

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARNOSİK ASİT VE GALLİK ASİTİN PANC-1 PANKREAS
HÜCRELERİNDE HNF1A GENİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

ELİF DENİZ ÜNAL

KOCAELİ 2021

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARNOSİK ASİT VE GALLİK ASİTİN PANC-1 PANKREAS
HÜCRELERİNDE HNF1A GENİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

ELİF DENİZ ÜNAL

**Dr. Öğr. Üyesi Gülçin Gacar
Danışman, Kocaeli Üniv.**

.....

**Doç. Dr. Üyesi Yonca Yüzügüllü Karakus
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.**

.....

**Dr. Öğr. Üyesi Özlem Sağlam Uçar
Jüri Üyesi, Haliç Üniv.**

.....

Projenin Savunulduğu Tarih: 25.06.2021

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, karnosik asit ve gallik asitin PANC-1 pankreas hücrelerinde HNF1A geni üzerine sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen, çalışmalarına yön veren, bana güvenen ve yüreklendiren danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca görüşleri ile çalışmalarına katkıda bulunan, karşılaştığım her zorlukta desteğini ve zamanını esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşım Sema YUSUFOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın belli aşamalarında bilgi ve destekleriyle katkıda bulunan hocam Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI'na teşekkür ediyorum.

Akademik çalışmalarım sırasında, birçok aşamada beni destekleyen KÖGEM araştırma görevlilerine teşekkür ediyorum.

Fen Bilimleri Enstitüsü'ndeki çalışma hayatım boyunca, üzerimdeki emekleri için minnettar olduğum Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca bana güç veren en büyük destekçilerim, her aşamada sıkıntılarımı ve mutluluklarımı paylaşan sevgili babam Dursun UZUN, annem Huriye UZUN, canım oğlum Ağâh Mirza Ünal, eşim Ömer ÜNAL ve merhume kayımvalidem Yurdağül GÖZÜTOK'a teşekkürlerimi sunarım.

Haziran-2021

Elif Deniz ÜNAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Pankreasın Anatomisi.....	3
1.2. Pankreas Kanseri	5
1.2.1. Kanser	5
1.2.2. Pankreas intraepitelyal neoplazi (PanIN)	10
1.2.3. İntraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN).....	11
1.2.4. Müsinöz kistik neoplazm (MCN)	12
1.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	13
1.3.1. Sigara	14
1.3.2. Alkol	15
1.3.3. Yaş	15
1.3.4. Kronik pankreatit	16
1.3.5. Obezite	16
1.3.6. Etnik köken	17
1.3.7. Diyabet.....	17
1.3.8. Kan Grubu.....	18
1.3.9. İnsan mikrobiyotası	18
1.3.10. Kalıtsal sendromlar ve genetik risk faktörleri.....	20
1.4. Pankreas Kanseri ve Genetik.....	22
1.4.1. Onkogenler.....	22
1.4.2. Tümör baskılayıcı genler	24
1.4.3. Diğer genetik değişiklikler.....	25
1.5. HNF1A Geni	26
1.6. Pankreas Kanseri Belirtileri, Tanısı, Evrelendirmesi ve Tedavisi.....	28
1.6.1. Pankreas kanseri belirtileri.....	28
1.6.2. Pankreas kanserinin tanısı.....	29
1.6.3. Tümör belirteçleri	29
1.6.4. Görüntüleme yöntemleri	30
1.6.5. Pankreas kanserinin evrelendirilmesi	32
1.6.6. Pankreas kanseri tedavisi	33
1.7. Karnosik Asit.....	34
1.8. Gallik Asit	37
1.9. Kök Hücre	39
1.9.1. Totipotent kök hücreler.....	39
1.9.2. Pluripotent kök hücreler.....	39

1.9.3. Multipotent kök hücreler	39
1.9.4. Oligopotent kök hücreler	40
1.9.5. Unipotent kök hücreler	40
1.10. Mezenkimal Kök Hücreler	40
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	44
2.1. PANC-1 Hücre Kültürü.....	44
2.2. Hücrelerin Dondurulması	45
2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi	45
2.4. Hücrelerin Pasajlanması	45
2.5. PANC-1 Pankreas Kanseri Hücre Dizisinin Karakterizasyon Çalışmaları	46
2.5.1. Akım sitometri analiz.....	46
2.6. İnsan Kemik İliği Kaynaklı MKH (İKİ-MKH) Hücre Kültürü.....	46
2.7. İKİ-MKH Karakterizasyon Çalışmaları	47
2.7.1. Akım sitometri analizi	47
2.8. Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi	48
2.9. Gallik Asit ve Karnosik Asitin Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Solüsyonunun Hazırlanması	49
2.10. WST-1 Canlılık Deneyi.....	49
2.11. Annexin V-PI Kapasite Tayini	50
2.12. Gen Ekspresyon Analizleri.....	51
2.12.1. Gen ekspresyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi – real time PCR.....	52
2.13. İstatiksel Analiz	52
3. BULGULAR.....	53
3.1. Panc-1 Hücre Kültürü.....	53
3.2. PANC-1 Pankreas Kanseri Hücre Dizisinin Karakterizasyon Çalışmaları	53
3.2.1. Akım sitometri analizi	53
3.3.2. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH (İKİ-MKH) hücre kültürü.....	54
3.4. İKİ-MKH Karakterizasyon Çalışmaları	55
3.4.1. Akım sitometri analizi	55
3.5. Gallik Asit ve Karnosik Asitin Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Solüsyonunun Hazırlanması	55
3.6. Canlılık Testi (WST-1).....	56
3.6.1. İKİ-MKH canlılık testi (WST-1)	56
3.6.2. PANC-1 canlılık testi (WST-1)	59
3.7. Annexin V-PI Kapasite Tayini	64
3.8. PCR ile gen ekspresyon analizi	70
4. TARTIŞMA	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	96
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Pankreasın anatomik yapısı ve pankreatik hücreler.....	3
Şekil 1.2.	Pankreasın anatomisi	4
Şekil 1.3.	İnsidans yüzdellikleri	6
Şekil 1.4.	Mortalite yüzdellikleri.....	7
Şekil 1.5.	2018'de pankreas kanseri için cinsiyete göre bölgeye özgü insidans yaşa göre standartlaştırılmış oranların çubuk grafiği	8
Şekil 1.6.	İnvaziv pankreas karsinomuna üç farklı morfolojik yolun modeli.....	9
Şekil 1.7.	PanIN ilerleme modeli sırasında moleküler değişikliklerin özeti.....	10
Şekil 1.8.	Pankreas kanseri evreleri	33
Şekil 1.9.	Karnosik asitin etkileri.....	35
Şekil 1.10.	Gallik asitin farmakolojik aktivitelerine genel bir bakış	37
Şekil 1.11.	Kök hücrelerin sınıflandırılması	40
Şekil 2.1.	Panc-1 ve Mezenkimal kök hücrenin indirekt co-kültürü.....	49
Şekil 2.2.	Annexin V/PI apoptoz tayini	51
Şekil 3.1.	PANC-1 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri ölçüm çubuğu: 100 µm.....	53
Şekil 3.2.	PANC-1 akım sitometri analiz sonucu	54
Şekil 3.3.	İKİ-MKH'lerin ışık mikroskop görüntüleri(ATCC) ölçüm çubuğu: 100 µm.....	54
Şekil 3.4.	iKİ-MKH'lerin akım sitometri analizi sonucu.....	55
Şekil 3.5.	MKH-GA ile kültüre edildiğinde 1.3.ve 7.Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü.....	56
Şekil 3.6.	MKH-KA ile kültüre edildiğinde 1.3.ve 7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü.....	57
Şekil 3.7.	MKH-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü	58
Şekil 3.8.	PANC-1 – MKH ile kültüre edildiğinde 1.3.7 Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü	59
Şekil 3.9.	PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 1.3.ve 7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü	60
Şekil 3.10.	PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 1. 3. ve 7.Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü	61
Şekil 3.11.	PANC-1-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü	62
Şekil 3.12.	PANC-1-MKH- GA- KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü	63
Şekil 3.13.	iKİ-MKH hücrelerin 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki ölüm grafiği.....	64
Şekil 3.14.	İKİ-MKH hücrelerin 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki canlılık grafiği.....	65
Şekil 3.15.	İKİ-MKH hücrelerin 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki apoptoz grafiği	66

Şekil 3.16. PANC-1 hücrelerin MKH, 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki ölüm grafiği.....	67
Şekil 3.17. PANC-1 hücrelerin MKH, 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki canlılık grafiği.....	68
Şekil 3.18. PANC-1 hücrelerin MKH, 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki apoptoz grafiği.....	69
Şekil 3.19. HNF1A gen ekspresyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi – Real Time PCR analizi.....	70



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Pankreasın ekzokrin ve endokrin kısımları.....	5
Tablo 1.2. Pankreas kanserlerinin detaylı evrelendirilmesi	32
Tablo 2.1. PANC-1 özellikleri	44
Tablo 2.2. PANC-1 hücre besiyeri.....	44
Tablo 2.3. PANC-1 hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri	46
Tablo 2.4. MKH besiyeri	47
Tablo 2.5. MKH hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri	47
Tablo 2.6. Çalışmadaki deney ve kontrol grupları.....	48
Tablo 2.7. WST-1 deney ve kontrol grupları	50
Tablo 2.8. HNF1A forward/reverse	52
Tablo 3.1. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 1. Gün WST değerleri	57
Tablo 3.2. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri.....	57
Tablo 3.3. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri	57
Tablo 3.4. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 1.Gün WST değerleri	58
Tablo 3.5. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri.....	58
Tablo 3.6. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri	58
Tablo 3.7. MKH-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerleri...	59
Tablo 3.8. PANC-1 – MKH ile kültüre edildiğinde 1.3.7 Gün WST değerleri ...	59
Tablo 3.9. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 1. Gün WST değerleri.....	60
Tablo 3.10. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri.....	61
Tablo 3.11. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri.....	61
Tablo 3.12. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 1. Gün WST değerleri.....	62
Tablo 3.13. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri.....	62
Tablo 3.14. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri.....	62
Tablo 3.15. PANC-1-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerleri	63
Tablo 3.17. MHK-Annexin PI testi sonucu-ölü hücre sayısı.....	64
Tablo 3.18. MKH-Annexin PI testi sonucu-canlı hücre sayısı	65
Tablo 3.19. MKH-Annexin PI testi sonucu-Apoptik.....	66
Tablo 3.20. PANC-1-Annexin PI testi sonucu-ölü hücre sayısı	67
Tablo 3.21. PANC-1-Annexin PI testi sonucu-canlı hücre sayısı.....	68
Tablo 3.22. PANC-1-Annexin PI testi sonucu-apoptik	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

AJCC	: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
ATCC	: American Type Culture Collection - Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CA 19-9	: Glikoprotein Karbonhidrat Antijen 19-9
COX-2	: Siklooksijenaz-2
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epitel-Mezenkimal Geçiş
ERCP	: Endoskopik Retrograd Kolanjiopankreatografi
EUS	: Endoskopik Ultrasonografi
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FNA	: İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi
GA	: Gallik Asit
GTP	: Guanozin Trifosfat
HNF1A	: Hepatosit Nükleer Faktör 1 α
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IPMN	: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplaziler
İKİ-MKH	: İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
İPKH	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
KA	: Karnosik Asit
LTA	: Lipoteikoik Asit
MAPK	: Mitojen Aktiviteli Protein Kinazları
MCN	: Müsinöz Kistik Neoplaziler
MKH	: Mezenkimal Kök Hücreler
MRG	: Magnetik Rezonans Görüntüleme Teknikleri
NET	: Nöroendokrin Tümörleri
NF- κ B	: Nükleer Faktör Kappa B
NGF	: Igf-1 Reseptörü, Sinir Büyüme Faktörü
PanIN	: Pankreatik İntraepitelyal Neoplaziler
PDAC	: Pankreas Duktal Adenokarsinom
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PP	: Pankreatik Polipeptit Hücreleri
RPMI 1640:	Roswell Park Memorial Institute Medium - Roswell Park Memorial Enstitüsü Ortamı
sICAM-1	: Çözünür Hücreler Arası Adhezyon Molekülü-1
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand – Tümör Nekroz Faktörü İle İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand

USG : Ultrasonografi
VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



KARNOSİK ASİT VE GALLİK ASİTİN PANC-1 PANKREAS HÜCRELERİNDE HNF1A GENİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

ÖZET

Pankreas hem ekzokrin, hemde endokrin salgı yapan lobüler yapılı karma bir bezdir. Pankreas kanseri, en agresif kanser türlerinden biridir. Düşük bir insidansı olmasına rağmen yüksek bir ölüm oranına sahiptir. Kötü prognozun sebebi sinsi büyüme, spesifik olmayan semptomlar ve geç tanıdır. Pankreas kanseri gelişiminde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler, intraduktal papiller müsinöz neoplaziler ve müsinöz kistik neoplaziler olmak üzere 3 öncü lezyon rol oynamaktadır. Bu lezyonların erken tespiti zordur. Pankreas kanseri dünyasındaki en sık görülen ikinci gastrointestinal kanserdir. Pankreas Kanseri 2030'da kansere bağlı ölümün ikinci nedeni olması beklenmektedir. Pankreas kanserinin tedavi seçeneklerinin az olması ve yaşam süresinin kısa oluşu yeni terapötik stratejileri hedeflemektedir. Yapılan çalışmalarda, fenolik bileşenlerin insan sağlığına yararlı biyoaktif fitokimyasallar oldukları gösterilmiştir. Sebze ve Meyvelerdeki antioksidan aktivite ile antikanser etkileri bulunmaktadır. Karnosik asit ve Gallik asit antiproliferatif ajanlar olarak bildirilmiştir. Bu sebeple bizde daha önce birlikte çalışılmamış doğal ajanlar olan Gallik Asit ve Karnosik Asitin kanser üzerindeki birleşik etkileri hakkında bilgi edinmek için çalışmalarımızı gerçekleştirdik. Mezenkimal kök hücreleri de çalışmamızda kullandık. Yeni onkogen olduğu rapor edilen, HNF1A geninin ekspresyon analizini gerçekleştirdik. PANC-1 – MKH – GA – KA kombinasyonunu oluşturduk. Akım sitometri analiz , WST-1 , Annexin ve PCR analizlerini gerçekleştirdik. Sonuç olarak yaptığımız çalışmada, Karnosik asit ve Gallik asit, mezenkimal kök hücrelerle birlikte PANC-1 hücrelerinde canlı hücre sayısında azalmaya, apoptatik hücre sayısında ise artışa neden olduğu ve HNF1A 'nın ekspresyonunun azalması pankreas kanseri büyümesini ve ilerlemesinin inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir. GA ve KA 'in HNF1A geninin ekspresyonunu düşürmesi bize kanser mekanizmalarının düzenlenmesinde rol olabileceği hipotezini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Gallik Asit, HNF1A, Karnosik Asit, MKH, Pankreas Kanseri.

COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF CARNOSIC ACID AND GALLIC ACID ON THE HNF1A GENE IN PANC-1 PANCREATIC CELLS

ABSTRACT

The pancreas is a mixed gland with lobular structure that secretes both exocrine and endocrine. Pancreatic cancer is one of the most aggressive types of cancer. Although it has a low incidence, it has a high mortality rate. Poor prognosis is due to insidious growth, nonspecific symptoms and late diagnosis. Three leading lesions, pancreatic intraepithelial neoplasms, intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms, play a role in the development of pancreatic cancer. Early detection of these lesions is difficult. Pancreatic cancer is the second most common gastrointestinal cancer in the world. Pancreatic Cancer is the second cause of cancer-related death in 2030. The scarcity of treatment options and the short life expectancy of pancreatic cancer target new therapeutic strategies. Studies have shown that phenolic compounds are bioactive phytochemicals beneficial to human health. It has antioxidant activity and anticancer effects in vegetables and fruits. Carnosic acid and Gallic acid have been reported as antiproliferative agents. Therefore, we conducted our studies to obtain information about the combined effects of Gallic Acid and Carnosic Acid, which are natural agents that have not been studied before, on cancer. We also used mesenchymal stem cells in our study. HNF1A, which is reported to be a new oncogene gene. It has been shown that it causes a decrease in the number of viable cells in cells, an increase in the number of apoptotic cells, and the decrease in the expression of HNF1A leads to inhibition of pancreatic cancer growth and progression. The fact that GA and KA reduce the expression of the HNA1A gene made us think about the hypothesis that they may be involved in the regulation of cancer mechanisms.

Keywords: Gallic Acid, HNF1A, Carnosic Acid, MSC, Pancreatic Cancer.

GİRİŞ

Dünya çapında milyonlarca insanın ölümüne neden olan kanser, giderek yaygınlaşmaktadır. Birçok çeşidinin olması ve farklılıklar içermesi sebebiyle tedavi güçleşmektedir. Kapsayıcı bir tedavi için bilim insanları oldukça uğraş vermektedir.

Pankreas kanserinin agresif kanser türlerinden ve tedavisi güç, teşhisi zor olan bir kanser çeşididir. Oldukça düşük sağ kalım süresi vardır. Yüksek bir mortaliteye sahiptir. Pankreas kanserinin tedavi seçeneklerinin az olması ve yaşam süresinin kısa oluşu yeni terapötik stratejileri hedeflemektedir. Yapılan çalışmalarda, fenolik bileşenlerin insan sağlığına yararlı biyoaktif fitokimyasallar oldukları gösterilmiştir. Sebze ve Meyvelerdeki antioksidan aktivite ile fenolik bileşiklerin ilişkili olduğu bildirilmiştir. Birçok fitokimyasalın antikanser etkisi olduğu ispatlanmıştır. Biberiyeye özleri ve bileşenleri olan karnosik asit, kanser hücrelerine karşı doğal güçlü antiproliferatif ajanlar olarak bildirilmiştir. Çeşitli tümörlerde anti-kanser rol oynamıştır. Bununla birlikte, biberiyeyi potansiyel olarak kanser tedavisinde tamamlayıcı bir yaklaşım olarak uygulamak için, en etkili bileşime, in vivo antitümör etkisine ve ana moleküler araçlarına ilişkin ek bilgilere hala ihtiyaç vardır. Aynı şekilde bir başka fenolik bileşik olan Gallik Asit, yapılan çalışmalarda antiproliferatif ajan olarak rapor edilmiştir. Bu sebeple bizde daha önce birlikte çalışılmamış doğal ajanlar olan Gallik Asit ve Karnosik Asitin (GA ve KA) kanser üzerindeki birleşik etkileri hakkında bilgi edinmek için çalışmalarımızı yaptık. Bu nedenle GA ve KA kombinasyonu ile kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyeceğine inandık. Gallik asit ve Karnosik asit çeşitli kanser araştırmalarında kullanılmış başarı sağlamıştır. Bizde ilk olarak ikisini beraber kullanarak panc-1 de amaca ulaşılabilir mi denemek istedik. Anti-tümör potansiyeline sahip Mezenkimal kök hücreleri de çalışmamızda kullandık. MKH'ler vaskülerizasyon oluşumu, immün baskılanması, epitelyal mezenkimal geçiş gibi süreçlere aracılık ederek pro-tümör etkinlik gösterebilmesine karşın, tümör gelişimi için önemli olan Wnt ve Akt yolları üzerinden de anti-tümör etkinlik de gösterdiği bilinmektedir. Bu sebeple PANC-1 + MKH + GA + KA kombinasyonunu oluşturduk. Pankreas kanseri için bir diğer kilit

nokta ise onkogenlerdir. Daha yeni onkogen kabul edilen HNF1A geni, pankreas kanserinin geleceği için önem taşımaktadır. Daha önceden tümör baskılayıcı gen olarak bilinen fakat son yıllardaki çalışmalarda onkogen olduğu rapor edilen, HNF1A geninin ekspresyonuna bakmayı hedefledik. İmmünomodölatör ve kanser karşıtı özelliğe sahip olan mezenkimal kök hücrelerin, Karnosik Asit ve Gallik Asitin PANC-1 Pankreas kanseri hücreleri nde HNF1A geni üzerine sitotoksik, antikansorejenik ve apoptik etkilerinin, incelenmesi amaçlanmaktadır.

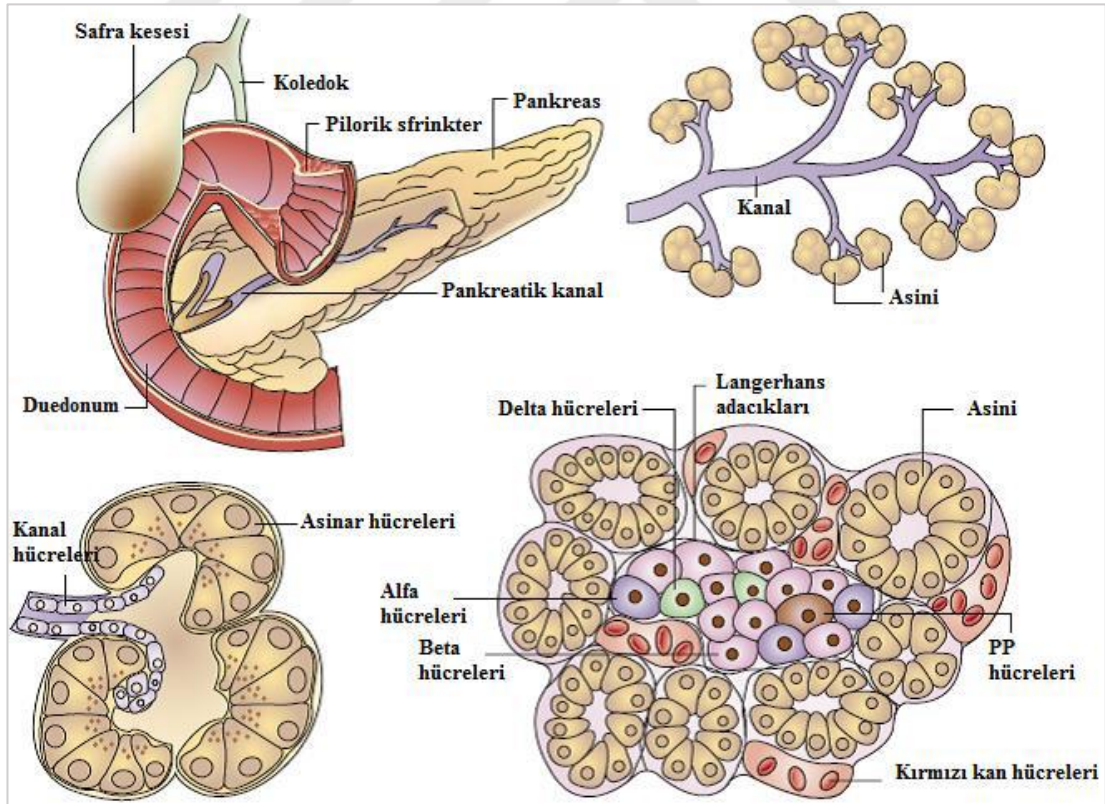


1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pankreasın Anatomisi

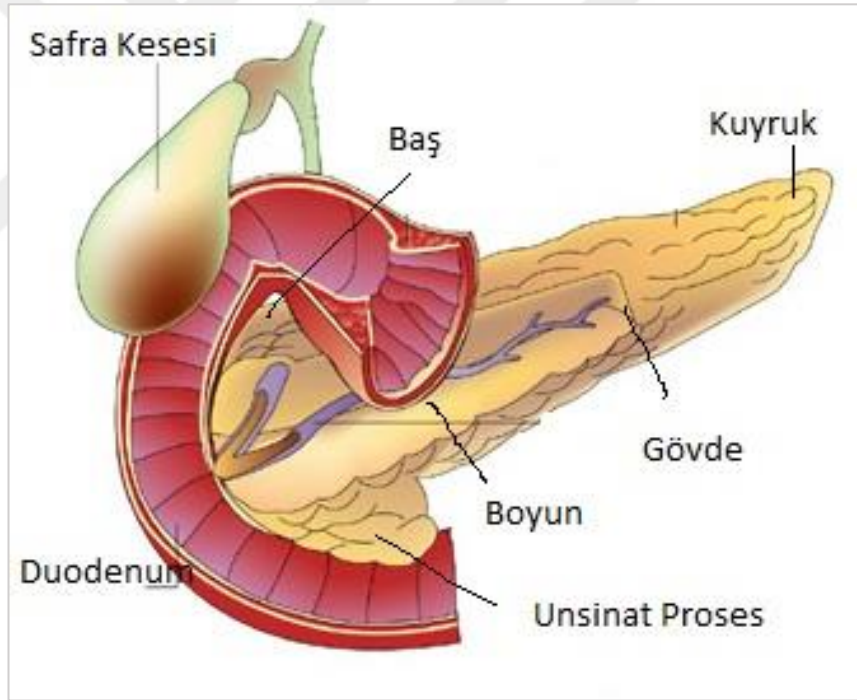
Pankreasın tanımı M.Ö.300 yıllarda Herophilus tarafından yapılmıştır ve ilk kez “pankreas isimlendirmesini Rufus yapmıştır. Pankreas eski Yunanca ve Latince yassı et anlamına gelmektedir [1].

Pankreas, fetal hayatın dördüncü haftasında ön barsağın kaudal kısmından arka ve ön pankreas tomurcukları olarak çıkan, retroperitoneal bir organdır. Midenin arka tarafında, on iki parmak bağırsağından dalağa kadar olan alana yerleşir. İnsanlarda 15-25 cm uzunluğunda 70-150 gr ağırlığında sarımtırak renktedir [2]. Şekil 1.1.’de görülmektedir.



Pankreas; baş, uncinat process, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 5 kısımdan oluşur. Pankreasın baş kısmı; en büyük bölüm olup duodenumun yaptığı yay içine yerleşim gösterir ve Koledok kanalının son kısmı genellikle pankreas başının içinden geçer.

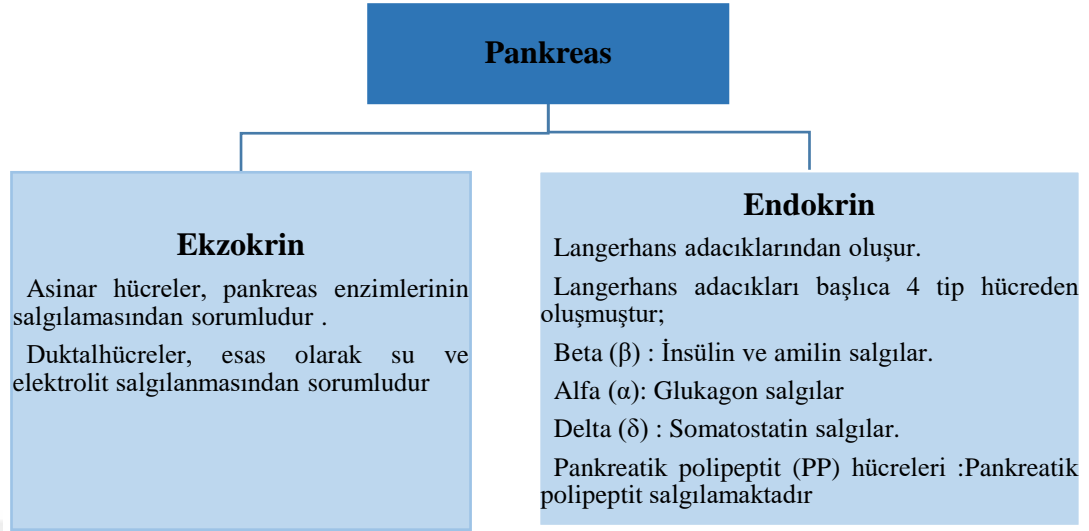
Processus Uncinatus: Portal ven ve superior mezenterik damarların arkasında, aort ve inferior vena kavanın önünde yer alır. Uncinate process her insanda olmayabilir veya superior mezenterik damarları tamamen çevreleyebilir. Boyun ise Pankreasın görece daralmış bir kısmıdır. Gövdesi ve kuyruğu aorta, superior mezenterik damarlar, sol böbrek ve böbrek üstü bezi ile komşudur, kuyruk kısmı dalak hilusunada kadar uzanmaktadır. Şekil 1.2.'de görülmektedir. Dalak damarları pankreas kuyruğunun üst kısmı içinde bulunur [2].



Şekil 1.2. Pankreasın anatomisi [3]

Pankreas hem ekzokrin, hemde endokrin salgı yapan lobüler yapıya sahip karma bir bezdir. Pankreasın %98 'ini oluşturan ekzokrin kısım asiner ve kanal hücrelerinden meydana gelir. Bu kısım karbonhidrat, protein ve yağların sindirimi için gerekli pankreatik sıvıyı salgılar. Pankreasın %2'lik endokrin kısmı ise Langerhans adacık hücrelerinden oluşmaktadır. Langerhans adacık hücrelerinin görevi ise salgıladığı hormonlarla glukoz metabolizmasını düzenlemektir [4]. (Tablo 1.1.)

Tablo 1.1. Pankreasın ekzokrin ve endokrin kısımları [2, 5]



İnsan tıbbı açısından bakıldığında, pankreas ilgili iki ana hastalıktan muzdariptir. Bu hastalıklar; Diabetes Mellitus ve Pankreas Kanseri'dir. Yaygın olarak, pankreası etkileyen birkaç geniş hastalık kategorisi vardır. Bunlar; pankreatit, pankreas yetmezliği, pankreasın kistik lezyonları ve pankreas tümörleridir [2].

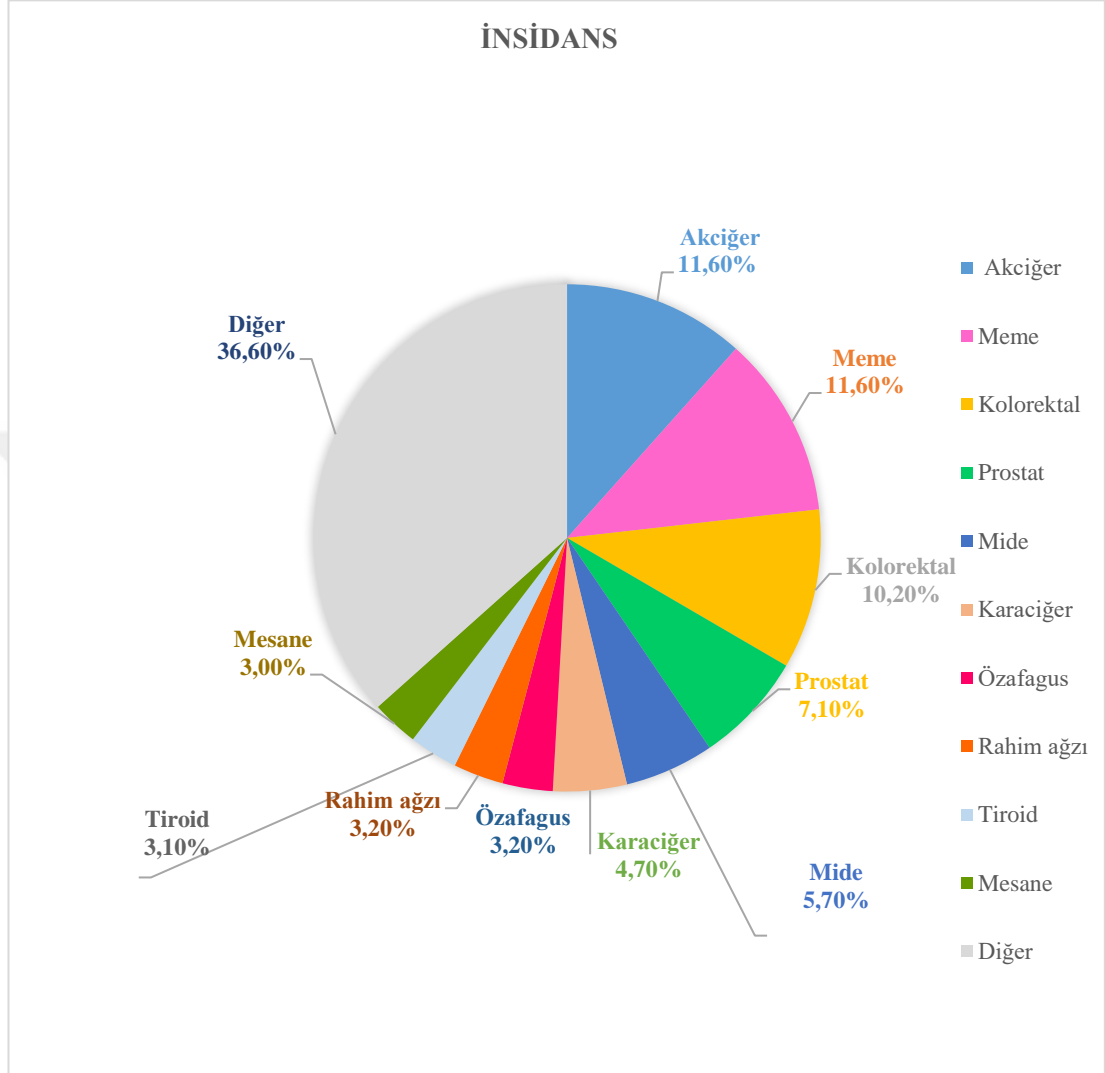
1.2. Pankreas Kanseri

1.2.1. Kanser

Kanser tahmin edilenin aksine sağlıklı hücrelerin malignan hücrelere dönüşmesi değil, kontrolsüz çoğalan hücrelerin apoptoza karşı direnç göstermeleri sonucu moleküler düzeydeki farklılıklarla beraber hücre motilite ve invazivitede değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreçtir. Kanseri ölümlerinin ana nedeni metastazdır. Metastaz, mikroçevre desteği sayesinde kanser hücrelerinin dolaşım sistemi aracılığıyla uzak organlara kolonizasyonu ve gelişimini içerir. Kanseri, kontrolsüz proliferasyon ve metastatik yayılımındaki en önemli nedeni genomik değişiklikler olduğu bilinmektedir. Kanseri araştırmaları ve gelecekteki potansiyel tedavilerinde, hastalığın klinik özellikleri ile moleküler yapısı arasındaki ilişkilerin açığa çıkması önem taşımaktadır.

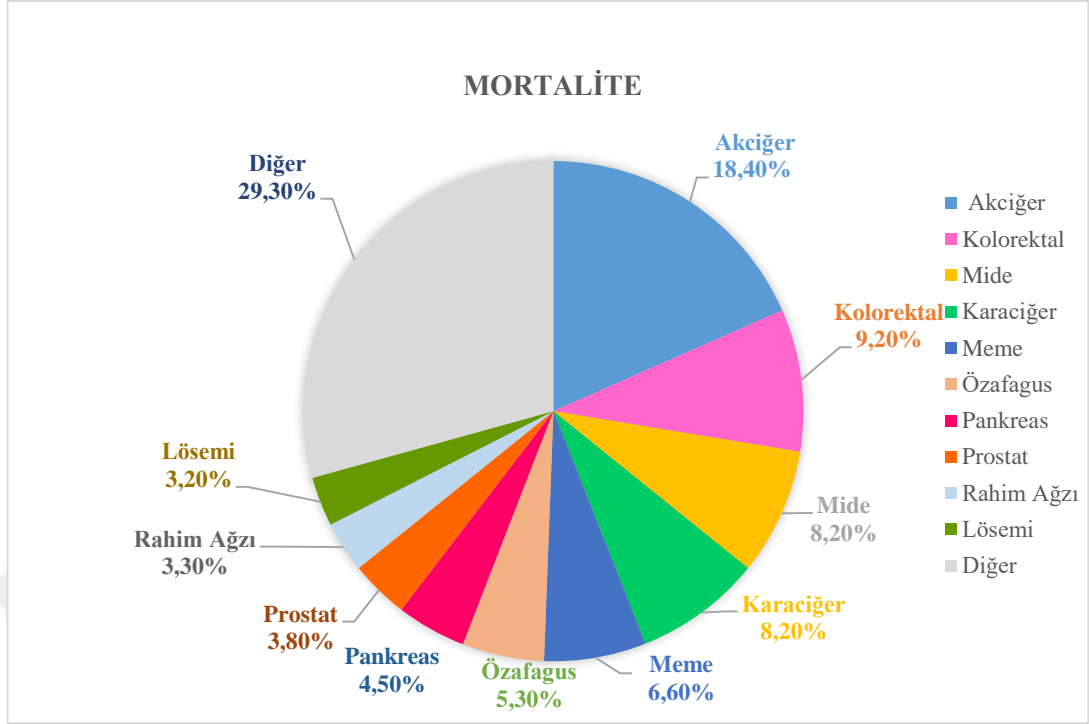
Kanseri her yıl dünya çapında milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Yüksek ölüm oranları nedeniyle bilim dünyasında üzerine en çok araştırma yapılan hastalıkların içerisinde yer almaktadır. Birçok tipinin olması ve

kişiden kişiye oluşan farklılıklardan dolayı kapsayıcı bir tedavinin geliştirilmesi güçleşmektedir.



