



**CFPAC-1 (ZEB1+) VE MIAPaCa-2 (ZEB1-) PANKREATİK KANSER
HÜCRE HATLARINDA VİTEKSİN'İN ANTI-METASTATİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEVSER YAŞAR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MERSİN
HAZİRAN- 2024**

**CFPAC-1 (ZEB1+) VE MIAPaCa-2 (ZEB1-) PANKREATİK KANSER
HÜCRE HATLARINDA VİTEKSİN'İN ANTI-METASTATİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEVSER YAŞAR

ORCID ID: 0000-0002-7460-9615

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN

PROF. DR. AHMET ATA ÖZÇİMEN

ORCID ID: 0000-0002-8871-8943

**MERSİN
HAZİRAN- 2024**

ÖZET

CFPAC-1 (ZEB1+) VE MIAPaCa-2 (ZEB1-) PANKREATİK KANSER HÜCRE HATLARINDA VİTEKSİN'İN ANTI-METASTATİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gastrointestinal sistemin ölümcül kanserlerinden biri olan pankreatik duktal adenokarsinom hızlı yayılım, geç teşhis ve sınırlı tedavi olanaklarından dolayı önemli bir kanser türüdür. Tedavi stratejilerine yönelik çalışmalar artmıştır. Bir doğal flavonoid olan ve bitkilerin yeşil kısımlarında bulunan viteksin maddesinin anti-tümöral özellikleri *in-vitro* kanser çalışmalarında yerini almıştır. Bu çalışmada, viteksin uygulanan CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hatlarında sitotoksik, apoptotik, migratif ve metastatik etkiler üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, proliferatif etkiyi gözlemlene açısından yapılan MTT deneyinde CFPAC-1 için IC_{50} ; 312 μ M, $IC_{50/2}$; 156 μ M, MIAPaCa-2 için IC_{50} ; 500 μ M, $IC_{50/2}$; 250 μ M bulunmuştur. Apoptotik etkiyi gözlemlene açısından yapılan DNA fragmentasyon deneyinde belirgin bir genomik DNA hasarı her iki hücre hattında da gözlenmemiştir. Anti-migratif/metastatik ve apoptotik etki incelenmesi açısından metastatik Zeb-1, apoptotik Kaspaz-3, -8, -9 gen ifadelerinin analizi Real Time PCR metoduyla B-Actin (ACTB) internal geni primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Viteksin IC_{50} uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz-3'te 0,4 kat artış gözlenirken, MIAPaCa-2 hücrelerinde kaspaz-3'te 16 kat artış ($P<0.05$), kaspaz-9 da 4 kat artış gözlenmiştir. Zeb-1 açısından incelendiğinde, CFPAC-1 hücre hattında 0,5 kat azalma ($P<0.01$), MIAPaCa-2 hücre hattında da 11 kat artış gözlemlenmiştir. Viteksin $IC_{50/2}$ uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz-3'te 0,8 kat azalış ($P<0.05$) gözlenirken, MIAPaCa-2 hücrelerinde kaspaz-3'te 3 kat artış ($P<0.01$), kaspaz-9 da 1 kat artış gözlenmiştir. Zeb-1 açısından incelendiğinde, CFPAC-1 hücre hattında 0,9 kat azalma, MIAPaCa-2 hücre hattında da 32 kat artış gözlenmiştir. Kaspaz-8 ifadesi her iki hücre hattında da azalmıştır. MIAPaCa-2 hücre hattında apoptozun iç yolaktan gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Anti-migratif/metastatik etkiyi gözlemlene açısından yapılan Wound-healing deneyinde CFPAC-1 hücre hattında yara kapanma oranının %16, MIAPaCa-2 hücre hattında yara kapanma oranının yüzde %100 olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, viteksinin MIAPaCa-2'de apoptotik, CFPAC-1 hücre hattında anti-migratif ve anti-metastatik etkinliğinin olabileceği görülmektedir.

Anahtar kelimeler; CFPAC-1, MIAPaCa-2, Viteksin, Metastaz, Apoptoz

Danışman: Prof.Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTI-METASTATIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF VITEXIN ON CFPAC-1 (ZEB1+) AND MIAPaCa-2 (ZEB1-) PANCREATIC CANCER CELL LINES

Pancreatic ductal adenocarcinoma, one of the deadly cancers of the gastrointestinal tract and is an important cancer type due to its rapid spread, late diagnosis and limited treatment options. Studies on treatment strategies have increased. The anti-tumoral properties of vitexin, a natural flavonoid found in the green parts of plants, have taken place in *in-vitro* cancer studies. In this study, cytotoxic, apoptotic, migratory and metastatic effects were studied in vitexin treated CFPAC-1 and MIAPaCa-2 cell lines. In this study, to observe the proliferative effect the MTT assay was performed onto two cell lines. The result of cytotoxicity were IC_{50} ; 312 μ M, $IC_{50/2}$; 156 μ M for CFPAC-1 and IC_{50} ; 500 μ M, $IC_{50/2}$; 250 μ M for MIAPaCa-2. To demonstrate the apoptotic fragmentation effect, DNA fragmentation assay was performed and no significant fragmented DNA bands was observed in both cell lines. In terms of anti-migratory/metastatic and apoptotic effects, analysis of metastatic Zeb-1 and apoptotic Caspase-3, -8, -9 gene expressions was performed by Real Time PCR method using B-Actin (ACTB) internal gene primer. While a 0.4 fold increase in caspase-3 was observed in CFPAC-1 cells treated with vitexin IC_{50} , a 16 fold increase in caspase-3 ($P<0.05$) and a 4 fold increase in caspase-9 was observed in MIAPaCa-2 cells. In terms of Zeb-1, a 0.5 fold decrease in CFPAC-1 cell line ($P<0.01$) and a 11 fold increase in MIAPaCa-2 cell line were observed. While a 0.8 fold decrease in caspase-3 ($P<0.05$) was observed in CFPAC-1 cells treated with vitexin $IC_{50/2}$, a 3 fold increase in caspase-3 ($P<0.01$) and a 1 fold increase in caspase-9 was observed in MIAPaCa-2 cells. In terms of Zeb-1, a 0.9 fold decrease was observed in CFPAC-1 cell line and a 32 fold increase was observed in MIAPaCa-2 cell line. Caspase-8 expression was decreased in both cell lines. It is thought that apoptosis in MIAPaCa-2 cell line may occur through the internal pathway. In the Wound-healing experiment conducted to observe the anti-migratory/metastatic effect, it was observed that the wound closure rate was 16% in the CFPAC-1 cell line and 100% in the MIAPaCa-2 cell line. As conclusion of the result, vitexin might have been an apoptotic activity in MIAPaCa-2 and anti-migratory/metastatic activity in CFPAC-1 cell line.

Keywords; CFPAC-1, MIAPaCa-2, Vitexin, Metastasis, Apoptosis

Advisor: Prof.Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Department of Biology, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana rehberlik eden sayın danışman hocam Prof.Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e ve tüm ekibe, hücre kültür bilgileriyle bana katkı sağlayan sayın hocam Arş. Gör. Dr. Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ'a, akademik hayatımın başlangıcından beri bana deneyimleriyle ışık tutan ve ufkumu genişleten sayın Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a, tez sürecimde yardımlarını esirgemeyen sayın Doç.Dr. Didem DERİCİ YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimi yürüttüğüm Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı'na şükranlarımı sunarım.

Küçük yaştan beri maddi manevi desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen biricik annem Niğdim YAŞAR, biricik babam Galip YAŞAR'a, varlıklarından dolayı ablalarım Yasemin KILIÇ, Elif ŞANLI, abim Kadir YAŞAR ve erkek kardeşim Hasan Muhammed YAŞAR'a, canım yeğenlerim sevgili Ömer Asaf, Erkin Bartu, Mert, Pera'ma, eğitim sürecimde benden inancını hiç kaybetmeyen ve her koşulda beni destekleyen sevgili Hülya FIRINCIGİL'e ve her ne ile karşılaşırsa karşılaşsın inandığı yolda ilerlemekten vazgeçmeyen ve elinden geleni yapmaya çalışan sevgili kendime en içten şükranlarımı sunarım.

Anti-kanser çalışma olmayı hedefleyen bu tez çalışmasını, halihazırda kanserle mücadele eden biricik babama ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAP) tarafından 2022-2-TP2-4735 numaralı proje ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1002B Acil Destek, 123Z849 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii,viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x, xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.2. Pankreatik Kanser	4
2.3. Pankreatik Kanser Hücre Hatları	6
2.3.1. CFPAC-1 Hücre Hattı	6
2.3.2. MIAPaCa-2 Hücre Hattı	6
2.4. Migrasyon ve Metastaz	7
2.5. Metastazda EMT ve ZEB Ailesi	8
2.5.1. EMT (epitelden mezenkimale geçiş) Mekanizması	8
2.5.2. EMT ve ZEB ilişkisi	10
2.6. Apoptoz, Nekroz ve Kaspazlar	12
2.7. Viteksin (Apigenin 8-C-Glikozit)	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyaller	17
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	17
3.1.2. Kullanılan Hücreler	17
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	17
3.2. Yöntemler	18
3.2.1. Hücre Kültürü	18
3.2.2. Deney grupları	18
3.2.3. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi ile sitotoksisite gözlemi ve IC ₅₀ doz tayini	18
3.2.4. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde Apoptoz ve Metastaz Yolağı ile ilişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	19
3.2.5. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde metastazın Wound-healing ile analizi	22
3.2.6. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde Apoptozun jel elektroforez yöntemiyle analizi	22
3.3. İstatistik	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	25
4.1. Bulgular	25
4.1.1. MTT ile IC ₅₀ Dozu Belirleme	25
4.1.1.1. Proliferasyonun 48. saat deney sonucu	25
4.1.1.2. Proliferasyonun 72. saat deney sonucu	26
4.1.2. Wound-Healing Yöntemi ile CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 Hücre Hatlarında Migrasyon Tayini	28
4.1.2.1. CFPAC-1 hücre hattı üzerinde Wound-Healing deneyi	28
4.1.2.2. MIAPaCa-2 hücre hattı üzerinde Wound-Healing deneyi	31
4.1.3. DNA jel elektroforez ile apoptoz tayini	37
4.1.4. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde Apoptoz ve Metastaz Yolağı ile ilişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	39

	Sayfa
4.1.4.1. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 Hücre Hatlarında Metastaz ile ilgili Genlerin İfade Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	40
4.1.4.2. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 Hücre Hatlarında Apoptoz ile ilgili Genlerin İfade Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	41
4.2. Tartışma	43
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	60



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. RT-PCR aşamasında kullanılan primer dizileri.	22
Tablo 4.1. MTT testinde doz ve zamana bağlı olarak elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi.	27
Tablo 4.2. MTT testinde doz ve zamana bağlı olarak elde edilen verilerin özetlenmesi.	28
Tablo 4.3. CFPAC-1 VE MIAPaCa-2 hücre hatlarına ait RNA'ların Nanodrop ölçüm sonuçları ve cDNA sentezi için gerekli nükleik asit miktarları.	39
Tablo 4.4. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve ZEB-1 genleri ifadesi ve verilerinin istatistiksel analiz sonuçları	40
Tablo 4.5. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve Kaspaz-3 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları	41
Tablo 4.6. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve Kaspaz-8 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları	41
Tablo 4.7. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve Kaspaz-9 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin 8 özelliği	3
Şekil 2.2. İnsan pankreasının anahtar anatomik özellikleri	4
Şekil 2.3. CFPAC-1 hücre hattı ışık mikroskop görüntüsü, 4X büyütme.	6
Şekil 2.4. MIAPaCa- 2 hücre hattı ışık mikroskop görüntüsü. 4X büyütme	7
Şekil 2.5. EMT boyunca epitelyal ve mezenkimal tip arasındaki değişimler	10
Şekil 2.6. ZEB-1 geninin hücre plastitesisi, EMT ve terapi dayanıklılığındaki pleyiotropik etkisi	11
Şekil 2.7. ZEB-1 proteinin şematik gösterimi.	12
Şekil 2.8. Apoptoz yolları.	14
Şekil 2.9. Viteksin'in moleküler yapısı.	16
Şekil 4.1. Doz ve zamana bağlı olarak 48. saat CFPAC-1 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.	25
Şekil 4.2. Doz ve zamana bağlı olarak 48. saat MIAPaCa-2 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.	25
Şekil 4.3. Doz ve zamana bağlı olarak 72. saat CFPAC-1 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.	26
Şekil 4.4. Doz ve zamana bağlı olarak 72. saat MIAPaCa-2 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.	27
Şekil 4.5.a. CFPAC-1 hücre hattı 0. saat Kontrol grubu, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	29
Şekil 4.5.b. CFPAC-1 IC ₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 24. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	29
Şekil 4.5.c. CFPAC-1 IC _{50/2} doz uygulaması yapılmış grup, 24.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	29
Şekil 4.5.d. CFPAC-1 IC ₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	30
Şekil 4.5.e. CFPAC-1 IC _{50/2} doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	30
Şekil 4.5.f. CFPAC-1 IC ₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	30
Şekil 4.5.g. CFPAC-1 IC _{50/2} doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	31
Şekil 4.6.a. MIAPaCa-2 Kontrol grubu, 0. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	31
Şekil 4.6.b. MIAPaCa-2 IC ₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 24. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	32
Şekil 4.6.c. MIAPaCa-2 IC _{50/2} doz uygulaması yapılmış grup, 24. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	32
Şekil 4.6.d. MIAPaCa-2 IC ₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	33
Şekil 4.6.e. MIAPaCa-2 IC _{50/2} doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	33
Şekil 4.6.f. MIAPaCa-2 IC ₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	33
Şekil 4.6.g. MIAPaCa-2 IC _{50/2} doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.	34
Şekil 4.7. CFPAC-1 IC ₅₀ gruplarında zamana bağlı olarak yara kapanma mesafesi.	34
Şekil 4.8. CFPAC-1 IC _{50/2} gruplarında zamana bağlı olarak yara kapanma mesafesi.	35
Şekil 4.9. MIAPaCa- 2 IC ₅₀ gruplarında zamana bağlı yara kapanma mesafesi.	35
Şekil 4.10. MIAPaCa- 2 IC _{50/2} gruplarında zamana bağlı yara kapanma mesafesi.	35
Şekil 4.11. CFPAC-1 IC ₅₀ ve IC _{50/2} gruplarında doz ve zamana bağlı yara kapanma oranları.	36
Şekil 4.12. MIAPaCa-2 IC ₅₀ ve IC _{50/2} gruplarında doz ve zamana bağlı yara kapanma oranları.	36
Şekil 4.13. Viteksin maddesi ile 48 saat uygulama yapılmış hücre morfolojileri görüntüleri.	37

