancer. Digestive diseases and sciences, 60, 4, 1067-80.
Narayanan P, Farghadani R, Nyamathulla S, Rajarajeswaran J, Thirugnanasampandan R, Bhuwaneswari G, 2022. Natural quinones induce ROS- mediated apoptosis and inhibit cell migration in PANC- 1 human pancreatic cancer cell line. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, e23008.
Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, Sadreddini S, Baradaran B, 2019. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. Gene, 698, 120-8.
ÖZENOĞLU A, ERDAĞ E, 2022. PANKREAS KANSERİ, DİYABET VE DİYET İLİŞKİSİ. Beslenme ve Diyetetikte Biyopsikososyal Konulara Multidisipliner Yaklaşım, 175.
Paunesku T, Mittal S, Protić M, Oryhon J, Korolev S, Joachimiak A, Woloschak G, 2001. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. International journal of radiation biology, 77, 10, 1007-21.
Pelosi E, Castelli G, Testa U, 2017. Pancreatic cancer: molecular characterization, clonal evolution and cancer stem cells. Biomedicines, 5, 4, 65.
Pliarchopoulou K, Pectasides D, 2009. Pancreatic cancer: current and future treatment strategies. Cancer treatment reviews, 35, 5, 431-6.
Princivalle A, Monasta L, Butturini G, Bassi C, Perbellini L, 2018. Pancreatic ductal adenocarcinoma can be detected by analysis of volatile organic compounds (VOCs) in alveolar air. BMC cancer, 18, 1, 1-10.
Rahman MM, Islam MR, Akash S, Shohag S, Ahmed L, Supti FA, Rauf A, Aljohani AM, Al Abdulmonem W, Khalil AA, 2022. Naphthoquinones and derivatives as potential anticancer agents: An updated review. Chemico-Biological Interactions, 110198.
Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R, 2010. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. Best practice & research Clinical gastroenterology, 24, 3, 349-58.

Ramana KV, Singhal SS, Reddy AB, 2014. Therapeutic potential of natural pharmacological agents in the treatment of human diseases. BioMed research international, 2014.
Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, T O'Dwyer S, Shalet SM, Egger M, 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. The Lancet, 363, 9418, 1346-53.
Riedemann J, Macaulay V, 2006. IGF1R signalling and its inhibition. Endocrine-related cancer, 13, Supplement_1, S33-S43.
Saif MW, 2011. Pancreatic neoplasm in 2011: an update. JOP. Journal of the Pancreas, 12, 4, 316-21.
Seyed Hosseini E, Nikkhah A, Sotudeh A, Alizadeh Zarei M, Izadpanah F, Nikzad H, Haddad Kashani H, 2021. The impact of LncRNA dysregulation on clinicopathology and survival of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis (PRISMA compliant). Cancer Cell International, 21, 1, 1-14.
Singh D, Upadhyay G, Srivastava RK, Shankar S, 2015. Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1856, 1, 13-27.
Slack JM, 1995. Developmental biology of the pancreas. Development, 121, 6, 1569-80.
Sun Y, Sun X, Shen B, 2017. Molecular imaging of IGF-1R in cancer. Molecular imaging, 16, 1536012117736648.
Tang YT, Li Y, Chu P, Ma XD, Tang ZY, Sun ZL, 2022. Molecular biological mechanism of action in cancer therapies: Juglone and its derivatives, the future of development. Biomedicine & Pharmacotherapy, 148, 112785.
Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao G-H, Testa JR, 2001. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. Cancer research, 61, 2, 589-93.
Terzi I, 2008. Allelopathic effects of Juglone and decomposed walnut leaf juice on muskmelon and cucumber seed germination and seedling growth. African Journal of Biotechnology, 7, 12.
Tsuboi Y, Ichida T, Sugitani S, Genda T, Inayoshi J, Takamura M, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y, 2004. Overexpression of extracellular signal- regulated protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma. Liver international, 24, 5, 432-6.
Valentinis B, Baserga R, 2001. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. Molecular Pathology, 54, 3, 133.
Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M, 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer treatment reviews, 30, 2, 193-204.
Verma RP, 2006. Anti-cancer activities of 1, 4-naphthoquinones: a QSAR study. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 6, 5, 489-99.
Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M, 2011. Pancreatic cancer. The lancet, 378, 9791, 607-20.
Wang K, Hao Z, Fu X, Li W, Jiao A, Hua X, 2022. Involvement of elevated ASF1B in the poor prognosis and tumorigenesis in pancreatic cancer. Molecular and Cellular Biochemistry, 1-11.

Wang S-C, 2014. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? Trends in pharmacological sciences, 35, 4, 178-86.
West KA, Castillo SS, Dennis PA, 2002. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. Drug resistance updates, 5, 6, 234-48.
Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH, 2013. Recent progress in pancreatic cancer. CA: a cancer journal for clinicians, 63, 5, 318-48.
Wood LD, Hruban RH, 2012. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. Cancer journal (Sudbury, Mass.), 18, 6, 492.
Xia X, Wu W, Huang C, Cen G, Jiang T, Cao J, Huang K, Qiu Z, 2015. SMAD4 and its role in pancreatic cancer. Tumor Biology, 36, 1, 111-9.
Xu J, Xu J, Liu X, Jiang J, 2022. The role of lncRNA-mediated ceRNA regulatory networks in pancreatic cancer. Cell death discovery, 8, 1, 1-11.
Yuan T, Cantley L, 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene, 27, 41, 5497-510.
Zhang X-B, Zou C-L, Duan Y-X, Wu F, Li G, 2015. Activity guided isolation and modification of juglone from Juglans regia as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 1, 1-8.
Zhu Y, Ke J, Gong Y, Yang Y, Peng X, Tian J, Zou D, Yang N, Wang X, Mei S, 2019. A genetic variant in PIK3R1 is associated with pancreatic cancer survival in the Chinese population. Cancer medicine, 8, 7, 3575-82.

EK B: TURNITIN RAPORU



JUGLONUN BXPC3 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE PROLİFERE HÜCRE ÇEKİRDEK ANTİJENİ (PCNA)/ İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ 1 RESEPTÖRÜ (IGF-1R) VE AKT SİNYAL YOLU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%18	%18	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%10
2	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%4
3	kongre.akademikiletisim.com İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.gecekitapligi.com İnternet Kaynağı	<%1

9	www.protontedavisi.com İnternet Kaynağı	<%1
10	open.library.ubc.ca İnternet Kaynağı	<%1
11	patentimages.storage.googleapis.com İnternet Kaynağı	<%1
12	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
13	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
14	nanopdf.com İnternet Kaynağı	<%1
15	www.nedirnedemek.com İnternet Kaynağı	<%1
16	www.tdx.cat İnternet Kaynağı	<%1
17	econvisnyk.dstu.dp.ua İnternet Kaynağı	<%1
18	www.medikaynak.com İnternet Kaynağı	<%1
19	www.pubfacts.com İnternet Kaynağı	<%1
20	www.scribd.com	

	İnternet Kaynağı	<%1
21	www.bioexpo.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
22	www.sid.ir İnternet Kaynağı	<%1
23	Klaartje Kok, Barbara Geering, Bart Vanhaesebroeck. "Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease", Trends in Biochemical Sciences, 2009 Yayın	<%1
24	gs.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
25	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1
26	marmoresegranitosdonorte.co.mz İnternet Kaynağı	<%1
27	Silvia D. Stan, Shivendra V. Singh, Randall E. Brand. "Chemoprevention strategies for pancreatic cancer", Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2010 Yayın	<%1
28	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1