Şekil 1.3. İnsidans yüzdeleri [6]

Dünya çapında ölümlere neden olan ilk 10 kanser türü şunlardır; Akciğer kanseri en sık teşhis edilen kanserdir (toplam vakaların% 11,6'sı) ve önde gelen kanser ölüm nedenidir (toplam kanser ölümlerinin% 18,4'ü), hemen ardından kadın meme kanseri (% 11,6), kolorektal kanser (% 10,2), prostat kanseri (% 7,1) gelmektedir. Mortalite grafiğine göre Akciğer (% 18,40) Kolorektal kanseri (% 9,2), Mide kanseri (% 8,2) ve Karaciğer kanseri (% 8,2) gelmektedir [6]. Şekil 1.3.ve Şekil 1.4.'de görülmektedir.

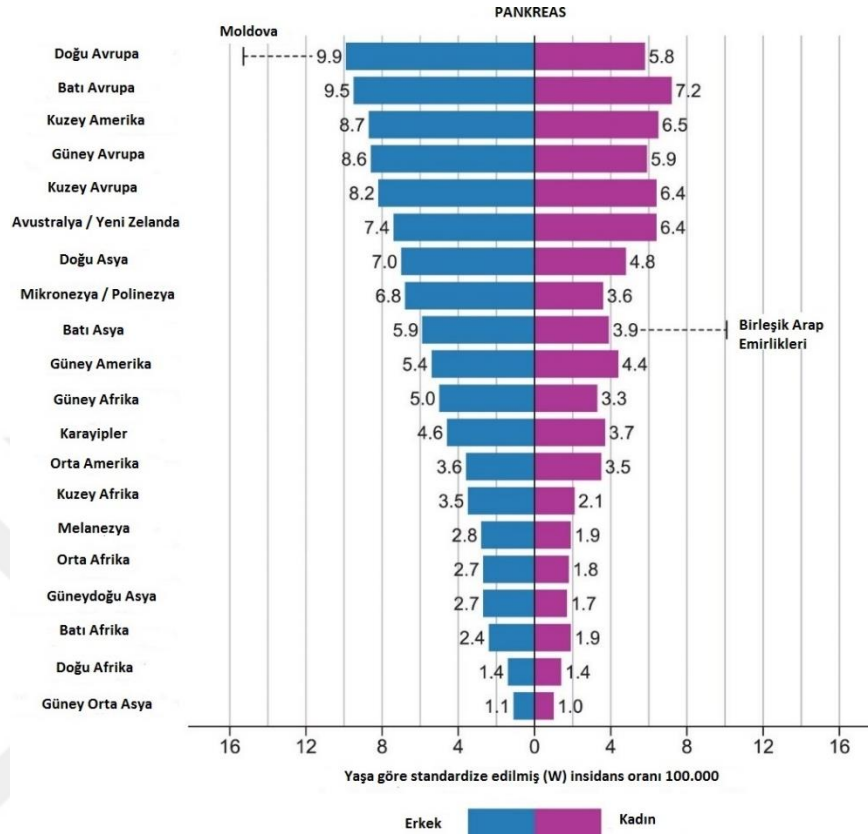


Şekil 1.4. Mortalite yüzdeleri [6]

Pankreas kanseri, en agresif kanser türlerinden biridir. Düşük bir insidansı olmasına rağmen yüksek bir mortaliteye sahiptir. Şekil 1.4. Mortalite yüzdeleri mevcuttur. Bu durumun sebebi ise geç tanıdır. Kanser yönetiminde ilerlemeye rağmen, sağkalım oranı son on yılda değişmeden kalmıştır [7]. Pankreas kanseri hastalarının bir yıllık sağkalım oranı % 20 'dir ve 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık % 7' dir. Dünyada yaygın kanser çeşitleri arasında 14. sırada, kansere bağlı ölümlerin (kansere bağlı mortalite sıralamasında) 7. önde gelen nedenidir. Çoğunlukla erkeklerde görülür, 40-85 aralığında daha fazla ortaya çıkar [8]. Kötü prognozun asıl sebebi; sinsi büyüme, spesifik olmayan semptomlar ve erken tanı için hassas ve spesifik yöntemlerin bulunmamasıdır [9,10]. Bilim insanları ilerleyen zamanlarda pankreas kanserinin daha fazla ölüm getireceğini düşünmektedir. ABD'de kanserden ölüm sebepleri arasında üçüncü sırada olup her yıl dünya çapında yaklaşık 227.000 kişi bu hastalıktan ölmektedir. 2030 yılına gelindiğinde kanser ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alması beklenmektedir [10].

Türkiye'de erkeklerde görülme insidansı 2002 yılında yüz binde 3,1 iken, 2016 yılında 5,7'ye yükselmiştir. Kadınlar da ise bu oran 2016 yılı için 3,6'dır. Türkiye'de

erkeklerde en sık görülen 10 kanserden biri olup bu cinsiyette tüm kanserler içindeki oranı %2,2'dir [11].

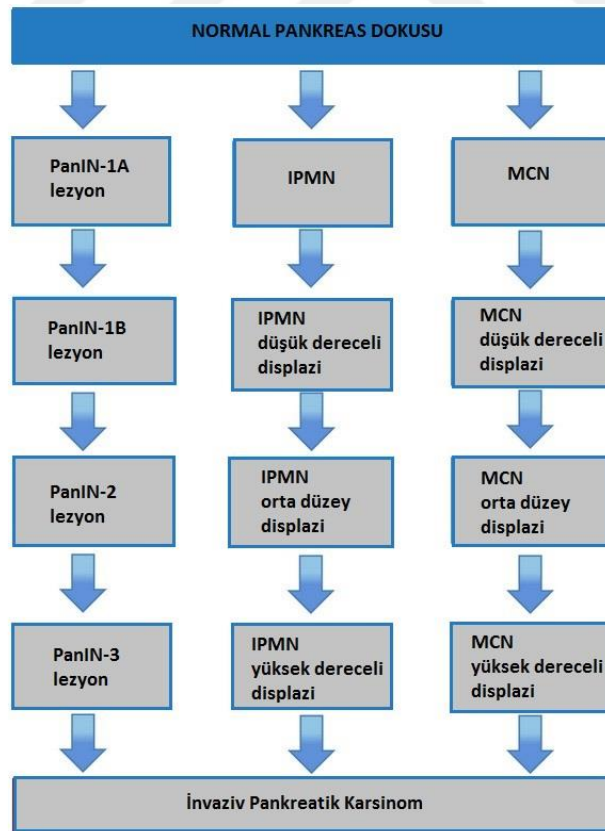


Şekil 1.5. 2018'de pankreas kanseri için cinsiyete göre bölgeye özgü insidans yaşa göre standartlaştırılmış oranların çubuk grafiği [6]

Erkeklerde daha fazla görülen pankreas kanseri; Doğu Avrupa, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika da görülme sıklığı daha fazladır. Şekil 1.5.'de görülmektedir. Semptomlar (örn. Sarılık, kilo kaybı ve epigastrik ağrı) hastalığın seyrinin sonlarına kadar ortaya çıkmaz. Hastalığı iyileştirme potansiyeline sahip tek terapötik yöntem cerrahi rezeksiyondur. Sıklıkla karşılaşılan durum lezyonların yakındaki yapılara yayılmasıdır ve bu nedenle ameliyat edilemez. Tümörlerin üçte birinden fazlası, teşhis üzerine dördüncü evredir ve bu kanserlerin% 20'den azı cerrahi rezeksiyon için adaydır [12].

Pankreas tümörleri için morfo-patolojik bir bakış açısına göre pankreas tümörlerinin % 95'inden fazlası ekzokrin pankreastan ve % 5'ten azı endokrin pankreastan kaynaklanmaktadır [13,14]. En yaygın malignite, ekzokrin bezleri tutan duktal adenokarsinomdur; bu tümörlerin çoğu pankreasın başında keşfedilir. Pankreas nöroendokrin tümörleri (NET'ler), pankreasın endokrin dokusunda oluşan

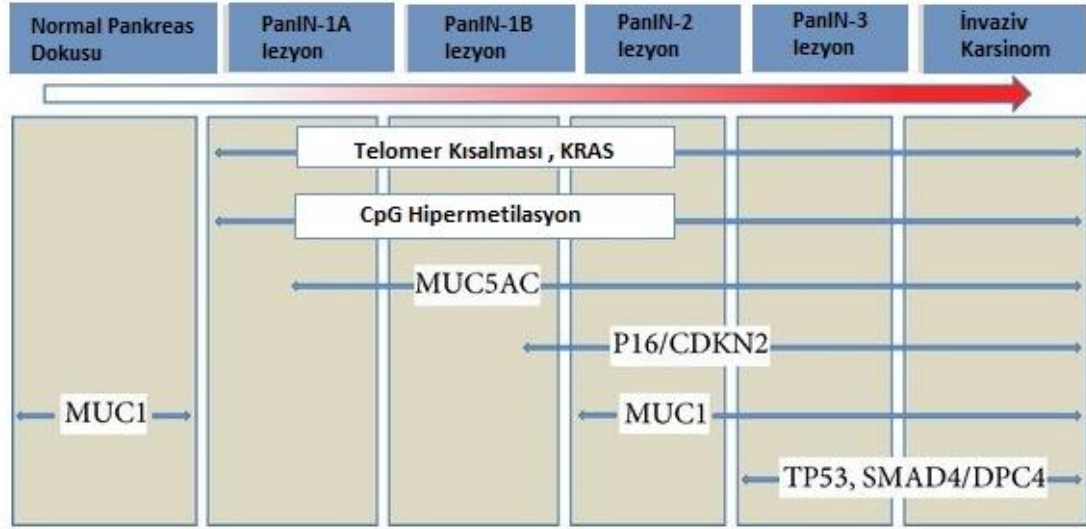
malignitelerdir. Adacık hücresi tümörleri olarak da bilinen bunlar, her 100000 kişiden yaklaşık 1'inde meydana gelen nadir tümörlerdir ve tüm pankreas tümörlerinin yalnızca% 1'i NET'tir. NET'ler, insülin, gastrin, glukagon ve vazoaktif bağırsak peptidi (VIP) dahil olmak üzere pankreas hormonlarının aşırı üretimi ve salgılanmasıyla spesifik klinik sendromlara neden olabilir [13,15]. Genellikle, pankreas kanseri terimi pankreas tümörlerinin %85-90'ını temsil eden duktal adenokarsinom için kullanılır [14]. Pankreas kanserlerinin %57'si pankreas başında, %9'u gövdesinde, %8'i kuyruk kısmında, %6'sı birden fazla yerde meydana gelmektedir ve %20'sinin ise anatomik yeri saptanamamaktadır. Pankreas kanseri gelişiminde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN) ve müsinöz kistik neoplaziler (MCN) olmak üzere 3 öncü lezyon rol oynamaktadır [16,17]. Bu lezyonların erken tespiti oldukça zordur, ancak hastaları invazif bir pankreas karsinomuna yakalanmadan önce iyileştirme şansı sağlar. Öncü lezyonların erken tespiti ve tedavisi, muhtemelen hastaları invazif pankreas kanserine ilerlemekten kurtarabilir. Şekil 1.6.'da invaziv pankreas karsinomun üç farklı yolu gösterilmektedir.



Şekil 1.6. İnvaziv pankreas karsinomuna üç farklı morfolojik yolun modeli [17]

1.2.2. Pankreas intraepitelyal neoplazi (PanIN)

Bir pankreas duktal adenokarsinomunun (PDAC) en önemli ve en iyi bilinen öncüsü, pankreas epitel içi neoplazisidir (PanIN). Hruban ilk olarak 2001 yılında “PanIN şemasını” oluşturdu. Şema, şekil 1.7.de mevcuttur.



Şekil 1.7. PanIN ilerleme modeli sırasında moleküler değişikliklerin özeti [17]

Pankreas kanserinin en önemli ve en iyi bilinen öncü lezyonu PanIN, küçük intralobüler pankreas kanallarında ortaya çıkan, invaziv olmayan düz ve papiller yapılı, çapları 5 mm'den küçük mikroskobik lezyonlardır. Bu lezyonlar karakteristik olarak asemptomatiktir [16]. Pankreasın baş kısmında yaygın olarak yerleşim gösteren bu lezyonlarda, normal düz kübik epitel yapı değişime uğramıştır. Epitelyal atipiye göre; PanIN-1A/B, PanIN-2 ve PanIN-3 olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar [18,19]. Silindirik epitel hücreli PanIN-1 kendi içinde, PanIN-1A (düz tip) ve PanIN-1B (papiller tip) olarak ikiye ayrılır. PanIN-2 lezyonlarında yalancı çok katlı epitelyum oluşumu, çekirdek hiperkromazisi ile birlikte orta dereceli displazi ile uyumlu çekirdek kutuplaşması kaybı başlamıştır. Önemli derecede sitolojik atipi gösteren PanIN-3 lezyonları ise, çekirdek kutuplaşmasının tamamen kaybı, çekirdek hiperkromazisi, belirgin çekirdekçik ve atipik mitotik şekiller ile karakterizedir [20]. (şekil 7)

PanIN-1 ve PanIN-2 %60 ya da daha fazla karsinomlu yapılarda bulunmakla birlikte normal pankreatik yapıda da yaygın olarak bulunabildiklerinden klinik olarak önemsiz sayılmakta, PanIN-3 ise karsinomsuz durumlarda çok nadir iken invaziv karsinomlu durumlarda çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bu nedenle klinik önemi büyüktür.

Ayrıca bu lezyon grupları, farklı histopatolojik yapıya sahip oldukları gibi genetik değişim derecelerine göre moleküler patolojilerinde de farklılık bulunmaktadır [19,21].

PanIN lezyonlarındaki genetik anormaller de lezyonlarda gözlenen bu histolojik ilerleyişi yansıtmaktadır. K-ras mutasyonu PanIN lezyonlarının gelişiminde önemli role sahiptir. PanIN-1 lezyonlarının %36'sında, PanIN-1B lezyonlarının %44'ünde, PanIN-2/3 lezyonlarının %87'sinde K-ras mutasyonu tespit edilmiş, K-ras mutasyon artışının neoplazi gelişimi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. CDK2NA/p16 aktivasyon kaybına neden mutasyonlar PanIN-2 lezyonlarında görülmeye başlarken, TP53, SMAD4/DPC4 ve BRCA2 aktivasyon kaybı genellikle daha ileri evre PanIN lezyonu olan PanIN-3 ile ilişkilendirilmektedir [22,23,24].

1.2.3. İntraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN)

IPMN'ler, son yıllarda artan insidansı ile heterojen kistik pankreas lezyonları grubuna aittir ve pankreatik kanalların kistik genişlemesi ile karakterizdir. IPMN'ler İnvaziv olmayan yapıdaki müsin üreten epitel hücrelerin papiller çoğalması sonucu aşırı müsin üretimi gerçekleştiren makroskopik lezyonlardır. Bu kistik lezyonlar ilk olarak 1990'larda farkedilmiştir [25]. Pankreas başında ortaya çıkmakla birlikte, boyutu çoğunlukla 1 cm'den büyüktür [19]. Ekzokrin pankreatik neoplazilerin yaklaşık %3'ünü, kistik pankreatik neoplazilerin ise %20'sini oluştururlar [26].

Çoğu IPMN hastaları sigara geçmişi bulunmaktadır. Pankreasın ana kanal ya da yan kanallarından gelişen bu lezyonlar klinik olarak ana kanal tip IPMN (IPMN-MD) ve yan kanal tip IPMN (IPMN-BD) olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Displazi derecelerine ve invaziv karsinomla bir ilişkisinin olup olmamasına göre düşük, orta, yüksek dereceli displazi ve invaziv karsinom displazi olarak sınıflandırılır [27]. IPMN-MD'lerin yaklaşık %60'ı yüksek derece displazi gösterir ve yaklaşık %45'i invaziv karsinom ile ilişkilendirilir [28]. Düşük derecede displazi gösteren IPMN'lerin yaklaşık %50'sinde K-ras onkogenini aktive eden nokta mutasyonları görülür ve displazi derecesi, K-ras mutasyonu sıklığıyla ilişkilidir. CDK2NA/p16 ve TP53 aktivasyon kaybı yüksek derece displazi gösteren IPMN'lerde tespit edilmiştir [29]. PanIN-3 lezyonlarının yaklaşık %30'unda görülen SMAD4 ifade kaybı ise IPMN'lerin yaklaşık %3'ünde gözlenir [30].

Morfolojik olarak, köken aldıkları bölgelere göre ana duktal tip (MD-IPMN) branşiyal duktal tip (BD-IPMN) olarak alt gruplara ayrılır; kombine duktal tip denen hem ana hem de branşiyal kanalın gözleendiği durumlar da vardır. IPMN'ler, gastrik, intestinal, pankreatobiliyer ve onkositik tip olmak üzere 4 alt gruba ayrılırlar. Bu sınıflandırma histolojik yapılarına, müsin antikoru ile immünohistokimyasal boyamadaki farklılıklarına göre yapılmıştır. Gastrik tip, branşiyal duktal kökenli iken diğerleri ana duktal kökenlidir [31,32].

1.2.4. Müsinöz kistik neoplazm (MCN)

Pankreasın MCN'leri, pankreas kanserinin en seyrek öncü lezyonlarıdır. MCN'ler, hücrelerin müsin üreten epitelyal tabakalarında ortaya çıkan ve septasyonlu kist oluşturan esas olarak kadınlarda görülen, duktal sistem ile iletişimi bulunmayan, pankreasın ayırıcı over-tip stromalı musinöz kistik tümörleridir [18]. Bu kistik lezyonlar neredeyse soliterdir ve MCN'lerin büyük çoğunluğu asemptomatiktir ve tesadüfen bulunur [33]. Görüntülemelerde kistler bölünmüş görünür ve kireçlenme içerebilir. Pankreasın gövde ve kuyruk kısmında yerleşim göstermektedir. Çok geniş alanlarda büyüme eğilimindedir ve büyüklükleri 2-35 cm arasındadır ama ortalama büyüklükleri 6-10 cm'dir [34].

Histolojik yapılar incelendiğinde MCN'ler, silindirik hücrelerden oluşan çeşitli derecede displazili epitelyal yapı görülmekte ve displazi derecelerine göre düşük, orta ve ileri MCN olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. MCN lezyonlarında K-ras ve TP53 mutasyonları yaygın olarak gözlenmekte, genetik anormalliklerin görülme sıklığı displazi derecesine bağlı olarak artış göstermektedir. SMAD4 ifade kaybı ise invaziv karsinoma ile ilişkilendirilen MCN lezyonlarında gözlenmiştir [30]. MCN'lerin yaklaşık 3'de 1'i genellikle duktal adenokarsinomları oluşturmak üzere invaziv hale gelebilir; buna rağmen bu lezyonlar non-invaziv (invaziv olmayan) olarak tanımlanırlar [19]. Noninvaziv MCN'si olan hastalar için beş yıllık sağkalım neredeyse % 100 dür. Ayrıca invaziv bir MCN için rezeksiyon uygulanan hastalar için beş yıllık sağkalım oranı yaklaşık % 60'tır [16,35].

1.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Pankreas kanseri dünyasındaki en sık görülen ikinci gastrointestinal kanser olmakla birlikte epidemiyoloji, sağkalım, prognostik faktörler ve yüksek ölüm oranı taşıyan oldukça agresif bir tümördür. Pankreas Kanseri 2030'da kansere bağlı ölümün ikinci nedeni olması beklenmektedir [36]. Diğer malignitelere kıyasla pankreas kanserini öne çıkartan durum, iyileştirilmiş sağ kalım açısından son on yıl içerisinde klinik ilerlemenin eksikliğidir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %5'in altındadır [32,37].

Pankreas kanserinin görülme sıklığı coğrafi bölgelere ve popülasyonlara göre değişir. 2012 yılına ait vakaların üçte biri Avrupa ülkelerinde meydana gelmiş, en yüksek insidans oranları orta ve doğu Avrupa, Kuzey Amerika, Arjantin ve Uruguay'da, en düşük insidans oranları ise Afrika ve Doğu Asya ülkelerinde gözlenmiştir [38]. Pankreas kanserinin Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılında en yaygın görülen 10. kanser olduğu belirtilmiş, erkeklerde ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin 4. nedeni olarak gösterilmiştir [39]. Ülkemizde ise, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan Sağlık İstatistikleri Yıllığına göre pankreas kanseri erkeklerde en sık görülen 8. kanser iken kadınlarda ilk 10'da yer almamıştır [40].

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın GLOBOCAN 2018 'e göre, 2018 yılında tüm yeni kanser teşhislerinin % 2,5'ini oluşturan 458,918 yeni Pankreas Kanseri vakası kaydedildi [41]. Tanı konulan tüm pankreas kanseri neoplazileri arasında pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC)% 90'dan fazlasını oluşturur [42].

Pankreas kanseri 2018 yılına göre, 100.000 kişi başına 4,8'lik küresel yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranı ile dünyadaki en yaygın 12. kanser olarak sıralanmıştır [41]. Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), 2020'de tahmini 57.600 kişiye teşhis konulan Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir [43,44].

PDAC teşhisi konan hastalar için genel 5 yıllık sağkalım oranı% 7 ila% 9 arasında durgun kalmaktadır. Cerrahi rezeksiyon iyileşme için tek umut sunarken, kemoterapi, kemoradyasyon ve potansiyel hedefli tedavileri içerecek şekilde multimodal terapi bağlamında uygulanmalıdır.

Bir hastanın multimodalite bakımının tüm yönlerini tamamladığı en iyi senaryoda bile, sağkalım 30 ila 40 aydır. Tek başına kemoterapi alan metastatik veya rezeke edilemeyen hastalığı olan hastaların yaşam süresi ise 10-13 aydır [45,46,47].

Tanı anında ilerlemiş hastalık yüzdesinin yüksek olması ve mevcut ilaç ve radasyon tedavisi kombinasyonlarının sınırlı etkinliği nedeniyle prognoz zayıf kalmaktadır. On yıllar süren çabalara rağmen, rapor edilen 5 yıllık sağkalım 2005 yılında% 5'in altındaydı ve ölüm oranları önemli değişiklikler olmaksızın sabit kalıyordu. Bugüne kadar cerrahi, uzun süreli sağkalım için tek umut olmaya devam etmektedir, ancak rezeke edilen hastalar için bile, 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık % 20 olarak kalmaktadır, çünkü % 80'i cerrahi rezeksiyondan sonraki 2 yıl içinde hastalığı tekrarlayacaktır [48,49].

Pankreas Kanserinin görülme sıklığı, son yıllarda çoğu ülkede her iki cinsiyette de artmaktadır ve muhtemelen dünya çapında artmaya devam edecektir [50]. Sigara içme yaygınlığındaki düşüşün olumlu etkisinin aksine, en azından erkeklerde, obezite ve diyabetli popülasyonda artış dahil olmak üzere diğer yaşam tarzı risk faktörlerinin yaygınlığının değişmesi, yetersiz meyve alımı ile kırmızı veya işlenmiş et alımında artış, sebzeler ve fiziksel hareketsizlikteki artışın yanı sıra gelişmiş teşhis yöntemleri, dünya çapında Pankreas Kanserinin görülme sıklığının zamansal eğilimine paralel olması muhtemeldir [51,52].

Pankreas kanseri oluşumunda pek çok faktörün etkili olabileceği belirtilmektedir. Risk faktörlerinin çoğu direkt olarak hastalığa sebep olmaz, ancak bu faktörlere maruz kalma düzeyi genellikle kanserin gelişmesini etkilemektedir. Tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle pankreas kanseri gelişiminde rol oynayabilecek kontrol edilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması, ailesinde pankreas kanseri öyküsü bulunan, yüksek risk taşıyan bireyler için özellikle önem taşımaktadır [53].

1.3.1. Sigara

Sigara kullanımının pankreas dokusunda kansere yol açan nedenlerin sigara dumanındaki nitrozamin gibi karsinojen bileşiklerinden olduğu belirtilmiştir. Pankreas

kanserlerinin yaklaşık %25'inde sorumlu olduğu bilinmekle birlikte, sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla yaklaşık 2,2 kat artmış risk bulunmaktadır [54].

N-nitrozaminlerin oluşturduğu metabolitlerin DNA kırıkları oluşturarak K-ras mutasyonuna neden olduğu, ayrıca karsinogenezde rol oynayan siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin aktivitesini arttırdığı bilinmektedir [55].

Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %25'inin sigara kullanımına bağlı olduğu belirtilmekte ve sigara içmeyi bırakmış kişilerde 15-20 yıl içerisinde kanser riski sigara içmeyenlerin seviyesine iniş göstermektedir. Pasif içicilik ise pankreas kanseri için bir risk faktörü olarak kabul edilmemektedir. Nikotin ve Nikotinden türetilmiş karsinojenlere maruz bırakılan PDAC hücrelerinde kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır. Araştırmalar, sigara dumanı ve bileşenlerinin pankreas hücrelerinin kök hücre özelliklerini artırabileceğini gösterdi. Kök hücre özellikleri, kanser hücrelerinin kendi kendini yenilemesini ve diğer hücre türlerine farklılaşmasını sağlar [56].

1.3.2. Alkol

Alkol tüketimi ve pankreas kanseri gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya yönelik yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, alkol kullanımı ile pankreas kanseri riski arasında herhangi bir ilişkinin varlığı doğrulanmamıştır [57]. Alkol tüketimi, her ikisi de artmış pankreas kanseri riski ile ilişkilendirilen pankreatit ve tip II diyabet için risk faktörüdür. Düşük ve orta seviyede alkol tüketimi, bir risk artışına neden olmazken, günde 30 gr ya da daha fazla olmak üzere ağır alkol tüketiminin yaklaşık %22 oranında pankreas kanseri risk artışına yol açabileceği belirtilmiştir. Bir kanserojen olan asetaldehit, yağ asidi etil esterleri ve etanolün kendisi olmak üzere alkolik metabolitlerin pankreas inflamasyonuna neden olarak dolaylı bir şekilde ya da doğrudan karsinogeneze katkıda bulunabildiği ifade edilmektedir [58].

1.3.3. Yaş

Yaş pankreas kanseri gelişiminde bir diğer risk faktörü olup, insidans ve ölüm oranı yaşla birlikte artmaktadır. Yaşamın ilk 30-40 yılında pankreas kanserine yakalanma riski düşüktür ve 30 yaşından sonra insidans artışı başlar. 70-80 yaşlarında ise pankreas

kanseri insidansı pik yapmış durumdadır. 50 yaşından önce pankreas kanseri teşhisi % 10'dur ve ortalama tanı konma yaşı ise 72'dir [59].

1.3.4. Kronik pankreatit

Kronik pankreatit, geriye dönüşümsüz histolojik değişimlere pankreas fibrozuna ve adacık hücrelerinin kaybına neden olan, pankreasın ilerleyici bir inflamatuvar durumudur. Sık sık Kronik pankreatit nöbetleri, hastalığın ilerlemesine ve ayrıca pankreas ekzokrin veya endokrin yetmezliğine yol açarak sonunda anormal pankreas enzimlerine yol açabilir. Ayrıca pankreas hücrelerinin endoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozomal otofaji sistemlerini bozabilir ve hücrel DNA hasarına, kromozomal mutasyonlara ve onkojen aktivasyonuna yol açabilir [60]. Akut pankreatit, bir risk faktörü olarak düşünülme de tropik ve herediter kronik pankreatitin pankreas kanserine yatkınlığı arttırdığı belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda pankreatit tanısıyla birlikte pankreas kanseri riskinin orantılı olduğu gösterilmiştir [61]. 20 yıllık bir süreçte kronik pankreatitli hastaların yaklaşık %5'inde pankreas kanseri gelişimi gözlemlendiği belirtilmiştir [62].

1.3.5. Obezite

Hızla çoğalan kanser hücreleri için, lipid oksidasyonu ve biyosentez, hücrenin hayatta kalması için gereklidir. Epidemiyolojik kanıtlar, obezitenin pankreas kanseri için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. YAP geni ile obezite arasında bir halka ağı olan KRAS mutasyonu, pankreas kanseri oluşumuna katkıda bulunur [63]. Birkaç prospektif çalışma, kırmızı et ve hayvansal yağ ile pankreas kanseri riski arasında pozitif bir ilişki ve meyveler, sebzeler ve folat ile pankreas kanseri riski arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir [64]. Yüksek oranda hayvansal protein ve yağ içeren besinlerle beslenmenin pankreas kanseri riskini 2,5 kat arttırdığı bildirilmiştir. Sebze ve meyve tüketimi, özellikle C vitamini olmak üzere vitamin ve liflerce zengin bir beslenmenin ise pankreas kanserinden koruyucu özelliği bulunmaktadır [65]. Obezite, hem kadınlar hem de erkekler için kabul görmüş bir risk faktörüdür. Obez bireyler, normal vücut ağırlığındaki bireylere kıyasla %20 daha fazla pankreas kanseri riski taşımaktadır [62]. Aynı zamanda, Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), insülin direnci, inflamasyon, intestinal mikroflora ve gastrointestinal peptidlerdeki değişiklikler aşağı akış sinyallerini ayarlayabilir. Yağ dağılımının

kanser riskini de etkileyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bel-kalça oranının veya bel çevresinin vücut kitle indeksi (BMI) ile birlikte belirli kanserlerin gelişimini ölçmek için kullanılması önerilir [66,67,68]. Vücut kitle indeksine(VKİ) bakıldığında hem erkek hem de kadınlar için 25 VKİ değeri artan pankreas kanseri riski ile ilişkili bulunurken, VKİ değeri 35 ya da daha fazla olan insanlarda bu risk artışı çok daha belirgindir. Özellikle abdominal obezite, erken yaşta pankreas kanserine yakalanma riski ile ilişkili bulunmuş ve ayrıca fiziksel aktivitenin pankreas kanseri riskini azaltabileceği bildirilmiştir [62].

1.3.6. Etnik köken

Etnik köken farklılıkları incelendiğinde pankreas kanseri için en yüksek insidans sırasıyla Afro-Amerikalılarda, Kuzey Avrupa halkında, Yeni Zelanda yerlileri ve Havai Polinezyalılarındadır. Amerika’da Afro-Amerikan popülasyonunda ölüm oranı Kafkas popülasyonuna göre 1,4 kat daha yüksektir [69].2018 itibariyle, dünyadaki pankreas kanserli insanlar arasında en yüksek ASR insidansı Avrupa (7,7 / 10 milyon) ve Kuzey Amerika'dadır.(7,6 10 milyon) En düşük insidans oranı ise Afrika'dadır. (100.000 kişi başına 2,2) [70].

1.3.7. Diyabet

Diabetes mellitus, pankreas kanserinin hem erken bir bulgusu hem de önemli bir risk faktörüdür. Uzun süreli diyabet durumu, diyabetik olmayan durumlara göre yaklaşık 2 kat risk taşımaktadır [61]. Tip 1 diyabette hastalık süresi 10 yıldan uzun olan hastalarda pankreas kanseri riski 5-10 kat artmaktadır. 20 yıldan uzun süredir bu hastalığa yakalanmış diyabetli kişilerde pankreas kanseri riski daha yüksektir [71]. Yapılan bir çalışmada anormal glukoz metabolizmasının pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte insülin direnci ve sekonder hiperinsülinizmin pankreatik karsinogenezde rol oynadığı düşünülmektedir. Yeni başlangıçlı diyabet ise, pankreas kanserinin potansiyel erken bulgusudur; öyle ki yeni başlangıçlı diyabetik yetişkinlerin yaklaşık %1’inde, diyabet teşhisi konulduktan sonra 3 yıl içerisinde pankreas kanseri teşhisi konulmaktadır [54,72]. Diyabet çeşitlerine bakıldığında, tip 1 diabetes mellitus ve tip 2 diabetes mellitus’un pankreas kanserinde sırasıyla 2 ve 1,8 kat risk artışına neden olduğu belirtilmiştir [73].

1.3.8. Kan Grubu

ABO kan grubu antijeni, kırmızı kan hücrelerinin tüm yüzeyinde bulunur. Yapılan son çalışmalar, kan grubu antijenlerinin pankreas kanseri riskini etkilediğini vurgulamaktadır [74]. Diyabetli insanlara bakıldığında A, AB veya B tipi kan grubuna sahip kişiler, O tipi kan grubuna göre daha yüksek risk altındadır [75]. ABO antijenini kodlayan gen, çözünür hücreler arası adhezyon molekülü-1 (sICAM-1) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi çeşitli plazma bileşenleriyle ilişkilendirilmesiyle kanser ilerlemesi, metastazının ilerletilmesi ve enflamatuvar sürecini içermektedir. Bu proteinler, immün hücre alımı için gerekli olan adezyon molekülleridir ve sistemik inflamasyona aracılık etmektedir. Yapılan bu çalışmalar, ABO kan grubunu kodlayan genin, tümör oluşumunda ve malignitede doğrudan bir rol oynadığını ve tümör hücresi immün gözetimi, hücre adezyonu, tümör apoptozu ve anjiyojenezde rol oynadığını ortaya koymaktadır [76].

1.3.9. İnsan mikroflorası

İnsan mikrobiyotası, bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoa dahil olmak üzere çeşitli organizmalardan oluşur. İnsan sağlığı ve hastalık durumlarında hayati bir rol oynarlar. Çalışmalar, pankreas kanserinin ortaya çıkışı, gelişimi ve prognozunun insan mikrobiyotası ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Spesifik oral, gastrointestinal ve pankreas mikroplarının yanı sıra bazı hepatit virüsleri ve safra, pankreas kanserinin gelişiminde potansiyel etiyolojik etkilere sahip olabilir. Mikrobiyota, kanserin gelişiminde esas olarak aşağıdaki şekillerde rol oynar. İmmünomodülatör aktivite, mikrobiyal metabolitler, mikrobiyota dysbiosis, mikrobiyal toksinler ve virülans ilişkisi, oral mikroplar ve ağız hastalıkları, gastrointestinal mikrobiyota, intrapancreatik mikrobiyal sistem şeklinde gruplandırılabilir [77,78,79,80].

İmmünomodülatör aktivite: Bağırsak mikrobiyotası, tümör oluşumu sürecine dahil olan birçok doğal ve uyarlanabilir bağışıklık tepkisini tetikler. Pankreastaki mikrobiyota, doğuştan gelen immün baskılama ve adaptif immünosupresyonu indükler [81].

Mikrobiyal metabolitler: Mikrobiyal ürünler ikincil safra asitleri, lipoteikoik asit (LTA) ve kısa zincirli yağ asitleri kanser hücresi büyümesinde önemli roller oynar [82]. Bağırsak mikropları tarafından üretilen metabolit, seyahat ederek ve pankreas hücreleri üzerinde etki ederek PDAC'ye neden olur. Spesifik mekanizma aydınlatılmamıştır [83,84].

Mikrobiyota dysbiosis: İnsan mikrobiyal sisteminin düzensizliği, bağırsakta ve vücuttaki diğer organlarda mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına neden olur. Sürekli antibiyotik alımından sonra, araştırmacılar farelerde mikrobiyal bozukluklara neden oldular ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli ekstraintestinal tümörlerin görülme sıklığının önemli ölçüde arttığını buldular. Artan sayıda kanıt, mikrobiyal disbiyozun PDAC'nin yatkınlığı, oluşumu ve prognozu ile ilişkili olduğunu göstermektedir [85].