	Sayfa
Şekil 4.14. CFPAC-1 hücre hattına ait doz ve zamana bağlı jel elektroforez görüntüsü, Ladder; 1 kb.	38
Şekil 4.15. MIAPaCa-2 hücre hattına ait doz ve zamana bağlı jel elektroforez görüntüsü, Ladder; 1 kb.	38
Şekil 4.16. Genlere ait erime pikleri.	39
Şekil 4.17. Genlere ait amplifikasyon eğrileri.	40



SİMGELELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simge	Tanım
DNA	Deoksiribo nükleik asit
KRAS	Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog, Proto-oncogene from Kirsten rat sarcoma virus
CDKN2A	Siklin bağımlı inhibitör 2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4, mothers against decapentaplegic homologue 4
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
EMT	Epithelial to mesenchymal transitions, Epitelyalden mezenkimale geçiş
CFPAC-1	Kistik fibrozis duktal pankreatik adenokarsinoma
MIAPaCa-2	Human pancreatic carcinoma
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox-1
PDAC	Pankreatik duktal adenokarsinoma
TP53	Tümör baskılayıcı protein 53
TGF- β	Transforme edici büyüme faktör-beta
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
RB1	Retinoblastoma
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
ROS	Reaktif oksijen türleri
BCL-2	B-cell lymphoma-2
CAD	Kaspazla aktive edilen DNAaz
PARP	Poli ((ADP-riboz)) polimeraz
DISC	Death inducing signalling complex-ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
RNA	Ribonükleik Asit
KASPAS (CASPASES)	Cysteine-containing aspartic acid-specific proteases
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration

1. GİRİŞ

Kanser dünyada birçok insanın muzdarip olduğu ve süreçte onkogenlerin aktive, tümör baskılayıcıların inaktive olduğu hücrenin genetik bir hastalığıdır (Katti vd., 2022). Pankreatik kanser çoğunlukla duktal adenokarsinom olarak karakterize edilmekle birlikte, Türkiyede en sık görülen kanserler listesinde 9. sıradadır ve ölüm oranı yüksektir. Ülkemizde gelecek yirmi yılda vaka sayılarında iki kat artış beklenmektedir (World Health Organization Globocan, 2023). İlaç dirençliliği, yüksek metastas yeteneği, zayıf erken teşhis ve nüksetme özellikleriyle bu kanser tipinde maligniteye ve zorluklara sebep olur (Tang ve Chen, 2014). Kuzey Amerika'da her iki cinsiyette, Batı Avrupa'da erkeklerde ölüm oranı açısından 3. sıradadır. Ölüm oranı erkeklerde yaklaşık olarak yüzde 12,7 iken kadınlarda 9.6'dır (Siegel vd., 2023).

Metastatik pankreas kanser tedavisinde kullanılan popüler ilaç gemsitabindir (Geredeli vd., 2018). Kemoterapötik ilaçlarla kombinlenen bazı ajanlarla ilaç etkinliğinin artması ve hasta sağ kalımında artış hedeflenmektedir (Heinemann vd., 2008). Ancak hastalarda uygulanan ilaçların etkinliğinin artırılıp, zararlı etkisinin en aza indirilmesi için yeni bileşenler arayışına girilmektedir.

Bu amaçla başlatılan bu çalışmada viteksin maddesinin in vitro yöntemle CFPAC-1 (ZEB1+) ve MIAPaCa-2 (ZEB1-) olmak üzere iki ayrı pankreas kanser hücre hattı üzerinde anti-metastatik ve apoptotik etkileri incelenmesi amaçlanmıştır.



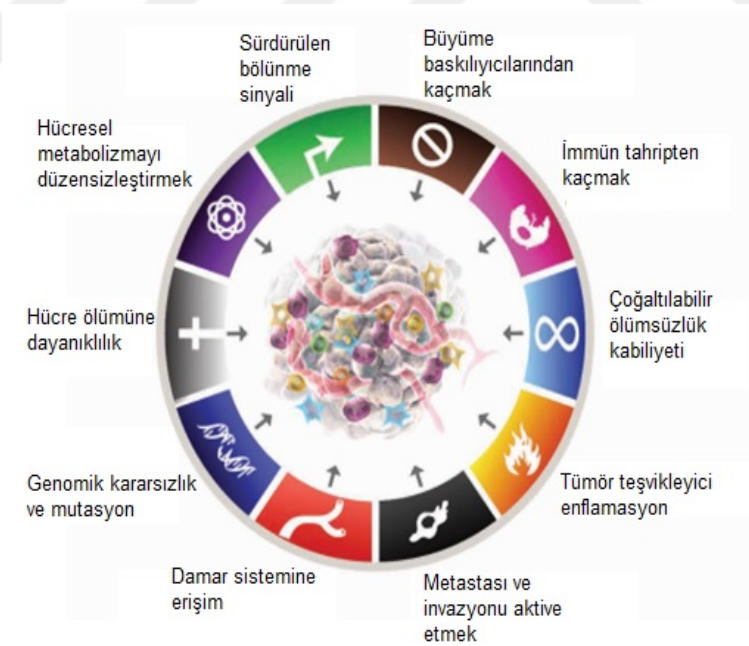
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında gözlenen ve birçok kişinin muzdarip olduğu bir hastalıktır. Temelde kanser, normal gen ifadesini koordine eden epigenomun düzensizliğinin yanında DNA'daki mutasyonlar nedeniyle aktive olan onkogenler ve inaktive olan tümör baskılayıcılar tarafından başlatılan hücrelerin genetik hastalığıdır. Ayrıca kanser metabolizmadaki değişimleri besleyen hücrenin, normal tip hücreler ve doku fonksiyonları ile iletişime geçen konağın savunma sistemini atlatan bir organizma hastalığıdır (Katti vd., 2022).

Kanser vücudun belirli bölgelerinde dokunun büyümesi ve hücrelerin artması açısından, hücreler arası popülasyon arasında sosyal ve iletişimsel açıdan köklü bir felakettir. Genellikle bir organın mikroskobik yapısının bozunumuyla ve sağlıklı dokuya invazyonu ile ortaya çıkar. Bu yapının organizasyon bozunumuyla, hücrelerin ve hücreler arası matriksin yapısal düzenlemelerine etki eder (Tarin, 2023).

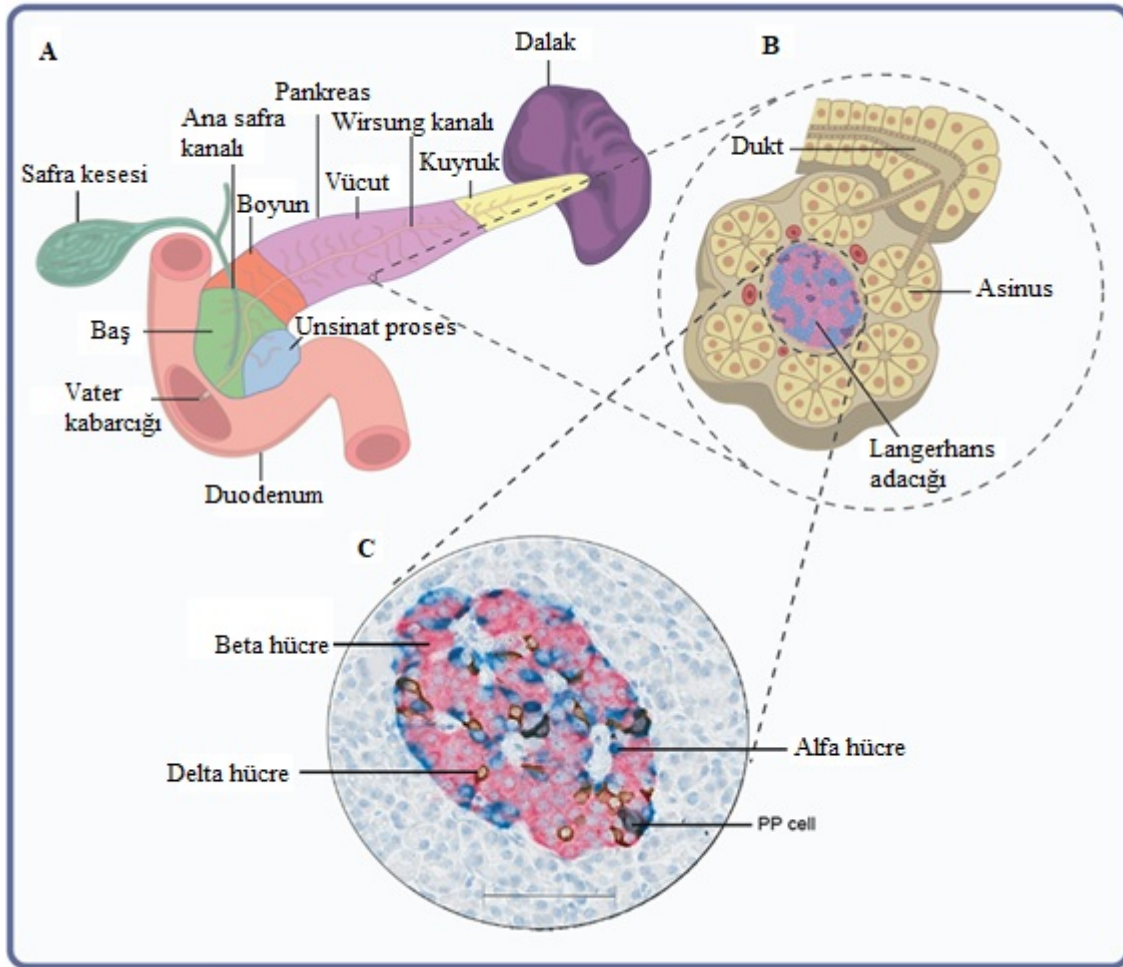
Kanser hücrelerinin 8 temel özelliği aslında kanser gelişimini ve hücre özelliklerini ortaya koymaktadır (Şekil 2.1) (Hanahan, 2022).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin 8 özelliği. İlk olarak 6 adet özellik yayımlanmış olsa da (Hanahan ve Weinberg, 2000) sonradan eklenen 2 özellikte yapı taşı olduğu düşünülmüştür (Hanahan, 2022).

2.2. Pankreatik Kanser

Genel olarak pankreas yapısına bakıldığında endokrin ve ekzokrin pankreas olarak ayrılmaktadır. Ekzokrin pankreas, loblu bileşik asinar bezdir ve sindirim enzimleri, proteazlar, amilazlar, lipazlar ve nükleazlar üretir. Pankreas kitlesinin %95'ini oluşturan duodenuma asinar hücreler; konnektif doku, damar ve sinirlerle ilişkili kanala salgılar. Endokrin pankreas ise ekzokrin doku içine gömülü Langerhans adacıkları kana; insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptit gibi hormonları üretir ve salgılar (Şekil 2.2.) (Atkinson vd., 2020). Adacıklar pankreatik kütleinin 1–2% sini oluşturur (Gao, 2007; Longnecker vd., 2018).



Şekil 2.2. İnsan pankreasının anahtar anatomik özellikleri. **A)** Pankreasın diyagramı ve çevresindeki organlar. **B)** Hüresel seviyede endokrin ve ekzokrin pankreas organizasyonunun şematik gösterimi. **C)** Endokrin hücre tiplerini gösteren insan pankreatik adacığı. Bar uzunluğu; 100µm (Atkinson vd., 2020).

Pankreatik kanser Kuzey Amerikada kadın ve erkeklerde, Batı Avrupada erkeklerde ölüm oranı açısından 3.üncü sırada yer almaktadır (Ferlay vd., 2021). Türkiye’de 2022 yılı verilerine göre pankreas kanseri en sık görülen kanserler listesinde 9. sıradadır. Vaka sayısı 8.636, ölüm sayısı 8.415’tir. Gelecek yirmi yılda pankreas kanseri yeni vakalarında ve ölüm oranlarında iki kat artış beklenmektedir (World Health Organization Globocan, 2023).

Çoğu pankreatik kanser, duktal adenokarsinom olarak karakterize edilir ve böylece küçük bir kısmının nöroendokrin bezlerin oluşturduğu ekzokrin pankreasın malignitesini ifade eder. Çoğu pankreatik adenokarsinom pankreatik intraepitelyal neoplazi (invaziv duktal adenokarsinomun en sık öncüleri) olarak adlandırılan öncül lezyonlardan ortaya çıkar. Küçük bir kısmı da intraduktal papiller müsinöz gibi kistik neoplazmlardan ortaya çıkar. Moleküler açıdan pankreatik intrapitelyal neoplazinin pankreatik duktal karsinoma karakterizasyonunun birinci dereceden ikinci dereceye ilerlemesi literatürde iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Evre 1 ve 2 pankreatik intrapitelyal neoplazi, KRAS onkogeninin 12. kodonundaki mutasyonla ilişkili olarak, RAS ve PI3K-AKT yolağı sinyal azalmasıyla karakterize edilir (Mizrahi, 2020). Ekzokrin pankreas kanserleri genel olarak ilişkili iki histolojik kategoriye ayrılır: pankreatik asinar karsinoma ve pankreatik duktal karsinoma (PDAC). Sonuç olarak, uzun süre bu iki tümör tipinin ilişkili normal hücrelerden ortaya çıktığına (yani asinar karsinomların asinar hücrelerden, duktal karsinomların duktal hücrelerden) inanılmıştır (Yuan vd., 2019).