Mikrobiyal toksinler ve virülans ilişkisi: Bazı bakteriyel toksinler kronik inflamasyona neden olabilir ve ayrıca hücrel DNA'yı yok edebilir ve ototoksinler yoluyla kanserojeneze neden olabilir.

Oral mikroplar ve ağız hastalıkları: Ağızdan mikropların translokasyon yoluyla nasıl yayıldığı veya pankreasa nasıl yayıldığı, mikrobiyologlar tarafından doğrulanmıştır. Bir vaka kontrol çalışmasında, oral patojenlerin yüksek pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu bulundu [86].

Gastrointestinal mikrobiyota: Bağırsak mikrobiyotası, insan vücudundaki en büyük mikrobiyal topluluktan oluşan karmaşık bir ekosistemdir. Mikrobiyotadaki mikroplar, vücudu enfeksiyondan korumak için etkileşime girerler ve bu da gastrointestinal sistemin normal şekilde çalışmasını sağlar. Pankreas tarafından salgılanan hidrolaz, bağırsak bakterilerinin parçalanmasını gerektirir ve pankreas suyu antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Pankreası retrograd enfeksiyondan korur ve bağırsak florasının normal işlevini sürdürmesine yardımcı olur. Son yıllarda, araştırmalar bağırsak mikroplarının pankreas kanserinde potansiyel patojenik rolünü ortaya çıkarmıştır. Son çalışmalar da, Pankreas kanseri için H. Pylorinin iltihaplanma ve bağışıklıktan kaçınma yoluyla dolaylı yoldan ilişkili olduğu gösterilmiştir [87].

İntrapankreatik mikrobiyal sistem: Çoğu mikroorganizmanın pankreasta hayatta kalamayacağına inanılıyor çünkü pankreas büyük miktarda güçlü alkali pankreas suyu ve proteazlar içermektedir [88]. Bazı araştırmacılar, PDAC hastalarının pankreasındaki mikroorganizma sayısının, 1000 katı olduğunu bulmuşlardır [89]. Karşılaştırmalı bir çalışma, PDAC'li hastaların pankreasında Bifidobacteria, γ -Proteus, H. pylori ve Clostridium bakterilerinin sayısında önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Proteus γ , antikanser ilaç gemsitabinin ilaç direnci ile ilişkili olabilir [90]. Klinik çalışmalar, H. pylori'nin pankreas kanserinin malignitesiyle ilişkili olabilecek pankreas PDAC'nin büyümesini ve ilerlemesini kontrol eden yolları aktive ettiğini göstermiştir [91].

1.3.10. Kalıtsal sendromlar ve genetik risk faktörleri

Pankreas kanseri gelişiminde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörler de önemli bir yere sahiptir. Pankreas kanserlerinin %3-10'u ailesel pankreas kanseri olarak sınıflandırılır. Aile içerisinde etkilenen bireylerin sayısına bağlı olarak risk 4,46-32 kat artmaktadır [92]. Son yıllarda yapılan araştırmalar, Pankreas kanserinin net bir aile temeline sahip olduğunu ve aile geçmişinin hastalık riskini büyük ölçüde artırdığını bulmuştur [93,94].

Temelde genetik ve edinilmiş gen mutasyonlarından kaynaklanır, Pankreas kanserlerinin çoğu sporadik olmasına rağmen, %10'u ailesel temellidir [72,73].

Pankreas kanserinde en sık görülenler; K-RAS, CDKN2A (P16), TP53, SMAD4, BRCA2, BRCA1, STK11, PRSS1 ve MMR nokta mutasyonlarıdır [95,96,97]. Ailesel pankreas kanseri hastalarında sıklıkla tanımlanan mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarıdır. BRCA1 mutasyonu varlığı pankreas kanseri riskini 2,26 kat artırırken, BRCA2 mutasyonu varlığında risk 3,5-8 kat artmaktadır [98]. Bazı kalıtsal hastalıklar ve sendromlarda da pankreas kanseri riskinde artış görülür. En yaygın Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser diğer adıyla Lynch sendromu, pankreas kanseri insidansının gözleendiği, otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Bu hastalık MSH2, MLH1, MSH6 ve PMS2, DNA tamir genlerindeki (MMR) mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu sendrom normal popülasyona göre 8,6 kat pankreas kanseri riski oluşturmaktadır [73].

CFTR gen mutasyonlarının sebep olduğu, otozomal resesif bir hastalık olan kistik fibrozisde de viskoz mukus üretimi pankreas kanalının tıkanmasına yol açarak inflamasyon riskini arttırır. Bu da kistik fibrozis hastalarında kronik pankreatit ve pankreas tümörü oluşumu riskini yükseltmektedir [23].

Peutz-Jeghers sendromu, otozomal dominant geçişli bir kalıtsal bir hastalık olup gastrointestinal kanalda hemartomatöz polipler, dudaklarda ve mukozalarda melanotik maküller ile karakterizedir. Hastaların yaklaşık %80'ni hücre enerji metabolizmasının düzenlenmesinde işlev gören *STK11/LKB1* tümör baskılayıcı geninde mutasyon taşımaktadır [99].

Bu sendrom normal popülasyona göre 132 kat pankreas kanseri riski oluşturmaktadır [100]. Etkilenmiş bireylerde pankreas kanseri gelişim riski ise %36'dır [101]. Bu hastalıkların yanı sıra pankreas kanseri, Li fraumeni sendromu, ataksitelanjiyektazi sendromu, multipl endokrin neoplazi tip I sendromu, Von Hippel-Lindau sendromu gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir [102].

Ailesel tipik multipl mole-melanom (FAMMM), hastalarının yaklaşık %38'i hücre döngüsünün düzenlenmesinde işlev gören *p16INK4A/CDKN2A* tümör baskılayıcı geninde mutasyon taşımaktadır ve otozomal dominant olarak kalıtılır [73]. Bu sendrom normal popülasyona göre 38 kat pankreas kanseri riski oluşturmaktadır [103].

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) sendromu, bazılarında maligniteye ilerleyerek 40'lı yaşlarda kolorektal adenokarsinomlar için kesin risk faktörü oluşturmaktadır. Kolorektal adenomatöz poliplerin erken gelişimi ile karakterize olan bir sendromdur [104]. Bu sendroma, Wnt/ β -katenin sinyal yolağında işlev gören hücre döngüsü kontrolü ve mikrotübül kararlılığında işlevsel olan *APC* geninde taşınan ve otozomal dominant olarak kalıtılan germline mutasyon neden olmaktadır. Pankreas kanseri ile ilişkisine bakıldığında normal popülasyona göre 4,5-6 kat artmış risk bulunmaktadır [73].

Pankreas kanseri için kesin risk faktörü olan kronik pankreatitin nadir bir formu olan kalıtsal pankreatit, otozomal dominant olarak kalıtılır ve yüksek penetrans özelliğe sahiptir. Ailedeki atasal kökene bağlı olmakla birlikte genellikle 30 yaşından önce kendini gösteren bir hastalıktır. Hastalarda, katyonik tripsinojeni kodlayan

*PRSSI*geninde otozomal dominant kalıtılan ve bir tripsin inhibitörü kodlayan *SPINK1*geninde ise otozomal resesif olarak kalıtılan germline mutasyonlar bulunmaktadır [73]. Bu ailelerde pankreatik kanser insidansı, özellikle sigara kullanımını ve diyabetli durumlarda erken başlangıç göstermekle birlikte 20-40 yıllık bir kronik pankreatit sonrası artmaktadır. Normal popülasyona göre 53 kat artmış risk bulunmaktadır [105].

Pankreas kök hücrelerinde, esas olarak kromatin düzenleyici proteinlerdeki mutasyon sürecinde ve epitel-mezenkimal geçişin (EMT) kontrolünde ortaya çıkan bariz epigenetik değişiklikler vardır, ancak bu değişiklikler genetik dizilimdeki değişiklikleri içermez. Yalnızca DNA ve kromatin yapısı / kimyasal değişiklikler söz konusudur. Bu nedenle, bu değişiklikler sonuçta hücrenin genel fenotipik durumunu etkiler. Bu fikirlere dayanarak, bazı araştırmacılar epigenetik düzenleme sürecini engellemenin yeni tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunup bulunmadığını araştırmaya başlamışlardır [56,106].

1.4. Pankreas Kanseri ve Genetik

Pankreas kanserinin ilerlemesinde, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen değişiklikler, kromozom ya da gen kopya sayısı değişiklikler, mikrosatellit kararsızlığı, epigenetik gen sessizleştirme gibi çok kapsamlı genetik değişimler rol oynamaktadır [107]. Pankreas kanserinde en fazla mutasyona uğrayanlar arasında *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4* genleridir. Bu genler gibi daha birçok gen mutasyona uğramaktadır.

1.4.1. Onkogenler

Diğer kanser türlerinde de karşımıza çıkan K-ras gen mutasyonu %95'lik oranla pankreas kanserinde en sık saptanan somatik mutasyondur. *Bu* mutasyonlar çoğunlukla 12. kodonu nadir olarak da 13 ve 61. kodonu etkileyen nokta mutasyonlarıdır [108]. K-ras mutasyonu, güçlü çoğalma özelliğine sahip, duktal prekanseröz lezyon oluşumunu uyarır [109]. K-ras hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre gelişimi gibi hücresel süreçle yakından ilişkilidir. Kromozom 12'nin kolunda yerleşik olan *KRAS2*geni, çeşitli hücresel işlevlere aracılık eden RAS ailesine ait bir guanozin trifosfat(GTP) bağlı protein kodlar [108]. Hücre zarında

bulunan RAS proteini, normal fizyolojik şartlarda GDP'ye bağılı olarak inaktif halde bulunur; hücre dışı ya da hücre içi uyarı sonucu aracı moleküllerle GDP/GTP değişimi yaparak aktif haldeki GTP-RAS bileşimi oluşur ve bu bileşim sinyallerin aktifleşmesini başlatır. RAS/RAF/MAPK sinyal yolağında aktif RAS, mitojen aktiviteli protein kinazları (MAPK) aktifleştirecek RAF'ın kinaz aktivitesini başlatır; böylece hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, migrasyon, doku tamiri ve anjiyogenez gibi temel hücre sel yolakları aktive eder [59]. Aktif *KRAS* gen mutasyonları, *KRAS* proteinin GTPaz aktivitesinin düzenlenmesini ortadan kaldırarak sürekli işlevsel haldeyani GTP-bağlı kalmasına ve akabinde RAF-MAPK, PI3K-Akt gibi birçok aşağı yönlü (downstream)efektör sinyal yolaklarının kontrolsüz sürekli aktivasyonuna yol açar; böylece kritik karsinojenik süreçler için gerekli transkripsiyon faktörlerinin uyarılması geręekleřir [59].

K-ras geninde meydana gelen mutasyon birçok sinyal yolağını aktive edebilir ve kanser gelişiminde etkili olabilir. AKT onkogeninin hücre zarındaki yerleşimi yoluyla aktivasyonunun düzenlenmesine dayanan önemli bir sinyal yolağı olan PTEN/PI3K/AKT yolağı da bunlardan biridir [110]. Bu yolda, PI3K, önemli hücre sel süreçleri tetikleyen, serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesi olan AKT'nin hücre zarına çekilmesine sebep olurken, bir fosfataz olan PTEN PI3K'a karşı hareket eder, AKT'nin hücre zarındaki yerleşimini bozarak etkinliğini azaltır. Çoğu kanserde PI3K'lar ile AKT'nin ifadesi yüksek iken, PTEN genellikle mutasyona uğrayarak aktivitesini kaybetmiş ya da tamamen silinmiştir. Pankreatik karsinomların yaklaşık %10'unda da apoptozu engelleyen ve anjiyogenezi uyararak AKT'de artış gözlenmektedir [111]. K-ras mutasyonunun, anjiyenez, hücre çoğalması, apoptoz, hücre göçü ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan MEK ve ERK1/2'yi de aktive etmesinin yanı sıra, solid tümörlerde anjiyogenezi uyararak vasküler endotelial büyüme faktöründe (VEGF) de artışa sebep olabileceği gösterilmiş, bu nedenle bu mutasyonun sadece hücre çoğalması değil dolaylı olarak anjiyogenezde de rol oynadığı belirtilmiştir [112,113].

STAT3 transkripsiyon faktörü, JAK/STAT sinyal yolağında yer alarak, hücrenin kendini yenilemesi, hücre yaşamı, metastaz ve hücre apoptozunda etkilidir ve pankreas kanseri anjiyogenezinde rol oynadığı bilinmektedir [114]. Bu sinyal yolaklarının yanı sıra hücre sağ kalımı, invazyonu, kemoterapi direncini ve anjiyenez teşvik eden

genleri düzenleyen transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin(Nükleer Faktör kappa B) aracılık ettiği sinyallerin, bütün pankreas kanseri hücreleri ve dokularında yapısal olarak aktif olduğu ve ayrıca normalde pankreas organogenezi ve gelişiminde kritik rol oynadığı bilinen Hedhehog ve Notch sinyallerindeki efektörlerin pankreas kanserinin başlatılmasında rol oynadıkları belirtilmiştir [115].

Pankreas kanserinde büyüme hormonları ve onların reseptörlerini kodlayan bazı genlerin ifade seviyeleri artmaktadır. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) seviyelerindeki artış azalan yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), IGF-1 reseptörü, sinir büyüme faktörü (NGF) genlerindeki ifade artışı ise artan tümörjenite ile ilişkilidir [116,117].

1.4.2. Tümör baskılayıcı genler

Pankreas kanserinin gelişiminde, genomik kararsızlıkla hücrenin yaşamasına izin veren önemli olaylardan bir diğeri birkaç tümör baskılayıcı genin somatik mutasyonlarla inaktivasyonudur. En sık mutasyonun gözleendiği tümör baskılayıcı genler TP53, SMAD4/DPC4 ve CDKN2A/p16'dır [118].

Hücre döngüsünün negatif kontrolünde rol oynayan CDKN2A geni, kromozom 9'un q kolunda yerleşmiştir ve P16INK4A, P14ARF tümör baskılayıcı proteinleri kodlar. P16INK4A proteini retinablastoma proteininin fosforilasyonunu engelleyerek G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünün durmasını sağlamaktadır.P14ARF proteini, MDM2'nin nötralize eder ve böylece p53 tümör baskılayıcı proteininin ubiquitinasyonu ve yıkımını engelleyerek p53'ün kararlılığını sağlar [119,120]. Hücre döngüsünün negatif kontrolünde her iki protein de aktif iken, pankreatik tümörlerde nokta mutasyonları, delesyonlar ve hipermetilasyona bağlı olarak G1 kontrol noktasında hücre döngüsünün ilerlemesinde rol oynayan anahtar molekülleri engelleyen p16INK4a işlevini kaybetmiştir. Pankreatik karsinogenezin erken aşamasında p16 aktivasyon kaybı gözlenir ve erken metastaz, tümör büyüklüğü ve sağkalım oranı ile ilişkilidir. Pankreas kanseri olgularının%95'indeCDKN2A geni en yaygın işlev kaybı gösteren tümör baskılayıcı gendir [120].

TP53 geni ise Kromozom 17p'de yerleşim gösteren, hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasının düzenlenmesi, G2/M geçiş noktasında tutulmasının sürdürülmesi ve apoptozun uyarılması, DNA tamiri gibi mekanizmalarda çoklu işlevli p53 tümör baskılayıcı proteinini kodlar. [119] p53 proteininde işlev kaybının olması, hasarlı kalması DNA ya sahip hücrenin bölünmenin devam etmesine sebep olur ve genetik anomalilerin hücre içinde birikmesine yol açar [121]. *TP53*, pankreas kanseri olgularının yaklaşık %75'inde mutasyona uğramıştır [122].

Pankreas kanserinde inaktive olan bir diğer tümör baskılayıcı gen 18. kromozomun q kolunda yerleşik olan *SMAD4*'tür ve Pankreas kanserlerinin %55'inde işlev kaybı görülür. *SMAD4* proteini, hücre döngüsünün durdurulması ve hücre göçünde önemli genlerin transkripsiyonunda görevli TGF- β sinyalinin anahtar düzenleyicisi olarak görev yapar. *SMAD4* işlev kaybı, *SMAD4* bağımlı çoğalma karşıtı ve proapoptotik özellikteki TGF- β yolağını ortadan kaldırarak düzensiz hücre çoğalmasına yol açar [120]. Ayrıca *SMAD4* mutasyonu pankreas kanserinde metastaz gelişimi ile de ilişkilendirilmektedir [123].

Bazı büyüme faktörleri ve onların reseptörlerinde normal pankreatik doku ile karşılaştırıldığında pankreas kanserinde büyüme, invazyon ve anjiyogeneze katkı sağlayacak şekilde çok yüksek bir oranda ifade edildikleri görülmektedir [124].

Hücrel çoğalma ve yaşamsal uyarılara aracılık eden EGFR(epidermal büyüme faktörü reseptörleri)ve ligandlarının aşırı ifadesi pankreas kanserinde kötü seyrin bir göstergesidir. Ayrıca endotelial hücre çoğalmasını, sağkalımı ve böylece anjiyogenezi teşvik eden VEGF'nin (vasküler endotelial büyüme faktörü) pankreas kanseri hücreleri ve dokularında aşırı ifade edildiği bilinmektedir [115]. Promotor bölgelerinde anormal CpG hipermetilasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı ve onkogenik genlerin hipometilasyonla aktivasyonu gibi epigenetik değişimler de pankreas kanserinde yaygındır [120].

1.4.3. Diğer genetik değişiklikler

Pankreas kanserinde, MLH1, MSH2 gibi DNA tamir mekanizmalarında görevli olan genlerde aktivasyon kaybı sonucu, DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmasında meydana gelen bozukluklar mikrosatellit kararsızlığa neden olmakta, bu durum

pankreas kanseri hastalarının %10' undan daha azında rastlanmaktadır [124]. Pankreas kanserlerinin yaklaşık %60'ında birden fazla gen, promotor bölgelerinde bulunan sitozinlerin hipermetilasyonu ile sessizleşmiştir. Pankreas kanserinde epigenetik mekanizmalar ile sessizleştirilen genler; ppENK (%90), RARB (%20), CDKN2A/P16 (%18), CACNA1G (%16), TIMP3 (%11), CDH1 (%7), THBBS1 (%7) ve hMLH1 (%4) olarak bildirilmiştir [125].

1.5. HNF1A Geni

HNF1A geni; Hepatosit nükleer faktör 1 α (HNF1 homeobox A), glukoz metabolizması ve adacık gelişiminde rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür. 12.kromozom üzerinde bulunan bir insan genidir ve 10 ekson içerir. Birçok doku ve hücre tipinde eksprese edilir. Bu gen tarafından kodlanan protein, karaciğere spesifik birkaç genin ifadesi için gereklidir. Pankreas β -hücresi gelişimi ve fonksiyonları için de önemlidir. Fakat HNF1A pankreas karsinogenezinde fonksiyonel önemi ve moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir [126]. Ayrıca artmış koroner arter hastalığı riski ile ilişkili 27 SNP'den birini içerir. HNF1A germline heterozigot mutasyonlarının tip 3 MODY'den (gençlerde olgunluk başlangıçlı diyabet) sorumlu olduğu bulunmuştur. Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) heterojen poligenetik bir hastalıktır. Tip 2 diyabetes mellitus patogenezinde HNF1A geninin rolü araştırılmaktadır. HNF1A-gendeki sık varyasyonların, Tip 2 diyabetes mellitus gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. Genome-wide-association (GWA) çalışmalarında HNF1A genin bulunduğu kromozom 12q24 ile Tip 2 diyabetes mellitus arasında ilişki gösterilmiş [127].

HNF1A genin klasik Tip 2 diyabetes mellitus gelişimine etkisiyle ilgili çelişki veriler bildirilmiştir. Beyaz ırkta yapılan GWA çalışmasında sık varyasyonlar ile (p I27L, p A98V ve p S487N) ile bozulmuş glukoz toleransı ve Tip 2 diyabetes mellitus arasında ilişki gösterilememiştir [128].

HNF1A geninin polimorfik varyantları, inflamasyonun bir biyobelirteci olan dolaşımdaki C reaktif protein (CRP) seviyesi ile ilişkilendirilmiştir [130,131] ve HNF1A plazma protein fukosilasyonunun ana düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır [132]. Bu kanıt, HNF1A'nın bağışıklığın düzenlenmesi, iltihaplanma tepkisi ve protein

katlanmasının yanı sıra hücre büyümesi ve farklılaşması yoluyla kanser gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir.

HNF1A ilk olarak hepatositlerde tanımlanan bir transkripsiyon faktörüdür ve yumurta sarısı endoderminde ve gelişmekte olan böbrekte, karaciğerde ve pankreasta zamansal bir şekilde ifade edilir [129]. Yetişkin dokularda, HNF-1 bağırsak, akciğer, karaciğer, pankreas ve ürogenital sistemin spesifik gen ekspresyonunu düzenler [133].

HNF1A'nın pankreas duktal adenokarsinomunda (PDAC) bir rolü olduğunu bildirmiştir ancak bu tartışmalı bir konudur. Daha önceki çalışmalar, HNF1A'nın spesifik siRNA tarafından seçici olarak bloke ederek, pankreas kanseri hücre proliferasyonunu önemli ölçüde teşvik etmiş ve in vitro apoptozu inhibe etmiştir. Ayrıca, HNF1A nakavtının pankreas kanseri hücre hatlarında Akt / mTOR sinyal yolunu aktive ettiğini de bildirmiştir [126]. HNF1A'nın pankreas kanserinde potansiyel bir tümör baskılayıcı rolü olduğunu düşünülmüştür. Fakat 2018 yılında Abel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pankreas kanseri kök hücre (PCSC) özelliklerinin merkezi bir transkripsiyonel düzenleyicisi ve pankreas duktal adenokarsinomda(PDA) yeni onkogen olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma ile beraber destekleyici birkaç çalışma daha yapılmış ve HNF1A geni yeni onkogen olarak kabul edilmiştir [134,135].

Abel ve arkadaşları; HNF1A geninin proteinlerinin pankreatik kanser kök hücrelerinde zenginleştiğini bulmuştur. İnsan pankreatik kanserlerinden alınan hücrelerde HNF1A seviyelerinin deneysel olarak azaltılması, hücrelerin daha az büyümesine ve farelerin pankreaslarına enjekte edildiğinde daha küçük tümörler oluşturmasına neden olmuştur. Bu durumda da HNF1A PDA'da yeni onkogen olarak tanımlanmaktadır [136].

Pankreas duktal adenokarsinomu, pankreas kanserinin en yaygın şeklidir. Aynı zamanda en ölümcül kanser türlerinden biridir. Pankreas tümörleri, farklı özelliklere sahip farklı kanser hücreleri içerir. Bunlar arasında pankreas kanseri kök hücreleri var. Bu agresif hücreler, tümör büyümesine ve yayılmasına katkıda bulunan kendi kopyalarını üretir. Ayrıca tümörlerin kemoterapi ve radyoterapiye direnmesine yardımcı olabilirler. Kanser kök hücrelerini spesifik olarak hedefleyen yeni tedaviler bu nedenle pankreas kanserinin tedavisinde önemli olabileceği düşünülmüştür [136].

Pankreas kanseri kök hücrelerinin (PCSC'ler) biyolojik özellikleri tam olarak tanımlanmamıştır ve merkezi düzenleyiciler bilinmemektedir. Abel ve arkadaşları İnsan PCSC ile zenginleştirilmiş gen imzasının biyoinformatik analizi ile, transkripsiyon faktörü HNF1A'yı, PCSC fonksiyonunun varsayılan bir merkezi düzenleyicisi olarak belirlemiştir. HNF1A ve hedef genlerinin seviyelerinin PCSC'lerde ve tümör kürelerinde yükseldiği ve HNF1A'nın inhibisyonunda, büyüme inhibisyonu, apoptoz, bozulmuş tümör oluşumu, azalmış PCSC belirteç ekspresyonu ve POU5F1 / OCT4 aşağı regülasyonu ile sonuçlandığı belirtilmiştir. HNF1A'nın aşırı ekspresyonu, pankreas kanseri hücrelerinde PCSC markör ekspresyonunu ve tümör oluşumunu artırmış ve pankreatik duktal adenokarsinom (PDA) hücre büyümesine neden olduğu gösterilmiştir. PDA hücrelerinde, hastalarda hayatta kalmanın azalmasıyla önemli ölçüde ilişkili olan HNF1A, Pankreas kanseri kök hücrelerinin (PCSC) özelliklerinin merkezi bir transkripsiyonel düzenleyicisi ve PDA'da yeni onkogen olarak tanımlandığı rapor edilmiştir [136].

1.6. Pankreas Kanseri Belirtileri, Tanısı, Evrelendirmesi ve Tedavisi

1.6.1. Pankreas kanseri belirtileri

Erken evredeki pankreas kanseri genellikle sessizdir ve tümörün çevre dokulara yayılması ya da metastazı ile belirgin hale gelir. Genellikle belirtileri gösteren pankreas kanseri ilerlemiş durumdadır ve tümör safra kanalı, mezenterik ve çölyak sinirler, pankreas kanalı ve duodenum gibi yapılara baskı uygulamaktadır [137,138].

Semptomlar tümörün pankreastaki yerine bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir. Pankreatik kanserlerin %60-70'i pankreas başında %20-25 ise gövde ve kuyruk kısmında yerleşiktir [138]. Genel olarak pankreas kanseri belirtileri; üst karın ağrısı, sarılık, iştah kaybı, bulantı ve kusma, ani ortaya çıkan diyabet, hazımsızlık, steatore (yağlı dışkı) ve idiyopatik pankreatit'dir. Hastaların yaklaşık %50'si diyabetlidir [139].

Pankreas başında bulunan tümörlerin en yaygın belirtisi sarılıktır. Ağrısızdır ve kaşıntı durumu mevcuttur [140]. Çoğu hastada, tıkanma sarılığı gelişiminin takip ettiği karın ve sırt ağrısı mevcuttur. Bu ağrı tümörün kesilip çıkarılamayacağını (rezekte edilemeyeceğini) işaret eder. Diğer belirtiler ise diyabetes mellitus gelişimi ve emilim

bozukluğudur. Daha nadir belirti ise pankreas kanalı tıkanıklığı durumunda pankreatit gözlenmesidir [141].

Pankreasta sinsice ve usulca gelişen gövde ve kuyruk tümörleri, erken evrede bulgusuz olmakla birlikte teşhis edildiklerinde pankreas başı tümörlerinden çok daha ilerlemiş haldedir. Hastaların %60'ında sırt ağrısı ile beraber belirgin bir kilo kaybı söz konusudur. Sarılık nadir olarak görülmektedir. Ağrı ise gövde ve kuyruk yerleşimli tümörlerde daha sık görülse de pankreas kanserinin en yaygın belirtisidir [142]. Pankreas başı dışında yerleşim gösteren kanserlerin çoğu, ya karaciğer metastazı ya da superior mezenterik damarların yerel invazyonu gerçekleştirmiştir [143].

1.6.2. Pankreas kanserinin tanısı

Tümör belirteçleri ve çeşitli görüntüleme yöntemlerinden faydalanılarak pankreas kanseri tanısı yapılmaktadır. Pankreasın anatomik yapısı, erken semptomların bulunmaması gibi etkenler tanıyı geciktirir veya zorlaştırır. Bunun sonucunda teşhis konulduğunda hastaların %85'inde; proksimal lenfatik nodlarda, karaciğerde ya da akciğerde metastazik infiltrasyon görülmektedir [140].

1.6.3. Tümör belirteçleri

Pankreas kanseri tanısında karsinoembriyonik antijen (CA) 19-9 başta olmak üzere diğer karbonhidrat antijen tümör belirteçler CA-50,CA72-4 ve CA-242 ile karsinoembriyonik antijen ilişkili hücre yapışma (adezyon) molekülü 1 (CEACAM1) ve serum makrofaj inhibitör sitokin 1 gibi aşırı ifade edilen genlerin protein ürünleri belirteç olarak kullanılmaktadır [144].

Pankreas kanseri tanısında en yaygın kullanılan tümör belirteci CA 19-9 dır ve normal pankreas ve çeşitli dokular tarafından salgılanır . Pankreatit, siroz, kolanjit gibi hastalıklarda serumdaki miktarı yükselir. Bazı tümör belirteçlerinin serum düzeyleri teşhis için önemlidir. Özellikle Siyalilatlı Lewis antijeni olarak da bilinen glikoprotein karbonhidrat antijen 19-9 (CA 19-9), pankreas kanseri için hassasiyeti %80 ve özgünlüğü %73 olan bir tümör belirteçidir. Popülasyonun %5-10'unda üretilmediğinden bir tarama testi olarak önerilmemektedir [145]. Fakat CA19-9

seviyesi cerrahi operasyon sonrasında kullanılmaktadır ve kemoterapiye cevabın değerlendirilmesinde kullanılabilir.

Pankreas tanısında bir diğer yardımcı faktör ise kan testleridir. Tıkanma sarılığı durumunda serum bilirubin, alkalın fosfataz ve γ -glutamiltransferaz miktarlarında önemli bir artış görülür. Az miktarda da Serum aspartat aminotransferaz ve serum alanin aminotransferaz artış gözlenebilir. Tümörün karaciğere metastaz yapması durumunda da serum alkalın fosfataz ve transaminaz seviyelerinde küçük artışlar görülebilir. K vitamini emilimi bozukluğu, K vitaminine bağlı olarak pıhtılaşma faktörlerinin azalması, hafif anemi ve pıhtılaşma bozukluğu gibi durumlar pankreas kanseri ile ilişkili olabilmektedir. Ancak hastalarda, özellikle pankreas kuyruğunda tümör bulunanlarda laboratuvar bulguları normal olabilmektedir [138].

1.6.4. Görüntüleme yöntemleri

Pankreas kanseri için ilk olarak başvurulmuş görüntüleme yöntemleri ultrasonografi (USG) ve bilgisayarlı tomografi (BT)'dir. Diğer yöntemler ise; magnetik rezonans görüntüleme teknikleri (MRG), pozitron emisyon tomografisi (PET), endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP)dir. Pankreas kanseri için şüpheli duyulan durumlarda ilk kullanılan transabdominal ultrasonografi, pankreatik kitlelerin boyutu ve bölgesi, safra ve pankreas kanalı dilatasyonu, tümörün ana damara yakınlığı, assit(karında sıvı toplanması), lenf nodu tutulumu ve karaciğer metastazı hakkında bilgi sağlayabilir [146]. Doğruluk payı ise %50-70'dir ve 3 cm'den küçük tümörler için hassas değildir. Obezite, assit ya da bağırsak gazlarından dolayı sonuçlar hatalı olabilir [62].

En sık kullanılan bir diğer tanı yöntemi BT'dir. Sebebi ise pankreası net göstermesidir. 3 cm'den büyük lezyonların tespit edilmesinde tek güvenilir yöntem olabileceğine dair raporlar bulunmaktadır [12]. Pankreas neoplazmlar tespit ve tümörün kesilerek çıkarılıp çıkarılmayacağını (rezektabilite) değerlendirmek için en iyi tekniktir. Ayrıca BT ile karaciğer metastazları, vasküler invazyon, lenf nodu metastazları da değerlendirilir. Bir diğer görüntüleme çeşidi olan abdominal ultrason, pankreas görüntülemesinde BT kadar etkin değildir ve 3 cm'den küçük tümörler sıklıkla kaçırılır. İleri pankreas kanserinde görülen karaciğer metastazı ve assit (karında sıvı toplanması) ultrason ile görüntülenebilir.

En hassas metot olan endoskopik ultrasonografi (EUS), pankreatik kitlelerin belirlenmesinde ve tümör evrelemede BT ya da MRG, 2 cm'den küçük tümör kitlelerini teşhisinde çok kullanışlıdır [62]. Özellikle portal ve mezenter vene invazyonun tespit edilmesi, pankreas çevresindeki lenf ganglionlarının değerlendirilmesi ve cerrahi operasyona karar aşamasında önemli bir görüntüleme yöntemidir.

İnce iğne aspirasyon biyopsisi (FNA); tanısal belirsizliği bulunan lezyonların sitolojik değerlendirilmesini sağlamaktadır. Pankreas parankiması, pankreas kanalı ve duodenum, mide gibi komşu yapıların yüksek çözünürlüklü görüntüsünü sayesinde, gerçek zamanlı görüntü anında ince iğne aspirasyonu gibi tekniklerle biyopsi yapılmasına imkan sunmaktadır. EUS rehberliğinde yapılan ince iğne aspirasyon biyopsisinin duyarlılığı ise %85-90'dır [147].

MR yöntemi ise pankreasın yüksek çözünürlükte görüntülenmesini sağlayan bir yöntemdir. Küçük lezyonların tespit edilmesi ve çıkartılabilirliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. EUS, BT ve MR'nin tanısal etkinliklerini karşılaştıran, pankreas kanseri şüphesi bulunan hastalar ile yapılan bir çalışmada, bu görüntüleme yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %94, %69 ve %83 olarak belirlenmiştir.

Glukoz metabolizmasını gösteren 18-florodeoksiglukoz yaygın olmak üzere radyoaktif işaretli maddeler kullanılarak morfolojik bilgiden ziyade tümörlerin metabolik bilgileri ise pozitron emisyon tomografisi (PET) ile sağlanmaktadır [62,146]. PET yöntemi primer tümörlerin tespiti ve metastazik hastalıkların varlığını ortaya koymak için kullanılır. PET, BT sonrası yapıldığı için özgünlüğü ve hassasiyeti BT sonuçlarına göre değişmektedir [62]. Pankreas kanalını tıkayabilen, ancak BT ile ayırt edilemeyen tümörlerin tanısında ERCP yöntemi kullanılabilir. Bu bölge direkt olarak görüntülenebileceği gibi biyopsi alınmasında da kullanılabilir. Aynı zamanda hepatobiliyer sistemi görselleştirerek, biyopsi yapılabilmesine, genetik analizler için pankreatik sıvı alınmasına olanak sağlar [62,148]. Pankreas kanseri nedeniyle safra kanalında oluşan tıkanıklığın giderilmesi için stent takılması gibi tedavisel müdahalelere izin vermesi bakımından önemlidir [148].

1.6.5. Pankreas kanserinin evrelendirilmesi

Pankreas kanserlerinin evrelendirilmesinde, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) evrelendirilme sistemi kullanılmaktadır. Tablo 1.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 1.2. Pankreas kanserlerinin detaylı evrelendirilmesi [103]

Primer Tümör (T)	
Tx	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ I (PanINIII)
T1	Tümör pankreasla sınırlı, >2cm

Tablo 1.2. (Devam) Pankreas kanserlerinin detaylı evrelendirilmesi [103]

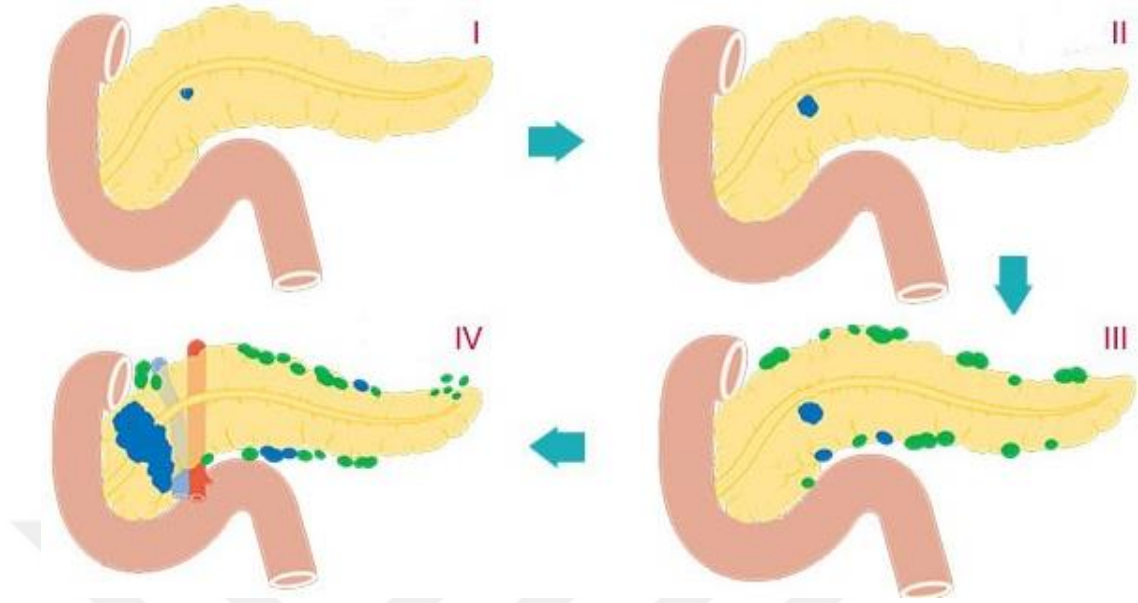
T2	Tümör pankreasla sınırlı, ≤2cm
T3	Tümör, çölyak ekseni ya da superior mezenterik arteri sarmadan pankreasın dışına uzanır
T4	Tümör, çölyak ekseni ya da superior mezenterik arteri sarar (primer tümör cerrahi olarak çıkartılamaz)

Bölgesel Lenf Nodlar (N)	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Anatomik Evre/Prognostik gruplar	
Evre 0	Tis, N0, M0
Evre IA	T1, N0, M0
Evre IB	T2, N0, M0
Evre IIA	T3, N0, M0
Evre IIB	T1, T2 ya da T3; N1; M0
Evre III	T4; N0 ya da N1; M0
Evre IV	T1, T2, T3 ya da T4; N0 ya da N1; M1

Evre I ve II tümörler ameliyatla çıkartılabilirken, Evre III ve IV'de metastaz sebebiyle tümör çıkartılamamaktadır. Pankreas kanseri hastalarının ortalama sağ kalım süreleri de evrelere göre değişmektedir. Evre I ve II tümürlü hastalarda ortalama sağ kalım süresi 15-22 ay, Evre III tümürlü hastalarda 8-18 ay, Evre IV tümürlü hastalarda ise 4-8 aydır [103]. Şekil 1.8.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.8. Pankreas kanseri evreleri [149]

1.6.6. Pankreas kanseri tedavisi

Pankreas kanseri erken evrelerinde genellikle hiçbir belirti göstermediğinden, erken tanı zordur. Pankreas kanseri tedavi seçenekleri; cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi olup, malignite aşamalarına bağlı olarak bu yöntemler tek başlarına ya da birlikte kullanılmaktadır.

Cerrahi, pankreas kanserinde kullanılan en temel tedavi yöntemidir Pankreas kanserinin cerrahi tedavisi, “Whipple” ameliyatıdır. Bu operasyonunun amacı; Lenf nodu metastazı olsa bile mikroskopik rezeksiyon sınırı bulunmadan makroskopik tümörün tamamen temizlendiği R0 rezeksiyon (kesip çıkarma) yapmaktır [150]. Bu ameliyat metastazı olmayan az sayıda hastaya uygulanabilmektedir. 1935 yılında İlk başarılı cerrahi operasyon gerçekleştirilmiştir. Pankreasın tümör taşıyan bölgesi ile mide, duodenum, safra kesesi ve safra kanalının bir bölümünün uzaklaştırıldığı, sindirim mekanizmasını destekleyici kısımların bırakıldığı Whipple yöntemi kullanılmıştır. Cerrahi operasyon iyi sonuçlar sağlasa da hastaların yaklaşık %80’inde kanser nüksetmekte ve 5 yıllık sağ kalım oranı ise %10-24 olabilmektedir [151].

Diğer tedavi seçenekleri; tek başına uygulanan sistemik kemoterapi ve radyasyon ile kemoterapinin kombine halde uygulandığı kemoradyoterapi şeklindedir [152]. Kemoterapi/radyoterapi uygulamaları adjuvan (cerrahi sonrası tedavi), neoadjuvan

(cerrahi öncesi tedavi) ve palyatif olarak sınıflandırılır. Pankreas kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları gemitabin, 5-fluourasil, kapesitabin, sisplatin ve oksaliplatin [153]. Bu ilaçlar, reaktif bölgeleri ile DNA ya da RNA nükleotitleri arasında çapraz bağlanma mekanizması ile etkileşime girerek iş görürler; böylece kanser hücrelerinde apoptoza neden olurlar [152].

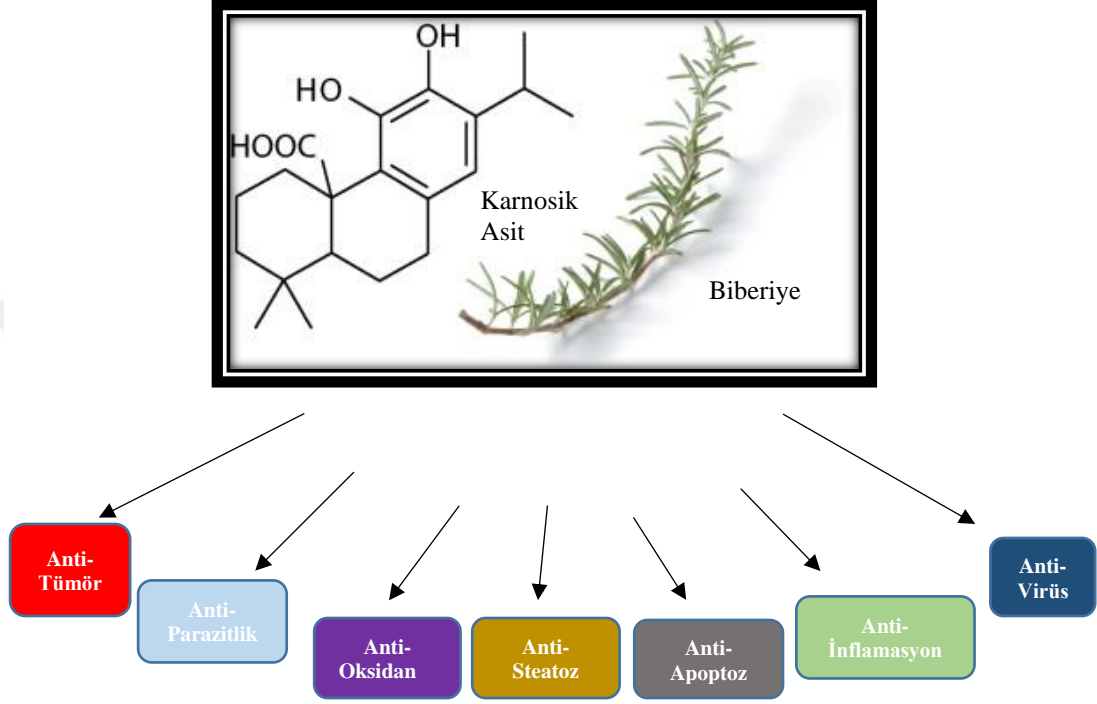
Genellikle kanser, cerrahi olarak tedavi edilmediğinde de kemoterapi/radyoterapi birlikteliği önerilmektedir. Pankreas kanserinde kemoradyoterapi etkili tedavi yaklaşımı iken, radyoterapinin yalnız başına bir tedavi seçeneği olduğunu destekleyen veri yoktur [152]. Araştırmacılar; antikanser gen terapi ajanları kombinasyonu uygulamaları ve tümörle ilişkili genlerin düzenlenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla bevasizumab gibi VEGF inhibitörleri ve erlotinib gibi EGFR inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu ajanların gemitabin ile birlikte kullanımının gemitabinin tek başına kullanıldığında istatistiksel olarak önemli yaşamsal yarar gösterdiği belirtilmiştir [154].

Pankreas kanserinin tedavi seçeneklerinin az olması ve yaşam süresinin kısa oluşu yeni terapötik stratejileri hedeflemektedir. Yapılan çalışmalarda, fenolik bileşenlerin insan sağlığına yararlı biyoaktif fitokimyasallar oldukları gösterilmiştir. Sebze ve Meyvelerdeki antioksidan aktivite ile fenolik bileşiklerin ilişkili olduğu bildirilmiştir [155,156]. Birçok fitokimyasalın antikanser etkisi olduğu ispatlanmıştır. Biberiye özleri ve bileşenleri olan Karnosik asit, kanser hücrelerine karşı doğal güçlü antiproliferatif ajanlar olarak bildirilmiştir. Çeşitli tümörlerde anti-kanser rol oynamıştır. Aynı şekilde bir başka fenolik bileşik olan Gallik Asitte, yapılan çalışmalarda antiproliferatif ajan olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, fenolik bileşikleri potansiyel olarak kanser tedavisinde tamamlayıcı bir yaklaşım olarak uygulamak için, en etkili bileşime, in vivo antitümör etkisine ve ana moleküler araçlarına ilişkin ek bilgilere hala ihtiyaç vardır [157,158].

1.7. Karnosik Asit

Karnosik asit (KA), biberiye (*rosmarinus officinalis*) ve salvia (*salvia officinalis*) gibi Lamiaceae familyasına ait bitki türlerinden elde edilen fenolik bileşiktir. Bu yağda çözünen bileşik, yiyecek ve içecek, kişisel bakım, beslenme ve sağlık alanlarında birçok endüstriyel uygulamaya yol açan yüksek antioksidatif kapasiteleriyle

tanınmaktadır. Antisteatoz , antioksidan, antiapoptoz ve antitümör anti-inflamasyon, antivirüs, antiparazitlik de dahil olmak üzere çoklu biyolojik fonksiyonlara sahip, birçok farmakolojik etkinlik göstermektedir [157,159].Şekil 1.9.'da karnosik asitin etkileri bulunmaktadır.



Şekil 1.9. Karnosik asitin etkileri [160]

Karnosik Asit; diş macunu, ağız gargarası ve sakız gibi gıda ve gıda dışı ürünlerinde koruyucu veya antioksidan olarak kullanılır. Günümüzde KA'nın, kanser hücresi büyümesi, apoptoz, reaktif oksijen türleri ve Akt aktivasyonunu düzenleyerek, kolon kanseri, meme tümörleri ve deri tümörleri gibi antitümörde çeşitli özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. KA, alkolik ve alkolsüz yağlı karaciğeri hafifletebilir. KA'nın kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü inhibe ettiği ve vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonunu da azalttığı gösterilmiştir. Karnosik asit, insan kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasını ve göç kapasitesini engellediği bilinmektedir [157,161].

Toplu ve emülsifiye lipit sistemlerinde test edildiğinde, karnosik asidin yağ asitlerini ve trigliseritleri oksidasyona karşı koruduğu bulunmuştur. Karnosik asidin ayrıca insan aortik endotel hücrelerinde düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu ve Caco-2 hücrelerinde lipid hidroperoksit aracılı oksidatif stresi önlediği

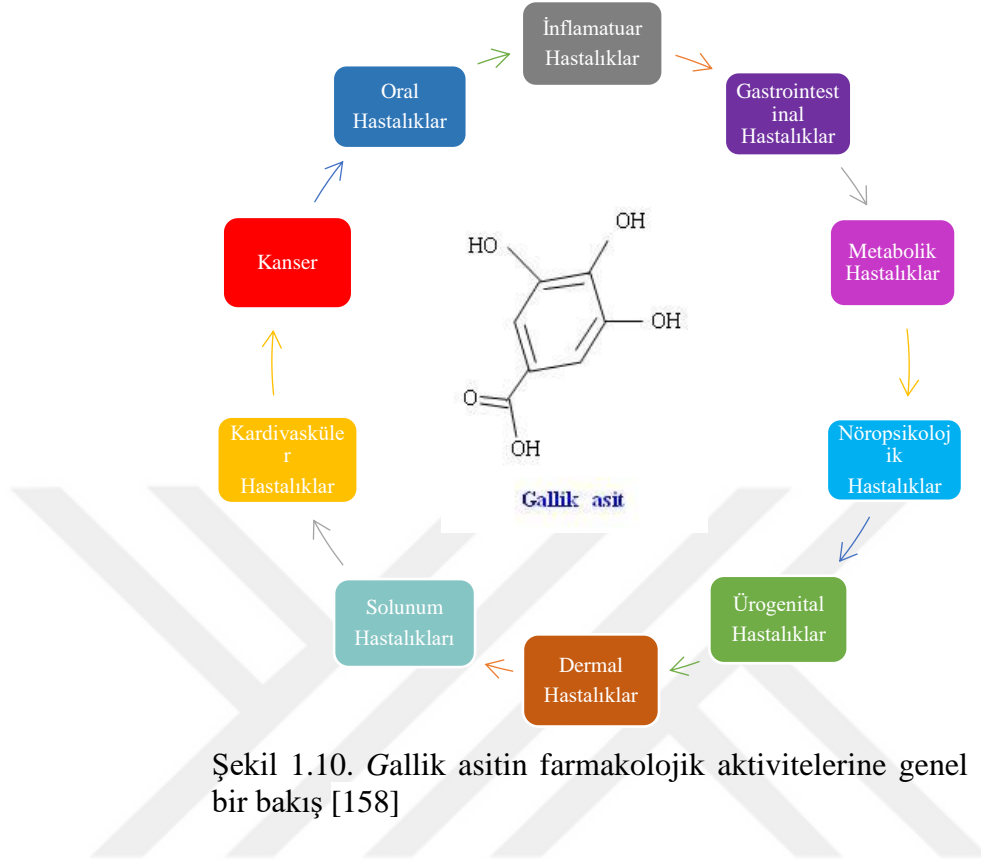
gözlenmiştir . Yağ, çiğ ve pişmiş et ve pişmiş et köftesi gibi gıda maddeleri, çoğu durumda sentetik antioksidanlardan daha yüksek bir verimlilikle karnosik asit tarafından oksidasyondan korunmuştur. Özellikle, karnosik asidin farklı reaktif oksijen türleri (ROS) veya lipid radikalleri ile etkileşimleri hakkında çok az şey bilinmektedir [157,162]

Yapılan bir çalışma da karnosik asitin farelerde lipopolisakkarit kaynaklı akciğer hasarına karşı koruduğu rapor edilmiştir. Karnosik asit (KA), iltihaplanmaya karşı sitoprotektif yanıtlarda merkezi bir role sahiptir. KA tarafından lipopolisakkarit ile indüklenen akut akciğer hasarı hafifletilmesi, histolojik sonuçlar ve akciğer dokularının ıslak-kuru oranında bir azalma ile doğrulanmıştır. Ek olarak, KA'nın, LPS'nin nötrofil apoptozu üzerindeki inhibitör etkisini ve LPS'nin IL-1 β , IL-6, TNF- α , TLR4 ve NF- κ B ekspresyonu ve NF- κ B fosforilasyonu üzerindeki teşvik edici etkilerini önemli ölçüde baskıladığı gözlenmiştir [163].

Sunulan verilere göre; Karnosik Asit'in HCT116 hücrelerinde apoptoza yol açtığı, ROS oluşumu, p53 indüksiyonu, kaspaz aktivasyonu ve STAT3 sinyal yolunun inhibisyonu rapor edilmiştir [164]. Kombinasyon olarak ise, Curcumin ve Karnosik Asit birlikteliği, in vitro ve in vivo olarak AML baskılayıcı etkiler yarattığı bildirilmiştir [165].

Yapılan başka çalışmada ise Karnosik Asit Tekrarlayan Hafif Travmatik Beyin Hasarı Sonrası Sonuçları İyileştirdiği ortaya çıkmıştır [166]. Ayrıca, çoğu çalışmada in vitro oksidasyon, uzun süreli ve yapay ısıtma işlemleriyle üretilmiştir, bu nedenle sonuçların bitkilerdeki in vivo duruma ekstrapole edilmesi zordur. Şaşırtıcı bir şekilde, bitki yapraklarındaki karnosik asidin rolü çok az ilgi görmüştür ve bu bileşiğin bitkilerdeki biyolojik rolü kesin olarak belirlenmemiştir [157].

1.8. Gallik Asit



"Fitokimyasal" terimi, değerli farmasötik ve besleyici özelliklere sahip çok çeşitli biyolojik olarak aktif doğal bileşiklere işaret etmektedir. Fenolik bileşikler, en az bir hidroksile benzen halkasına sahip bir fitokimyasallar grubudur. Bu büyük ve çeşitli kimyasal bileşik grubunun üyeleri, genellikle yapılarındaki karbon atomlarının sayısına göre sınıflandırılır. Beş ana sınıfa ayrılırlar: kumarinler, flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve tanenler. Kafeik asit, ferulik asit, P- hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, vanillik asit, salisilik asit ve gallik asit, fenolik asitlerin en yaygın üyeleridir [158,167].

GA; Gıda ve ilaç endüstrilerinde geniş uygulama alanına sahip, renksiz veya hafif sarı kristalli bir bileşiktir. Meşe türleri, yabani nar, çay yaprakları, üzüm, böğürtlen ve kavun gibi birçok bitki ve üründe bulunur. Başlıca quercus spp. Ve punicaspp. gibi bitki türlerinden izole edilmiştir. Bu bileşiğin, anti-enflamatuvar, anti-tümör, anti-mutajenik, anti-alerjik, antiülser, antioksidan ve anti-mikrobiyal, anti-hiperglisemik aktiviteleri içeren birçok önemli farmakolojik özelliği vardır [167,168,169]. Şekil 1.10.'da gösterilmiştir.

Günümüzde fenolik bileşikler içeren gıda maddeleri ve bunların metabolitleri, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı ilgi odağıdır. Flavonoidlerin çeşitli kanser türlerine ve yaşa bağlı hastalıklara karşı koruyucu rolü önemli örneklerdir [170]. Bazı raporlar, gallik asidin kardiyovasküler hastalıklar, vasküler kalsifikasyon ve radyasyona karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. En son veriler gallik asidin metabolik hastalıkları düzenlediğini göstermiştir. Çeşitli çalışmalar MMP-2 aktivitesini inhibe ederek anti-anjiyojenik etkiye katkıda bulunduğunu için göstermiştir. Gallik asit ve türevleri, serbest radikal süpürücü ve antioksidan doğalarına atfedilen sıvı ve katı yağların oksidasyonunu ve acılaşmasını engelleyebilir. Bu nedenle gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak faydalı olabilirler [171].

Gallik asit, sitotoksik ve antitümör etkisini, antioksidan / pro-oksidan dengesinin modülasyonu yoluyla gösterebilir. Kaspaz yolunu ve ROS oluşumunu aktive ederek hücre döngüsü tutuklamasını, otofajiyi ve apoptozu indükleyebilir. Buna ek olarak, bu matriks metalloproteinaz ekspresyonu ve aktivitesi azaltarak istilasını ve metastazını inhibe edebilir [168,169].

Yapılan bir çalışmada GA, iki yumurtalık kanseri hücre dizisi OVCAR-3 ve A2780 / CP70'in büyümesini ve in vitro anjiyogenezini seçici olarak inhibe etmiş, Akt fosforilasyonunun ve HIF-1 α ekspresyonunun baskılanması ve PTEN ekspresyonunun desteklenmesi yoluyla VEGF sekresyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada ise kanser seçici ajan olarak gallik asit, pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği rapor edildi [172].

Geçmişte, gallik asit, lösemi ve akciğer kanserinde farklılaşma ve apoptozu indüklemeye ve tümör anjiyogenezini ve hücre metastazını baskılayabilecek bir serbest radikal toplayıcısı olarak rapor edilmiştir [173]. Gallik asitin diğer fenolik bileşiklerle kombinasyonundan da güzel sonuçlar alınmıştır. Gallik asit ve kurkumin, apoptoz indüksiyonu yoluyla anti-kanser etkiler sergiledikleri ayrı ayrı gösterilmiştir [174].

1.9. Kök Hücre

Kök hücreler, kendi kendini yenileyebilen ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilen, doku ve organları inşa edebilen özel hücrelerdir. Birçok hastalığın tedavisinde kök hücreler kullanılır. Hücre terapisi ve doku jenerasyonu alanlarında önemli potansiyellere sahiptir. Kök hücreler somatik hücrelere benzer olarak simetrik bölünme yeteneğine sahip olmanın yanında, kök hücre havuzunu korumayı sağlayan ve aynı zamanda somatik hücreleri de oluşturabildiği asimetric bölünme yeteneğine de sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda kök hücrelerin farklı özelliklere sahip oldukları ve farklı kaynaklardan elde edilebildikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle kök hücreler, farklılaşabilme potansiyellerine göre ve elde edildikleri kaynağa göre sınıflandırılırlar [175].

Farklılaşabilme kapasitelerine göre 5 ana grupta sınıflandırılırlar. Şekil 1.11.'de gösterilmiştir.

1.9.1. Totipotent kök hücreler

Yumurtanın sperm ile döllenişle oluşan zigot, bir vücudu oluşturabilen tüm hücrelere dönüşebilecek kapasiteye sahiptir. Döllenişmeden sonraki 3.günün sonuna kadar bu özelliklerini korurlar [176].

1.9.2. Pluripotent kök hücreler

Bölünerek kendi kendine yenileme kapasitesine ve erken embriyonun üç primer germ hücre tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektodermden köken alan tüm hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu nedenle yetişkin vücudunun tüm hücrelerini oluşturabilir ancak plasenta gibi ekstra embriyonik dokulara dönüşme kapasitesine sahip değildir. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) pluripotent kök hücrelerdir [176,177].

1.9.3. Multipotent kök hücreler

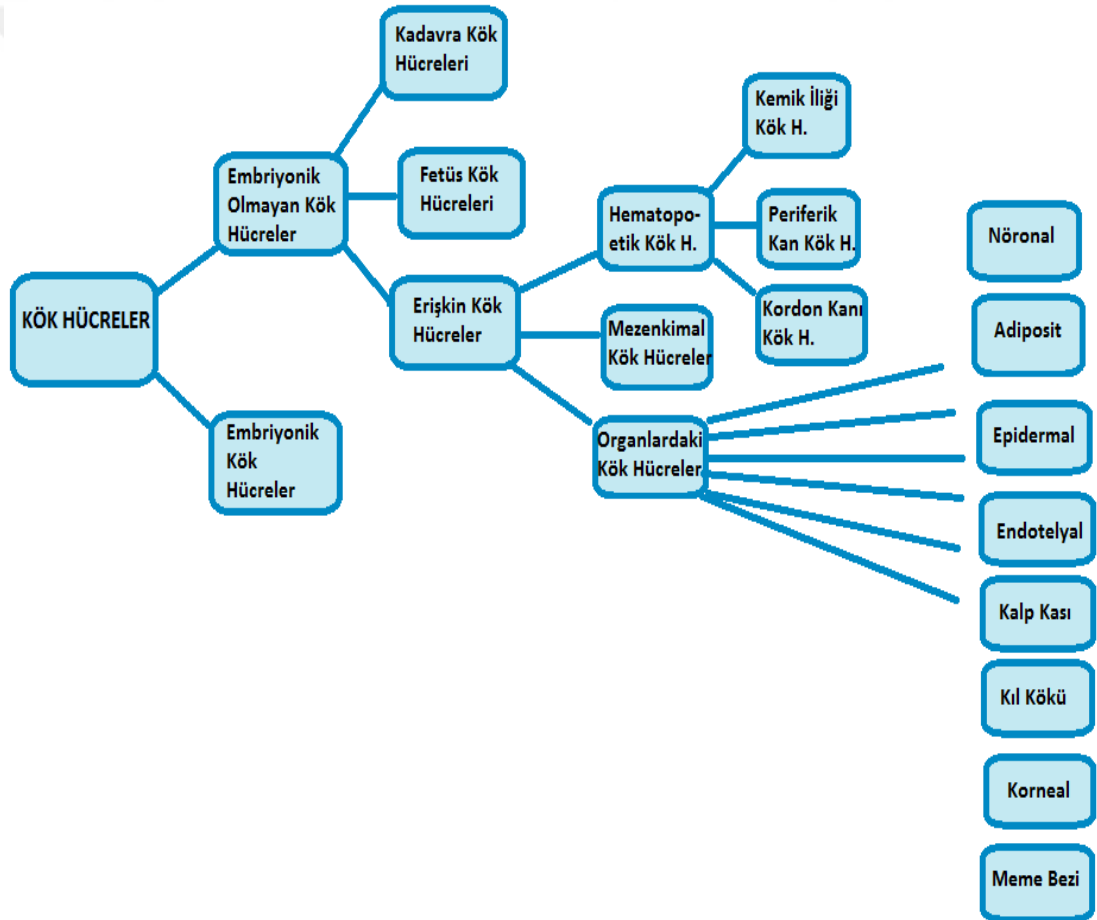
Bölünerek kendi kendini yenileme kapasitesine sahip hücrelerdir. Belirli bir doku veya organda bulunan birçok farklı özel hücre tiplerine dönüşebilen hücrelerdir. Erişkin kök hücrelerin çoğu, multipotent kök hücrelerdir [176].

1.9.4. Oligopotent kök hücreler

Bu kök hücreler sınırlı bir hücre soyuna veya dokusuna farklılaşabilmektedir. Lenfoid kök hücreler ve gözdeki korneal kök hücreler oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir [176].

1.9.5. Unipotent kök hücreler

Bu hücreler tek bir tip hücreye dönüşebilme kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Deri hücreleri örnek olarak verilebilir. Kök hücreler farklılaşabilme kapasitelerinin yanında, elde edildikleri kaynaklara göre de sınıflandırılabilirler [176].



Şekil 1.11. Kök hücrelerin sınıflandırılması

1.10. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler isimlerini gevşek bağ dokusu yapısındaki mezenkimden almaktadır. Multipotent stromal kök hücreler olan mezenkimal kök hücreler, adipositlere, kondrositlere, osteoblastlara ve miyosit gibi birçok hücre tipine

farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler, farklılaşabilme kapasitelerinin yanında immünmodülatör etkileri de bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalarda kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdikleri rapor edilmiştir [178].

İlk olarak 1966 yılında Friedenstein ve Patrakova tarafından, sıçan kemik iliğinden stroma hücrelerinin izole edilmesi ile tanımlanmıştır. MKH'ler çoğu kök hücre gibi kendini yenileyebilme ve çoklu farklılaşma yeteneğine sahiptir. Kemik, kırık, tendon, kas ve yağ doku gibi mezodermal dokuları oluşturan osteoblastlar, kondrositler, miyositler ve adipositlere farklılaşabilmektedir. Ayrıca nöronlar ve endotel hücreleri gibi ektoderm ve endoderm doku hücrelerine de farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Kemik iliği, yağ doku gibi heterojen ortamlardan elde edilen bu hücreler ortak belirteçler ile tanımlanmalıdır [179].

Bir hücre tipinden farklı hücre tiplerine farklılaşabildiklerinden multipotent kök hücreler olarak adlandırılmışlardır [180]. Mezenkimal kök hücreler vücutta bulunan birçok dokudan elde edilebilmektedir. Örneğin; kemik iliği, adipoz doku, kordon kanı, diş pulpası MKH kaynaklarıdır. Ancak MKH'lerin kaynaklarının farklı olması MKH'ler içinde de farklılıklara neden olmaktadır. Buna neden olarak da kök hücrelerin mikro-çevrelerinden etkilendiği öne sürülmektedir. Mikro-çevre farklılıkları mezenkimal kök hücrelerin fenotiplerinde, farklılaşma kapasitelerinde, kemokin ve sitokin salgılama özelliklerinde farklılıklar doğmasına neden olmaktadır. Örneğin farklılaşma özellikleri ele alındığında, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma yetenekleri adipoz dokudan elde edilen MKH'lere göre daha fazladır [181].

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'ne göre, dokulardan elde edilen hücrelerin MKH olduğunun kesinleşmesi için 3 ana özelliği taşımaları beklenir.

1. Adherent hücreler olmaları. MKH'ler kültüre alındıkları kültür kaplarının yüzeyine yapışabilen ve çoğalabilen hücrelerdir.
2. Pozitif ve negatif belirteçler. Yüzeylerinde CD105, CD73 ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken (pozitif) , CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR (insan lökosit

antijeni-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri (negatif) [182]

3. Farklılaşabilme kapasiteleri. İn vitro ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine (osteojenik, adipojenik ve kondrojenik) farklılaşabilmeleri gerekmektedir.

Mezenkimal kök hücreler sahip oldukları birçok özellik nedeniyle, temel bilimsel araştırmalarda ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Anti-kanser özellikleri en fazla araştırılmış olan kök hücre türüdür. MKH'ler vücutta hasarlı dokuya göç etme, hasarın onarılmasında rol alma ve inflamasyonu önleme gibi özel yetenekleri vardır [183]. Bu yeteneğe "homing" denilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle rejeneratif tıpta tercih edilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilebiliyor olmaları ve kültürde kolaylıkla çoğalmaları MKH'lerin tercih edilmesinde bir başka neden olarak gösterilebilir. Bu özelliklerinin yanı sıra, birçok hücre tipine farklılaşabilmeleri kullanım nedenlerinden biridir. Farklılaşabilme yeteneklerinden dolayı, doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıpta kullanılmaktadır. En önemli özelliklerinden biri allojenik nakil sırasında ortaya çıkan komplikasyonlara karşı bir koruyucu olarak kullanımlarıdır. GVHD (Graft Versus Host Disease) olarak adlandırılan hastalığa karşı oldukça etkili sonuçlar alınmıştır ve bu nedenle MKH'ler klinikte nakil durumlarında kullanılmaktadır.

MKH'ler ayrıca immünmodülatör özellikleri aracılığıyla immün sistem hücrelerini kontrol etmekte ve hücrelerin sayılarını düzenlemektedir. Böylece hücrelerin olması gereken nicelik ve nitelikte kalmalarını sağlayarak oto-immün reaksiyonların oluşmasının önüne geçmektedir. MKH'nin lenfositleri baskıladığını gösteren direkt ve indirekt çalışmalar mevcuttur [184,185,186].

Mezenkimal kök hücrelerin anti anti-tümör potansiyeline sahip olduğuna da inanılmaktadır [187]. MKH'ler vaskülerizasyon oluşumu, immün baskılanması, epitelyal mezenkimal geçiş gibi süreçlere aracılık ederek pro-tümör etkinlik gösterebilmesine karşın, tümör gelişimi için önemli olan Wnt ve Akt yolları üzerinden de anti-tümör etkinlik de göstermektedir [188]. Mezenkimal kök hücrelerin anti-tümör etkileri şunlardır; Wnt yolağını baskılar, Akt yolağını baskılar, NF-κB yolağını baskılar [189]. TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) ifadesini düzenler. Tümör büyümesini baskılayıcı interferon ve interlökinler

salgılar. Toksik olmayan öncü antikanser ilacını, toksik (aktif) antikanser ilacına dönüştüren enzimler salgılar.

MKH'nin bu "farmakolojik pompa özelliği", tümör hücrelerinin seçilimli olarak öldürülmesinde kullanılabilir [190]. MKH'ler bu özellikleriyle sebebiyle kanser hedefli çalışmalar için geniş bir terapötik yelpaze sunar ve araştırmalarda sık sık tercih edilmektedir.



2. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan PANC-1 hücreleri, ATCC (Biological Resource Center / Biyolojik Materyal Kaynak Merkezi) hücre koleksiyonundan elde edilmiştir ve Mezenkimal kök hücreler, KÖGEM hücre arşivinde mevcut olan ve daha önceden etik kurul onayı alınmış, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir. Bu çalışmada kullanılmak üzere alınmış olan etik kurul onayına dair karar numarası: KÜ GOKAEK 2016/21.1'dir.

2.1. PANC-1 Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan PANC-1 hücre hattı (Tablo 2.1.' belirtilmiştir.)ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edildi. PANC-1 hücreleri %10 fetal sığır serum (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin/ streptomisin), 200 mM L-glutamin, RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) besiyer karışımı 37 °C'de %5'li CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılarak kültür edildi. Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. PANC-1 özellikleri

Çalışmada kullanılan hücre hattı	
Hücre	PANC-1
ATCC Kodu	CRL- 1469
Organizma	<i>Homo sapiens</i>
Doku	Pankreas kanalı
Hastalık	Epiteloid karsinoma
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Erkek
Yaş	56
Büyüme özelliği	(Aderent)

Tablo 2.2. PANC-1 hücre besiyeri

PANC-1 Hücre Hattı Besiyeri	Oranları
RPMI 1640	1x
FBS (serum)	% 10
penisilin \ streptomisin	% 1
L-glutamin	200 mM

2.2. Hücrelerin Dondurulması

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

2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi

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

2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Flask içerisindeki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştıktan sonra kültürün devamı için hücrelerin pasajlandı. Flask içerisindeki eski besiyeri, uzaklaştırılıp, flaska ilave edilen 1-2ml 1X DPBS ile hücreler yıkandı. Flaska yapışık haldeki hücrelere 1-2ml %0,05 Tripsin/EDTA uygulandı ve hücrelerin flasktan ayrılması için 37 °C'de %5CO₂'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin kalktığından emin olmak için inverted mikroskop altında inceleme yapıldı. Hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra, uygun miktarda taze besiyeri ilave edildi. Hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirildikten sonra bir falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti yaklaşık 10 ml taze besiyeri ile yavaşça pipetaj yapılarak çözdürüldü. Tripa mavisini boyası ile hücre sayım lamın kullanılarak ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı, belirlenen hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü. Hücre gelişimi için hücreler 37 °C'de %5CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Kültüre devam edilerek

elde edilen hücre grubunun, amaçladığımız hücre grubu olup olmadığını belirlemek için yapacağımız karakterizasyon analizleri için gerekli hücre sayısını elde edilinceye kadar hücreler çoğaltıldı. Pasaj 3'e geldiğimizde karakterizasyon analizleri yapıldı.

2.5. PANC-1 Pankreas Kanseri Hücre Dizisinin Karakterizasyon Çalışmaları

2.5.1. Akım sitometri analiz

PANC-1 karakterizasyon analizi için pasaj 3'e gelindiğinde hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, yaklaşık 1x10⁵ PANC-1 i PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel, fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlar (CD18, CD24, CD31, CD34, CD38, CD44, CD133, CD166, CD309, CD324, CD325, CD338, Ki-67, PCNA; Tablo 2.3.'de mevcuttur) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek oda ısısında, karanlıkta 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu eklenip santrifüj edilerek (5dk. 1800 rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu BD FACS Calibur cihazında okutulacak ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi.

Tablo 2.3. PANC-1 hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri

BELİRTEÇ	POZİTİF/NEGATİF
CD18	+
CD24	-
CD31	-
CD34	-
CD38	-
CD44	+
CD133	-
CD166	+
CD309	-
CD324	-
CD325	-
CD338	-
Kİ-67	+
PCNA	+

2.6. İnsan Kemik İliği Kaynaklı MKH (iKİ-MKH) Hücre Kültürü

-150 C'de dondurularak saklanan ATCC (Biological Resource Center / Biyolojik Materyal Kaynak Merkezi) hücre koleksiyonundan elde edilen insan kemik iliği

kaynaklı Mezenkimal kök hücreleri 37 C⁰ su banyosunda çözüldükten sonra FBS %10(Fetal bovine serum), Penisilin-streptomisin %1 içeren RPMI 1640 (RPMI 1640, %10 serum, %1 antibiyotik, 10 mM FGF-b, 200 mM L-glutamin) besi ortamında çoğaltıldı.Tablo 2.4.'de belirtilmiştir. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'lik ortamda inkübe edilerek 3 günde bir besi ortamı değiştirildi. Hücreler %70-80 sıklığına ulaştığında alt kültürleme (pasaj) yapmak üzere tripsin-EDTA (%0,25) ile kültür kabından kaldırılıp yeni kültür kaplarına uygun yoğunlukta ekildi. Pasaj 3'e geldiğimizde karakterizasyon analizleri için akım sitometri yapıldı.