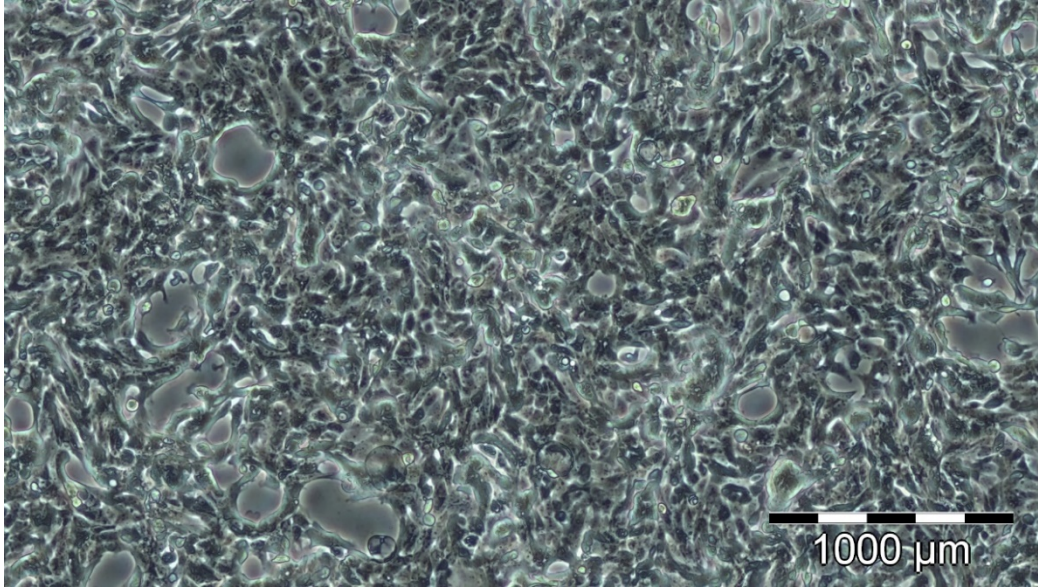
Pankreatik duktal adenokarsinomda dört ana faktör gen (bir onkogen ve üç tümör baskılayıcı gen) bulunmaktadır. KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), GTPaz kodlar ve büyüme faktör reseptörlerinden gelen sinyale aracılık eden bir gendir. KRAS’ta meydana gelen somatik mutasyonlar tümörlerin %90’ından fazlasını ve spesifik etkin noktalarda kümeleri (çoğunlukla yaygın şekilde kodon 12) oluşturur. CDKN2A (Siklin bağımlı inhibitör 2A), temel hücre döngüsü düzenleyicisini kodlar, en sık değiştirilen tümör baskılayıcı gendir ve duktal adenokarsinomların %90’ında fonksiyon değişimine sebep olur. Tümör baskılayıcı gen olan TP53 (tümör baskılayıcı protein 53)’te meydana gelen somatik mutasyonlar bu genin ürettiği protein hücre stres cevabında anahtar role sahiptir ve birçok tümör tipinde mutasyona uğramıştır. SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4) diğer bir tümör baskılayıcı gendir. TGF- β (Transforme edici büyüme faktör-beta) reseptör sinyalinin yavaşlatılmasında aracılık eder ve tümörlerin %50’sinde inaktive edilmiştir (Kamisawa vd., 2016).

Pankreatik adenokarsinomun genetik ilerleme sürecine bakıldığında, KRAS aktivasyonu %90, CDKN2A fonksiyon kaybı %95, TP53 fonksiyon kaybı %75, SMAD4 fonksiyon kaybının %55 olduğu görülmektedir (Pietrasz vd., 2022).

2.3. Pankreatik Kanser Hücre Hatları

2.3.1. CFPAC-1 Hücre Hattı

Bu hücre hattı Alabama Üniversitesi, Birmingham Kistik Fibrozis Bakım Merkezindeki 26 yaşındaki erkek kistik fibrozisli bir hastanın karaciğer metastazından elde edilmiştir. Epitelyal özellik göstermektedir (Şekil 2.3). Laparotomi pankreasın başında iyi farklılaşmış adenokarsinoma ve çoklu karaciğer metastazı ortaya çıkarmıştır. CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) kodlayan gendeki mutasyonlar yaygın bir şekilde pankreas kanseri risk faktörü olan idiopatik pankreatit sergiler. Homozigot delesyon kaynaklı SMAD4/DPC4 protein yoksunluğu gösterir. Proliferasyon süresi yaklaşık olarak 31 saattir. Metastatik özelliği bulunmaktadır. İyi bir farklılaşma özelliğine sahiptir. Histolojik olarak adenokarsinom olarak tanımlanmaktadır (Schoumacher vd., 1990; Deer vd., 2010).

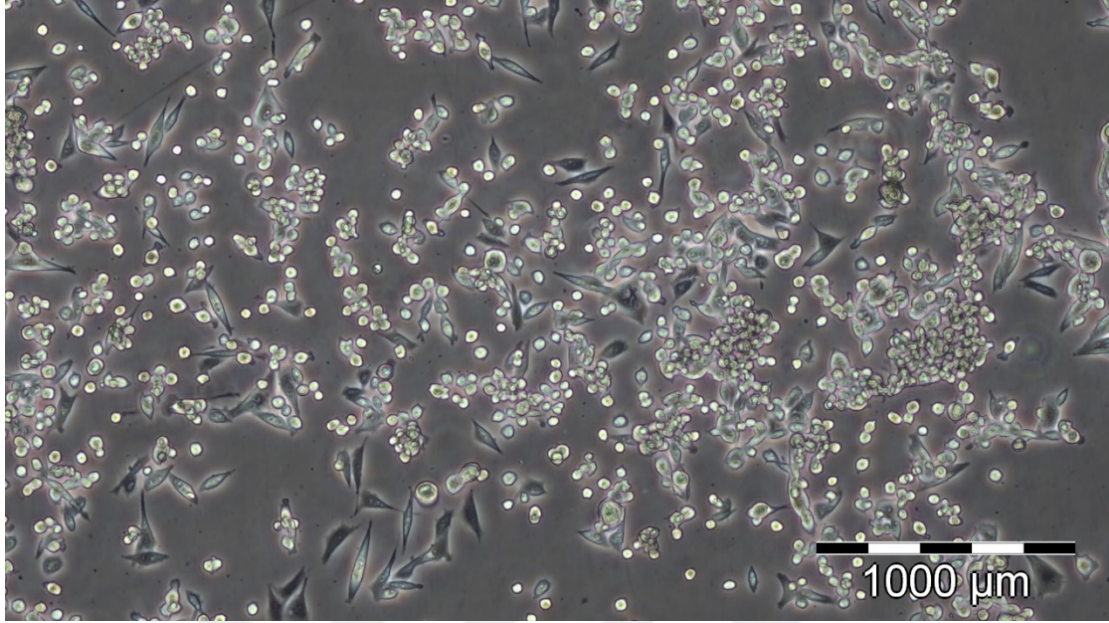


Şekil 2.3. CFPAC-1 hücre hattı ışık mikroskop görüntüsü, 4X büyütme.

2.3.2. MIAPaCa-2 Hücre Hattı

Bu hücre hattı, 65 yaşında altı ay boyunca karın ağrısı şikayetine sahip Kafkas bir erkek hastadan operasyon sırasında alınmıştır. Pankreasın vücut ve kuyruk alanlarında bir tümör kitlesi olarak gözlenmiştir. Histolojik inceleme ve doku kültürü için çoklu biyopsiler alınmıştır. Bol sitoplazmaya sahip büyük hücrelerdir. Yüksek derecede anöploidi sergiler ve diğer hücrelerin üzerinde büyümeye meyillidir (Şekil 2.4). Metastatik özelliği tanımlanmamıştır. Proliferasyon süresi

yaklaşık olarak 40 saattir. Zayıf bir farklılaşma özelliğine sahiptir. Histolojik olarak karsinoma olarak tanımlanmaktadır (Yunis vd., 1977; Deer vd., 2010).



Şekil 2.4. MIAPaCa-2 hücre hattı ışık mikroskop görüntüsü. 4X büyütme.

2.4. Migrasyon ve Metastaz

Metastaz kelimesi ilk olarak 1580'lerde Yunanca 'meta' (değişim, değiştirme, fakat çoğunlukla değişim sonucuyla ilgilidir) ve 'statis' (denge durumu ve sürdürme) eklerinin ya da edatlarının kombinasyonu olarak kaydedilmiştir. Böylelikle metastaz hem süreci ve hem de süreçlerin ortaya çıkışını temsil eder (Welch ve Hurst, 2019).

Metastaz tümör oluşumunda en ölümcül olaydır ve uzak mesafe metastazlar bu oluşumun sonucudur. Metastaz, tümör hücrelerinin primer tümörden kaçtığı ve uzak mesafede ikincil tümör olarak kolonileştiği organa özel ve çok adımlı bir süreçtir (Mortezae, 2020). Pankreas kanseri genel olarak karaciğer, mide (doğrudan uzatma yoluyla), bağırsak ve peritonyum gibi alanlara metastaz yapmaktadır (Welch ve Hurst, 2017).

Bütünleştirici klinik genomik metastazı somatik şekilde en çok etkileyen genlerin p53 (TP53), CDKN2A (cyclindependent kinase inhibitor 2A), PTEN (phosphatase and tensin homolog), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), RB1 (retinoblastoma) olduğunu göstermiştir. Metastaz kaskadında beş anahtar adım mevcuttur. Bunlar; invazyon, intravazasyon, sirkülasyon, ekstrasvazasyon ve kolonizasyondur (Fares vd., 2020).

İnvazyon; İnvazyon metastatik kaskadın birincil basamağıdır. Tümörün, tümör-stromal arayüz (ayrıca uç ve invaziv ön olarak adlandırılır) de meydana gelir. Bu olay ya tek hücre göçü (monoklonal metastaz) ya da toplu invazyon (poliklonal metastaz) ile gerçekleşir. Birincisinde tümöral hücreler

morfolojik olarak modifiye edilir ve saldırı profilini oluşturmada invaziv fenotipe erişir. İkincisinde ise, invazyon yapışık çok hücreli sırada meydana gelir ve hücre-hücre adezyonu sürdürmeye devam eder. Kolon, meme, tiroid, prostat, akciğer ve glioblastoma kanser hücreleri toplu (kollektif) invazyon özelliğini alır (Majidpoor vd., 2021).

Normal epitel hücreler hafif bağlantılar ve desmozomlar tarafından sürdürülen kutuplaşmış bir yapı gösterirler. Hemidesmozomlar, ilişkili ara filamentleri ve integrinleriyle birlikte bazal membrana bağlanmıştır. Bu sebeple hücreler invaziv özellik kazanmak için hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi ile hücre hareketliliği yeniden düzenler (Friedl vd., 2012, Fares vd., 2020).

İnvazyon boyunca tümör hücre morfolojisinde, polarize olmayan hareketli epitelyal morfolojiye sahip fibroblasta benzer şekilli belirgin değişimler EMT (Epiteliyal Mezenkimal Geçiş) olarak ifade edilir (Thiery, 2002). EMT adherens junctionlardan epitele özel E-kadherin kaybıyla ilişkilidir. EMT tümör mikroçevreden etkilenmektedir ve ilk olarak tümör stroması ile bağlantılı tümör kitle ucunda gözlenmiştir (Heerboth vd., 2015, Bakir vd., 2020).

Embriyonik gelişim ve kanser sürecinde bir majör EMT düzenleyicisi TGF- β (transforming growth factor beta)'dır. Diğer sinyal yolları Wnt, Notch ve Hedgehog, EMT ilişkili kök hücre sürdürülebilirliği ile bağlantılıdır. Tümör hücreleri aynı zamanda EMT-indükleyici sinyal yokluğunda süreci tersine çevirerek MET (mezenkim epitel geçişi) mekanizmasına dönüştürebilir. Bu dönüşüm süreci metastatik hücrelerin tüm kaskad adımlarını tamamladıktan sonra tekrardan morfolojik olarak primer tümöre benzemesini açıklamaktadır (Tam ve Weinberg, 2013; Alabaş ve Özçimen, 2023a).

2.5. Metastazda EMT ve ZEB Ailesi

2.5.1. EMT (Epitelden mezenkimal geçiş) Mekanizması

Epitel hücreleri, bazal kısmından lümene doğru güçlü apikal ve bazal polariteye sahiptir. Aktin ve intermedial filament içermesinden ötürü çok köşeli, düz bir yapıya sahiptir. Mezenkimal hücreler ise nispeten mekik şeklindedir ve yapısında bulunan stres fibrilleri onun çeşitli tipteki hareketine izin verir. EMT (epithelial to mesenchymal transitions, epitelyalden mezenkimal geçiş), epitel hücrelerinin özelliklerini kaybederek mezenkimal hücre özelliği gösterdiği bir geri dönüşümlü süreçtir (Şekil 2.5). Böylelikle hücrelerde hareket-invaziv özellik gelişir ve buda onlara yüksek plastisite ve dinamiklikte epitelyal halden mezenkimal hale geçişe izin verir. Wound Healing (yara iyileşmesi), inflamasyon alanlarında EMT epitel ve endotel bütünlüğünü yenilemede merkezi bir rol alır (Huang vd., 2022).

EMT'nin biyolojik süreci tip-1, tip-2, tip-3 olarak sınıflandırılabilir. Tip-1'de EMT, embriyonik süreçte gastrulasyondan doku ve organların gelişimine kadarki sürecin bir parçası olarak meydana gelir. Tip-2'de birey dokularında yaralanma ya da inflamasyona bağlı olarak fibrosizasyon yol açar. Tip-3'te karsinomunun metastatik sürecinin bir parçasıdır (Sommariva ve Gagliano, 2020). Tersine süreç MET

olarak bilinir ve kalp gelişimi, özellikle böbrek morfogenezinde ve somit oluşumu gibi safhalarda sık sık meydana gelir. Bu süreç Paired box 2 (Pax2), bone morphogenetic protein 7 (Bmp7), ve Wilmstumor 1 (Wt1) genleri tarafından yönlendirilir (Kalluri ve Weinberg, 2009). E-kaderinin metastatik alanda ifadesi MET mekanizmasının kanıtıdır, pankreatik kanser metastazı aynı zamanda MET ile de bağlantılıdır (Bakir vd., 2020).