Hücre pasajlama ve dondurma işlemleri PANC-1 hücre kültüründe anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 2.4. MKH besiyeri

MKH Besiyeri	Oranları
RPMI 1640	1x
Serum FBS	%10
Antibiyotik (p\s)	%1
FGF-b	10 mM
L-glutamin	200 mM

2.7. İKİ-MKH Karakterizasyon Çalışmaları

2.7.1. Akım sitometri analizi

Kültür ortamında P3'e kadar çoğaltılan MKH'ler tripsin-EDTA (%0,25) ile kaldırıldıktan sonra kök hücre karakterizasyonunun ilk aşaması olan yüzey belirteçlerinin oranın belirlenmesi akım sitometri ile gerçekleştirildi. Uluslararası Hücre Terapileri Derneği (ISCT) tarafından belirlenen kriterlere göre elde edilen MKH'lerin analiz sonucunda CD13, CD29, CD44, CD73 ve CD90 için pozitifliği ve CD14, CD34, CD45, CD105, CD117, HLA A,B,C ve HLA-DR için negatifliği belirlendi. Tablo 3.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.5. MKH hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri

BELİRTEÇ	POZİTİF/NEGATİF
CD13	+
CD14	-
CD15	-
CD29	+
CD34	-
CD44	+

Tablo 2.5. (Devam) MKH hücrelerinin pozitif ve negatif belirteçleri

CD45	-
HLA ABC	-
CD73	+
CD90	+
CD105	-
CD117	-
HLA-DR	-

Tablo: İnsan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometride pozitif / negatif belirteçleri

2.8. Hücrelerin Ortak Kültürü ve Etkileşimlerinin İncelenmesi

Toplam 2 kontrol grubu, 8 deney grubu olmak üzere hücreler 0,1,3,7 gün boyunca ortak kültüre alındı. Tablo 2.6.'da mevcuttur.. Hücreler arası doğrudan olmayan (indirekt) ortak kültürler gerçekleştirildi. Şekil2.1. görülmektedir. Ortak kültüre alındıktan sonra hücre canlılığı, çoğalımı, apoptozu değişimleri karşılaştırıldı. Hücreler arası oranlar PANC-1: iKİ-MKH 1:1 ve 1:3, hücre kültür besiyerine verildi. Gallik asit ve Karnosik asit maddelerimizin oranları aşağıdaki gibidir. Bu oranlardan elde ettiğimiz verilere göre en uygun değer ile çalışmalara devam edildi.

WST-1 testleri sonucu ve literatürler doğrultusunda mezenkimal kök hücreyi öldürmeyen panc-1'i baskılayan ölçülerle devam edildi [191,192]. Gallik asit oranları ise 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 µM olarak belirlenmiştir. Karnosik asit oranları ise 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 µM olarak belirlenmiştir. Küçük alikotlar halinde ihtiyaç duyuluncaya kadar -20 derecede muhafaza edilecektir.

Tablo 2.6. Çalışmadaki deney ve kontrol grupları

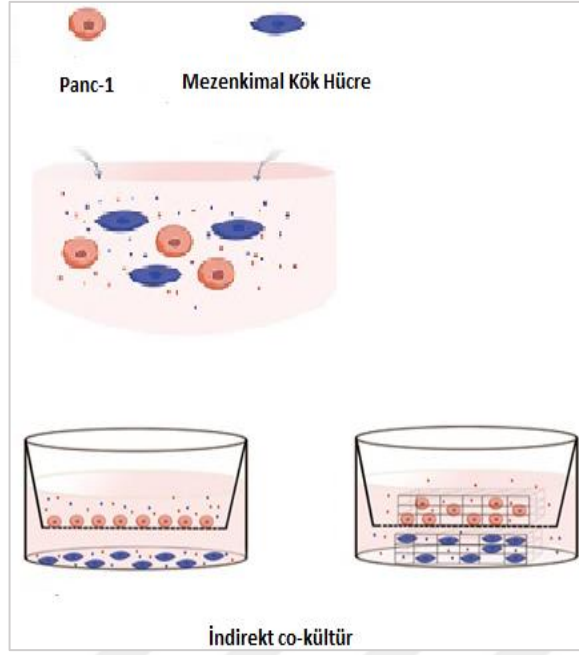
KONTROL GRUPLARI	DENEY GRUPLARI
iKİ-MKH	iKİ-MKH + KARNOSİK ASİT
	iKİ-MKH + GALLİK ASİT
	iKİ-MKH + KARNOSİK ASİT +GALLİK ASİT
PANC-1	PANC-1+ iKİ-MKH
	PANC-1+ KARNOSİK ASİT
	PANC-1+ GALLİK ASİT
	PANC-1 + KARNOSİK ASİT+ GALLİK ASİT
	PANC-1+ iKİ-MKH + KARNOSİK ASİT +GALLİK ASİT

PANC-1 : İnsan pankreas kanser hücre hattı

iKİ-MKH: insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre

KARNOSİK ASİT : Biberiye yaprağından elde edilen fenolik bileşik

GALLİK ASİT : Çeşitli bitkilerden elde edilen fenolik bileşik



Şekil 2.1. Panc-1 ve Mezenkimal kök hücrenin indirekt co-kültürü

2.9. Gallik Asit ve Karnosik Asitin Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Solüsyonunun Hazırlanması

GA ve KA in Panc-1 hücreleri üzerinde letal dozunun belirlenmesi ve kanser hücreleri üzerinde toksik etki sağlayan ama insan kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücreler için de toksik etki göstermeyen dozu belirlemek amacıyla ise 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 μ M olarak GA ve KA konsantrasyonları için WST-1 analizleri yapıldı. 3 defa tekrarlandı [191,192].

Sırasıyla merckco ve sigma –Aldrich firmalarından ticari olarak satın alınan toz halindeki GA ve KA öncelikle 20 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürüldükten sonra WST-1 analizi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda alikotlararak -20 de saklandı. Her 50 ml ortak kültür besiyeri için GA ve KA alikotlarından birer adet alikot kullanıldı.

2.10. WST-1 Canlılık Deneyi

WST-1 testinde, WST-1 yapısındaki tetrazolyum tuzları canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından formazon kristallerine dönüştürülür. Canlı hücre artışına paralel olarak hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz

aktivitesinde de artış olur. Bu durum formazon kristallerinin artmasına ve daha koyu bir renkte ayraç oluşturmaya neden olur. Oluşan formazon kristallerinin miktarındaki artış, metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır. GA ve KA eklentisiyle kültüre edilecek olan MKH'ler için optimum dozun belirlenmesinin yanı sıra, aynı dozda GA ve KA ya maruz bırakılan MKH ve PANC-1 lerin gösterdikleri canlılık profillerini karşılaştırmayı amaçladık.

Hücreler, bir kuyucuğa 200µl besiyeri 1x10⁴/kuyucuk hücre ve her konsantrasyon için üçer tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekildi. Tablo 2.7.'deki gruplar belirlenen günler boyunca kültüre edildi. Belirlenen günlerde besiyeri % 10 WST-1 reaktifi (Roche Diagnostics, Almanya) içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 2 saat inkübe edildi. Örneklerin absorbans değerleri, mikropilaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

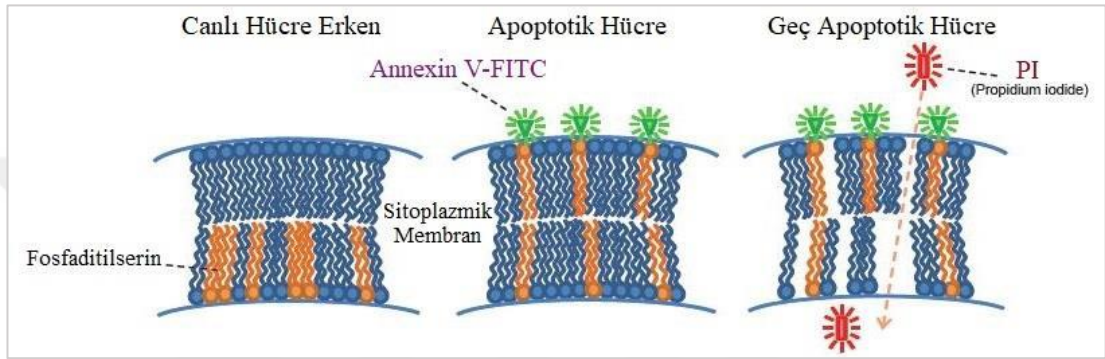
Tablo 2.7. WST-1 deney ve kontrol grupları

MKH WST-1	PANC-1 WST-1
MKH-GA 1. Gün	PANC-1 – MKH 1. 3. 7. Gün
MKH-GA 3. Gün	PANC-1 – GA 1.Gün
MKH-GA 7. Gün	PANC-1 – GA 3.Gün
MKH-KA 1. Gün	PANC-1 – GA 7.Gün
MKH-KA 3. Gün	PANC-1 – KA 1.Gün
MKH-KA 7. Gün	PANC-1 – KA 3.Gün
MKH-50 µm GA - 25µm KA - 0.1.3.7 Gün	PANC-1 – KA 7.Gün
	PANC-1 - 50 µm GA - 25µm KA - 0.1.3.7 Gün
	PANC-1 –MKH- 50 µm GA - 25µm KA - 0.1.3.7 Gün

2.11. Annexin V-PI Kapasite Tayini

Anneksin V/PI apoptoz tayini, apoptoz sürecine girmiş hücrelerdeki Fosfaditilserin (PS) in hücre membran yerleşimindeki değişimin ve membran bütünlüğündeki bozulmanın saptanmasını temel alan bir testtir. Fosfaditilserin (PS) molekülü sağlıklı ve canlı hücrelerde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde olmasına karşın; erken apoptotik ve apoptotik hücrelerde membranın dış yüzeyinde yerleşim gösterir. FITC florokrom işaretli anneksin V molekülü; apoptotik sürece girmiş hücrelerin, membranın ekstraselüler alanına geçmiş olan PS'ne bağlanmaktadır. Propidyum iyodür (PI) canlı ve ölü hücre tanımlanmasında kullanılan standart bir akım sitometri canlılık probudur. Membran bütünlüğüne sahip canlı hücreler, PI'ı hücre içine

almazken; ölü ve hasarlı hücreler, bozulmuş membran bütünlüğüyle PI'e karşı geçirgendir. Bu anlamda FITC Annexin V için pozitif, PI için negatif hücreler erken apoptotik hücrelerdir. Hem FITC Annexin V hem de PI için negatif boyanan hücreler canlıdır ve ölçülebilir bir apoptoz süreci geçirmemektedir. FITC Annexin V için pozitif, PI için negatif hücreler erken apoptotik hücrelerdir. Hem FITC Annexin V hem de PI için pozitif boyanan hücreler ise nekrotik/ölü hücrelerdir. Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Annexin V/PI apoptoz tayini

Ortak kültür sonrası 0,1,3 ve 7.günün sonunda PANC-1 ve MKH hücrelerinde apoptoz düzeylerini saptamak amacıyla kullanılan yöntem AnnexinV-PI kiti (BD Biosciences)'dir. Hücreler enzimatik olarak kaldırılıp; 15 ml'lik steril falkon tüpte toplanıp, 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1X binding buffer ile sayısı 1×10^6 ml olacak şekilde süspansiyon edildi. Akabinde 5 µl Annexin V, 5 µl PI eklenerek ve oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutulup BD Cell Quest™ programı kullanılarak apoptotik hücre analizi gerçekleştirildi. Bu şekilde deney sonrası canlı, apoptotik ve ölü hücre oranları sayısal olarak belirlendi.

2.12. Gen Ekspresyon Analizleri

WST-1 sonucu elde ettiğimiz GA ve KA dozları ile ortak kültüre aldığımız PANC-1 hücrelerinde *HNF1A* geninin ifade düzeyleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Roche LightCycler cihazı kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) çalışması yapıldı.

2.12.1. Gen ekspresyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi – real time PCR

Ortak kültürler sonrası hücrelerin gen ekspresyonlarındaki değişimlerinin saptanabilmesi için kanser hücrelerine yönelik “Cancer PathwayFinder PCR Array (SABioscience)” paneli kullanıldı. Öncelikle hücrelerin RNA’ları, RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Germany) ile saflaştırıldı. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülecek ve 1µg total RNA olacak şekilde cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche, Mannheim, Germany) ile cDNA ’ya çevrildi. Hedef genlerin amplifikasyonu SYBR green boyası ile LightCycler 480-II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) gerçek-zamanlı kantitatif PCR) cihazında gerçekleştirildi. Hedef gen ve ona uygun seçilmiş olan referans genler aynı panelde çoğaltıldı.

PCR koşulları; 95°C’de 10 dakika inkübasyon, takibinde 45 döngü 95°C ’de 15 s denatürasyon, 60°C’de 1 dak bağlanma ve uzama şeklinde uygulandı. Sonuçlar Light Cycler yazılımıyla (version 4) Cp değerlerinin hesaplanmasıyla analiz edildi. Kontrol grupları baz alınarak HNF1A gen ekspresyon analizleri yapıldı. Çalışmada ekspresyonu araştırılan hedef gen primer dizisi Tablo 3.8.de gösterilmiştir.

Tablo 2.8. HNF1A forward/reverse

HNF1A	Forward	5'-AACACCTCAACAAGGGCACTC-3'
	Reverse	5'-CCCCACTTGAAACGGTTCCT-3'

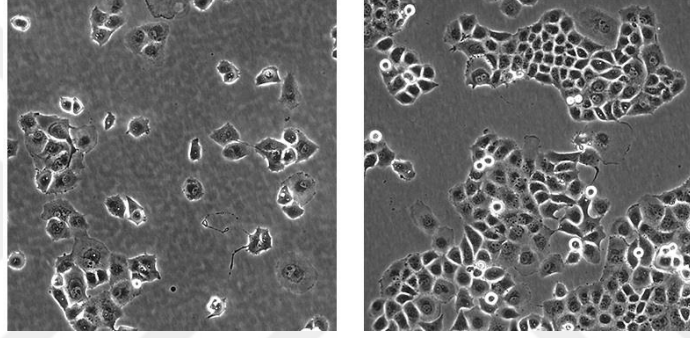
2.13. İstatiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı ile yapılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edilmiştir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0,05$ olduğunda anlamlı ve $p < 0,01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Panc-1 Hücre Kültürü

Panc-1 kanser hücreleri kültür olarak çoğaltılmış ve kültür boyunca düzenli olarak faz-contrast mikroskop altında görüntülenip morfolojileri incelenmiştir. Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Panc-1 'lerin kültür süresince, ileri pasajlarda dahi oldukça hızlı çoğaldıkları gözlemlendi. ATCC numarası: CRL-1469



Şekil 3.1. PANC-1 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri ölçüm çubuğu: 100 µm

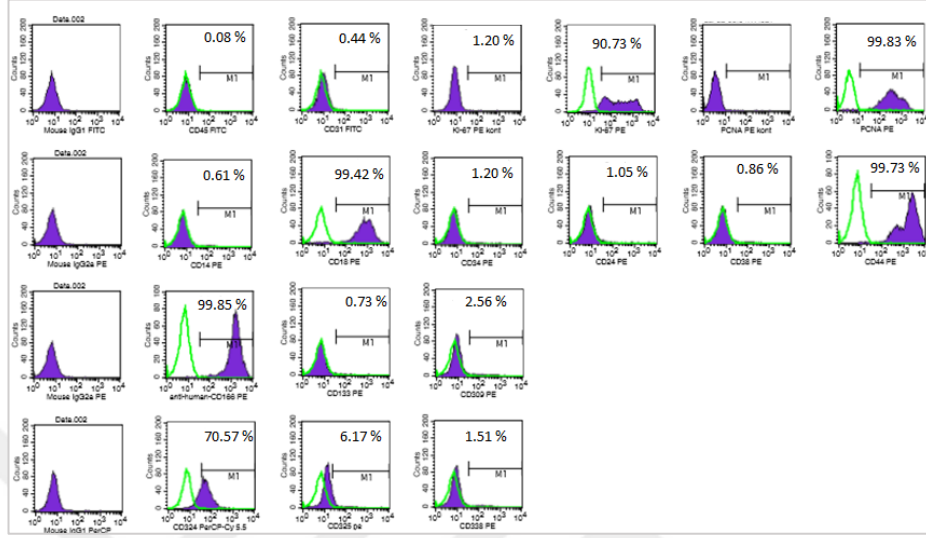
3.2. PANC-1 Pankreas Kanseri Hücre Dizisinin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Akım sitometri analizi

Yapılan çalışmada kullanılan Panc-1 hücreleri deneylerde kullanılmadan önce akım sitometri cihazı ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucunda kullanılan hücrelerin Panc-1 belirteçlerine sahip olduğu Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Hücrelerinin karakterizasyon analizi için pasaj 3'e gelindiğinde tripsinizasyon işlemi ile kaldırdı. Hücreler taşıdıkları yüzey belirteçlerine göre karakterize edildi. CD18, CD24, CD31, CD34, CD38, CD44, CD133, CD166, CD309, CD324, CD325, CD338, Ki-67, PCNA hücre yüzey belirteçleri sırasıyla %99,42, %1,05, %0,44, %1,20, %0,86, %99,73, %0,73, %99,85, %2,56, %70,57, %6,17, %1,51, %90,73, %99,83 olarak bulunmuştur. Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

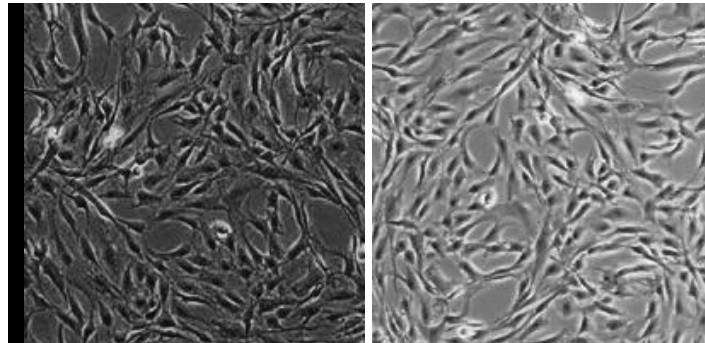
Akım sitometri analiz sonrasında CD18, CD44, CD166, CD324, Ki67 ve PCNA için pozitif CD24, CD31, CD34, CD38, CD133, CD309, CD325 ve CD338 için negatifliği akım sitometri cihazında saptanarak panc-1 hücre yüzey belirteçleri gösterildi.



Şekil 3.2. PANC-1 akım sitometri analiz sonucu

3.3.2. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH (İKİ-MKH) hücre kültürü

KÖGEM hücre arşivinde mevcut olan (KÜ GOKAEK 2016/21.1) ve daha önceden etik kurul onayı alınmış, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler yapışan kültür olarak çağaltılmış ve kültür boyunca düzenli olarak faz-kontrast mikroskop altında morfolojileri incelenmiştir. MKH'ler morfolojik yapı ve yüksek proliferasyon özellikleriyle mezenkimal kök hücre fenotipine uyumlu görülmüştür. İleri pasajlara kadar da yüksek proliferatif özelliğini korumuştur. Mikroskop altında yapılan incelemelerde, fibroblast hücrelerine benzeyen iğsi yapıda oldukları gözlemlendi. Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.

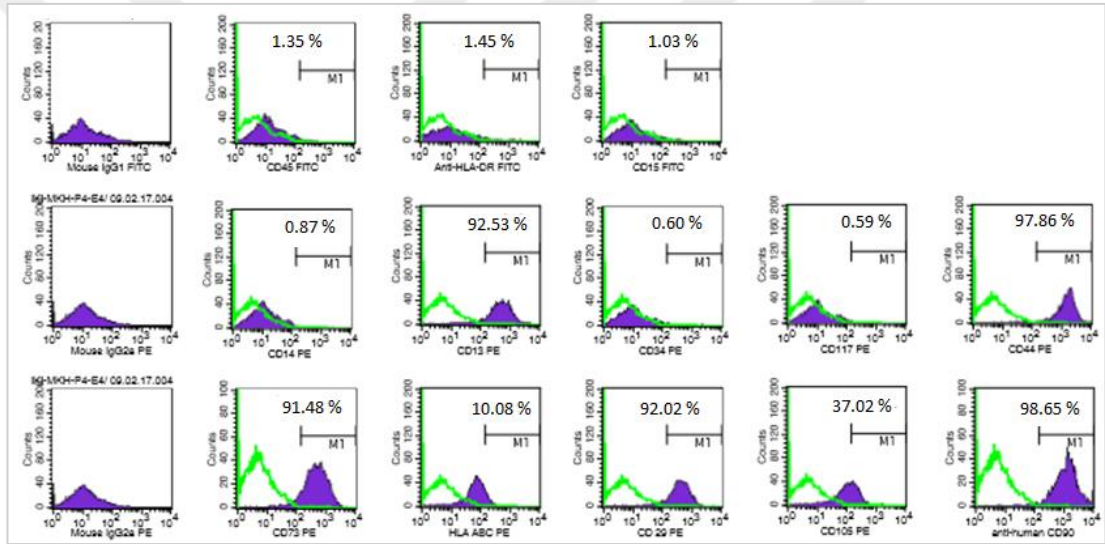


Şekil 3.3. İKİ-MKH'lerin ışık mikroskop görüntüleri (ATCC) ölçüm çubuğu: 100 µm

3.4. İKİ-MKH Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1. Akım sitometri analizi

Hücrelerinin karakterizasyon analizi için pasaj 3'e gelindiğinde tripsinizasyon işlemi ile kaldırdı. Taşıdıkları yüzen belirteçlerine, kök hücre belirteçlerine ve farklılaşma yeteneğine göre karakterize edildi. Taşıdıkları yüzey belirteçleri CD13, CD15, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve HLA A,B,C, CD14, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR ekspresyonlarına bakılarak sırasıyla %92,53, %1,03, %92,02, %97,86, %91,48, %98,65, %37,02, %10,08, %0,87, %0,60, %1,35, %0,59, %1,45 olarak bulunmuştur. Şekil 3.4'de mevcuttur.



Şekil 3.4. İKİ-MKH'lerin akım sitometri analizi sonucu

Akım sitometri analiz sonrasında CD13, CD29, CD44, CD73 ve CD90 için pozitif ve CD14, CD15, CD34, CD45, CD105, CD117, HLA A,B,C ve HLA-DR için negatifliği akım sitometri cihazında saptanarak insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin kök hücre karakterine sahip olduğu gösterildi.

3.5. Gallik Asit ve Karnosik Asitin Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Solüsyonunun Hazırlanması

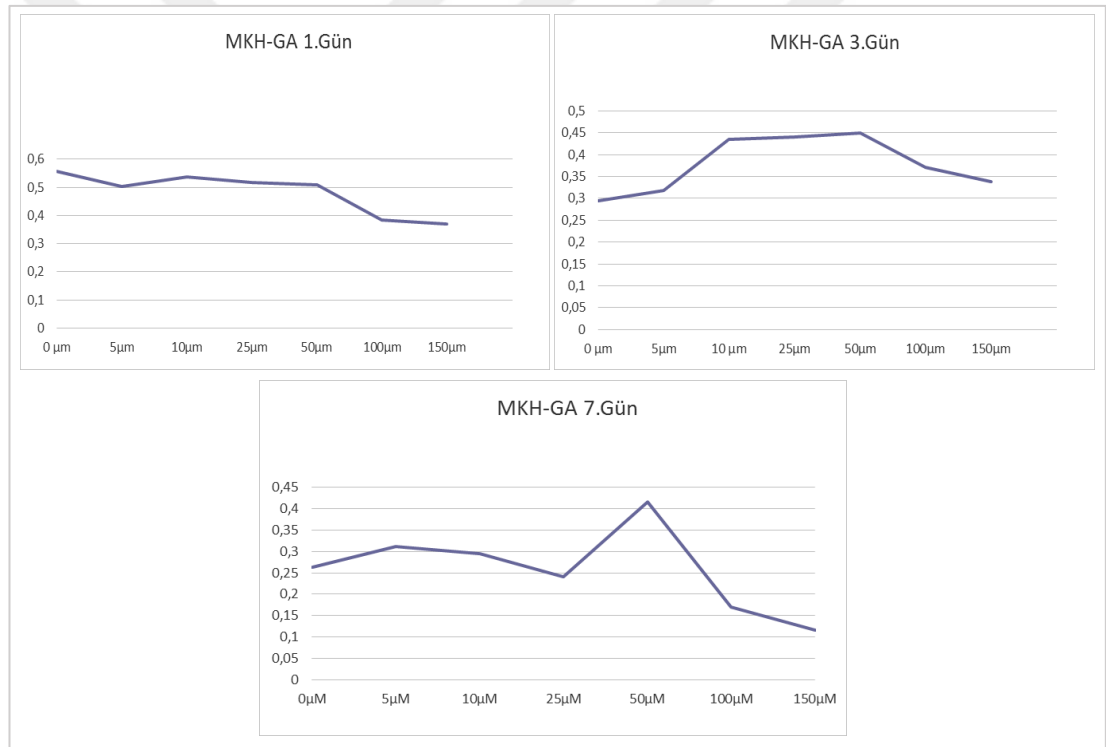
Yapılan testler sonucunda literatürün desteklediği doğrultuda ve konsantrasyon GA; 50 μ M ve KA; 25 μ M olarak belirlendi [191,192]. Tez çalışması boyunca tüm deneylerde GA; 50 μ M ve KA; 25 μ M konsantrasyonu sırasıyla olacak şekilde

kullanıldı. Hazırlanan bu stok solüsyon steril ortamda 0,22 μm ' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C ' de saklandı. Hazırlanan bir adet alikot (50GA, 25KA) 50ml lik ortak kültür besiyeri için hazırlandı. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki solüsyonlar stok solüsyondan RPMI 1640 besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.(iki alikot kullandık bir adet GA ve KA)

3.6. Canlılık Testi (WST-1)

Metabolik olarak aktif hücre sayısını belirlemek için 1. 3. 7. Günlerde alınan örneklerle yapılan WST-1 proliferasyon analizi.

3.6.1. İKİ-MKH canlılık testi (WST-1)



Şekil 3.5. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 1.3.ve 7.Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

MKH – GA kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 1. Ve 3. Gün 50 μM GA konsantrasyon oranına kadar canlılıkta artış sonrasında düşüş tespit edildi. 7. Gün ise 25 μM GA konsantrasyonuna kadar düşüş eğiliminde olup, 50 μM GA konsantrasyonunda en yüksek canlılık tespit edildi. Bütün grafikler 100 μM GA ve 150 μM GA konsantrasyonlarında canlılıkta düşüş tespit edildi. Şekil 3.5.'de mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.1. tablo 3.2. tablo 3.3.de mevcuttur.

Tablo 3.1. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 1. Gün WST değerleri

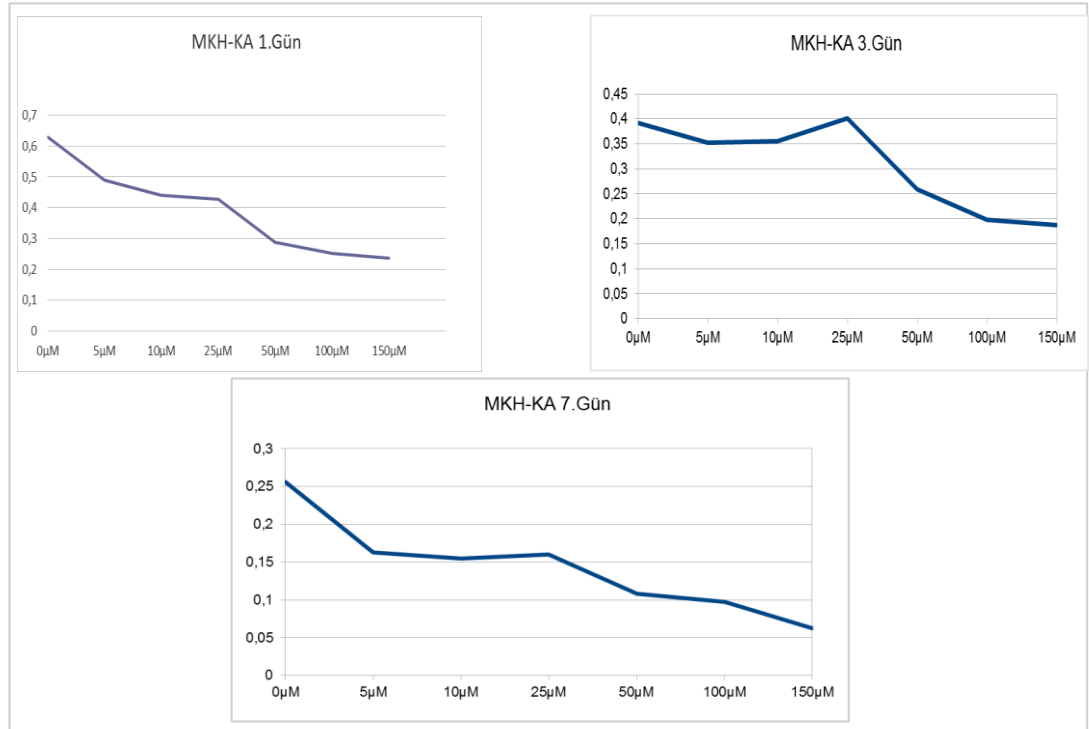
0 μm	5 μm	10 μm	25 μm	50 μm	100 μm	150 μm	BLANK
0,572	0,553	0,609	0,58	0,535		0,342	-0,003
0,509	0,372	0,568	0,535				0,012
0,564	0,514	0,629		0,408	0,361	0,386	-0,008
0,585	0,579	0,339	0,435	0,583	0,409	0,385	-0,001
0,5575	0,5045	0,53625	0,516667	0,508667	0,385	0,371	

Tablo 3.2. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri

0 μm	5 μm	10 μm	25 μm	50 μm	100 μm	150 μm	BLANK
0,165	0,285	0,396	0,302	0,353	0,422	0,375	-0,004
0,221	0,303	0,464	0,456	0,254	0,35	0,459	0,003
0,38	0,302	0,532	0,575	0,579	0,321	0,279	-0,000
0,409	0,385	0,348	0,424	0,61	0,388	0,238	0,001
0,29375	0,31875	0,435	0,43925	0,449	0,37025	0,33775	

Tablo 3.3. MKH-GA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri

0 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM	150 μM	BLANK
0,261	0,25	0,302	0,351	0,495	0,133	0,106	-0,001
0,288	0,334	0,248		0,457	0,122	0,22	0,001
0,242	0,283	0,314	0,214	0,307		0,055	-0,002
	0,378	0,315	0,157	0,405	0,254	0,084	0,003
0,263667	0,31125	0,29475	0,240667	0,416	0,169667	0,11625	



Şekil 3.6. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 1.3.ve 7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

MKH – KA kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 1. Ve 3. Ve 7.Gün 25µM KA konsantrasyon oranında canlılıkta artış tespit edildi. 25µM KA konsantrasyonundan sonra canlılıkta azalma tespit edildi. Şekil 3.6.'de mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.4. tablo 3.5. tablo 3.6.da mevcuttur.

Tablo 3.4. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 1.Gün WST değerleri

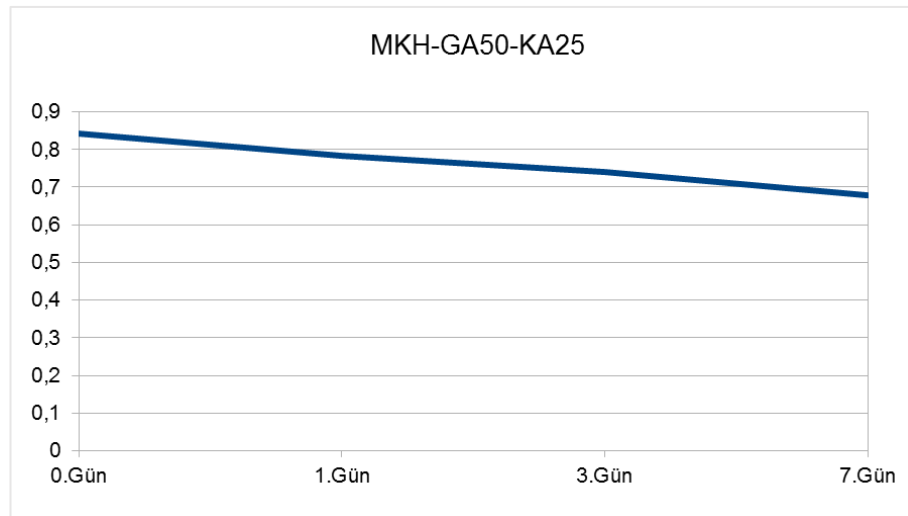
0µM	5µM	10µM	25µM	50µM	100µM	150µM	BLANK
0,675	0,568	0,468	0,494	0,209	0,274	0,202	-0,008
0,521	0,489	0,495	0,315	0,312	0,299	0,208	0,004
0,656	0,485	0,309	0,499	0,399	0,221	0,292	-0,001
0,661	0,414	0,494	0,403	0,228	0,215	0,242	0,005
0,62825	0,489	0,4415	0,42775	0,287	0,25225	0,236	

Tablo 3.5. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri

0µM	5µM	10µM	25µM	50µM	100µM	150µM	BLANK
0,456	0,461	0,214	0,417	0,311	0,243	0,24	0,002
0,484	0,315	0,365	0,363	0,319	0,269	0,245	0,006
0,323	0,321	0,374	0,346	0,283	0,15	0,159	-0,006
0,306	0,313	0,465	0,477	0,122	0,127	0,104	-0,003
0,39225	0,3525	0,3545	0,40075	0,25875	0,19725	0,187	

Tablo 3.6. MKH-KA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri

0µM	5µM	10µM	25µM	50µM	100µM	150µM	BLANK
0,256	0,061	0,214	0,186	0,11	0,043	0,14	0,002
0,284	0,25	0,065	0,112	0,119	0,069	0,045	0,006
0,223	0,21	0,174	0,154	0,083	0,15	0,059	-0,006
0,26	0,13	0,165	0,187	0,122	0,127	0,004	-0,003
0,25575	0,16275	0,1545	0,15975	0,1085	0,09725	0,062	



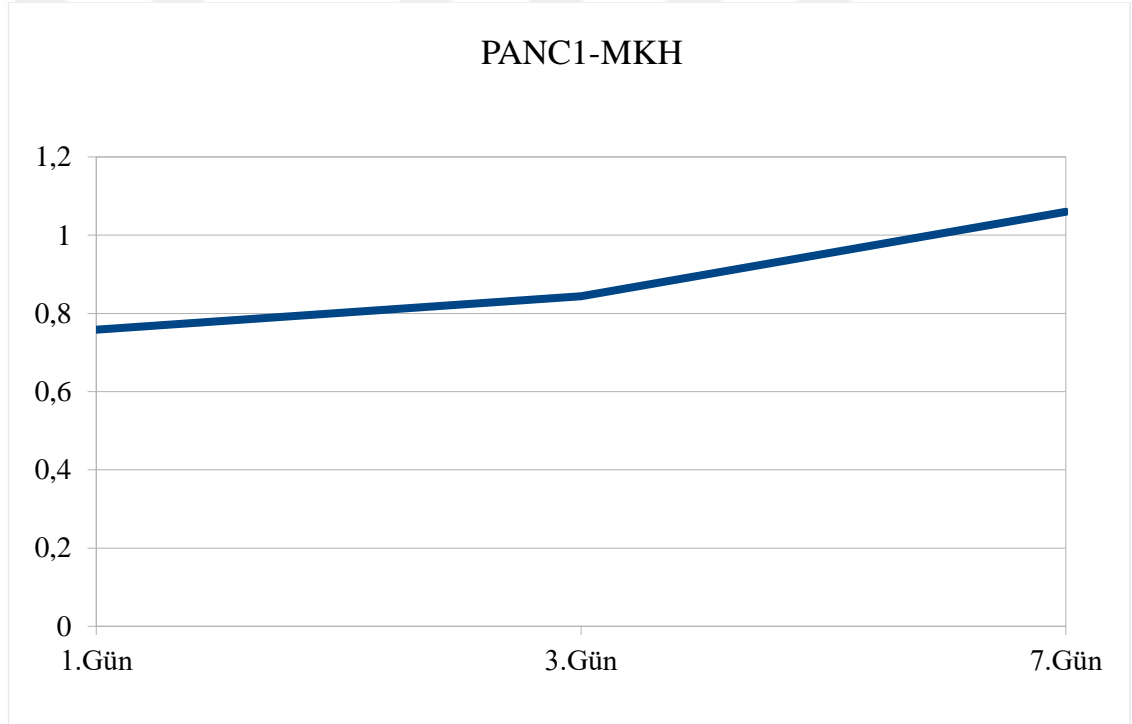
Şekil 3.7. MKH-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

Tablo 3.7. MKH-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerleri

0.Gün	1.Gün	3.Gün	7.Gün	BLANK
0,856	0,788	0,714	0,761	0,002
0,784	0,714	0,739	0,715	0,006
0,923	0,882	0,774	0,521	-0,006
0,806	0,747	0,737	0,713	-0,003
0,84225	0,78275	0,741	0,6775	

MKH – GA-KA Kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 1. Ve 3. Ve 7.Gün 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyon oranları MKH'lere zarar vermediği tespit edildi. Şekil 3.7.' mevcuttur. Sayısal verile tablo 3.7. de mevcuttur.

3.6.2. PANC-1 canlılık testi (WST-1)

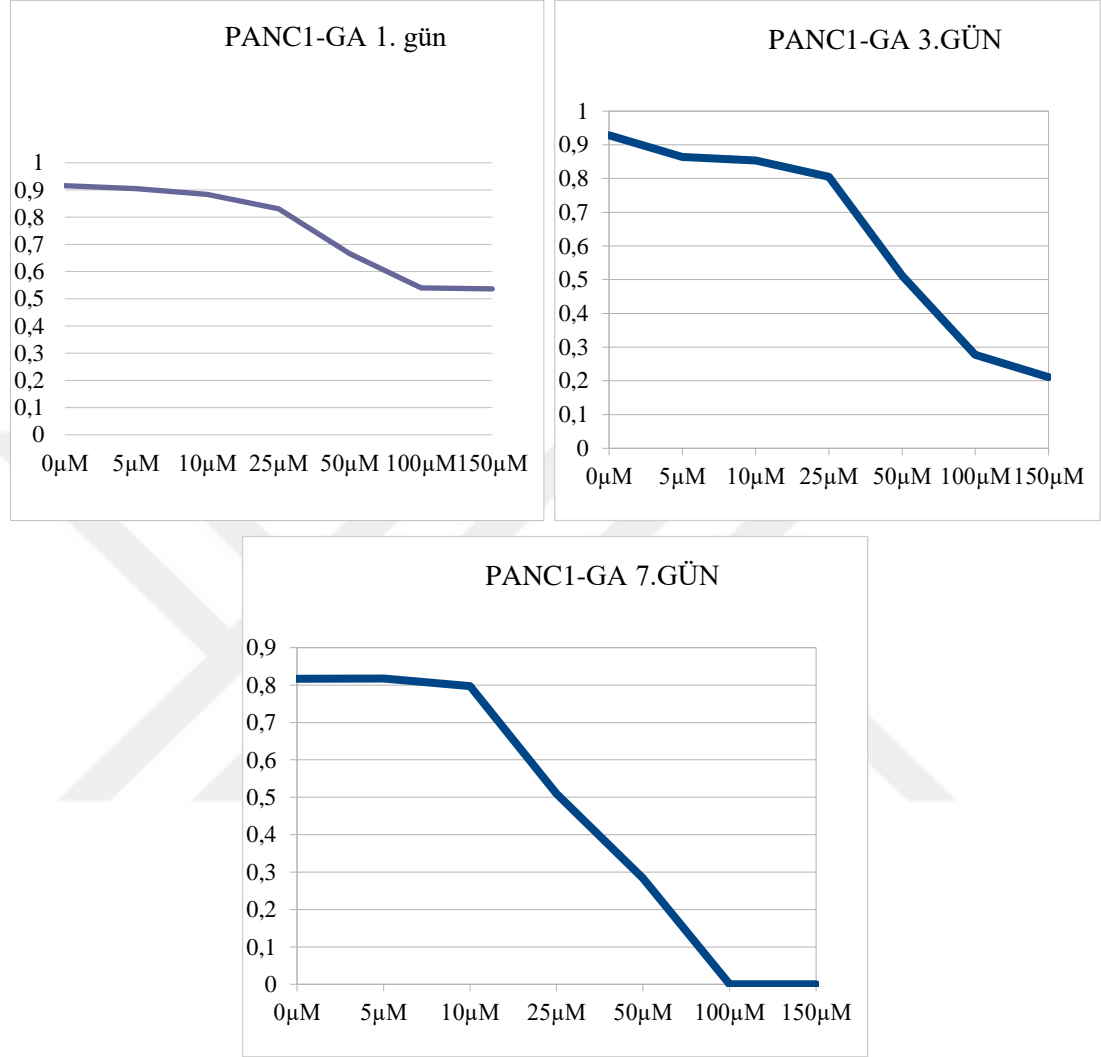


Şekil 3.8. PANC-1 – MKH ile kültüre edildiğinde 1.3.7 Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

Tablo 3.8. PANC-1 – MKH ile kültüre edildiğinde 1.3.7 Gün WST değerleri

1.Gün	3.Gün	7.Gün	BLANK
0,6	0,726	0,904	0,012
0,855	0,879	1,187	-0,004
0,713	0,781	0,983	-0,001
0,865	0,989	1,165	0,007
0,75825	0,84375	1,05975	

PANC-1 ve MKH kültürü 3. Günden sonra canlılıkta artışa geçtiği tespit edildi. Şekil 3.8.' de mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.8. de mevcuttur.



Şekil 3.9. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 1.3.ve 7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

PANC-1 – GA Kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 1. Ve 3. Günlerde 25μM GA konsantrasyonundan sonra canlılıkta azalma tespit edildi.7.Gün ise ve 10μM konsantrasyonundan sonra canlılıkta azalma tespit edildi. Şekil 3.9.'da mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.9. tablo 3.10. tablo 3.11.de mevcuttur.

Tablo 3.9. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 1. Gün WST değerleri

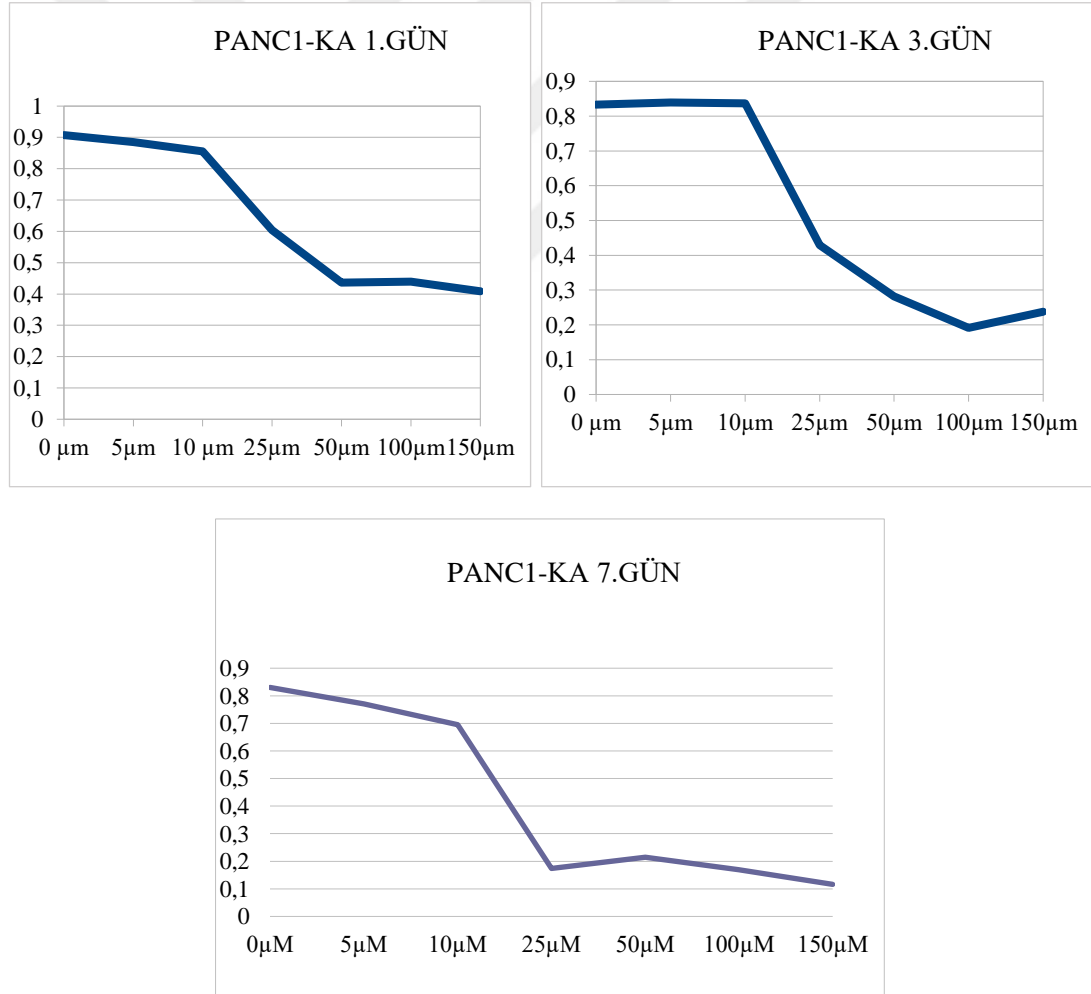
5μM	10μM	25μM	50μM	100μM	150μM	BLANK
0,831	0,833	0,821	0,695	0,576	0,533	-0,001
0,973	0,957		0,757	0,659	0,522	0,001
0,956	0,917	0,814	0,607	0,509		-0,002
0,861	0,826	0,857	0,605	0,414	0,554	0,003
0,90525	0,88325	0,830667	0,666	0,5395	0,536333	

Tablo 3.10. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri

0 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	150 μ M	BLANK
0,975	0,868	0,848	0,794	0,509	0,374	0,202	-0,008
0,921	0,889	0,895	0,825	0,612	0,299	0,308	0,004
0,856	0,885	0,869	0,799	0,499	0,221	0,192	-0,001
0,961	0,814	0,804	0,803	0,428	0,215	0,142	0,005
0,92825	0,864	0,854	0,80525	0,512	0,27725	0,211	

Tablo 3.11. PANC-1 – GA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri

0 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	150 μ M	BLANK
0,856	0,821	0,784	0,586	0,311	0,143	0,14	0,002
0,884	0,815	0,865	0,412	0,319	0,169	0,145	0,006
0,723	0,821	0,774	0,454	0,283	0,15	0,159	-0,006
0,806	0,813	0,765	0,587	0,222	0,127	0,204	-0,003
0,81725	0,8175	0,797	0,50975	0,28375			



Şekil 3.10. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 1. 3. ve 7.Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

PANC-1 – KA Kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 1. Ve 3. Ve 7.Gün 10µM KA konsantrasyon oranında canlılıkta azalma tespit edildi. Şekil 3.10.'da mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.12. tablo 3.13. tablo 3.14.de mevcuttur.

Tablo 3.12. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 1. Gün WST değerleri

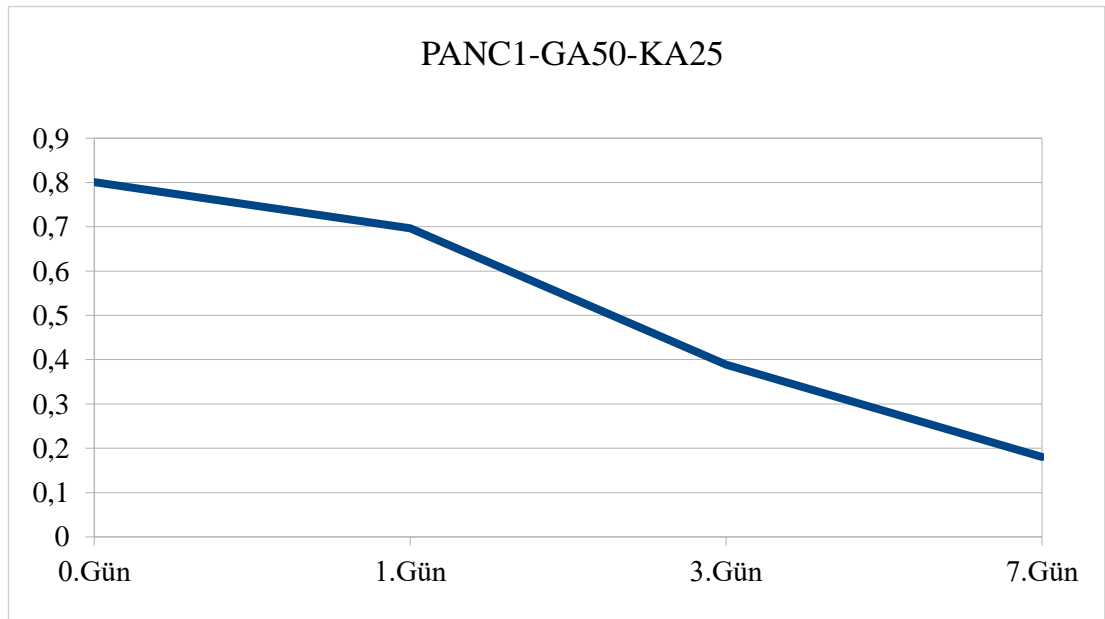
0 µm	5µm	10 µm	25µm	50µm	100µm	150µm	BLANK
0,872	0,885	0,873	0,653	0,409	0,448	0,435	-0,003
0,909	0,893	0,851	0,672	0,568	0,435		0,012
0,964	0,891	0,845	0,514	0,429		0,408	-0,008
0,885	0,871	0,854	0,579	0,339	0,435	0,383	-0,001
0,9075	0,885	0,85575	0,6045	0,43625	0,439333	0,408667	

Tablo 3.13. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 3. Gün WST değerleri

0 µm	5µm	10µm	25µm	50µm	100µm	150µm	BLANK
0,965	0,802	0,853	0,453	0,266	0,222	0,175	-0,004
0,821	0,856	0,754	0,404	0,221	0,135	0,259	0,003
0,738	0,875	0,879	0,431	0,289	0,121	0,279	-0,000
0,809	0,824	0,861		0,352	0,288	0,238	0,001
0,83325	0,83925	0,83675	0,429333	0,282	0,1915	0,23775	

Tablo 3.14. PANC-1 – KA ile kültüre edildiğinde 7. Gün WST değerleri

0µM	5µM	10µM	25µM	50µM	100µM	150µM	BLANK
0,761	0,788	0,702	0,151	0,176	0,133	0,106	-0,001
0,888	0,734	0,648		0,259	0,122	0,22	0,001
0,842	0,783	0,714	0,214	0,209		0,055	-0,002
	0,778	0,715	0,157	0,214	0,254	0,084	0,003
0,830333	0,77075	0,69475	0,174	0,2145	0,169667	0,11625	

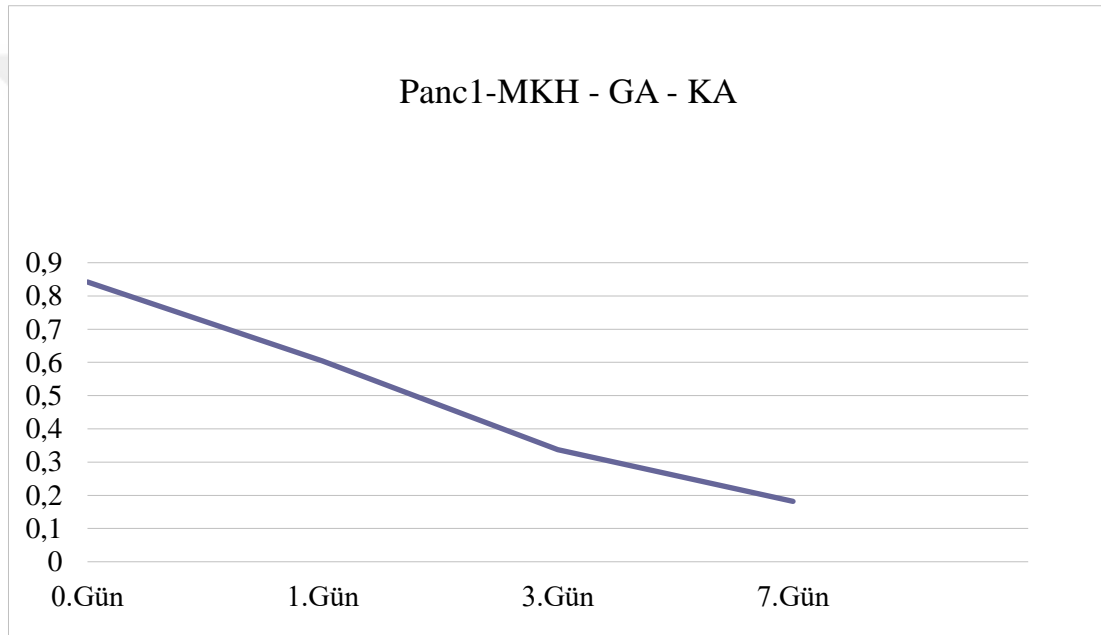


Şekil 3.11. PANC-1-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

Tablo 3.15. PANC-1-GA-KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerleri

0.Gün	1.Gün	3.Gün	7.Gün	BLANK
0,817	0,611	0,443	0,214	0,002
0,863	0,719	0,369	0,145	0,006
0,746	0,783	0,315	0,159	-0,006
0,777	0,672	0,427	0,204	-0,003
0,80075	0,69625	0,3885	0,1805	

PANC-1-GA-KA Kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 1. ve 3. ve 7.Günlerde düzenli düşüş tespit edildi. Şekil 3.11.'da mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.15.de mevcuttur.



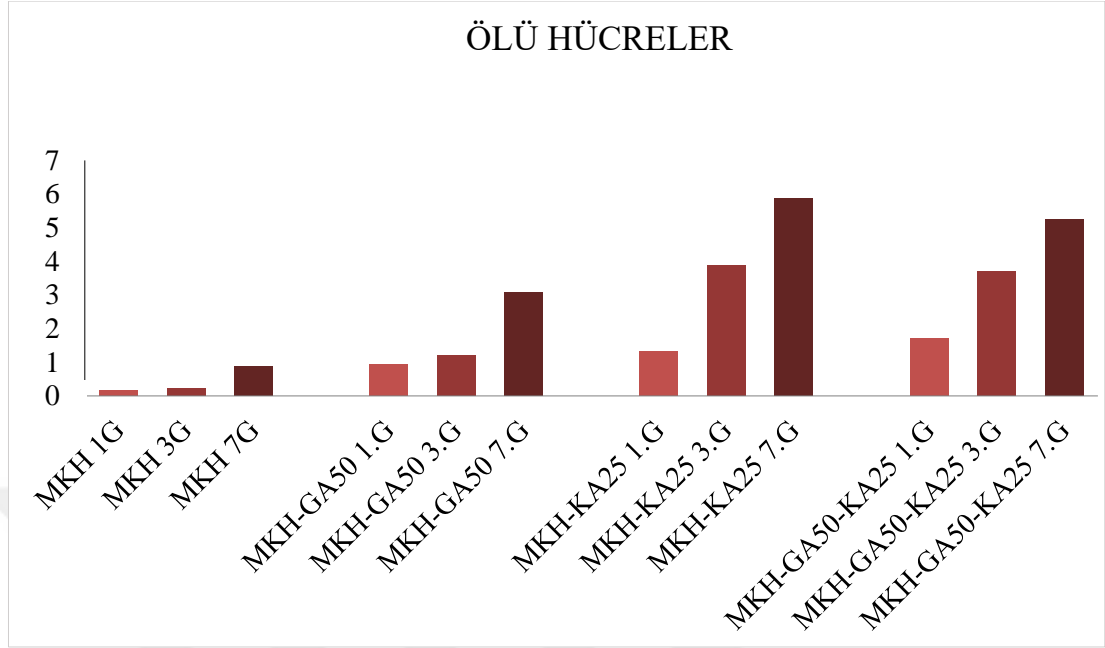
Şekil 3.12. PANC-1-MKH- GA- KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerlerinin grafik görüntüsü

Tablo 3.16.PANC-1-MKH- GA- KA ile kültüre edildiğinde 0.1.3.7. Gün WST değerleri

0.Gün	1.Gün	3.Gün	7.Gün	BLANK
0,835	0,634	0,439	0,142	-0,003
	0,641	0,339	0,114	0,012
0,808	0,541	0,261	0,186	-0,008
0,883	0,601	0,309	0,285	-0,001
0,842	0,60425	0,337	0,18175	

PANC-1-MKH- GA-KA Kombinasyonunun Wst-1 testi sonucunda 0. 1. Ve 3. Ve 7.Günlerde canlılıkta düzenli düşüş tespit edildi. Şekil 3.12.'da mevcuttur. Sayısal veriler tablo 3.16.da mevcuttur.

3.7. Annexin V-PI Kapasite Tayini

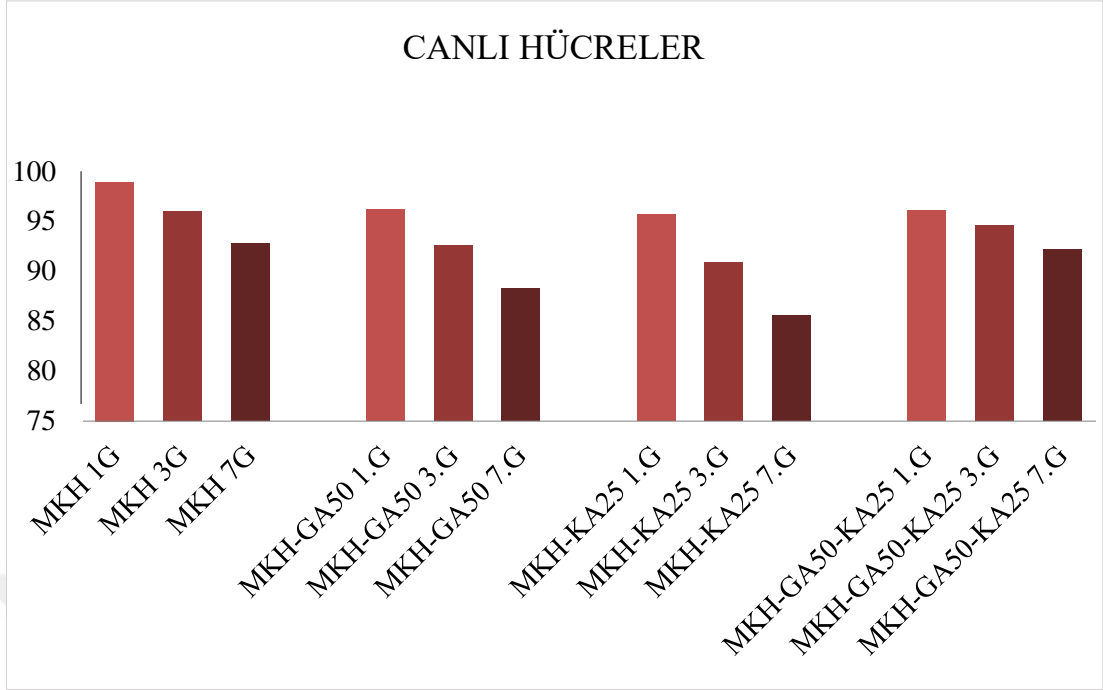


Şekil 3.13. İKİ-MKH hücrelerin 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki ölüm grafiği

Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 25µM KA konsantrasyonundaki ölüm oranının İKİ-MKH - GA ve İKİ-MKH –GA-KA gruplarından daha fazla olduğu gözlemlendi. Şekil 3.13.'de gösterilmiştir. Sayısal veriler tablo 3.17.de mevcuttur.

Tablo 3.17. MKH-Annexin PI testi sonucu-ölü hücre sayısı

	Ölü
MKH 1G	0,153333
MKH 3G	0,216667
MKH 7G	0,876667
MKH-GA50 1.G	0,946667
MKH-GA50 3.G	1,21
MKH-GA50 7.G	3,07
MKH-KA25 1.G	1,322222
MKH-KA25 3.G	3,876667
MKH-KA25 7.G	5,876667
MKH-GA50-KA25 1.G	1,723333
MKH-GA50-KA25 3.G	3,693333
MKH-GA50-KA25 7.G	5,24

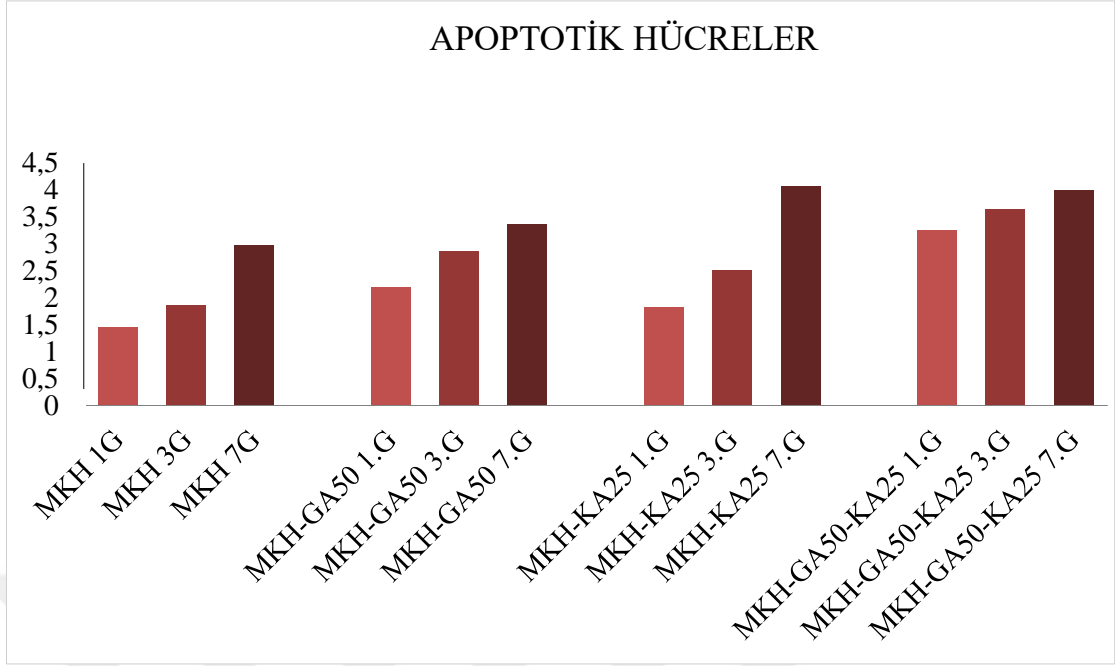


Şekil 3.14. İKİ-MKH hücrelerin 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki canlılık grafiği

Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 50µM GA – 25 µM KA konsantrasyonundaki canlılık oranının İKİ-MKH-GA ve İKİ-MKH – KA gruplarına oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Şekil 3.14.’de gösterilmiştir. Sayısal veriler tablo 3.18.de mevcuttur.

Tablo 3.18. MKH-Annexin PI testi sonucu-canlı hücre sayısı

	Canlı
MKH 1G	98,93333
MKH 3G	95,96667
MKH 7G	92,76667
MKH-GA50 1.G	96,2
MKH-GA50 3.G	92,6
MKH-GA50 7.G	88,3
MKH-KA25 1.G	95,69667
MKH-KA25 3.G	90,9
MKH-KA25 7.G	85,6
MKH-GA50-KA25 1.G	96,08667
MKH-GA50-KA25 3.G	94,6
MKH-GA50-KA25 7.G	92,2

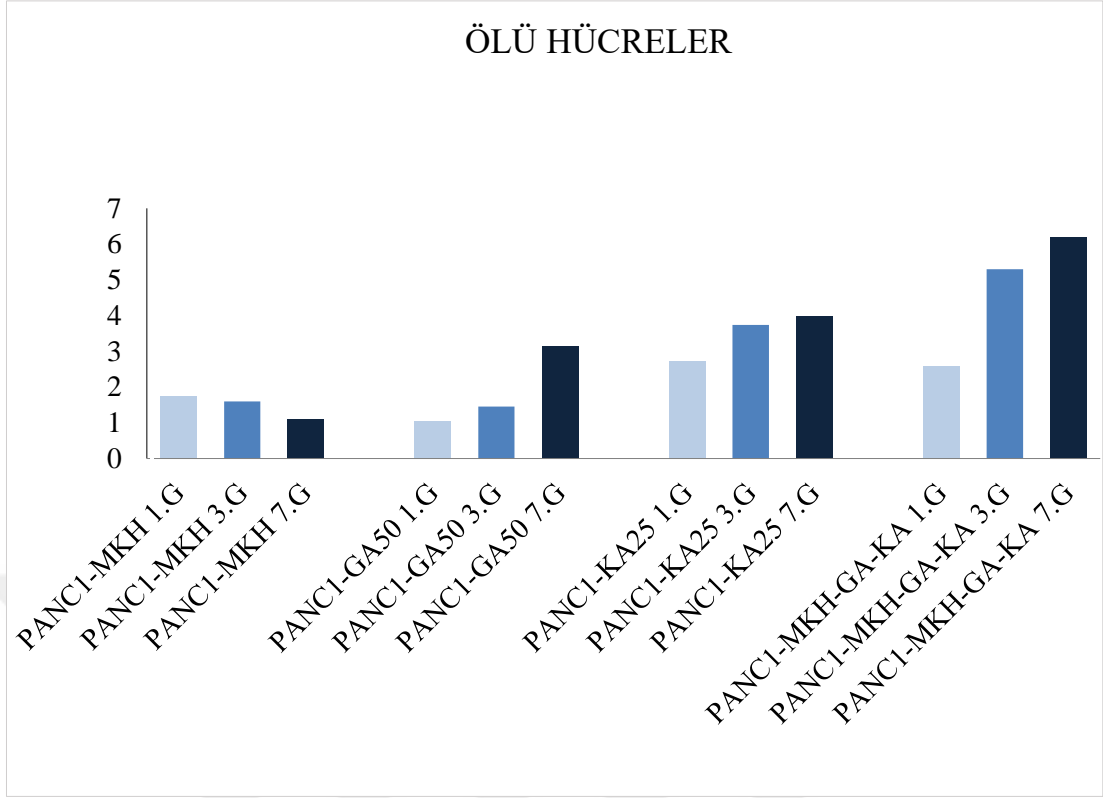


Şekil 3.15. İKİ-MKH hücrelerin 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki apoptoz grafiği

Annexin PI testi sonucunda İKİ-MKH hücrelerinin 50µM GA – 25 µM KA konsantrasyonundaki apoptoz oranının İKİ-MKH-GA ve İKİ-MKH – KA gruplarına oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Şekil 3.15.'de gösterilmiştir. Sayısal veriler tablo 3.19.da mevcuttur.

Tablo 3.19. MKH-Annexin PI testi sonucu-Apoptik

	Apoptik
MKH 1G	1,453333
MKH 3G	1,866667
MKH 7G	2,98
MKH-GA50 1.G	2,2
MKH-GA50 3.G	2,863333
MKH-GA50 7.G	3,366667
MKH-KA25 1.G	1,833333
MKH-KA25 3.G	2,51
MKH-KA25 7.G	4,08
MKH-GA50-KA25 1.G	3,253333
MKH-GA50-KA25 3.G	3,65
MKH-GA50-KA25 7.G	3,995

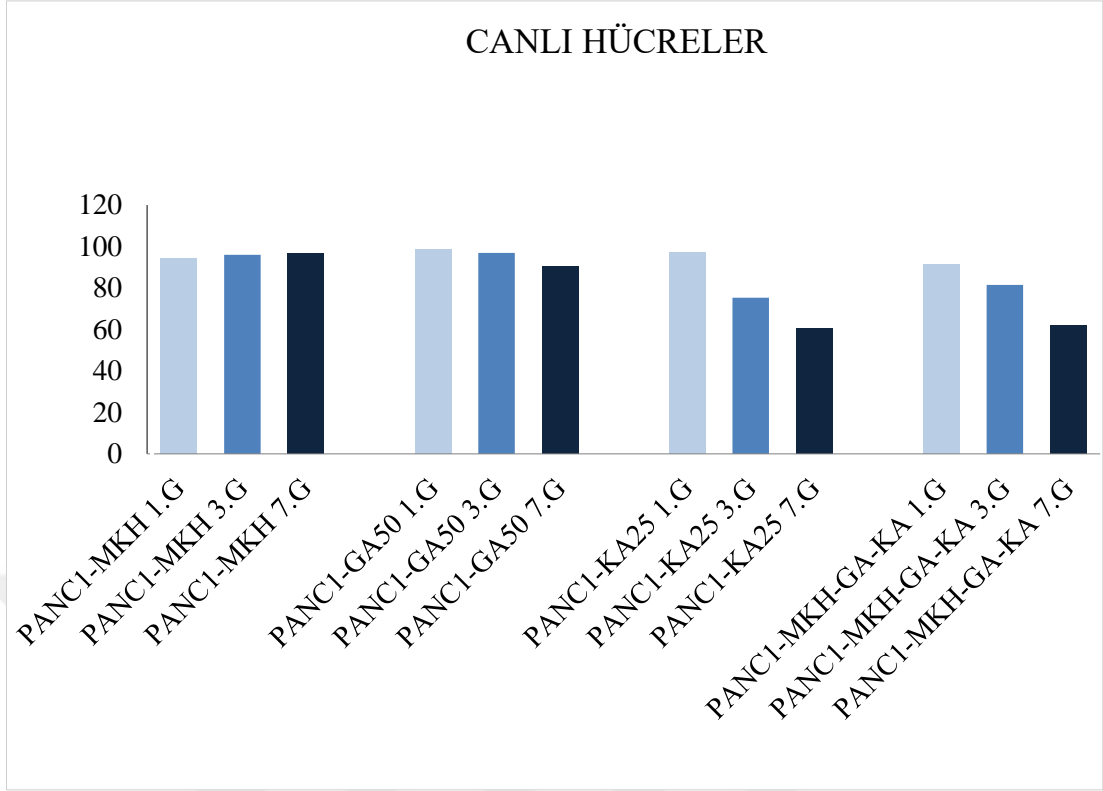


Şekil 3.16. PANC-1 hücrelerin MKH, 50µM GA ve 25µM KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki ölüm grafiği

Annexin PI testi sonucunda PANC-1 hücrelerinin MKH - 50 µM GA – 25 µM KA olan kültürde ölüm oranının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. Şekil 3.16.'de gösterilmiştir. Sayısal veriler tablo 3.20.de mevcuttur.