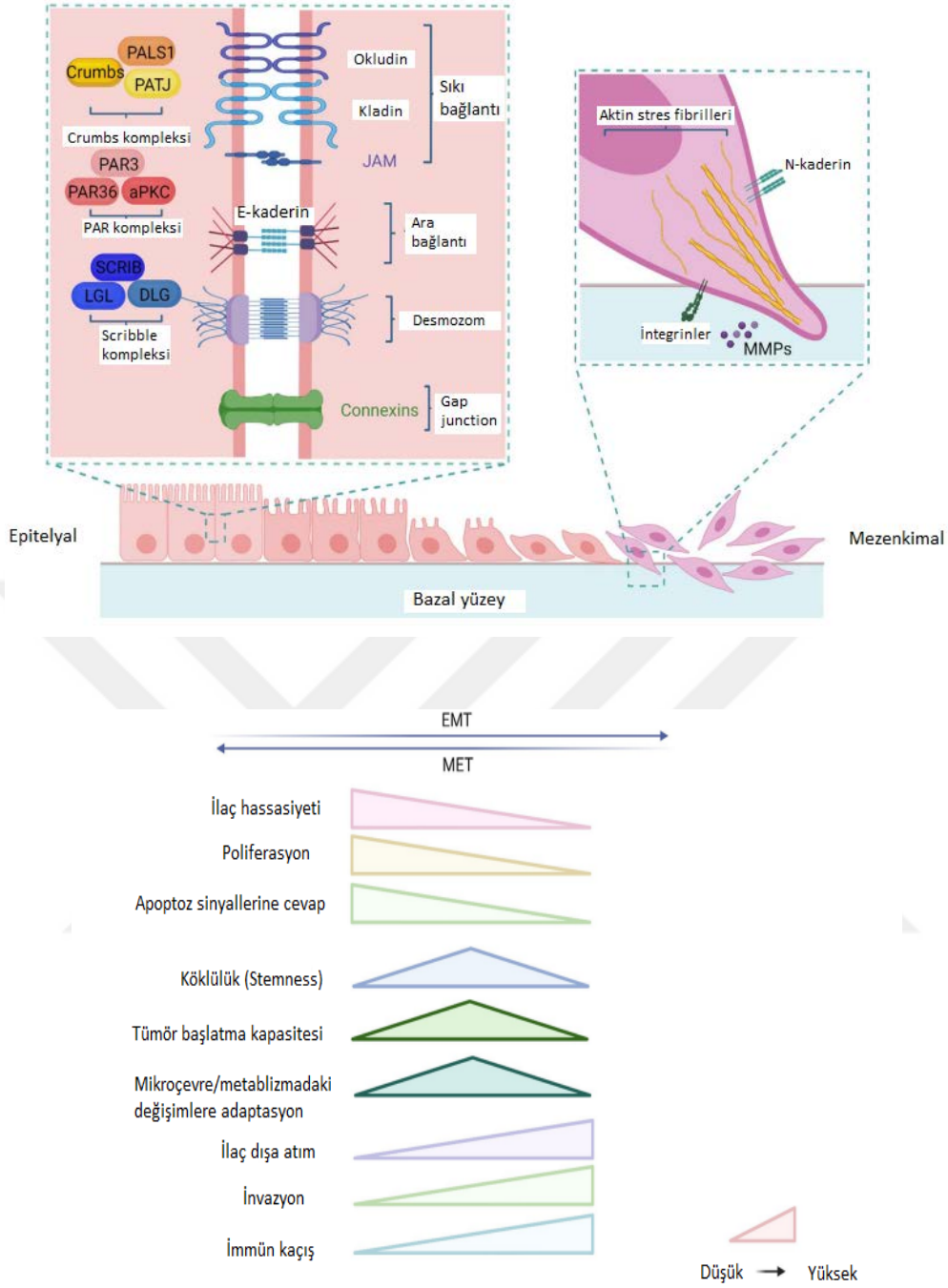
MET ve EMT ye organizmanın gelişimi boyunca transkripsiyonel kaskad, epigenetik değişimler, doku iyileşmesi, homeostazi, fibrozis gibi gözlenmiş fizyolojik değişimler aracılık etmektedir (Georgakopoulos-Soares vd., 2020).

İlk olarak bu mekanizmanın embriyogenezdeki önemi Elizabeth Hay tarafından 1970'lerin başlarında fark edilmiştir (Hay, 1968; Alabaş ve Özçimen 2023b). Zeb-1 geninin bu mekanizmadaki önemi de Grooteclaes ve Frisch tarafından 2000 yılında ortaya çıkarılmıştır (Yang vd., 2020).

E-kaderin, bazı sitokeratinler ve zona okludens 1 (ZO-1) gibi epitelyal genlerin ifadesi, geçiş sürecinde azalırken mezenkimal fenotipi tanımlayan vimentin, fibronektin, N-kaderin, B1 ve B3 integrinler gibi bazı genlerin ifadesi artmaktadır (Lu ve Kang., 2019).

Epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe geçişte epigenetik ve transkripsiyon sonrası düzenleyicilerin yanında SNAIL, TWIST ve ZEB gibi transkripsiyon faktörleri de görev almaktadır. Bu transkripsiyon faktörlerinin ifadesi ile EMT aktive edilmektedir ve böylece kanser gelişimi ve fibroziste merkezi role sahiptir. EMT transkripsiyon faktörleri epitelyal genlerin baskılanması ve mezenkimal genlerin aktivasyonunu koordine eder. Sıklıkla transkripsiyon faktörleri ifade ve aktivasyonu yönlendirir (Lamouille vd., 2014). Özellikle hücre kültür ve fare xenograft modeli çalışmalarında, EMT-aktivatörü olan ZEB-1'in hücre hareketliliğini ve kök hücre özelliklerini tetikleyerek tümörjenisite ve metastazda önemli rol aldığı gösterilmiştir (Krebs vd., 2017).

Tümör hücreleri genellikle ılımlı (orta) EMT sürecindedir. Bu özellik tümör hücrelerine lokal doku invazyonu, toplu migrasyon, migrasyon sirkülasyonu ve hem lokal hem de uzak mesafelere metastaz özelliği kazandırır (Pal vd., 2021).



Şekil 2.5. EMT boyunca epitelyal ve mezenkimal tip arasındaki değişimler (Huang vd., 2022).

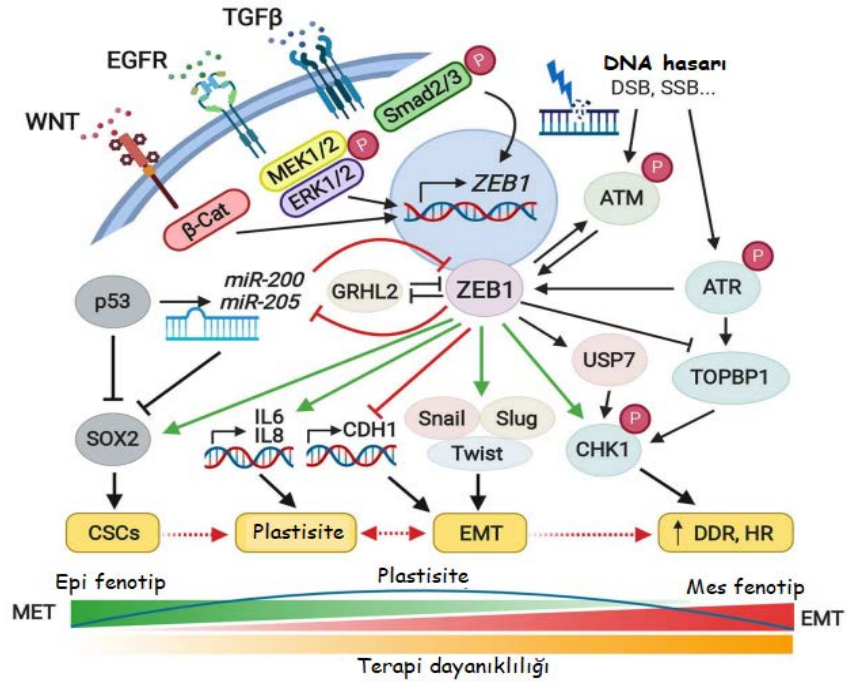
2.5.2. EMT ve ZEB İlişkisi

ZEB-1 (Zinc finger E-box binding homeobox-1) geni tümör karsinogenezi boyunca epitelden mezenkimal hale geçişte kritik bir transkripsiyon faktörüdür (Şekil 2.6). ZEB-1 ayrıca dEF1, ZFH1A, Nil-2-a, TCF8, AREB6, BZP olarak da bilinir. İşlevsel olarak ZEB-1 nöral krest hücreleri, nörojenez,

lenfopoez gelişimi ile bağlantılıdır. Son zamanlardaki ileri çalışmalar ZEB-1 geninin EMT boyunca çeşitli insan kanser tiplerinde metastaz, tümör invazyonu gibi belirgin bir role sahip olduğunu göstermiştir. Araştırmalar p300-P/CAF bağlanma domaini, Smadla ilişkili domain ve C-terminal-binding proteinle ilişkili domainlere bağlanarak ZEB-1'in EMT sürecini teşvik ettiğini kanıtlamıştır (Chen vd., 2019). ZEB-1, TGF- β , PI3K/AKT, NF- κ B, Wnt/ β -catenin, RAS/ERK ve reseptör tirozin kinazlar gibi klasik yolların aktivasyonu ya da inaktivasyonu ile EMT sürecini ve tümör hücrelerindeki diğer programları başlatır ya da inhibe eder. Ayrıca ZEB-1 geni tarafından kodlanan ve insanda kromozom 10p11.2'de konumlanan bir proteindir (Zhang vd., 2019).

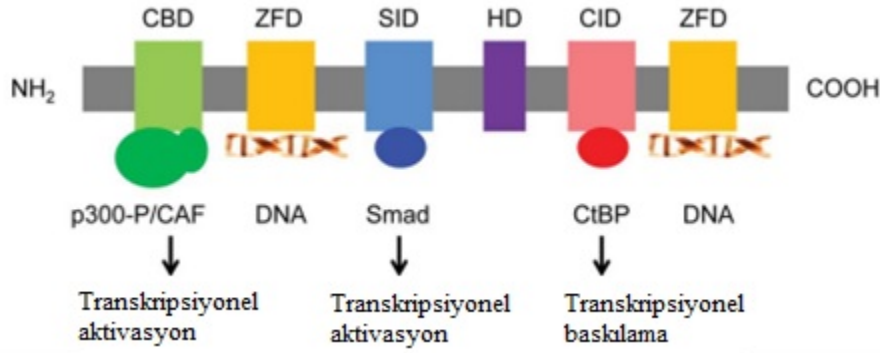
ZEB-1 geni 211.320 baz çifti ve 9 adet exon bölgesinden oluşur, genin AREB6, BZP, FECD6, NIL-2-A, PPCD3, TCF8, ZEB, ZFHEP, ZFHX1A sinonimleri mevcuttur (Ensembl, 2023).

ZEB-1 proteini (TCF8 olarak bilinir), iki adet C2H2-type flanking zinc finger kümesi varlığı ile karakterize edilir ve bunlar DNA üzerindeki CACCT(G) E-box-benzeri promotor elemanları ile bağlantılıdır. Aynı zamanda, merkezi şekilde yerleşmiş POU-benzeri homeodomain, DNA'ya bağlanmayan kısımdan oluşur. Bunlara ek olarak ZEB-1, Smad- (SID), CtBP- (CID), p300-P/CAF (CBD: koaktivator p300 ve P/CAF bağlanma domaini) gibi transkripsiyonel aktivitesinde önemli olan etkileşim domainlerini içerir (Şekil 2.7) (Zhang vd., 2019; Drápela vd., 2020).



Şekil 2.6. ZEB-1 geninin hücre plastitisesi, EMT ve terapi dayanıklılığındaki pleyiotropik etkisi. Zeb-1'in aşırı ifadesi hücre fenotip değişimiyle, yüksek tümörojenik potansiyel ve artmış göç karakteri ile sonuçlanır. Pre-metastatik alan oluşumuna katkısı dışında ayrıca immün kaçışı destekler. Kanser hücrelerinin köklülüğünde ve artan radyoterapi ve kemoterapi direncinde önemli role sahiptir. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla ZEB1 geninin aktive ve inhibe ediciliğini göstermektedir. CSCs; Kanser kök

hücreler, EMT; Epitelyal-mezenkimal geçiş, MET; Mezenkimal-epitelyal geçiş, DDR; DNA hasar cevabı, HR; Homolog rekombinasyon (Drápela vd., 2020).



Şekil 2.7. ZEB-1 proteinin şematik gösterimi. CBD: ko-aktivator p300 ve P/CAF bağlanma domaini, ZFD: zinc finger domain, SID: Smad etkileşim domain; HD: homeodomain; CID: CtBP etkileşim domain (Zhang vd., 2015).

2.6. Apoptoz, Nekroz ve Kaspazlar

Apoptoz, kaskadların ve hücre proteinlerinin bir seri sinyal iletimi ile gerçekleşen ve sıkı biçimde organize edilen bir süreçtir. Hücre ölümü gerçekte doğal dengenin bir parçasıdır. Homeostatik dengeyi korumak için hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki oranı korumak kritiktir. Kanser, AIDS, Diyabet, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ve diğer pek çok hastalık apoptotik yollardaki dengesizlik ve anormal mekanizmayla meydana gelmektedir. Bu hastalıkların birçoğuna reaktif oksijen türleri (ROS) de aracılık etmektedir (Indran vd., 2011).

Apoptotik olmayan hücre ölüm tiplerine otofaji, nekroptozis ve apoptoz benzeri programlanmış hücre ölümü dahildir. Otofajik hücre ölümü kendi kendine bozunucu bir süreçtir ve otofajik vakuollerde, ölen hücre içinde hücre içeriğinin bozunumunda hayati bir rol alır. Bu sebeple omurgalı dokularında vakuoler hücre ölümü olarak ta bilinmektedir (Glick vd., 2010). Nekroptozis, nekrotik ölümün programlanmış, planlanmış şeklidir ve apoptozu indükleyen aynı ölüm sinyalleri ile başlatılmaktadır. Nekroptozis yaygın şekilde in vivo fiziksel travmalar, enfeksiyon, çeşitli nörodejenerasyon sebebiyle başlamaktadır. Apoptozda bulunan FAS, TNFR gibi birkaç ölüm reseptörü ile uyarılsa da nekroptozis genellikle apoptozun genetik ve kimyasal olarak baskılandığı ya da engellendiği durumlarda görülmektedir (Nikoletopoulou vd., 2013).