Tablo 3.20. PANC-1-Annexin PI testi sonucu-ölü hücre sayısı

	Ölü
PANC1-MKH 1.G	1,74
PANC1-MKH 3.G	1,6
PANC1-MKH 7.G	1,1
PANC1-GA50 1.G	1,056667
PANC1-GA50 3.G	1,45
PANC1-GA50 7.G	3,153333
PANC1-KA25 1.G	2,723333
PANC1-KA25 3.G	3,733333
PANC1-KA25 7.G	3,976667
PANC1-MKH-GA-KA 1.G	2,6
PANC1-MKH-GA-KA 3.G	5,3
PANC1-MKH-GA-KA 7.G	6,19

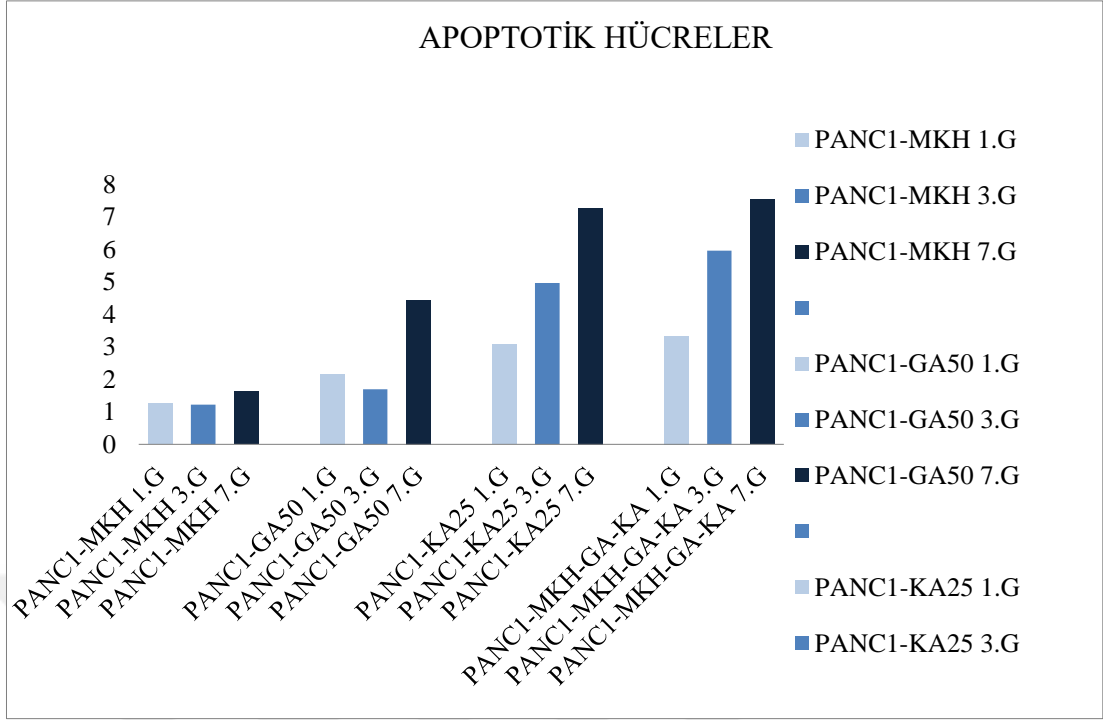


Şekil 3.17. PANC-1 hücrelerin MKH, 50 μ M GA ve 25 μ M KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki canlılık grafiği

Annexin PI testi sonucunda PANC-1 hücrelerinin 25 μ M KA olan kültürde canlılık oranının diğer gruplara oranla daha az olduğu saptandı. MKH - 50 μ M GA – 25 μ M KA grubunda PANC-1 -25 μ M KA grubuna benzer canlılık oranında azalış izlendi. Şekil 3.17.'de gösterilmiştir. Sayısal veriler tablo 3.21.de mevcuttur

Tablo 3.21. PANC-1-Annexin PI testi sonucu-canlı hücre sayısı

	Canlı
PANC1-MKH 1.G	94,06667
PANC1-MKH 3.G	96,03667
PANC1-MKH 7.G	96,67
PANC1-GA50 1.G	98,63333
PANC1-GA50 3.G	96,9
PANC1-GA50 7.G	90,42333
PANC1-KA25 1.G	97,1
PANC1-KA25 3.G	75,36
PANC1-KA25 7.G	60,35
PANC1-MKH-GA-KA 1.G	91,41333
PANC1-MKH-GA-KA 3.G	81,44
PANC1-MKH-GA-KA 7.G	61,83333



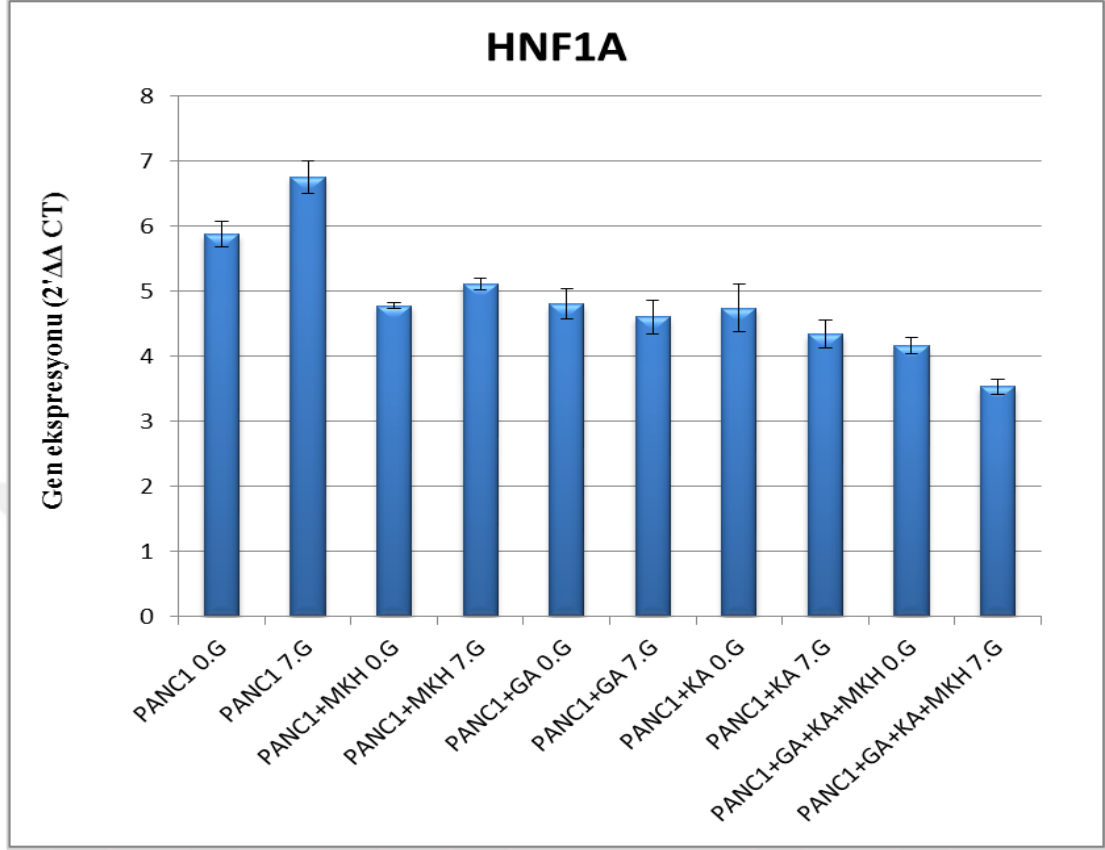
Şekil 3.18. PANC-1 hücrelerin MKH, 50 μ M GA ve 25 μ M KA konsantrasyonunda ayrı ayrı ve birlikte 1.3.7. Günlerdeki apoptoz grafiği

Annexin PI testi sonucunda PANC-1 hücrelerinin MKH, 50 μ M GA ve 25 μ M KA olan kültürde apoptoz oranının daha fazla olduğu görüldü. PANC-1 - 25 μ M KA grubunda da benzer artış gözlemlendi. Şekil 3.18.'de gösterilmiştir. Sayısal veriler tablo 3.22.de mevcuttur.

Tablo 3.22. PANC-1-Annexin PI testi sonucu-apoptik

	Apoptotik
PANC1-MKH 1.G	1,26
PANC1-MKH 3.G	1,226667
PANC1-MKH 7.G	1,63
PANC1-GA50 1.G	2,163333
PANC1-GA50 3.G	1,693333
PANC1-GA50 7.G	4,443333
PANC1-KA25 1.G	3,073333
PANC1-KA25 3.G	4,966667
PANC1-KA25 7.G	7,29
PANC1-MKH-GA-KA 1.G	3,333333
PANC1-MKH-GA-KA 3.G	5,97
PANC1-MKH-GA-KA 7.G	7,543333

3.8. PCR ile gen ekspresyon analizi



Şekil 3.19. HNF1A gen ekspresyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi – Real Time PCR analizi

PANC-1 hücre hattında 7. Gün HNF1A gen ekspresyonlarında artış gözlemlendi. PANC-1 – MKH - 50 μ M GA ve 25 μ M KA kombinasyonu HNF1A gen ekspresyonunu azaldığı saptandı. Şekil 3.19.'da gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Kanser hastalığının tedavi seçeneklerinin yetersiz olması ve ölüm oranının yüksek olması çalışmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Günümüzdeki çalışmalar kanseri tedavi etmenin yanı sıra kanserden korunma ve erken tanıyı da kapsamaktadır. Cerrahi tedaviler radyoterapi, kemoterapi haricinde hedefe yönelik tedavi ve gen tedavileri çalışmaları artmaktadır.

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümler arasında 4. sırada yer almaktadır ve en agresif kanser türlerinden biridir. Genellikle belirtisiz seyirli, ileri evrelerde tanısı konabilen kanser tipidir [193]. Erken evrede tespit edilemeyen pankreas kanserinde, ameliyat küratif bir seçenektir. Fakat kanserin yerleşimine bağlı olarak hastaların sadece %15'inde cerrahi rezeksiyon için uygun olmaktadır. Maalesef ki rezeke edilmiş tümörlerin de %70-80'inde ameliyat sonrası nüks görülebilmektedir [194]. Pankreas kanseri hücrelerinin çeşitli genetik değişikliklerle apoptozdan kaçmak için kemoterapi/radyoterapi gibi sitotoksik geleneksel tedavilere karşı yüksek oranda direnç mekanizması geliştirmiş olduğu bilinmektedir. Pankreas kanseri hücrelerinin sitotoksik kemoterapötik ajanlara ve/veya radyoterapiye karşı oluşan direnç nedeniyle de tedavide güçlükler ortaya çıkmaktadır [195]. Bu nedenle hastalıktan korunmada ve tedavide yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [196].

Son yıllarda doğal ürünlere olan ilgi artmaktadır. Çünkü biyoaktif antikanser ajanları için önemli kaynak teşkil eden doğal ürünler, kemo-ilaçlara kıyasla çok daha düşük toksisiteye sahiptir. Aynı zamanda ilaçların toksisitesini azaltıcı ve etkilerini artırıcı özellikleri nedeniyle de tercih edilmektedirler [197]. Günümüzde kemoterapötik ilaçların %60'tan fazlasının doğal ürünlerden köken aldığı bilinmekte ve birçok kanser tipinde olduğu gibi pankreas kanserinde de bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin, kanserden koruyucu ya da terapötik ajan olarak değerlendirilmesi amacıyla antikanser özellikleri çalışılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile düşük toksisiteye sahip olan kurkumin, resveratrol, likopen, folik asit, beta karoten, selenyum, flavonoidler gibi doğal bitkisel ürünlerin

apoptozu uyarma ya da karsinogenezi önleme gibi farklı mekanizmalarla kanser hücrelerini etkileyebildikleri gösterilmiştir [198]. Bitkisel kaynaklı doğal bir bileşik olan flavonoidlerden genistein, daidzein, resveratrol, baikalein, flavopridol, apigenin ve katesinlerin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkileri gösterilerek pankreas kanseri tedavisinde ve korunulmasında önemli terapötik ajan olabilecekleri rapor edilmiştir [199]. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında (2020); resveratrol, protein dışı kodlayan RNA ifadesini antagonize ederek farklılaşmayı engelleyip, insan özofaringeal karsinomu hücre büyümesini bastırarak anti-kanser etki göstermiştir. Bizim çalışmamızda da karnosit asit ve gallik asit anti-kanser etki göstermektedir [200].

Bu doğal bileşiklerin pankreas kanserindeki antikanserojenik etkilerinin incelenmesi amacıyla PANC-1 hücrelerinin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda ise; Panc-1 hücre hattında MKH +GA+KA kombinasyonu sonrasında HNF1A geninin ekspresyonunda %50 azalma gözlemlenmiştir.

Son zamanlarda kök hücrenin keşfi ile kanser çalışmaları hız kazanmış hücresel temelli tedaviler geliştirilmeye ve önem kazanmaya başlamıştır. Kök hücreler hasarlı dokuya migrasyon yetenekleri olan ve bulunduğu dokunun yenilenmesinde görevli olan özel hücrelerdir. Diğer yandan kanser hastalarının kemoterapi ve radyoterapi sonrasında yaşam kalitesi kötü etkilenmekte ya da düşmektedir. Hastanın yaşam kalitesini arttırmak amacıyla da kök hücreler büyük önem taşımaktadır. Allojenik kemik iliği nakli ile hastanın yaşam kalitesinin arttığı yapılan çalışmalarda görülmüştür. Kök hücrenin klinikte uygulama alanının genişlemesi için moleküler mekanizmasının tam olarak çözülmesi gerekmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar moleküler düzeyde hızla artmaktadır. Yolakların tam olarak anlaşılabilmesi büyük önem taşımaktadır. Kanseri oluşturan kanser kök hücrelerinin normal kök hücreler ile olan benzerlikleri kendilerini yenilemesi için kullandığı sinyal yolları (Notch, SHH, WNT) , asimetrik hücre bölünmesi ve taşıdıkları benzer transkripsiyon faktörleri (SOX2, Nanog, Klf4, OCT 4) kanseri oluşturan hücrelerin normal kök hücrelerden kaynaklandığını düşündürmektedir. Mezenkimal kök hücreler çalışmalarda en çok kullanılan kök hücredir. Hasarlı dokuya olan migrasyon yeteneği ve orada dokunun onarımını sağlaması, kanser hücrelerinin üzerinde anti tümörojenik etkisi çalışmamızda mezenkimal kök hücre grubunu seçmemize neden olmuştur.

Antiinflamatuvar özelliğe sahip olması diğer kök hücreler arasında hücre sel temelli tedavilerde mezenkimal kök hücrelerin daha çok çalışılan hücre grubu olmasını sağlamaktadır. Fakat tek başına kanseri eradike edebilecek bir tedavi oluşturulamamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin kanserli bir dokuya verildiğinde kanser dokusunun olduğu yere yerleşip savunma sistemi oluşturduğu yapılan çalışmalarda izlenmiştir[201]. Çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin PANC-1 hücreleri üzerinde etkisinin izlenmesi haricinde, antitümörojenik ve antikanserojenik olan kanser hücrelerinin büyümesini engelleyici etkiye sahip olan GA ve KA'nın pankreas kanseri üzerinde hem tek başına hem de Mezenkimal kök hücre ile birlikte gösterecekleri etkisi incelenmiştir. Mezenkimal kök hücreler tek başına anti-kanser etkisi göstermese de Panc-1+MKH+GA+KA birlikteliğinde anti-kanser etkinlik göstermiştir. Onkogen olan HNF1A geni üzerinde, Panc-1+MKH birlikteliğinde ekspresyon artışına yol açmıştır. Panc-1+MKH+GA+KA birlikteliğinde ise ekspresyon azalmasına yol açmıştır. MKH+GA+KA 'in HNF1A geninin ekspresyonunu düşürmesi bize kanser mekanizmalarının düzenlenmesinde rol olabileceği hipotezini düşündürmüştür. Aynı zamanda hasarlı dokuya olan migrasyon yeteneği ve orada dokunun onarımını sağlaması yönünde etkileri olacağı tahmin edilmektedir. Fakat bunun için in vivo ve in vitro deneylere ihtiyaç vardır.

Birçok çalışmada GA ve KA gibi doğal bitkisel ürünler kanser hücrelerine karşı kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada (2012) ; Gallik Asit, iki yumurtalık kanseri hücre dizisi OVCAR-3 ve A2780 / CP70'in büyümesini ve in vitro anjiyogenezini seçici olarak inhibe etmiş, Akt fosforilasyonunun ve HIF-1 α ekspresyonunun baskılanması ve PTEN ekspresyonunun desteklenmesi yoluyla VEGF sekresyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada ise kanser seçici ajan olarak gallik asit, pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [172].

Bahri ve ark (2017); rosmarinik asit (KA), akciğer fibroblastlarının ve miyofibroblastların karnosik asit ile indüklenen apoptozunu artıran bir adjuvan olarak güçlü bir rol oynadığı bildirilmiştir. [202]. Bizim çalışmamızda ise; Panc-1 + KA birlikteliğinde apoptotik hücre miktarında 1. güne kıyaslandığında 7. günde 2 kat artış yakalamıştır. Panc-1 + GA birlikteliğinde de; apoptotik hücre miktarında 1.güne kıyaslandığında 7. günde 2 kat artış yakalamıştır. Fakat KA, GA kıyasla apoptoza etkisi daha fazladır.

Liu ve ark. (2012): GA'nın insan pankreas kanseri hücre hatları CFPAC-1 ve MiaPaCa-2'nin yanı sıra normal hücreler olarak hepatositler HL-7702 üzerindeki antiproliferatif etkisi incelenmiştir. Özellikle, MiaPaCa-2 hücrelerinde GA ile indüklenen apoptoz mekanizması in vitro olarak daha fazla çalışılmıştır. Kanserde seçici bir ajan olarak gallik asit pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği bildirilmiştir [203].

Jing ve ark (2020); Gallik asit-altın nanoparçacıkları, insan glioma U251 hücrelerinin radyasyona bağlı hücre ölümünü arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, GA-GNP'ler artı radyasyon, S ve G2/M fazlarında U251'in hücre döngüsünü durdurduğu ve artan BAX protein seviyeleri ve azalmış BCL-2 ekspresyonu ile desteklenen apoptotik hücre ölümünü tetiklediği rapor edilmiştir. Bu nedenle, GBM tedavisi için gelecekteki çalışmalarda radyasyon tedavisi ile kombinasyon halinde GA-GNP'ler büyük potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir [204]. Bizim çalışmamızda ise; GA 1. güne kıyasla 7. gün 3 kat hücre ölümüne neden olmuştur. Panc-1 + MKH + GA+KA birlikteliğinde ise; 2,5 kat hücre ölümünde artış tespit edilmiştir.

Pesakhov ve ark (2010); Kurcumin ve Karnosik Asit birlikteliği, in vitro ve in vivo olarak akut miyeloid lösemiye baskılayıcı etkiler yarattığı bildirilmiştir[205]. Bizim çalışmamızda ise; PANC-1+MKH+GA+ KA birlikteliğinde hücre canlılığında 4,5 kat azalma tespit edilmiştir.

GA ve KA pankreas kanseri hücrelerinde antikanser etkileri tam bilinmemekle birlikte sitotoksik etkileri, apoptoz uyarıcı ve antiinvaziv gibi tümör büyümesini baskılayıcı özellikteki antikanser etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Kim ve ark (2016); Karnosik Asit'in HCT116 hücrelerinde apoptoza yol açtığı, ROS oluşumu, p53 indüksiyonu, kaspaz aktivasyonu ve STAT3 sinyal yolunun inhibisyonu rapor etmiştir [206].

D'Alesio ve ark (2017); ERBB2 + meme kanseri hücrelerinde karnosik asit ve Trastuzumab arasındaki işbirliği antitümör aktivitesi ile kanser hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir [207].

Zhao ve ark (2019) Karnosik asidin, apoptotik ölümü aktive ederek, hücre göçünü ve istilasını inhibe ederek ve PI3K/AKT/m-TOR sinyal yolunu baskılayarak A-549 akciğer kanseri hücrelerinde kanser hücresi büyümesini inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir [208]. Çalışmamızda canlılık oranlarına baktığımızda; Panc-1 +GA birlikteliğinde küçük bir düşüş gerçekleşirken, Panc-1 +KA birlikteliğinde %50 oranında düşüş gerçekleşmiştir.

GA ve KA' nın ve MKH'lerin PANC-1 hücrelerindeki etkilerini incelediğimiz bu çalışmada apoptozu tayini Annexin V/FITC-PI yöntemi, canlılık için WST-1 ve akım sitometri bir analiz yapılmıştır. Ve son çalışmalarda onkogen kabul edilen HNF1A geninin ekspresyonuna bakılmıştır. GA ve KA nın PANC-1 ve İKİ-MKH hücreleri üzerinde uygun dozu bulmak amaçlı konsantrasyon deneyi yapılmıştır. Kanser hücreleri üzerinde uygun GA ve KA konsantrasyonu sırasıyla 50 µM ve KA µM olarak belirtilmiştir [191,192]. Yapılan konsantrasyon deneyi sonucunda PANC-1 ve İKİ-MKH hücreleri için kurulacak olan ortak kültür için İKİ-MKH için sitotoksik olmayan hücrenin proliferasyonunu azaltıcı olmayan ve en önemlisi kanser hücreleri üzerinde gösterecek olduğu gibi apoptotik etkiye sahip olmayan doz WST testi ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda insan kemik iliği kaynaklı olan MKH'ler karakterizasyon için flow sitometri analizden geçirildi. Analiz sonuçlarına göre CD13, CD29, CD44, CD73 ve CD90 için pozitif ve CD14, CD15, CD34, CD45, CD105, CD117, HLA A,B,C ve HLA-DR için negatif çıkmıştır. Bu sonuçlar kullandığımız hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterine sahip olduğunu göstermektedir. Mikroskop altındaki morfolojileri ve kültür kabının yüzeyine yapışmaları da kullandığımız hücrelerin mezenkimal kök hücreler olduğunu ispatlamaktadır. Kullandığımız PANC-1 pankreas kanseri hücre hattının karakterizasyonu için de belirli yüzey belirteçleri flow sitometri cihazıyla saptanmıştır. Bu analiz sonucunda, PANC-1 hücrelerinin CD18, CD44, CD166, CD324, KI67 ve PCNA belirteçleri bakımından pozitif olduğu, CD24, CD31, CD34, CD38, CD133, CD309, CD325 ve CD338 belirteçleri bakımından negatif olduğu gösterilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre panc-1 hücrelerinde bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir.

Mezenkimal kök hücreler ile kanser hücreleri arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bazı çalışmalarda MKH'lerin kanser hücrelerini desteklediği bazı çalışmalarda ise baskıladığı gözlemlenmiştir. MKH'lerin kanser hücrelerini destekledikleri çeşitli mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar; tümörle ilişkili fibroblastlara geçiş, immün yanıtın baskılanması, anjiyogenezin teşvik edilmesi, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) uyarılması, tümör mikroçevresine destek ve kanser hücrelerinin metastaz yapmalarına destek olarak sıralanabilir. MKH'lerin tümör gelişimini baskılama mekanizmaları ise inflamatuvar infiltrasyonun arttırılması, anjiyogenezin inhibe edilmesi ve Wnt yolağının baskılanması aracılığıyla tümör gelişiminin inhibe edilmesi olarak gösterilebilir.[209] Bizim çalışmamızda tek başına MKH'lerin PANC-1 kanser hücrelerini desteklediği ya da baskıladığı hakkında netlik yoktur. Bunun için daha fazla in vitro deneylere ihtiyaç vardır. Aynı zamanda in vivo deneylerde gerekmektedir.

PANC-1 pankreas kanseri hücreleri bitkisel kaynaklı doğal bileşik olan GA ve KA ile kültüre edildiğinde antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir ve kanser hücresi canlılığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. PANC-1 hücrelerinde canlı hücre sayısında azalmaya, apoptatik hücre sayısında ise artışa neden olmuştur. Karnosik asitin, Gallik asite oranla daha güçlü bir bileşik olduğu da gözden kaçmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, bitkilerin yapısında bulunan ve fenolik bileşik olan Karnosik asit ve Gallik asitin, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle birlikte PANC-1 hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik özellikleriyle pankreas kanserindeki antikanser etkisi HNF1A gen ifade analizleri ile araştırılmıştır. Yapılan analizler neticesinde mezenkimal kök hücrelerin Panc-1 hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri ve sitotoksik etkileri olduğu gözlemlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde canlı hücre sayısında azalmaya, apoptotik hücre sayısında ise artışa neden olduğu anti-kanser etkisi gözlenmiştir.

Bu çalışma ile MKH'lerin, gallik asit ve karnosik asitin pankreas kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilebileceği gösterilmiştir. Ancak daha etkili ve verimli sonuçlar alınması için hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaların yapılması ve istatistiksel olarak olumlu veya olumsuz anlamlı veriler elde edinceye kadar tekrarlanması gerekmektedir. Ayrıca MKH'lerin kanser hücrelerini öldürme mekanizmalarının aydınlatılması için moleküler yolaklar çalışılmalıdır.

Çalışmamızın bir sonraki hedefi GA ve KA kombinasyonunun MKH ile birlikte, deneylerin *in-vivo* olarak da incelenmesidir.

Bulgularımıza göre MKH'lerin GA + KA birleşimiyle Panc-1 hücrelerine karşı antiproliferatif etkilerinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Karnosik Asitin, Gallik Asite göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Pankreas Kanseri hücrelerine karşı GA +KA kombinasyonu gelecek için umut vaat etmektedir. Çalışmamızdaki fenolik bileşikler GA ve KA pankreas kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisi ilk kez araştırılmış ve PANC-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkinin belirlenmesiyle GA ve KA'nın pankreas kanseri tedavisi için yeni bir terapötik ajan aday olabileceği gösterilmiştir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada, karnosik asit ve gallik asit, mezenkimal kök hücrelerle birlikte PANC-1 hücrelerinde canlı hücre sayısında azalmaya, apoptotik

hücre sayısında ise artışa neden olduğu ve HNF1A 'nın ekspresyonunun azalması pankreas kanseri büyümesini ve ilerlemesinin inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir. GA ve KA'in HNA1A geninin ekspresyonunu düşürmesi bize kanser mekanizmalarının düzenlenmesinde rol olabileceği hipotezini düşündürmüştür.



KAYNAKLAR

- [1] Yeo C. J., Cameron J. L., Acute Pancreatitis, Editors: Sabiston D. C., *Textbook of Surgery*, 15th ed., W.B. Saunders Company, 1156-1165, 1997.
- [2] Slack J. M., Developmental Biology of the Pancreas, *Development*, 1995, 121, 1569-80.
- [3] Bardeesy N., DePinho R. A., Pancreatic Cancer Biology and Genetics, *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2, 897-909.
- [4] Rovasio A. R., Development and Structure of the Pancreas, Editors: Neoptolemos J. P., Urrutia R., Abbruzzese M., Büchler M., *Pancreatic Cancer*, 1th ed., Springer, USA, 27-38, 2010.
- [5] Şimşek H., Pankreasın yapısı ve konjenital anomaliler, Editors: Telatar H., Şimşek H., *Astroenteroloji*, Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 917-23, 1993.
- [6] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., et al., Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin*, 2018, **68**(6), 394-424.
- [7] Zhong Y., Naito Y., Cope L., Naranjo-Suarez S., Saunders T., Hong S. M., Goggins M. G., Herman J. M., Wolfgang C. L., Iacobuzio-Donahue C. A., Functional p38 MAPK Identified by Biomarker Profiling of Pancreatic Restrains Growth through JNK Inhibition and Correlates with Improved Survival, *Clin. Cancer Res.* 2014, 20, 6200–6211.
- [8] Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., Cancer Statistics, *CA Cancer J. Clin.*, 2019, 69, 7–34.
- [9] WHO GLOBOCAN Database. <https://gco.iarc.fr/today/home>. (Ziyaret tarihi: 15 Nisan).
- [10] Fernandez-del Castillo C., Clinical Manifestations, Diagnosis and Staging of Exocrine Pancreatic Cancer, Editors: Tanabe K., Howell D., <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-staging-of-exocrine-pancreatic-cancer> (Ziyaret tarihi: Ağustos 2020).
- [11] Başara Bora B., Soyutun Çağlar İ., Aygün A., Özdemir T. A., Kulali B., Uzun B. B., Birge Kayış B., Aydoğan Kılıç D., *Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2018*, T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2019.
- [12] Valls C., Andía E., Sanchez A., Fabregat J., Pozuelo O., Quintero J. C., Serrano T., Garcia-Borobia F., Jorba R., Dual-Phase Helical CT of Pancreatic

- Adenocarcinoma: Assessment of Resectability Before Surgery, *Am J Roentgenol*, 2002, **178**(4), 821-6.
- [13] Klimstra D. S., Noductal Neoplasms of the Pancreas. *Mod. Pathol.*, 2007, 20, 94–112.
- [14] Haeberle L., Esposito I., Pathology of Pancreatic Cancer, *Transl. Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, 4, 50. doi: 10.21037/tgh.2019.06.02.
- [15] Stevens Kyle J. and Lisanti C., *Pancreas Imaging*, StatPearls Publishing, Treasure Island, 2019.
- [16] Hruban R. H., Takaori K., Klimstra D. S., Adsay N. V., Albores-Saavedra J., Biankin A. V., Biankin S. A., Compton C., Fukushima N., Furukawa T., Goggins M., Kato Y., Klöppel G., Longnecker D. S., Lüttges J., Maitra A., Offerhaus G. J., Shimizu M., Yonezawa S., An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms, *Am J Surg Pathol*, 2004, 28, 977–87.
- [17] Distler, M., et al., Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN IPMN, and MCN, *BioMed Research International*, 2014, 1–11.
- [18] Hruban R. H., Maitra A., Kern S. E., Goggins M., Precursors to Pancreatic Cancer, *Gastroenterol Clin North Am*, 2007, 36, 831-49.
- [19] Distler M., Aust D., Weitz J., Pilarsky C., Grützmann R., Precursor Lesions For Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN, *Biomed Res Int*, 2014, 11.
- [20] Wilde R. F., Hruban R. H., Maitra A., Reporting Precursors to Invasive Pancreatic Cancer: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia, Intraductal Neoplasms and Mucinous Cystic Neoplasm, *Diagn Histopathol*, 2012, 18, 17–30.
- [21] Reid M. D., Bagci P., Adsay N. V., Histopathologic Assessment of Pancreatic Cancer: Does One Size Fit All?, *J Surg Oncol*, 2013, 107, 67-77.
- [22] Hruban R. H., Maitra A., Goggins M., Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia, *Int J Clin Exp Pathol*, 2008, 1, 306–16.
- [23] Avcı E., Juglonun bxp-3 Pankreas Kanseri Kücrelerinde Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi, Invazyon ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2015.
- [24] Wilentz R. E., Iacobuzio-Donahue C. A., Argani P., McCarthy D. M., Parsons J. L., Yeo C. J., Kern S. E., Hruban R. H., Loss of Expression of Dpc4 in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Evidence That DPC4 Inactivation Occurs Late in Neoplastic Progression. *Cancer Res*, 2000, 60, 2002–2006.
- [25] Klöppel G., Solcia E., Longnecker D. S., et al., *Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas: World Health Organization International*

Histological Classification of Tumours. 2nd edition. Springer, New York, 1998.

- [26] Kosmahl M., Pauser U., Peters K., Sipos B., Lüttges J., Kremer B., Klöppel G., Cystic Neoplasms of the Pancreas and Tumor-Like Lesions with Cystic Features: A Review of 418 Cases and a Classification Proposal, *Virchows Arch*, 2004, 445, 168–78.
- [27] Capella C., Albarello L., Capelli P., Sessa F., Zamboni G., Carcinoma of the Exocrine Pancreas: The Histology Report, *Dig Liver Dis*, 2011, 43, 282-92.
- [28] Salvia R., Fernández-del Castillo C., Bassi C., Thayer S. P., Falconi M., Mantovani W., Pederzoli P., Warshaw A. L., Main-duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas: Clinical Predictors of Malignancy and Long-Term Survival Following Resection, *Ann Surg*, 2004, 239.
- [29] Abe T., Fukushima N., Brune K., Boehm C., Sato N., Matsubayashi H., Canto M., Petersen G. M., Hruban R. H., Goggins M., Genome-Wide Allelotypes of Familial Pancreatic Adenocarcinomas and Familial and Sporadic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms, *Clin Cancer Res*, 2007, 13, 6019–25.
- [30] Iacobuzio-Donahue C. A., Klimstra D. S., Adsay N. V., Wilentz R. E., Argani P., Sohn T. A., Yeo C. J., Cameron J. L., Kern S. E., Hruban R. H., Dpc-4 Protein is Expressed in Virtually All Human Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas: Comparison With Conventional Ductal Adenocarcinomas, *Am J Pathol*, 2000, 157, 755–61.
- [31] Klöppel G., Kosmahl M., Lüttges J., Intraductal Neoplasms of the Pancreas: Cystic and common, *Pathologe*, 2005, 26, 31–6.
- [32] Aşık A., Juglonun Panc-1 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotic Etkilerinin Moleküler ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2015.
- [33] Zamboni G., Hirabayashi K., Castelli P., Lennon A. M., Precancerous lesions of the pancreas, *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 2013, 27(2), 299–322.
- [34] Fukushima N., Fukayama M., Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas: Pathology and Molecular Genetics, *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2007, 14, 238–42.
- [35] Crippa S., Salvia R., Warshaw A. L., et al., Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas is not an Aggressive Entity: Lessons From 163 Resected Patients, *Annals of Surgery*, 2008, 247(4), 571–579.
- [36] Rahib B. D., Smith R., Aizenberg A. B., Rosenzweig J. M., Fleshman L. M., Matrisian Projecting Cancer Incidence and Deaths To 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancer, *United States Cancer Res*, 2014, 74, pp. 2913-2921

- [37] Søreide K., Sund M., Epidemiological-Molecular Evidence of Metabolic Reprogramming on Proliferation, Autophagy and Cell Signaling in Pancreas Cancer, *Cancer Lett.*, 2015, 356, 281-8.
- [38] Hruban R. H., Klöppel G., Offerhaus G. J., Pancreatic Cancer, Editors: Stewart B. W., Wild C. P., *World Cancer Report 2014*, 1th ed., International Agency for Research on Cancer, 594-608, 2014.
- [39] Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A., Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin*, 2014, 64, 9-29.
- [40] Başara B. B., Güler C., Yentür G. K., T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı, Ankara, 2013.
- [41] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., et al, Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin.*, 2018, 68, 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [42] Hidalgo M., Cascinu S., Kleeff J., Labianca R., Löhr J. M., Neoptolemos J., et al., Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes, *Pancreatology*, 2015, **15**(1), 8-18.
- [43] Conroy T., Hammel P., Hebbar M., Ben Abdelghani M., Wei A.C., Raoul J. L., Choné L., Francois E., Artru P., Biagi J.J. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 2018;**379**:2395–2406.
- [44] Dhir M., Zenati M. S., Hamad A., Singhi A. D., Bahary N., Hogg M. E., Zeh H. J., Zureikat A. H., FOLFIRINOX Versus Gemcitabine/Nab-Paclitaxel for Neoadjuvant Treatment of Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Head Adenocarcinoma, *Ann. Surg. Oncol.*, 2018, 25, 1896–1903.
- [45] Ielpo B., Caruso R., Duran H., Diaz E., Fabra I., Malavé L., Ferri V., Alvarez R., Cubillo A., Plaza C., A Comparative Study of Neoadjuvant Treatment With Gemcitabine Plus Nab- Paclitaxel Versus Surgery First For Pancreatic Adenocarcinoma, *Surg Oncol.*, 2017, 26, 402–410.
- [46] Katz M. H. G., Pisters P. W. T., Evans D. B., Sun C. C., Lee J. E., Fleming J. B., Vauthey J. N., Abdalla E. K., Crane C. H., Wolff R. A., Borderline Resectable Pancreatic Cancer: The Importance of This Emerging Stage of Disease, *J. Am. Coll. Surg.*, 2008, 206, 833–846.
- [47] Cloyd J. M., Chen H. C., Wang X., Tzeng C. W. D., Kim M. P., Aloia T. A., Vauthey J. N., Lee J. E., Katz M. H. G., Chemotherapy Versus Chemoradiation as Preoperative Therapy for Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Propensity Score Adjusted Analysis. *Pancreas*, 2019, 48, 216–222.
- [48] Winter J. L., Cameron K. A., Campbell M. A., Arnold, D. C., Chang, J., Coleman, et al., 1423 Pancreaticoduodenectomies For Pancreatic Cancer: A Single Institution Experience, *J Gastrointest Surg*, 2006, **10**, 1199-1211.