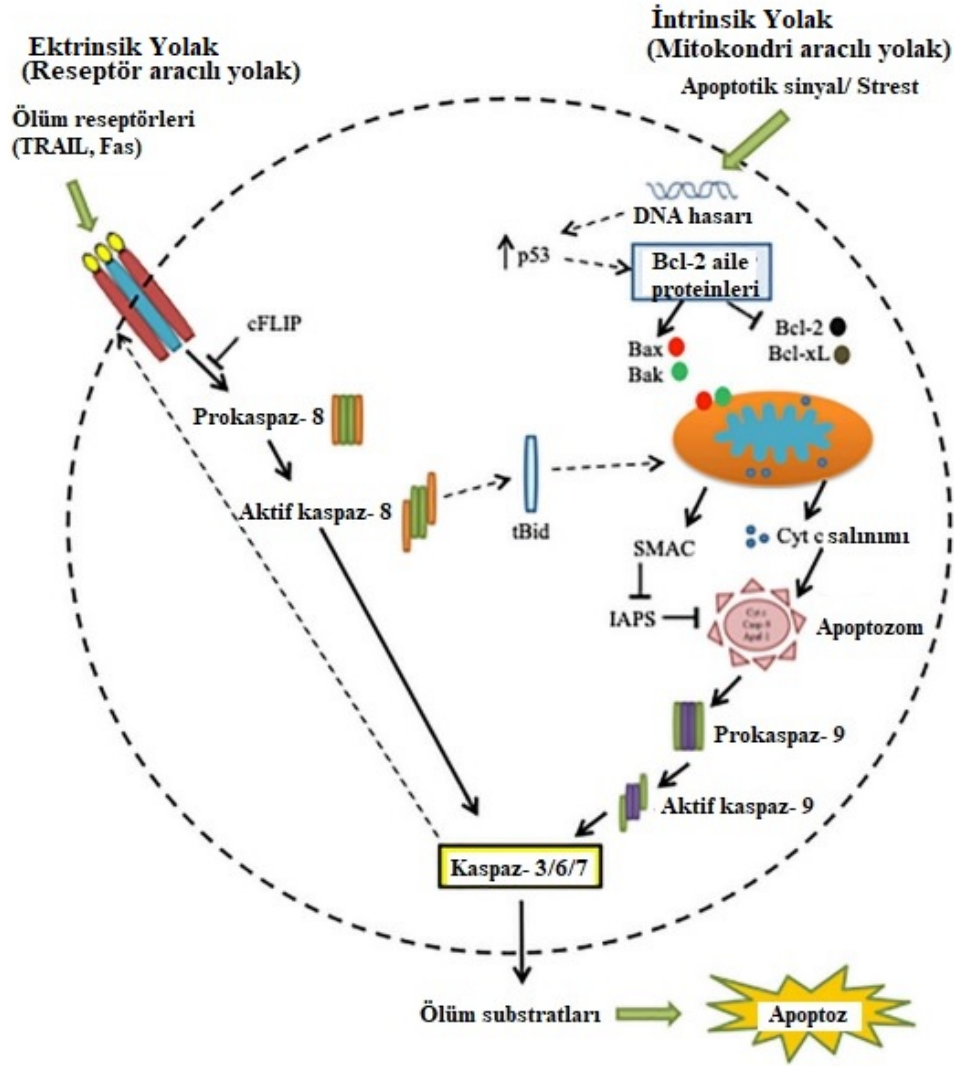
Apoptozda genel olarak bakıldığında; tek hücre ya da küçük hücre kümeleri, hücre daralması ve kıvrımlaşması, piknozis ve karyoreksis, bütün hücre membranı, sitoplazmada tutunan apoptotik parçalar gözlenmektedir. İnternükleozomal bağlayıcı bölgelerde 180-200 baz çiftinin katlarına yol açan DNA'nın parçalanması ile karakterize edilmektedir. Nekrozda ise; sık sık bitişik hücreler, hücre şişmesi, karyolizis, piknozis, karyoreksis, dağılmış hücre zarı, serbest kalmış sitoplazma ile karakterize

inflamasyon mevcuttur (Elmore, 2007; Rainaldi vd., 2008). Apoptotik hücreler fagositik hücreler tarafından nihai olarak absorblanıldığı için inflamasyona sebep olmazlar (Savill ve Fadok, 2000).

Apoptoz, intrinsik (iç yolak) ve ekstrinsik (dış yolak) olmak üzere iki ayrı yol ile uyarılabilir (Şekil 2.8). İntrinsik yol, mitokondriyal yol olarak ta bilinmektedir ve başlıca sebeplerine bakıldığında DNA hasarı, replikasyon stresi, ER (Endoplazmik retikulum) stresi, mikrotübüler değişimler ya da mitotik defektler sayılabilir (Carpio vd., 2015; Roos vd., 2016; Galluzzi vd., 2018).

Mitokondriyal apoptoz, negatif ve pozitif yolaklarla uyarılabilir. Negatif sinyaller hücrenin doğal çevresinde sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri eksikliğinden ortaya çıkmaktadır. Bu hayatta kalım sinyalleri olmaması durumunda, normalde inhibe durumda olan puma, noxa ve bax gibi pro-apoptotik moleküller aktifleşir ve apoptozu başlatır. Pozitif sinyallere bakıldığında hipoksi, toksinler, radyasyon, reaktif oksijen türleri, virüsler ve çeşitli toksik ajanlar gibi doğal uyarılar yer almaktadır (D'arcy, 2019).

Sitokin çekinimiyle başlatılan hücre ölümü genellikle mitokondri membran geçirgenleşme durumu, sitokrom-c salınımı, Smac/Diablo salınımı ve diğer faktörlerin mitokondriden sitoplazmaya geçişiyle ve sonunda kaspazların aktivasyonu ile karakterize edilir. Bu süreçte Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondri membran geçirgenliğini teşvikleyerek ya da engelleyerek apoptozun fonksiyonunda ve sonuç olarak pro-apoptotik faktörlerin yayılımını sağlayarak kaspazların aktivasyonuna sebep olan merkez düzenleyici bir rol oynar. Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi bir ya da daha fazla Bcl-2 homoloji domainleri varlığına göre sınıflandırılır ve üyeleri iki ana gruba bölünmektedir. Bunlar apoptoz inhibitörleri ve hücre ölümü indükleyicilerdir (Brumatti vd., 2010).



Şekil 2.8. Apoptoz yolları. Apoptoz başlıca iki ana yoldan oluşur. Ekstrinsik yolak, dış uyarılardan ya da ligand molekülü ve özellikle ölüm reseptörleri (death receptors; DRs) tarafından tetiklenmektedir. İntrinsik yolak Bax/Bak'ın mitokondriyal membrana yerleşmesiyle başlatılmaktadır.

Burada Apaf-1 ve Prokaspaz-9 ile kombine olan sitokrom-c salınımı gerçekleşir. Bu yapıya Apoptozom denir ve oluşumundan sonra apoptozun kaspaz-3 kaskadı aktive olur. TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand), cFLIP (cellular FLICE inhibitory proteins), tBid (Truncated bid), Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2), Bcl-xL (Bcl-2 homologue splice variants), Cyt C (Cytochrome), SMAC (Second mitochondrial activator of caspases), IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) (Jan ve Chaudhry, 2019).

BAX, BAK1, BIM, BID ve BBC3 (yaygın şekilde PUMA) pro-apoptotik üyeler olup mitokondri dış membranında temel olarak delikler yapıp sitokrom-c salınımı uyarırken BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BCL-2-A1 ve MCL1 üyeleri mitokondri dış membran geçirgenliğini inhibe etmektedir. Pankreatik kanser hücre hatlarında CDK5'in inhibasyonu MCL1 seviyesinin azalmasına sebep olur ve

BCL-2–BCL-XL inhibitörü navitoklaks (ABT-263) ile apoptozu indüklemek için sinerji oluşturmaktadır (Carneiro ve El-Deiry, 2020; Green, 2022).

Evrimsel süreçte kaspazlar yüksek derecede korunmuş ve insandan böceklerle, nematodlara ve hidralara kadar bulunmaktadır (Hengartner, 2000). Kaspaz-8 ve kaspaz-9 başlatıcı kaspazlar iken kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, kaspaz-10, CAD (kaspazla aktive edilen DNAaz) ve PARP (Poli ((ADP-riboz)) polimeraz) efektör ya da cellat kaspazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Jan ve Chaudhry, 2019; Hengartner, 2000).

Kaspazlar normal durumda inaktiftir ve aktive olabilmek için proteolitik süreç gerektirir. Bu olay DISC (death inducing signalling complex-ölüm indükleyici sinyal kompleksi) ve apoptozomu gerektirir. İkinci kompleks Apaf-1 (~130 kDa) dir. Sitokrom-c ve dATP'yi çok büyük (~700–1400 kDa) apoptozom kompleksini oligomerize eder. Apoptozom ve kaspaz-9 holoenzim kompleksini oluşturur ve efektör kaspazı aktive eder (Cain, 2002).

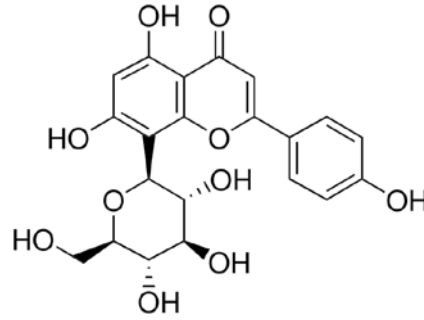
Ekstrinsik yolak, hücre yüzeyinde bulunan ve hücre yüzeyi ölüm reseptörleri olarak da bilinen TNFR1, FAS, TRAIL-R1 gibi reseptörlere TNF- α , TRAIL ve FasL gibi ölüm ligantlarının bağlanmasıyla başlamaktadır (Brenner ve Mak, 2009, Kashyap vd., 2021). Ölüm reseptör aracılı apoptozda, CD95/Fas/APO-1 ve TRAIL gibi ligandlar reseptör trimerizasyonunu indükleyerek ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC-death inducing signalling complex) oluştururlar. Bu kompleks, hücre membranında bulunur, daha sonra prokaspaz-8, FADD/MORT1 adaptör molekülü aracılığıyla uyarılır, sonunda kaspaz-8 ve kaspaz-10'da konformasyonel değişim meydana gelir. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 daha sonra doğrudan ya da dolaylı olarak kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 gibi tüm diğer kaspazları aktive edebilir (Cain, 2002; Kashyap vd., 2021).

2.7. Viteksin (Apigenin 8-C-Glikozit)

Doğal olarak mevcut flavonoidler O- ya da C- glikozit halde bulunur. O-glikozitler, düzenli olarak 3 ya da 7 pozisyonda bir aglikon hidroksiline bağlı şeker bileşenine sahiptir. Ancak bununla birlikte, C-glikozidler, genellikle C-6 veya C-8'de aglikon karbonlarına bağlı şeker grupları içerir ve bir C-C bağı oluşturarak onları asit hidrolizine karşı daha fazla direnç kazandırarak çeşitli biyolojik aktiviteler gerçekleştirmesinde yardımcı olur (Ganesan ve Xu, 2017).

Viteksin, biyoaktivitelere katkıda bulunan özellikle flavinoidlerde radikal temizleyici olan A halkasındaki o-di-hidroksil olmak üzere toplamda 7 hidroksil grubuna sahiptir. Flovenler flovinoidlerin bir sınıfıdır, genellikle sarı renge sahiptir. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) de bir doğal flovendir.

(He vd., 2016). Viteksinin moleküler ağırlığı 432.38 g/mol, açık formülü $C_{21}H_{20}O_{10}$ 'dur ve molekül yapısı Şekil 2.9'da gösterilmektedir (Sigma Aldrich 'Vitexin').



Şekil 2.9. Viteksin'in moleküler yapısı (Sigma Aldrich).

Viteksin örneklerle sınırlandırılmamakla birlikte inci darı (Gaitan vd., 1989), alıç (*Crataegus* spp.) (Edwards vd., 2012), güvercin bezelye (Fu vd., 2008), passiflora (*Passiflora* spp.) (Zucolotto vd., 2012), bambu (*Bambusa vulgaris*) (Yang vd., 2017), buğday yaprağı (*Triticum aestivum*) (Moheb vd., 2011), mimoza (Zhang vd., 2011), hayıt (Hajdú vd., 2007), maş fasulyesi (*Vigna radiata*) (Cao vd., 2011), *Arum dioscoridis* (Afifi vd., 2016; Öztürk, 2017) gibi çeşitli tıbbi bitkide bulunmaktadır.

Viteksin, kalp damar sağlığı koruyucu etki (Al-jeboory ve Dizaye, 2006; Che vd., 2016), nöron koruyucu etki (Lyu vd., 2018; Malar vd., 2018), anti inflamatuvar ve anti alerjik etki (Jiang vd., 2019; Yang vd., 2019) anti kanser etki (Choi vd., 2006; Czemplik vd., 2016; Girish vd., 2016; Liu vd., 2019) gibi çeşitli biyolojik aktivitesinden kaynaklı dikkat çekmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAP) 'nin TP2 Yüksek lisans tezi kapsamında 2022-2-TP2-4735 numaralı proje kodu ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1002B Acil Destek, 123Z849 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Kullanılan materyaller ve yöntem aşağıda verilmiştir.

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Fetal Bovine Serum (Thermo, qualified, Cat. No: 10500064, heat inactivated, United States), innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytic Jena, InnScreen, Berlin), DMEM (Euroclone, high glucose, pyruvate, Cat. No: ECB7501L), DMSO (Dimethyl sulfoxide, for cell biology), 15 ml steril santrifüj tüpü (Grenier), 50 ml steril santrifüj tüpü (Grenier), Viteksin (Sigma Aldrich, 10mg), DNA Purification kit (Atlas Biyoteknoloji, Cat. No: I01-01-05, Türkiye), 1kb plus DNA Ladder, 250bp-10000bp (Atlas Biyoteknoloji, Cat. No: EDL108, Türkiye), TBE Buffer (Tris-borate-EDTA, Cat. No: B03-10-01, 10X), 6X Loading Buffer (Cat. No: B10-01-01) LightCycler 480 SYBR Green I (Roche, Cat. No: 4707516, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo, Cat. No: 4368814), Steril Pastör pipeti (Lp Italiana Cat. No: L135138), Etanol (Merck), Trypsin-EDTA (Gibco), Serolojik pipet (Grenier, 10 ve 20ml), MTT (Biobasic). Penicillin-Streptomycin (HyClone, Cat. No: SV30010), Amphotericin B (Capricorn, Cat. No: AMP-B).

3.1.2. Kullanılan Hücreler

CFPAC-1 hücre hattı (ATCC, Manassas, VA, USA), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Güneş Esendağlı tarafından sağlanmıştır.