- [49] Frampas E., et al., Pancreatic Carcinoma: Key-Points from Diagnosis to Treatment, *Diagnostic and Interventional Imaging*, 2016, **97**(12), 1207–1223.
- [50] Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., Cancer Statistics, 2020, *CA Cancer J Clin.*, 2020, 70, 7-30. doi: 10.3322/caac.21590.
- [51] Gordon-Dseagu V. L., Devesa S. S., Goggins M., et al., Pancreatic Cancer Incidence Trends: Evidence from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Population- Based Data, *Int J Epidemiol*, 2018, 47, 427–39.
- [52] Luo W., et al., Current Epidemiology of Pancreatic Cancer: Challenges and Opportunities, *Chinese Journal of Cancer Research*, 2020, 32(6), 705–719.
- [53] Decker G. A., Batheja M. J., Collins J. M., Silva A. C., Mekeel K. L., Moss A. A., Nguyen C. C., Lake D. F., Miller L. J., Risk Factors for Pancreatic Adenocarcinoma and Prospects for Screening, *Gastroenterol Hepatol*, 2010, 6, 246-254.
- [54] Wolfgang C. L., Herman J. M., Laheru D. A., Klein A. P., Erdek M. A., Fishman E. K., Hruban R. H., Recent Progress in Pancreaticcancer, *CA Cancer J Clin*, 2013, 63, 318-48.
- [55] Hoffmann D., Rivenson A., Abbi R., Wynder E. L., A Study of Tobacco Carcinogenesis: Effect of the Fat Content of the Diet on the Carcinogenic Activity of 4-(Methylnitrosamino)- 1-(3-Pyridyl)-1-Butanone in F344 Rats, *Cancer Res*, 1993, 53, 2758–2761.
- [56] Zhao Z., Liu W., Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2021, 19, 1533033820962117.
- [57] Dusek L., Muzík J., Gelnarová E., Fínek J., Vyzula R., Abrahámová J., Cancer Incidence and Mortality in the Czech Republic, *Klin Onkol*, 2010, 23, 311.
- [58] Landi S., Genetic Predisposition and Environmental Risk Factors to Pancreatic Cancer: A Review of the Literature, *Mutat Res.*, 2009, **681**(2-3), 299–307. doi:10.1016/j.mrrev.2008.12.001
- [59] Zavoral M., Minarikova P., Zavada F., Salek C., Minarik M., Molecular Biology of Pancreatic Cancer, *World J Gastroenterol*, 2011, 17, 2897-908.
- [60] Yadav D., Lowenfels A. B., The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer, *Gastroenterology*, 2013, **144**(6), 1252–1261. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.068
- [61] Talamini G., Falconi M., Bassi C., Sartori N., Salvia R., Caldiiron E., Frulloni L., Di Francesco V., Vaona B., Bovo P., Incidence of Cancer in the Course of Chronic Pancreatitis, *Am J Gastroenterol*, 1999, 94, 1253-60.
- [62] Muniraj T., Jamidar P. A., Aslanian H. R., Pancreatic Cancer: A Comprehensive Review and Update, *Dis Mon*, 2013, 59, 368-402.

- [63] Eibl G., Rozengurt E., KRAS, YAP, and Obesity in Pancreatic Cancer: A Signaling Network With Multiple Loops, *Semin Cancer Biol.*, 2019, 54, 50–62. doi:10.1016/j.semcancer.2017.10.007
- [64] Taunk P., Hecht E., Stolzenberg-Solomon R., Are Meat and Heme Iron Intake Associated With Pancreatic Cancer? Results From the NIH-AARP Diet and Health Cohort, *Int J Cancer*, 2016, 138, 2172–89. doi: 10.1002/ijc.29964.
- [65] Nkondjock A., Krewski D., Johnson K. C., Ghadirian P., Dietary Patterns and Risk of Pancreatic Cancer, *Int J Cancer*, 2005, 114, 817-23.
- [66] Djuric Z., Obesity-Associated Cancer Risk: The Role of Intestinal Microbiota in the Etiology of the Host Proinflammatory State, *Transl Res.*, 2017, 179, 155–167. doi:10.1016/j.trsl.2016.07.01.
- [67] Li J., Song J., Zaytseva Y. Y., et al., An Obligatory Role For Neurotensin in High Fat-Diet-i Induced Obesity, *Nature*, 2016, **533**(7603), 411–415. doi:10.1038/nature17662
- [68] Siergiejko A. S. K., Gomez-Chou S. B., Cruz-Monserrate Z., et al., Chronic Inflammation Initiates Multiple Forms of K-Ras-Independent Mouse Pancreatic Cancer in the Absence of TP53, *Oncogene*, 2017, **36**(22), 3149–3158. doi:10.1038/onc.2016.461
- [69] Silverman D. T., Hoover R. N., Brown L. M., Swanson G. M., Schiffman M., Greenberg R. S., Hayes R. B., Lillemoe K. D., Schoenberg J. B., Schwartz A. G., Liff J., Pottern L. M., Fraumeni J. F. Jr, Why do Black Americans Have a Higher Risk of Pancreatic Cancer Than White Americans?, *Epidemiology*, 2003, 14, 45-54.
- [70] Rawla P., Sunkara T., Gaduputi V., Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors, *World J Oncol.*, 2019, **10**(1), 10–27. doi:10.14740/wjon1166
- [71] Bosetti C., Rosato V., Silverman D., et al., Diabetes, Antidiabetic Medications, and Pancreatic Cancer Risk: An Analysis From the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium, *Ann Oncol.*, 2014, **125**(10), 2065–2072. doi:10.1093/annonc/mdu276
- [72] Wörmann S. M., Algül H., Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer, *Front Oncol*, 2013, 3, 282.
- [73] Becker A. E., Hernandez Y. G., Frucht H., Lucas A. L., Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Risk Factors, Screening, and Early Detection, *World J Gastroenterol*, 2014, **20**(111), 82-98.
- [74] Risch H. A., Lu L., Wang J., et al., ABO Blood Group and Risk of Pancreatic Cancer: A Study in Shanghai and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol*, 2013, **177**(12), 1326–1337. doi:10.1093/aje/kws458.

- [75] Midha S., Chawla S., Garg P. K., Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors For Pancreatic Cancer: A Review, *Cancer Lett.*, 2016, **381**(1), 269–277.
- [76] Li X., Xu H., Gao P., ABO Blood Group and Diabetes Mellitus Influence the Risk For Pancreatic Cancer in a Population From China, *Med Sci Monit.*, 2018, **24**, 9392–9398.
- [77] Raza M. H., Raza M. H., Arshad A., et al., Microbiota in Cancer Development and Treatment, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, **145**(1), 49–63. doi:10.1007/s00432-018-2816-0
- [78] Garrett W. S., Cancer and the Microbiota, *Science*, 2015, **348**(6230), 80–86. doi:10.1126/science.aaa4972
- [79] Hamm A. K., Weir T. L., Editorial on “Cancer and the Microbiota” Published in *Science*, *Ann Transl Med.*, 2015, **3**(13), 175. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.07.16
- [80] Meng C., Bai C., Brown T. D., Hood L. E., Tian Q., Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer, *Genomics, Proteomics Bioinformatics*, 2018, **16**(1), 33–49.
- [81] Pushalkar S., Hundeyin M., Daley D., et al., The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression, *Cancer Discovery*, 2018, **8**(4), 403–416.
- [82] Brown D. G., Rao S., Weir T. L., et al., Metabolomics and Metabolic Pathway Networks From Human Colorectal Cancers, Adjacent Mucosa, and Stool, *Cancer Metab.*, 2016, **4**, 11. doi:10.1186/s40170-016-0151-y
- [83] Arpaia N., Campbell C., Fan X., et al., Metabolites Produced By Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-cell Generation, *Nature*, 2013, **504**(7480), 451–455. doi:10.1038/nature12726
- [84] Eibl G., Rozengurt E., KRAS, YAP, and Obesity in Pancreatic Cancer: A Signaling Network With Multiple Loops, *Semin Cancer Biol.*, 2019, **54**, 50–62. doi:10.1016/j.semcancer.2017.10.007
- [85] Zitvogel L., Galluzzi L., Viaud S., et al., Cancer and the Gut Microbiota: An Unexpected Link, *Science Transl Med.*, 2015, **7**(271), 271ps1.
- [86] Fan X., Alekseyenko A.V., Wu J., et al., Human Oral Microbiome and Prospective Risk For Pancreatic Cancer: a Population-Based Nested Case-Control Study, *Gut*, 2018, **67**(1), 120–127.
- [87] Jesnowski R., Isaksson B., Möhrcke C., et al., Helicobacter Pylori in Autoimmune Pancreatitis and Pancreatic Carcinoma, *Pancreatology*, 2010, **10**(4), 462–466. doi:10.1159/000264677.
- [88] Maekawa T., Fukaya R., Takamatsu S., et al., Possible Involvement of Enterococcus Infection in The Pathogenesis of Chronic Pancreatitis and

- Cancer, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2018, **506**(4), 962–969. doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.169.
- [89] Dickson I., Microbiome Promotes Pancreatic Cancer, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, **15**(6), 328. doi:10.1038/s41575-018-0013-x.
- [90] Geller L.T., Barzily-Rokni M., Danino T., et al., Potential Role of Intratumor Bacteria in Mediating Tumor Resistance to the Chemotherapeutic Drug Gemcitabine, *Science*, 2017, **357**(6356), 1156–1160. doi:10.1126/science.aah5043.
- [91] Takayama S., Takahashi H., Matsuo Y., Okada Y., Manabe T., Effects of Helicobacter Pylori Infection on Human Pancreatic Cancer Cell Line, *Hepato Gastroenterology*, 2007, **54**(80), 2387–2391.
- [92] Lynch H. T., Lanspa S. J., Fitzgibbons R. J. Jr, Smyrk T., Fitzsimmons M. L., McClellan J., Familial Pancreatic Cancer (Part 1): Genetic Pathology Review, *The Nebraska Medical Journal*, 1989, **74**(5), 109-112.
- [93] Hruban R. H., Canto M. I., Goggins M., Schulick R., Klein A. P., Update on Familial Pancreatic Cancer, *Adv Surg.*, 2010, **44**(1), 293–311.
- [94] Wood L. D., Hruban R. H., Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms, *Cancer J.*, 2012, **18**(6), 492–501.
- [95] Raimondi S., Maisonneuve P., Lowenfels A. B., Epidemiology of Pancreatic Cancer: An Overview, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, **6**(12), 699–708.
- [96] Del Chiaro M., Segersvard R., Lohr M., Verbeke C., Early Detection and Prevention of Pancreatic Cancer: Is it Really Possible Today? *World J Gastroenterol*, 2014, **20**(34), 12118–12131.
- [97] Chen F., Roberts N. J., Klein A. P., Inherited Pancreatic Cancer, *Chin Clin Oncol.*, 2017, **6**(6), 58. doi:10.21037/cco.2017.12.04.
- [98] Ferrone C. R., Levine D. A., Tang L. H., Allen P. J., Jarnagin W., Brennan M. F., Offit K., Robson M. E., BRCA Germline Mutations in Jewish Patients With Pancreatic Adenocarcinoma, *J Clin Oncol*, 2009, **27**, 433-8.
- [99] Seicean A., Seicean R., Risk Factors in Pancreatic Cancer, Editors: Srivastava S. K., *Pancreatic Cancer- Molecular Mechanism and Targets*, InTech, Croatia, 1-16, 2012.
- [100] Poruk K. E., Firpo M. A., Adler D. G., Mulvihill S. J., Screening for Pancreatic Cancer, *Ann Surg*, 2013, **257**, 17-26.
- [101] Latchford A., Greenhalf W., Vitone L. J., Neoptolemos J. P., Lancaster G. A., Phillips R. K., Peutz-Jeghers Syndrome and Screening For Pancreatic Cancer, *Br J Surg*, 2006, **93**, 1446.

- [102] Lowenfels A. B., Maisonneuve P., DiMagno E. P., Elitsur Y., Gates L. K. Jr, Perrault J., Whitcomb D. C., Hereditary Pancreatitis and The Risk Of Pancreatic Cancer, *J Natl Cancer Inst*, 1997, **89**(6), 442-446.
- [103] Lowery M., O'Reilly E., Dx/Rx: Pancreatic Cancer, Editor: Shah M. A., Jones & Bartlett Learning, USA, 2012
- [104] Kastrinos F., Syngal S., Inherited Colorectal Cancer Syndromes, *Cancer J*, 2011, 17, 405-415.
- [105] Solomon S., Das S., Brand R., Whitcomb D. C., Inherited Pancreatic Cancer Syndromes, *Cancer J*, 2012, 18, 485-91.
- [106] Lanfranca P. M., Thompson J. K., Bednar F., et al., Metabolism and Epigenetics of Pancreatic Cancer Stem Cells, *Semin Cancer Biol.*, 2019, 57, 19–26. doi:10.1016/j.semcancer.2018.09.008
- [107] Hansel D. E., Kern S. E., Hruban R. H., Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2003, 4, 237-56.
- [108] Ghaneh P., Costello E., Neoptolemos J. P., Biology and Management of Pancreatic Cancer. *Gut*, 2007, 56, 1134-1152.
- [109] Tada M., Ohashi M., Shiratori Y., Okudaira T., Komatsu Y., Kawabe T., Yoshida H., Machinami R., Kishi K., Omata M., Analysis of K-ras Gene Mutation in Hyperplastic Duct Cells of the Pancreas Without Pancreatic Disease, *Gastroenterology*, 1996, 110, 227–31.
- [110] Carnero A., Blanco-Aparicio C., Renner O., Link W., Leal J. F., The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications, *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8, 187-98.
- [111] Cheng J. Q., Ruggeri B., Klein W. M., Sonoda G., Altomare D. A., Watson D. K., Testa J. R., Amplification of AKT2 in Human Pancreatic Cells and Inhibition of AKT2 Expression and Tumorigenicity by Antisense RNA, *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93, 3636–41.
- [112] Rak J., Mitsuhashi Y., Bayko L., Filmus J., Shirasawa S., Sasazuki T., Kerbel R. S., 1995. Mutant Ras Oncogenes Upregulate VEGF/VPF Expression: Implications For Induction and Inhibition of Tumor Angiogenesis, *Cancer Res*, 1996, 55, 4575-80.
- [113] McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., Lehmann B., Terrian D. M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Roles of the Raf/MEK/ ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1773**(8), 1263–84.
- [114] Huang C., Jiang T., Zhu L., Liu J., Cao J., Huang K. J., Qiu Z. J., STAT3 Targeting RNA Interference Inhibits Pancreatic Cancer Angiogenesis in Vitro and in Vivo, *Int J Oncol*, 2011, 38, 1637.

- [115] Abramson M. A., Jazag A., van der Zee J. A., Whang E. E., The Molecular Biology of Pancreatic Cancer, *Gastrointest CancerRes*, 2007, 1, 7-12.
- [116] Korc M., Role of Growth Factors in Pancreatic Cancer, *Surg Oncol Clin N Am*, 1998, 7, 25-41.
- [117] Shi X., Friess H., Kleeff J., Ozawa F., Buchler M. W., Pancreatic Cancer: Factors Regulating Tumor Development, Maintenance and *Metastasis*. *Pancreatology*, 2001, 1, 517-24.
- [118] Hong S. M., Park J. Y., Hruban R. H., Goggins M., Molecular Signatures of Pancreatic Cancer, *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135, 716-27.
- [119] Cowan R. W., Maitra A., Genetic Progression of Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal*, 2014, **20**(1), 80-84.
- [120] Saiki Y., Horii A., Molecular Pathology of Pancreatic Cancer, *Pathol Int*, 2014, 64, 10-19.
- [121] Vogelstein B., Kinzler K. W., Cancer Genes and the Pathways They Control, *Nat Med*, 2004, 10, 789–99.
- [122] Güngör C., Hofmann B. T., Wolters-Eisfeld G., Bockhorn M., Pancreatic Cancer, *Br J Pharmacol*, 2014, 171, 849-58.
- [123] Schutte M., Hruban R. H., Hedrick L., Cho K. R., Nadasdy G. M., Weinstein C. L., Bova G. S., Isaacs W. B., Cairns P., Nawroz H., Sidransky D., Casero R. A. Jr, Meltzer P. S., Hahn S. A., Kern S. E., DPC4 Gene in Various Tumor Types, *Cancer Res*, 1996, 56, 2527–2530.
- [124] Sakorafas G. H., Smyrniotis V., Molecular Biology of Pancreatic Cancer: How Useful is it in Clinical Practice? *Journal of the Pancreas*, 2012, **13**(4), 332-337.
- [125] Ueki T., Walter K. M., Skinner H., Jaffee E., Hruban R. H., Goggins M., Aberrant CpG Island Methylation in Cancer Cell Lines Arises in the Primary Cancers From Which They Were Derived, *Oncogene*, 2002, 21, 211-47.
- [126] Luo Z., Li Y., Wang H., Fleming J., Li M., Kang Y., ... & Li, D., Hepatocyte Nuclear Factor 1A (HNF1A) as a Possible Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer, *PLoS one*, 2015, **10**(3), e0121082.
- [127] Yang Y., Zhou T.C., Liu Y.Y., Li X., Wang W.X., Irwin D. M., Zhang, Y.P., Identification of HNF4A Mutation p.T130I and HNF1A Mutations p.I27L and p.S487N in a Han Chinese Family with Early-Onset Maternally Inherited Type 2 Diabetes, *J. Diabetes Res.*, 2016.
- [128] Morita K., Saruwatari J., Tanaka T., Oniki K., Kajiwara A., Otake K., Ogata Y., Nakagawa K., Associations Between the Common HNF1A Gene Variant p.I27L (rs1169288) and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus are Influenced by Weight, *Diabetes Metab.*, 2015, 41, 91–94.

- [129] Cereghini S., Ott M. O., Power S., Maury M., Expression Patterns of vHNF1 and HNF1 Homeoproteins in Early Postimplantation Embryos Suggest Distinct and Sequential Developmental Roles, *Development*, 1992, 116, 783–797.
- [130] Ley S. H., Hegele R. A., Connelly P. W., Harris S. B., Mamakeesick M., Cao H., et al., Assessing the Association of the HNF1A G319S Variant With C-Reactive Protein in Aboriginal Canadians: A Population-Based Epidemiological Study, *Cardiovasc Diabetol*, 2010, 9(1), 39. doi: 10.1186/1475-2840-9-39.
- [131] Kleber M. E., Grammer T. B., Renner W., Marz W., Effect of the rs2259816 Polymorphism in the HNF1A Gene on Circulating Levels of C-reactive Protein and Coronary Artery Disease (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study), *BMC Med Genet.*, 2010, 11, 157. doi: 10.1186/1471-2350-11-157.
- [132] Lauc G., Essafi A., Huffman J. E., Hayward C., Knezevic A., Kattla J. J., et al., Genomics Meets Glycomics-the First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1alpha as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation, *PLoS Genet.*, 2010, 6, e1001256. doi: 10.1371/journal.pgen.1001256.
- [133] Harries L. W., Brown J. E., Gloyn A. L., Species-Specific Differences in the Expression of the HNF1A, HNF1B and HNF4A Genes, *PLoS ONE*, 2009, 4, e7855. doi: 10.1371/journal.pone.0007855.
- [134] Hu Y., Wu F., Liu Y., Zhao Q., Tang H., DNMT1 Recruited by EZH2-Mediated Silencing of miR-484 Contributes to the Malignancy of Cervical Cancer Cells Through MMP14 and HNF1A, *Clinical Epigenetics*, 2019, 11(1). doi:10.1186/s13148-019-0786-y.
- [135] Subramani R., Medel J., Flores K., Perry C., Galvez A., Sandoval M., Lakshmanaswamy R., Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha Influences Pancreatic Cancer Growth and Metastasis, *Scientific Reports*, 2020, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-77287-5.
- [136] Abel E. V., Goto M., Magnuson B., Abraham S., Ramanathan N., Hotaling E., . . . Simeone D. M., HNF1A is a Novel Oncogene That Regulates Human Pancreatic Cancer Stem Cell Properties, *ELife*, 2018, 7. doi:10.7554/elife.33947.
- [137] Evans D. B., Abbruzzese J. L., Rich T. R., Cancer of the Pancreas, Editors: DeVita V. T., Hellman S., Rosenberg S. A., *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 5th ed., Lippincott Raven, Philadelphia, 1054–87, 1997.
- [138] Hijioka S., Yamao K., Clinical, Laboratory, and Radiologic Presentation of Pancreatic Cancer, Editors: Beger H. G., Nakao A., Neoptolemos J. P., Peng S. Y., Sarr M. G., *Pancreatic Cancer, Cystic Neoplasms, and Endocrine Tumors: Diagnosis and Management*, 1th ed., John Wiley & Sons, 23, 2015.
- [139] Perek, S., Pankreas Kanseri, *İ.Ü. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinleri*, 2002, 28, 215.

- [140] Seufferlein T., Bachet J. B., Van Cutsem E., Rougier P., Pancreatic Adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up, *Ann Oncol*, 2012, 7, vii33-40.
- [141] Lin A., Pancreatic Carcinoma as a Cause of Unexplained Pancreatitis: Report of Ten Cases, *Ann Intern Med*, 1990, 113, 166–167.
- [142] Menteş N. K., *Klinik Gastroenteroloji*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir, 1976.
- [143] Pai M., Spalding D., Pancreatic Cancer, *Medicine*, 2015, 43, 329-33.
- [144] Göral V., Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı. *Güncel Gastroenteroloji*, 2014.
- [145] DiMagno E. P., Reber H. A., Tempero M. A., AGA Technical Review on the Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *American Gastroenterological Association*, 1999, 117, 1464–84.
- [146] Tewari N., Lobo D. N., Pancreatic Cancer, *Surgery*, 2013, 31, 286-94.
- [147] DiMagno E. P., Reber H. A., Tempero M. A., AGA Technical Review on the Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *American Gastroenterological Association*, 1999, 117, 1464–84.
- [148] Dabizzi E., Assef M. S., Raimondo M., Diagnostic Management of Pancreatic Cancer, *Cancers*, 2011, 3, 494-509.
- [149] <https://www.asiancancer.com/cancer-staging/pancreatic-cancer-staging/> (Ziyaret tarihi: 15.04.2021)
- [150] Alexakis N., Halloran C., Raraty M., Ghaneh P., Sutton R., Neoptolemos J. P., Current Standards of Surgery for Pancreatic Cancer, *Br J Surg*, 2009, 91, 1410–27.
- [151] Arvold N. D., Ryan D. P., Niemierko A., Blaszkowsky L. S., Kwak E. L., Wo J. Y., Allen J. N., Clark J. W., Wadlow R. C., Zhu A. X., Fernandez-Del Castillo C., Hong T. S., Long- Term Outcomes of Neoadjuvant Chemotherapy Before Chemoradiation For Locally Advanced Pancreatic Cancer, *Cancer*, 2012, 118, 3026.
- [152] Husain K., Pancreatic Cancer Treatment, *J Drug Metab Toxicol*, 2014, 5.
- [153] Mahalingam D., Kelly K. R., Swords R. T., Carew J., Nawrocki S. T., Giles F. J., Emerging drugs in the treatment of pancreatic cancer, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2009, 14(2), 311-28
- [154] Kindler H. L., Pancreatic Cancer: An Update, *Curr Oncol Rep*, 9, 170-176.

- [155] Silva B. M., Andrade P. B., Valentão P., Ferreres F., Seabra R. M., Ferreira M. A., Quince (Cydonia Oblonga Miller) Seed (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity, *J Agr Food Chem*, 2004, 52, 4405–4712.
- [156] Giada M. L., Filho J. M., The Importance of Dietary Phenolic Compounds in the Promotion of Human Health. *Biol Health Sci*, 2006, 12, 7–15.
- [157] Loussouarn M., et al., Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms, *Plant Physiology*, 2017, **175**(3), 1381–1394. doi: 10.1104/pp.17.01183.
- [158] Niloofar K., et al., Pharmacological Effects of Gallic Acid in Health and Diseases: A Mechanistic Review. *Iran J Basic Med Sci.*, 2019, **22**(3), 225–237. doi: 10.22038/ijbms.2019.32806.7897.
- [159] Hossain M. B., Rai D. K., Brunton N. P., Martin-Diana A. B., Barry-Ryan C., Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS, *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 10576–10581
- [160] Birtić S., Dussort P., Pierre F., Bily A. C., Roller, M., Carnosic Acid, *Phytochemistry*, 2015, 115, 9-19. doi:10.1016/j.phytochem.2014.12.026.
- [161] Barni M., Carlini M., Cafferata E., Puricelli L., Moreno S., Carnosic Acid Inhibits the Proliferation and Migration Capacity of Human Colorectal Cancer Cells. *Oncology Reports*, 2012, **27**(4), 1041-1048.
- [162] Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., Antioxidant Activities of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extract, Blackseed (*Nigella Sativa* L.) Essential Oil, Carnosic Acid, Rosmarinic Acid and Sesamol, *Food Chem*, 2008, 110, 76–82.
- [163] Li Q., Liu L., Sun H., Cao K., Carnosic Acid Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury In Mice, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019. doi:10.3892/etm.2019.8042
- [164] Kim D., Park K., Chae I. G., Kundu J., Kim E., Kundu J. K., Chun K., Carnosic Acid Inhibits STAT3 Signaling and Induces Apoptosis Through Generation of ROS in Human Colon Cancer HCT116 Cells, *Molecular Carcinogenesis*, 2015, **55**(6), 1096- 1110. doi:10.1002/mc.22353.
- [165] Pesakhov S., Nachliely M., Barvish Z., Aqaq N., Schwartzman B., Voronov E., Danilenko M., Cancer-Selective Cytotoxic ca² Overload in Acute Myeloid Leukemia Cells and Attenuation of Disease Progression in Mice By Synergistically Acting Polyphenols Curcumin and Carnosic Acid, *Oncotarget*, 2016, 7(22), 31847-31861.
- [166] Maynard M. E., Underwood E. L., Redell J. B., Zhao J., Kobori N., Hood K. N., Dash P. K., Carnosic Acid Improves Outcome After Repetitive MildTraumatic Brain Injury, *Journal of Neurotrauma*, 2019, **36**(13), 2147-2152.

- [167] Pengelly A., *The Constituents of Medicinal Plants: An Introduction to the Chemistry and Therapeutics of Herbal Medicine*, 2nd ed., CABI, 2004.
- [168] Goyal R., Patel S., Cardioprotective Effects of Gallic Acid in Diabetes-Induced Myocardial Dysfunction in Rats, *Pharmacognosy Research*, 2011, **3**(4), 239. doi:10.4103/0974-8490.89743.
- [169] Liao C., Chen S., Huang H., Wang C., Gallic Acid Inhibits Bladder Cancer Cell Proliferation and Migration Via Regulating Fatty Acid Synthase (FAS), *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, **26**(2), 620-627. doi:10.1016/j.jfda.2017.06.006.
- [170] Siah M., Farzaei M., Ashrafi-Kooshk M., Adibi H., Arab S., Rashidi M., Khodarahmi R., Inhibition of Guinea Pig Aldehyde Oxidase Activity By Different Flavonoid Compounds: An in Vitro Study, *Bioorg Chem.*, 2016, **64**, 74–84.
- [171] Choubey S., Varughese L., Kumar V., Beniwal V., Medicinal Importance of Gallic Acid and its Ester Derivatives: A Patent Review, *Pharm Pat Anal.*, 2015, **4**, 305–315.
- [172] Liu Z., Li D., Yu L., Niu F., Gallic Acid as a Cancer-Selective Agent Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells, *Chemotherapy*, 2012, **58**(3), 185-194.
- [173] You B. R., Park W. H., Kim S. H., Verma S., Singh A., Mishra A., Gallic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia Cell Line (C121), *Iranian Journal of Medical Sciences*, 2016, **41**(6), 525-530
- [174] Moghtaderi H., Sepehri H., Delphi L., Attari F., Gallic Acid and Curcumin Induce Cytotoxicity and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231. *BioImpacts*, 2018, **8**(3), 185-194. doi:10.15171/bi.2018.21.
- [175] Hua J., Qiu P., Zhu H., ve diğ., Multipotent Mesenchymal Stem Cells (Mscs) From Human Umbilical Cord: Potential Differentiation of Germ Cells, *African Journal of Biochemistry Research*, 2011, **5**(4), 113-123.
- [176] Can A., *Kök Hücre*, Akademisyen Kitabevi, 2013.
- [177] Takahashi K., Yamanaka S., Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, 2006, **126**(4), 663-676.
- [178] Kang S. G., Jeun S. S., Lim J. Y., Kim S. M., Yang Y. S., Oh W. I., ... & Park C. K., Cytotoxicity of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Against Human Malignant Glioma Cells. *Child's Nervous System*, 2008, **24**(3), 293-302.
- [179] Friedenstein A. J., Piatetzky I., Petrakova K. V., Osteogenesis in Transplants Of Bone Marrow Cells, *Embryol. Exp. Morph.*, 1966, **16**(3), 581-390.

- [180] Caplan A. I., Mesenchymal Stem Cell, *Journal of Orthopedic Research*, 1991, 9, 641-650.
- [181] Huang J. I., Kazmi N., Durbhakula M. M., ve diğ., Chondrogenic Potential of Progenitor Cells Derived From Human Bone Marrow and Adipose Tissue: A Patient-Matched Comparison, *J Orthop Res.*, 2005, **23**(6), 1383-9.
- [182] Schäffler A., Buchler C., Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies, *Alpha Med Press*, 2007, 1066-5099.
- [183] Tian L. L., Yue W., Zhu F., Li S., Li W., Human Mesenchymal Stem Cells Play a Dual Role on Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo, *J Cell Physiol.*, 2011, **226**(7), 18607.
- [184] Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F., Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Response of Naive and Memory Antigen-Specific T Cells to Their Cognate Peptide, *Blood*, 2003, **101**, 3722– 3729.
- [185] Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanesi M., Longoni P. D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A. M., Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T- Lymphocyte Proliferation Induced By Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli, *Blood*, 2002, **99**, 3838– 3843.
- [186] Tse W. T., Pendleton J. D., Beyer W. M., Egalka M. C., Guinan E. C., Suppression of Allogeneic T-cell Proliferation by Human Marrow Stromal Cells: Implications in Transplantation, *Transplantation*, 2003, **75**, 389– 397.
- [187] Ramdasi S., Sarang S., Viswanathan C., Potential of Mesenchymal Stem Cell Based Application in Cancer, *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.*, 2015, **9**(2), 95-103.
- [188] Dai L. J., Moniri M. R., Zeng Z. R., ve diğ., Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy, *Cancer Lett*, 2011, **305**(1), 8-20.
- [189] Qiao L., Zhao T. J., Wang F. Z., ve diğ., NF-kappaB Downregulation May Be Involved the Depression of Tumor Cell Proliferation Mediated by Human Mesenchymal Stem Cells, *Acta Pharmacol Sin.*, 2008, **29**(3), 333-340.
- [190] Shah B. M., Hajjar E. R., Polypharmacy, Adverse Drug Reactions, and Geriatric Syndromes. *Clinics in Geriatric Medicine*, 2012, **28**(2), 173-186.
- [191] Moghtaderi H., Sepehri H., Delphi L., Attari F., Gallic Acid and Curcumin Induce Cytotoxicity and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231. *BioImpacts*, 2018, **8**(3), 185-194.
- [192] López-Jiménez A., García-Caballero M., Medina M. Á., Quesada A. R., Anti-angiogenic Properties of Carnosol and Carnosic Acid, Two Major Dietary Compounds From Rosemary, *European Journal of Nutrition*, 2011, **52**(1), 85.

- [193] Kaur M., Deep G., Jain A. K., Raina K., Agarwal C., Wempe M. F., Agarwal R., Bitter Melon Juice Activates Cellular Energy Sensor AMP-Activated Protein Kinase Causing Apoptotic Death of Human Pancreatic Carcinoma Cells, *Carcinogenesis*, 2013, 34, 1585-92.
- [194] Boreddy S. R., Srivastava S. K., Pancreatic Cancer Chemoprevention by Phytochemicals. *Cancer Letters*, 2013, 86–94.
- [195] Schneider G., Siveke J. T., Eckel F., Schmid R. M., Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects, *Gastroenterology*, 2005, 128, 1606–25.
- [196] Von Hoff D. D., et al., Gemcitabine Plus Nab-Paclitaxel is an Active Regimen in Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Phase I/II trial, *J Clin Oncol*, 2011, 29, 4548–4554.
- [197] Alshatwi A. A., Hasan T. N., Shafi G., Syed N. A., Al-Assaf A. H., Alamri M. S., Al Khalifa A. S., Validation of the Antiproliferative Effects of Organic Extracts From The Green Husk of Juglans Regia L. On PC-3 Human Prostate Cancer Cells By Assessment of Apoptosis-Related Genes. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 103026.
- [198] Amin A. R., Kucuk O., Khuri F. R., Shin D. M., Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *J Clin Oncol*, 2009, 27, 2712-25.
- [199] Roginsky A. B., Ujiki M. B., Ding X. Z., Adrian T. E., On the Potential Use of Flavonoids in the Treatment and Prevention of Pancreatic Cancer. *Vivo*, 2005, 219, 61-67.
- [200] Zhang J., Jin X., Zhou C., Zhao H., He P., Hao Y., Dong Q., Resveratrol Suppresses Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Growth Via Inhibiting Differentiation Antagonizing Non-Protein Coding RNA (DANCR) Expression, *Medical Science Monitor*, 2020, 26.
- [201] Heldring N., Mäger I., Wood M., ve diğ., Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles, *Human Gene Therapy*, 2015, 26(8), 506-517.
- [202] Bahri S., Mies F., Ali R. B., Mlika M., Jameleddine S., Entee K. M., Shlyonsky V., Rosmarinic Acid Potentiates Carnosic Acid Induced Apoptosis in Lung Fibroblasts, *Plos One*, 2017, 12(9).
- [203] Liu Z., Li D., Yu L., Niu F., Gallic Acid as a Cancer-Selective Agent Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells, *Chemotherapy*, 2012, 58(3), 185-194.
- [204] Jing Z., Li M., Wang H., Yang Z., Zhou S., Ma J., . . . Fu X., Gallic Acid- Gold Nanoparticles Enhance Radiation-Induced Cell Death of Human Glioma U251 Cells. *IUBMB Life*, 2020, 73(2), 398-407.
- [205] Pesakhov S., Khanin M., Studzinski G. P., Danilenko M., Distinct Combinatorial Effects of the Plant Polyphenols Curcumin, Carnosic Acid, and

Silibinin on Proliferation and Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells, *Nutrition and Cancer*, 2010, **62**(6), 811-824.

- [206] Kim D., Park K., Chae I. G., Kundu J., Kim E., Kundu J. K., Chun K., Carnosic Acid Inhibits STAT3 Signaling and Induces Apoptosis Through Generation of ROS in Human Colon Cancer HCT116 Cells, *Molecular Carcinogenesis*, 2015, **55**(6).
- [207] D'Alesio C., Bellese G., Gagliani M. C., Aiello C., Grasselli E., Marcocci G., . Castagnola P., Cooperative Antitumor Activities of Carnosic Acid and Trastuzumab in ERBB2 Breast Cancer Cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36(1).
- [208] Zhao L., Zhang J., Fan Y., Li Y., Antiproliferative Activity of Carnosic Acid is Mediated via Inhibition of Cell Migration and Invasion, and Suppression of Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K)/AKT/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Pathway, *Medical Science Monitor*, 2019, 25, 7864-7871.
- [209] Rhee K. J., Lee J. I., Eom Y. W., Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression, *Int J Mol Sci.*, 2015, **16**(12), 30015–30033.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] Polat F., Durgun A. M., Olacam A., İnci G. S., Doğan M. B., **Uzun E. D.**, Işık E., Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Yerleşkesi'nde Yayılış Gösteren Kertenkelelerin Moleküler Düzeyde Tür Tayini, *Koc. Üni. Fen Bil. Der.*, 2019, 2(1), 01-06.
- [2] **Uzun E. D.**, Gacar G., Yusufoglu S., Immunotherapeutic CAR T-Cell Engineering, *J Immunol Clin Microbiol.*, 2019, 4(2), 34-51.
- [3] Gacar G., **Ünal E. D.**, Yusufoglu S., *Cancer: A Comprehensive Review*, Akademisyen Kitabevi , Ankara, 2020.

ÖZGEÇMİŞ

4 çocuklu ailenin en büyük çocuğudur. Lise öğrenimini Özel Çırağan Lisesi'nde tamamladı. 2012 yılında girdiği İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldu. Bir yıl sonra Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitiminde Karnosik Asit ve Gallik Asitin PANC-1 Pankreas hücrelerinde HNF1A geni üzerine sitotoksik etkileri üzerine çalışmaları bulunmaktadır.