MIAPaCa-2 hücre hattı (ATCC, Manassas, VA, USA), Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Prof.Dr. Ömer Faruk Bayrak tarafından sağlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

SANYO CO2 inkübatör (MCO- 18AIC), HETTİCH santrifüj (ROTOFIX 32 A), NİKON ECLIPSE (TS 100) inverted mikroskop, HELFER steril kabin, Termal Cycler T100 (BIO-RAD),

Lightcycler 480 II cihazı (Roche), NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific), Wisd su banyosu, Eppendorf mini spin plus, Labnet VX100 vorteks.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

-80 °C' de bulunan CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücreleri 37 °C de hızla eritilerek santrifüj işlemiyle DMSO'lu ortamdan hızla uzaklaştırılması sağlanmıştır. DMEM medium içerisinde %10 FBS, %1 Penicillin-Streptomycin, %1 Amphotericin B olacak şekilde beslenmiştir. Hücreler bu medium ile haftada iki kez besleme olacak şekilde T25 flasklarda çoğaltılmıştır. Hücrelerin streste girmemesi için vücut ortamının taklit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Sanyo marka etüv ortamında 37 °C de %5 CO₂ ortamında %95 nemli koşulda inkübe edilmesi sağlanmıştır.

Hücreler adherent özellik göstermektedir ve yaklaşık olarak %80 oranında konflüens (T25 flask üzerinde yayılım oranı) olduğunda Tripsin – EDTA ile muamele edilerek flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin üzerine eklenen katkılı medyum ile enzimatik aktivasyon durdurulup hücreler 15 ml'lik falconlara alınmıştır. 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilen hücreler bire üç olacak şekilde pasajlanmıştır. Yeterli miktarda sayıya ulaşıldığında deneylere başlanmıştır. Hücre morfolojilerinin takibi Nikon Eclipse marka mikroskop ile düzenli olarak yapılmıştır.

Deney başlangıcı ve dondurma işlemi öncesinde hücreler Thoma lamı ile 1:1 oranı (genellikle 30 µL: 30 µL olacak şekilde) mikroskopta Tripan mavisi ile boyanarak sayılmıştır.

Dondurma işleminde santrifüj edilen hücrelerin supernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet kısmı 950 µL katkılı medium a tamamlanıp üstüne 50 µL DMSO gelecek şekilde %5 oranında DMSO ile 1,5 ml lik kriyovial tüplerde kademeli olarak soğutulurak (-20, -80, sıvı azot) depolanmıştır.

3.2.2. Deney Grupları

10 mg Viteksin (Sigma Aldrich) DMSO da çözdürülüp 200 mM stok elde edilmiştir. 5mM, 1mM, 0.5mM, 0.1mM ara stoklar PBS ile hazırlanmıştır. 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM doz uygulamaları hazırlanan ara stoklardan uygulanmıştır.

3.2.3. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi ile sitotoksisite gözlemi ve IC₅₀ doz tayini

MTT test içeriği ele alındığında başrolde bulunan yapı tetrazolyum tuzudur. Bu tuz hücrede aktif bir mitokondri varlığında formazan kristallerine indirgenirken, ölü hücrelerde herhangi bir renk kaybına uğrama gerçekleşmemektedir. İndirgeme sonucu sarı renkte olan içerik mor renge

dönüşmektedir (Mossmann, 1983; Tokur ve Aksoy, 2017). Vitexinin anti-proliferatif etkisi için MTT testi uygulanmaktadır ve sitotoksik bir etki olup olmadığına bakılmaktadır. Deneylerde kullanılmak üzere, Vitexinin doz ve zaman bağımlı olarak IC₅₀ değeri çıkarılmaktadır.

Belirlenen doz aralıkları 10 – 500 µM arasında seçilmiştir. Literatürde farklı kanser hücrelerine uygulanan farklı dozlar olması nedeniyle ve çalışmada kullanılacak pankreas karsinoma hücreleri epitel kökenli adenoma hücreleri olması göz önünde bulundurularak bu aralıklar belirlenmiştir (An vd., 2015; Kılıç, 2022).

MTT boyası toz sarı halde bulunur ve deneye yakın zamanda 1 mL içersinde 5 mg olacak şekilde çözündürülmüştür. Işıktan etkilendiği için hazırlandığı ependorf tüp aleminyum folyo ile kaplanarak +4 °C derecede muhafaza edilmiştir. Deney grupları olarak iki hücre hattında da Kontrol, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM dozları uygulanmıştır ve DMSO grubu eklenmiştir. Hücre sayımı Thoma lamında yapıldıktan sonra kuyu başına CFPAC-1 için 4x10³, MIAPaCa-2 için 2x10³ hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Her dozun ≥ 3 kez (n ≥ 3) tekrarı yapılmıştır. Hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra kuyucuklara tutunması için hücreler bir gece inkübe edilmiştir.

Sonraki gün kuyucuk içerikleri boşaltılarak (DMSO hariç) ilaç uygulamaları 2 gün (48.saat, 72.saat) hesaplanacak şekilde yapılmıştır. Deney sonucunda ELİSA okuyucuda kuyucukların absorbans değeri ölçülmüştür. Ölçüm sonrası çıkan değerler Excel uygulamasında sigmoidal eğri üzerinde yorumlanmıştır. IC₅₀ değeri hesaplanırken $IC_{50} = \frac{(\text{kontrol grubu ortalaması} - \text{örnek grubu ortalaması})}{(\text{kontrol grubu ortalaması})} \times 100$ denkleminde faydalanılmıştır. Kontrol grubu (doz uygulaması yapılmayan grup) canlılık açısından 100 kabul edilmiştir (Mossmann, 1983).

3.2.4. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde Apoptoz ve Metastaz Yolağı ile ilişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

MTT ile doz belirlenmesinin ardından hücreler kontrol ve belirlenen iki Vitexin dozu CFPAC-1 hücreleri için 312 ve 156 µM, MIAPaCa-2 hücreleri için 500 ve 250 µM 48 saat uygulanmış ve Total RNA izolasyonu yapılmıştır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

1. Uygulama yapılmış 1 milyon hücre santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı atılarak pellet üzerine 400 µL lizis solüsyonu (Lysis Solution RL) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Pipetaj yapılan hücreler tekrar 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu adımdan sonra hiçbir hücre yığını görülmemelidir.
2. Toplayıcı tüpe Spin Filter D kolonu yerleştirilmiştir. Lizis edilen örnekler bu kolona transfer edilmiştir. 11,000 x g (11.000 rpm) da 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu adımda elde edilen filtrat RNA içermektedir. Eğer solüsyon tamamen Spin Filterdan geçmedi ise daha yüksek hızda ve biraz uzatılmış zamanda filtrelenmelidir.
3. Spin Filter R kolonu yeni toplayıcı tüpe yerleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 400 µL %70 Etanol 2. Adımda elde edilen örneğe eklenmiştir ve birkaç kez pipetaj yapılmıştır. Örnek, hazırlanan

kolon ve alıcı tüpe aktarılmıştır. 11,000 x g (11.000 rpm) da 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp filtratla beraber atılmıştır. Eğer solüsyon tamamen Spin Filterdan geçmedi ise daha yüksek hızda ve biraz uzatılmış zamanda filtrelenmelidir.

4. Spin Filter R kolonunun kapağı açılıp 500 µL yıkama solüsyonu (Washing Solution **HS**) eklenmiştir. Kapak kapatılıp 11,000 x g (11.000 rpm) da 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp filtratla beraber atılmıştır. Spin Filter R kolonu yeni bir toplayıcı tüpe yerleştirilmiştir.
5. Spin Filter R kolonunun kapağı açılıp 700 µL yıkama solüsyonu (Washing Solution **LS**) eklenmiştir. Kapak kapatılıp 11,000 x g (11.000 rpm) da 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp filtratla beraber atılmıştır. Spin Filter R kolonu yeni bir toplayıcı tüpe yerleştirilmiştir. 700 µL %80 Etanol ile RNA saflığını artırmak amacıyla yıkama yapılmıştır.
6. Alkolü uzaklaştırmak için 11,000 x g (11.000 rpm) da 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp atılmıştır.
7. Spin Filter R, Elüsyon tüp (Elution Tube)'e yerleştirilmiştir. Dikkatli bir şekilde kapağı açılarak 30-80 µL RNase-free su (RNase-free Water) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilip 11,000 x g (11.000 rpm) da 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Elde edilen RNA'ların miktarları NanoQ cihazı ile ölçülmüştür (Tablo 4.1). RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezi yapılmıştır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir. Her deney grubu için elde edilen karışıma RNA'dan 1 µg olacak şekilde eklenip kalan hacmin 20 µL ye Nuclease-free su ile tamamlanması hedeflenmiştir.

CFPAC-1 kontrol, IC ₅₀ , IC ₅₀ /2 için	Miktarlar
10× RT Buffer	2 µl
25× dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10× RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free su	10,2 µl
Eklenecek RNA	4 µl
Toplam Hacim	20 µl

MIAPaCa-2 kontrol için	Miktarlar
10× RT Buffer	2 µl
25× dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10× RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free su	12,2 µl
Eklenecek RNA	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

MIAPaCa-2 IC ₅₀ , IC ₅₀ /2 için	Miktarlar
10× RT Buffer	2 µl
25× dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10× RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free su	11,2 µl
Eklenecek RNA	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

Termalcykler cihazında kullanılan protokol

25°C de 10 dakika

37°C de 120 dakika

85°C de 5 dakika

4°C de 1 dakika

Gerekli teçhizat ve kullanılan malzemeler

1. Lightcycler 480 II cihazı (Roche)
2. Lightcycler 480 multiwell plate 96 (Roche cat no: 04729692001)
3. Lightcycler 480 sealing foil (Roche cat no: 04729757001)
4. Master Mix; Lightcycler 480 SYBR Green I Master Mix, (Thermo kat no: 04707516001)
5. Primer Dizaynı; Probesynthesis Biyoteknoloji

Ekspresyon Çalışmasında hazırlanan içerikler ve uygulanan döngüler

Real-Time PCR da kullanılan karışım (Her gen ve çalışılan her grup için ayrı ayrı 3 tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır); 4.0 µL PCR için uygun saflıkta su, 10 µL Reaksiyon enzimi (Master Mix), 2.0 µL Primer (Reverse ve Forward), 4 µL c-DNA.

Real-Time PCR döngü protokolü

İnkübasyon aşaması; 95°C’de 5 dk.,

Amplifikasyon aşaması; (döngü 45 defa tekrarlanmıştır); 95°C’de 10 saniye DNA’nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon), 60°C’de 15 saniye primer bağlanması (annealing), 72°C’de 15 saniye uzama (extesion),

Erime döngüsü; 95°C’de 5 saniye, 65 °C’de 1 dakika, 97 °C’de,

Soğutma aşaması; 40°C’de 10 saniye bekletilmiştir.

Tablo 3.1. RT-PCR aşamasında kullanılan primer dizileri.

PRİMERLER	GEN DİZİLERİ	
ACTB Reverse	5' CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC 3' (21 mer)	(Alabaş, 2017)
ACTB Forward	5' GAGGTGATAGCATTGCTTTCG 3' (21 mer)	
KASPAZ-3 Reverse	5' TCAGCCCTCCATGTTGTGAA 3' (20 mer)	(Alabaş, 2017)
KASPAZ-3 Forward	5' TCATCACCTGTTTCAGATCCAGAG 3' (23 mer)	
KASPAZ-8 Reverse	5' GGAAAATGAGGGAAGGACACAAA 3' (23 mer)	(Alabaş, 2017)
KASPAZ-8 Forward	5' GAAATAGAACTACAAGCGGATGGTT 3' (25 mer)	
KASPAZ-9 Reverse	5' ATCCTGCCTTTCTTTCCAAACAG 3' (23 mer)	(Alabaş, 2017)
KASPAZ-9 Forward	5' CTTTGCTGCTTGCCTGTTAGTT 3' (22 mer)	
ZEB1 Reverse	5' GGTTGTTCCATCTTGATCAACCA 3' (23 mer)	(Ren vd., 2013)
ZEB1 Forward	5' CAAGAAACAATCAATGCTTCACC 3' (23 mer)	

3.2.5. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde metastazın Wound-healing ile analizi

1. Deney grupları oluşturmak adına 6 lı kuyucuklu plate kullanılmıştır ve her kuyucuğa 1 milyon hücre ekilmiştir.
2. Hücrelerin tutunması için bir gün beklenmiştir. Konfluens oranı %90'a ulaştığında FBS içermeyen medium eklenerek 24 saat etüvde inkübe edilmiştir.
3. Kuyucuklarda bulunan medium alınıp 200 µL'lik pipet ucuyla düz şeritler çekilmiştir. 1x DPBS ile 3 kez yıkanıp yara bölgesinden kalkan hücreler uzaklaştırılmıştır.
4. %1 FBS mediumlu ilaç dozları kuyucuklara eklenmiştir. 24, 48, 72. saatlerde yara kapanmaları mikroskopun bağlı olduğu bilgisayardan fotoğraflanmıştır.
5. Universal TEM Imaging Platform (ITEM) ve Image J programlarından ölçümler yapıp yara mesafesi ve kapanma oranı hesaplanmıştır (Grada vd., 2017; Martinotti ve Ranzato, 2020).

3.2.6. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde Apoptozun jel elektroforez yöntemiyle analizi

Deney gruplarından izolasyon ABT DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Deney aşamaları aşağıdaki gibidir.

1. 20 µl Proteinaz K, 200 µl örnek ve 200 µl Lizis Buffer (Lysis Buffer) karışım 1.5 mL santrifüj tüpüne sırasıyla eklenmiştir. Karışımın tamamının homojenizasyonu için vortexlenmiştir.
2. 56°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Kapağın içinde herhangi bir şey kalmaması adına spin yapılmıştır.
3. Karışıma 200 µl Absolü etanol eklenip vortekslenmiştir ve Kapağın içinde herhangi bir şey kalmaması adına spin yapılmıştır.

4. Karışım spin kolonuna dikkatlice transfer edilmiştir. 1 dakika 8,000 rpm de santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp içeriği boşaltılıp tekrar kolona yerleştirilmiştir.
5. 600 µl Yıkama Buffer I (Wash Buffer I) eklenmiştir. 1 dakika 8,000 rpm de santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp içeriği boşaltılıp tekrar kolona yerleştirilmiştir.
6. 700 µl Yıkama Buffer II (Wash Buffer II) eklenmiştir. 1 dakika 8,000 rpm de santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüp içeriği boşaltılıp tekrar kolona yerleştirilmiştir.
7. Spin kolonu temiz 1.5 mL tüpe yerleştirilmiştir. 50-200 µl Elution Buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Tam hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Elde edilen DNA'lar %1'lik Agar hazırlanarak jel elektroforez yöntemiyle 90A, 100W, 50 dakika jelde yürütülmüştür. UV kabin altında gözlenmiştir.

3.7. İstatistik

Bu çalışma kapsamında yapılan istatistik analizler Jamovi (2.3.28.0) programı ile yapılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında One Way Anova testi kullanılmış olup, Post hoc test olarak Tukey testinden yararlanılmıştır. Normal dağılım varsayımı sağlanmadığı durumda ise grup karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır ve Post hoc test olarak Dwass-Steel-Critchlow-Fligner pairwise comparisons testi kullanılmıştır. Veriler normallik sağlandığı durumda ortalama±standart sapma, sağlanmadığı durumda ise medyan[min-max] olarak özetlenmiştir. $P < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlılığı belirlemek için kabul edilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

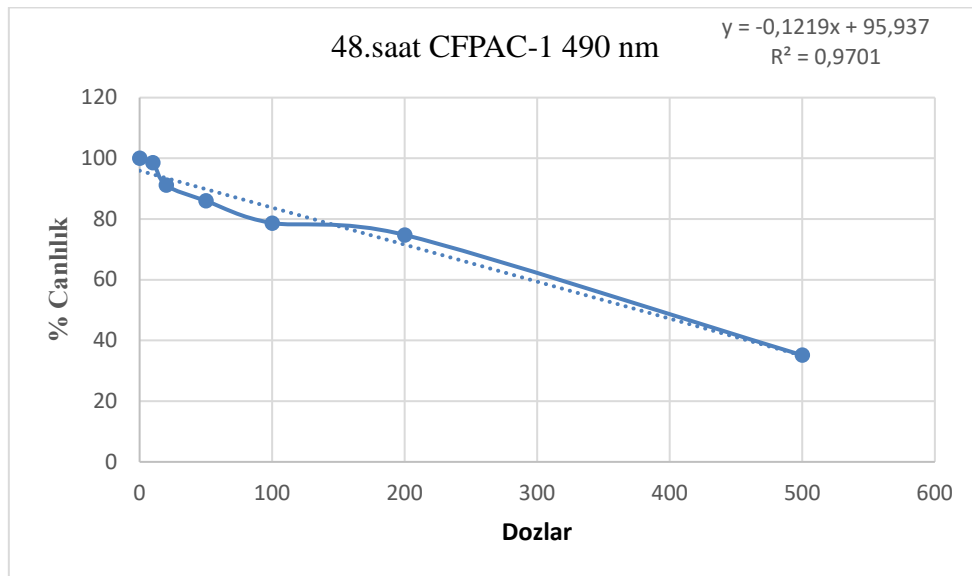
4.1. Bulgular

4.1.1. MTT ile IC₅₀ Dozu Belirleme

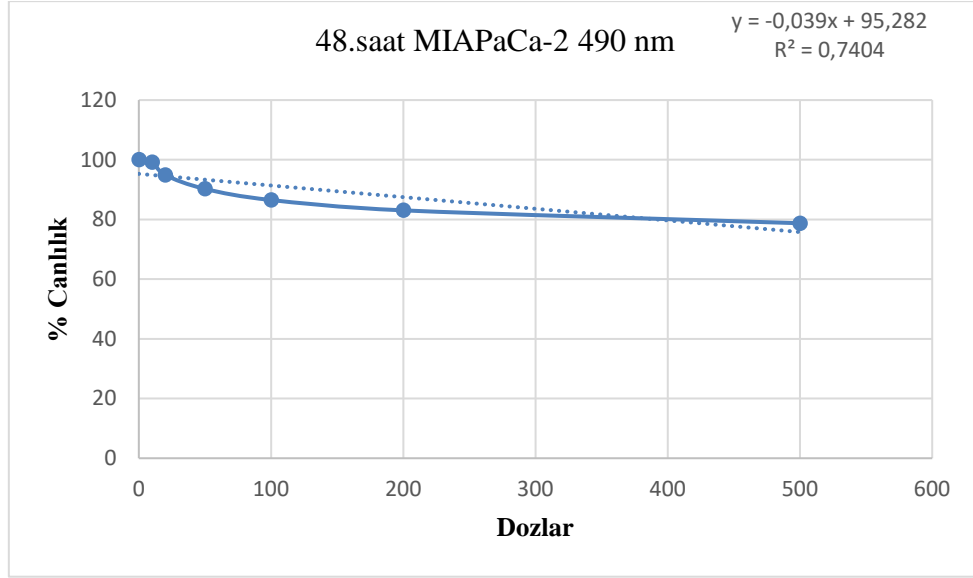
Yapılan deneyde 48. ve 72. saat absorbans değeri incelenmiş, maddenin özellikle MIAPaCa-2 hücre hattında 72. saatte (Şekil 4.3, Şekil 4.4) 48.saate (Şekil 4.1, Şekil 4.2) nazaran etkinliği gözlenmiş ve iki hücre hattında sonraki uygulamalar için ortak deney saati olarak 72. saat temel alınmıştır. Deney uygulaması kabul edilen saat üzerinden zaman ve doza bağlı yüzde canlılık grafiği çıkarılıp IC₅₀ dozu belirlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Grafik üzerindeki denklem üzerinde y değeri 50 seçilerek x (IC₅₀) değeri CFPAC-1 hücrelerinde 312,96 µM, MIAPaCa-2 hücre hattında 501,43 µM bulunmuştur. Uygulama gruplarında CFPAC-1 için 312 µM ve 156 µM, MIAPaCa-2 için 500 µM ve 250 µM dozları kullanılmıştır.

4.1.1.1. Proliferasyonun 48. saat deney sonucu

CFPAC-1 hücre hattı için 500 µM'daki canlılık %35,13 200 µM'daki canlılık %74,77 bulunmuştur. MIAPaCa-2 hücre hattı için 500 µM daki canlılık %78,73 200 µM daki canlılık %83,04 bulunmuştur.



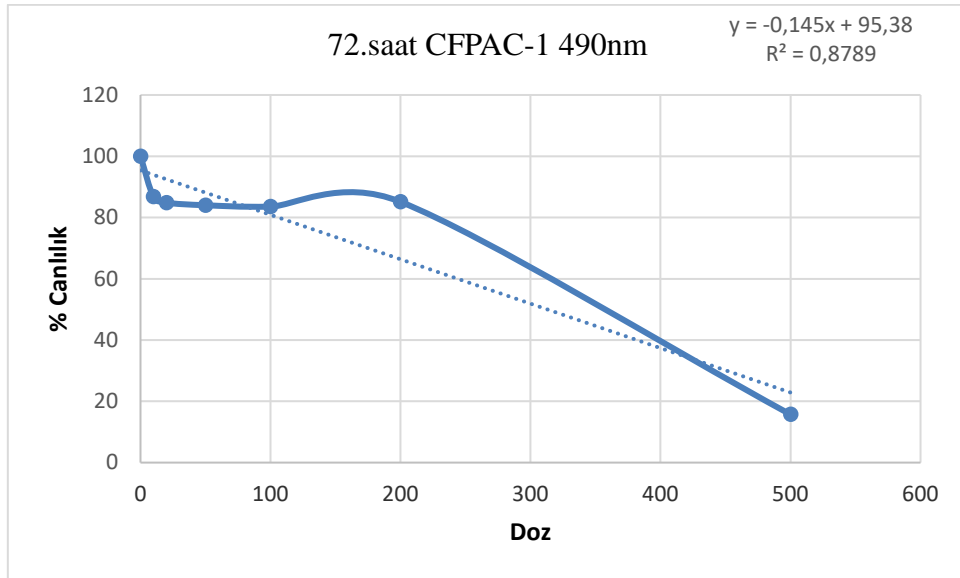
Şekil 4.1. Doz ve zamana bağlı olarak 48. saat CFPAC-1 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.



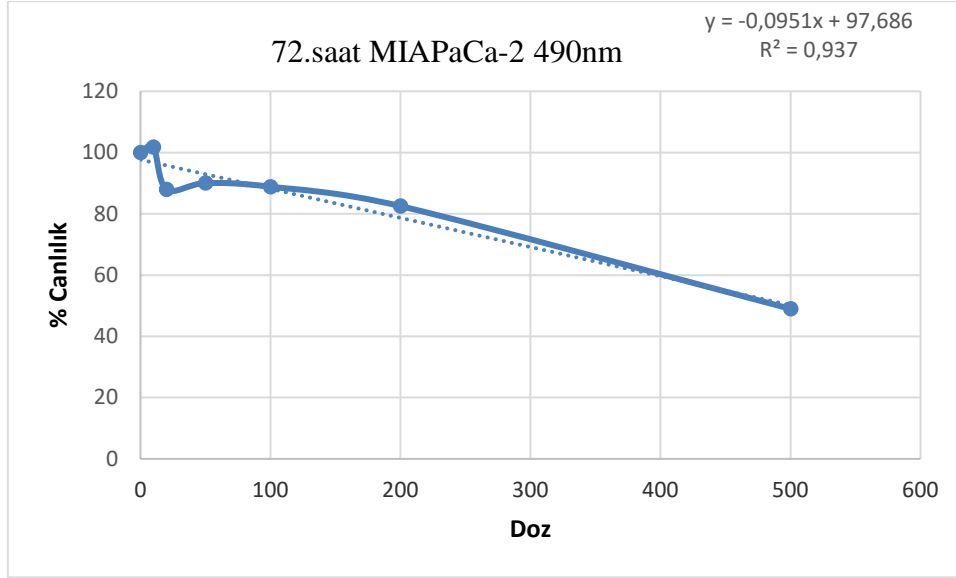
Şekil 4.2. Doz ve zamana bağlı olarak 48. saat MIAPaCa-2 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.

4.1.1.2. Proliferasyonun 72. saat deney sonucu

CFPAC-1 hücre hattı için 500 μM daki canlılık %15,70, 200 μM 'daki canlılık %85,12 bulunmuştur. MIAPaCa-2 hücre hattı için 500 μM daki canlılık %48,97, 200 μM 'daki canlılık %82,52 bulunmuştur.



Şekil 4.3. Doz ve zamana bağlı olarak 72. saat CFPAC-1 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.



Şekil 4.4. Doz ve zamana bağlı olarak 72. saat MIAPaCa-2 hücre hattına ait yüzde ve canlılık grafiği, 490nm.

Tablo 4.1. MTT testinde doz ve zamana bağlı olarak elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 48.SAAT CFPAC-1; Kontrol ve 500 μ M; $P < 0.001$ 500 μ M ve 10 μ M; $p < 0.001$ 500 μ M ve 20 μ M; $p < 0.001$ 500 μ M ve 50 μ M; $p = 0.001$
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 72.SAAT CFPAC-1; Kontrol ve 500 μ M; $P < 0.001$ 500 μ M ve 10 μ M; $p < 0.001$ 500 μ M ve 100 μ M; $p < 0.001$ 500 μ M ve 20 μ M; $p < 0.001$ 500 μ M ve 200 μ M; $p < 0.001$
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 48.SAAT MIAPaCa-2; Kontrol ve 500 μ M; $P = 0.02$ 500 μ M ve 10 μ M; $p = 0.02$ 500 μ M ve 20 μ M; $p = 0.009$ 500 μ M ve 50 μ M; $p = 0.045$
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 72.SAAT MIAPaCa-2; Gruplar arası anlamlı bir farklılık yoktur ($P > 0.05$).

Tablo 4.2. MTT testinde doz ve zamana bağlı olarak elde edilen verilerin özetlenmesi.

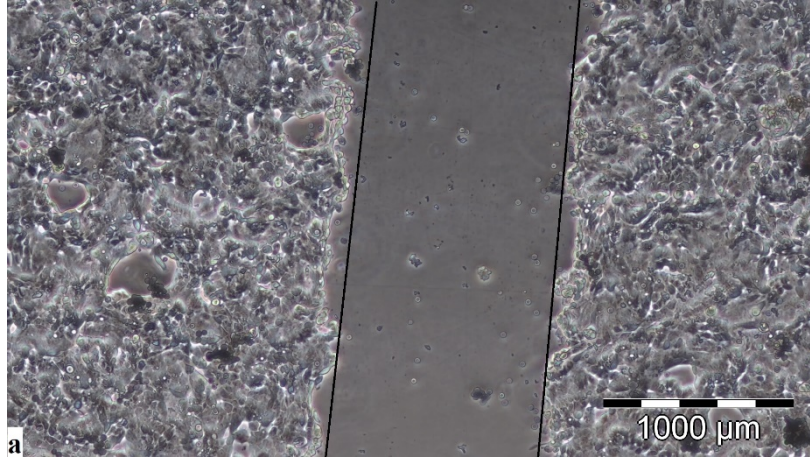
	500 µM	200 µM	100 µM	50 µM	20 µM	10 µM	Kontrol
48.saat CFPAC-1 Ortalama± St. sapma	0.43±0.08	0.92±0.05	0.96±0.05	1.06±0.04	1.12±0.09	1.21±0.22	1.23±0.25
72.saat CFPAC-1 Ortalama± St. sapma	0.27±0.03	1.49±0.16	1.46±0.06	1.53±0.06	1.42±0.13	1.52±0.03	1.75±0.11
48.saat MIAPaCa-2 Ortalama± St. sapma	0.56±0.03	0.65±0.09	0.68±0.04	0.71±0.02	0.74±0.04	0.78±0.02	0.78±0.06
72.saat MIAPaCa-2 Medyan [Min-Max]	0.80	1.34	1.43	1.53	1.43	1.67	1.70

4.1.2. Wound-Healing Yöntemi ile CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 Hücre Hatlarında Migrasyon Tayini

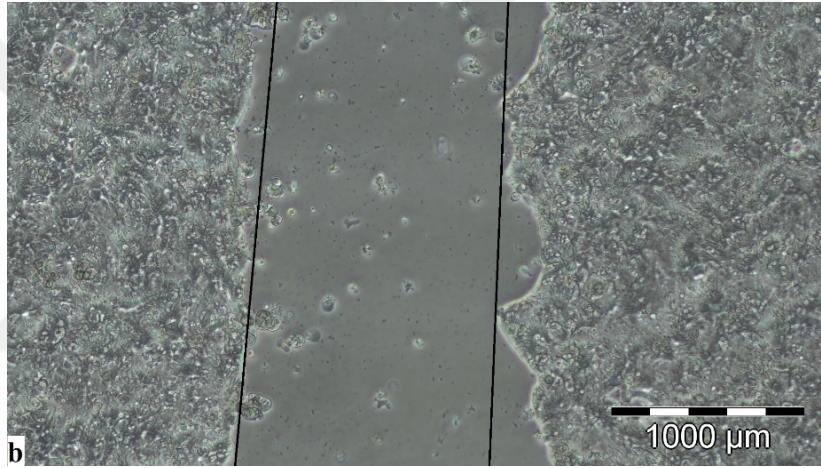
Wound- Healing yöntemi ile yara modeli oluşturulmuş iki hücre hattında da doz ve zamana bağlı olarak hücre göç mesafeleri ve yara kapanma oranları hesaplanmıştır.

4.1.2.1. CFPAC-1 hücre hattı üzerinde Wound-Healing deneyi

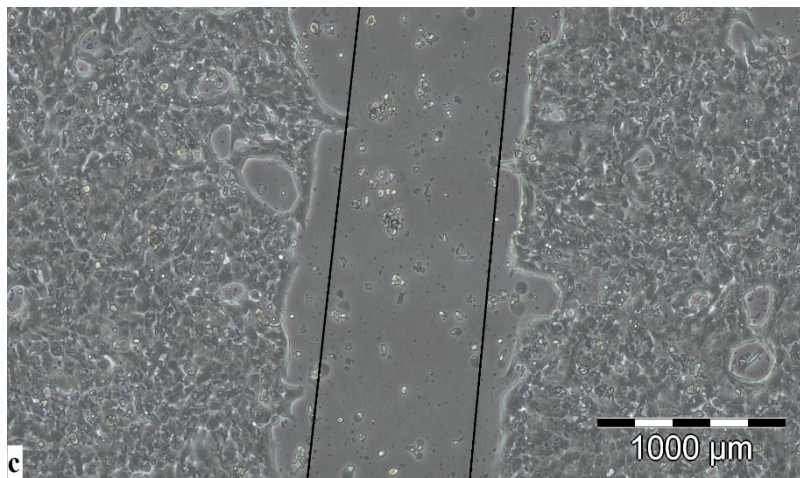
CFPAC-1 hücre hattına ait wound-healing deney sonuçları aşağıda verilmiştir.



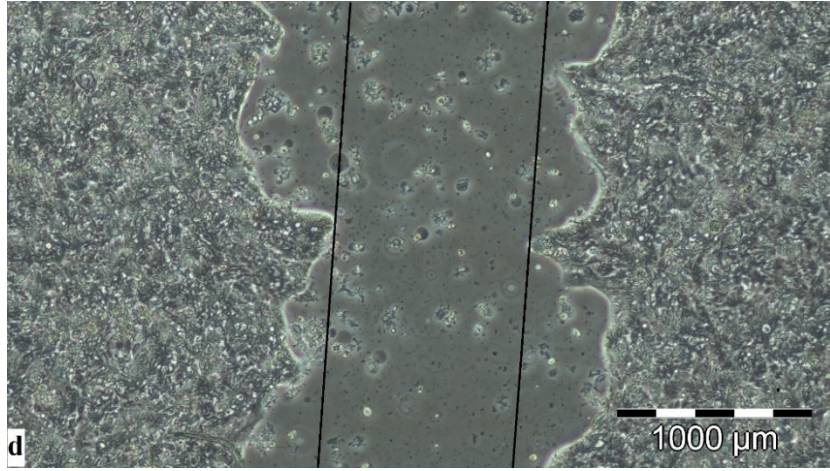
Şekil 4.5.a. CFPAC-1 hücre hattı 0. saat Kontrol grubu, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



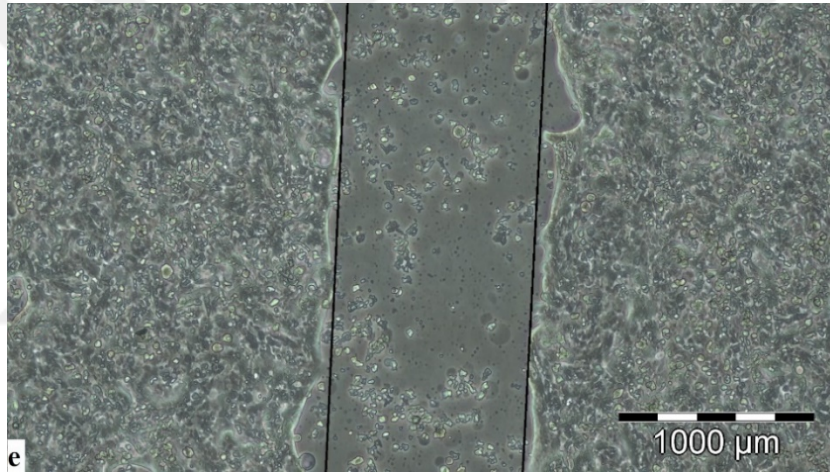
Şekil 4.5.b. CFPAC-1 IC₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 24. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



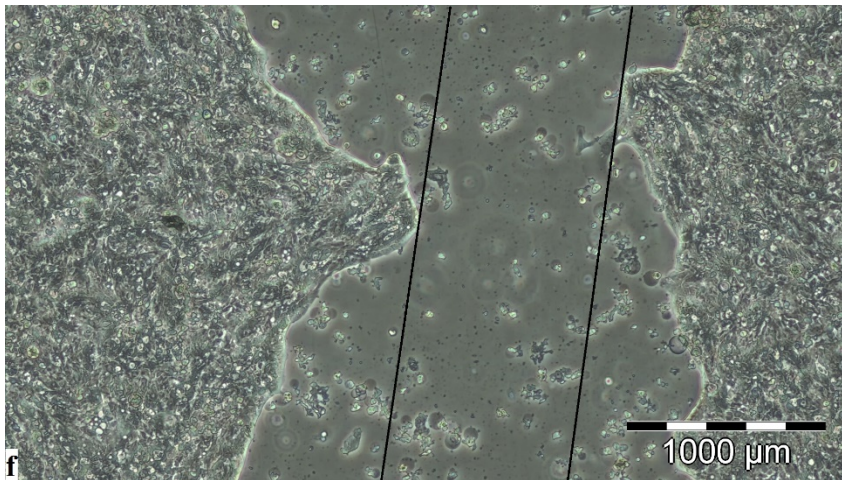
Şekil 4.5.c. CFPAC-1 IC₅₀/2 doz uygulaması yapılmış grup, 24.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



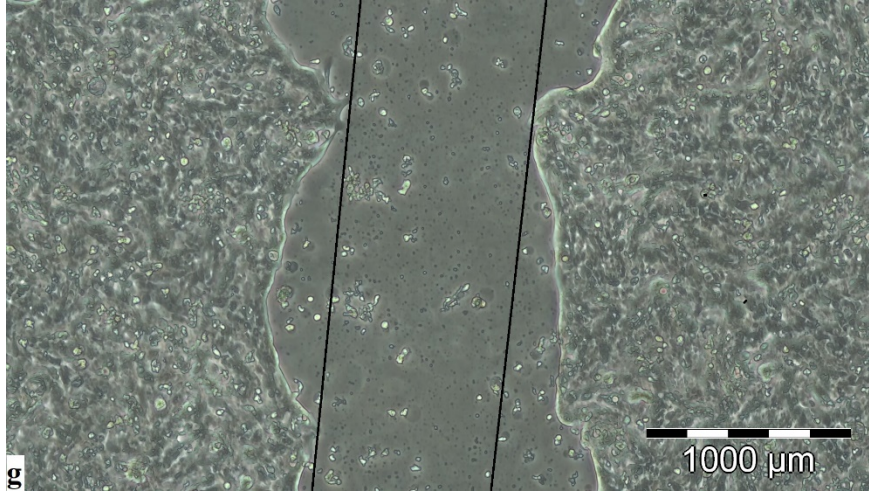
Şekil 4.5.d. CFPAC-1 IC₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



Şekil 4.5.e: CFPAC-1 IC₅₀/2 doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



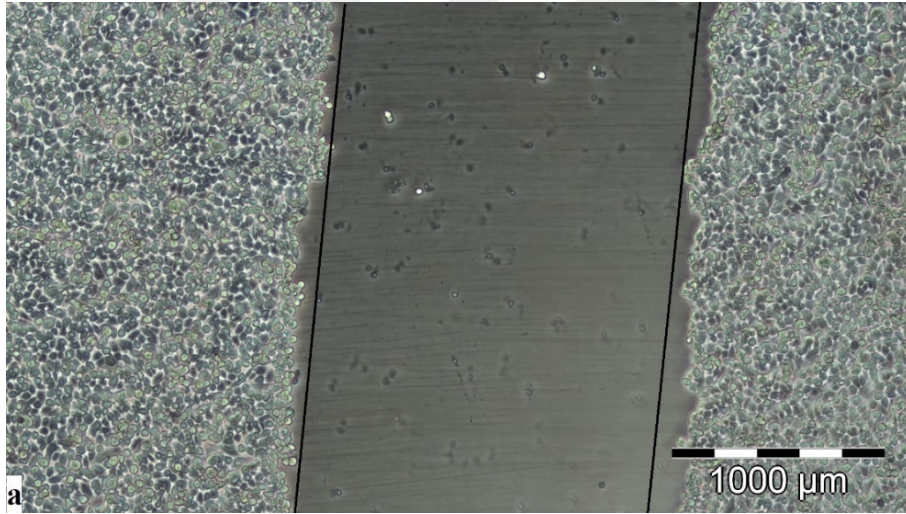
Şekil 4.5.f: CFPAC-1 IC₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



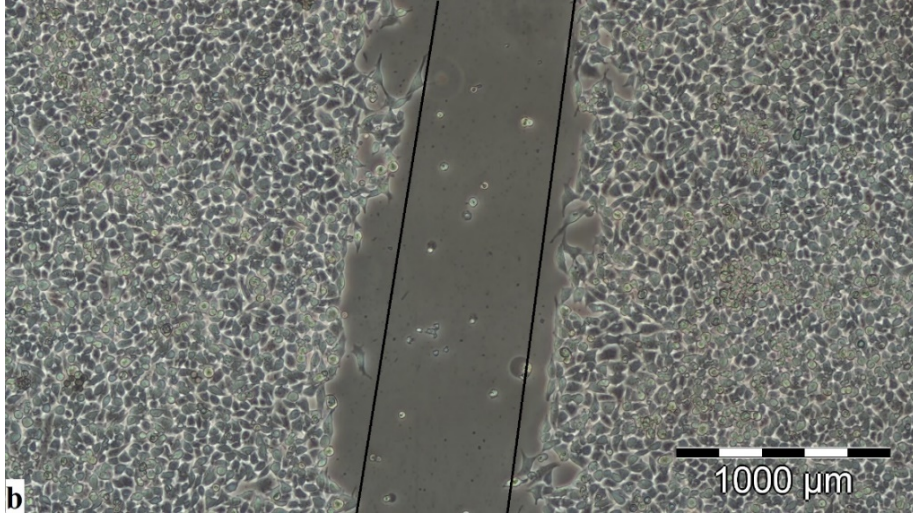
Şekil 4.5.g: CFPAC-1 IC₅₀/2 doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.

4.1.2.2. MIAPaCa-2 hücre hattı üzerinde Wound-Healing deneyi

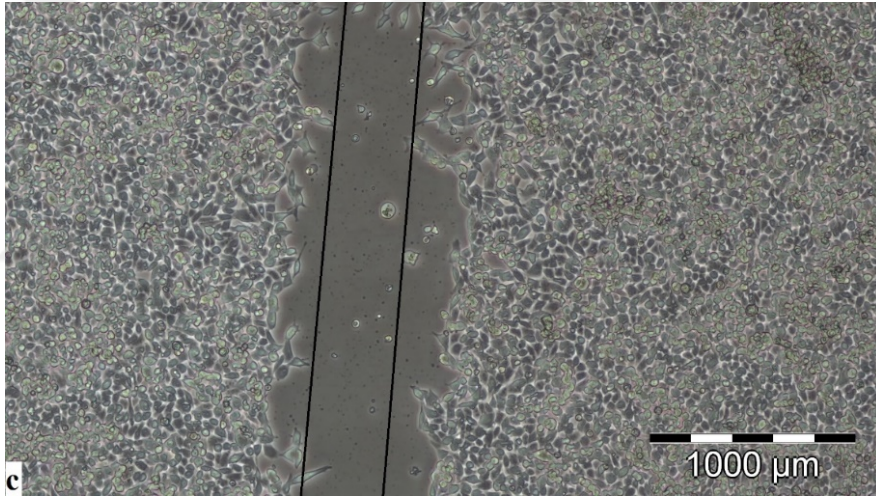
MIAPaCa-2 hücre hattına ait wound-healing deney sonuçları aşağıda alt alta verilmiştir.



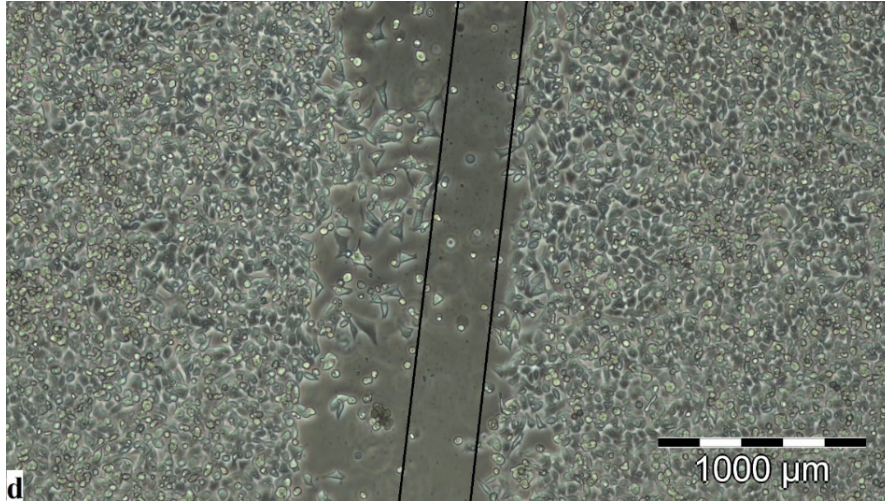
Şekil 4.6.a: MIAPaCa-2 Kontrol grubu, 0. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



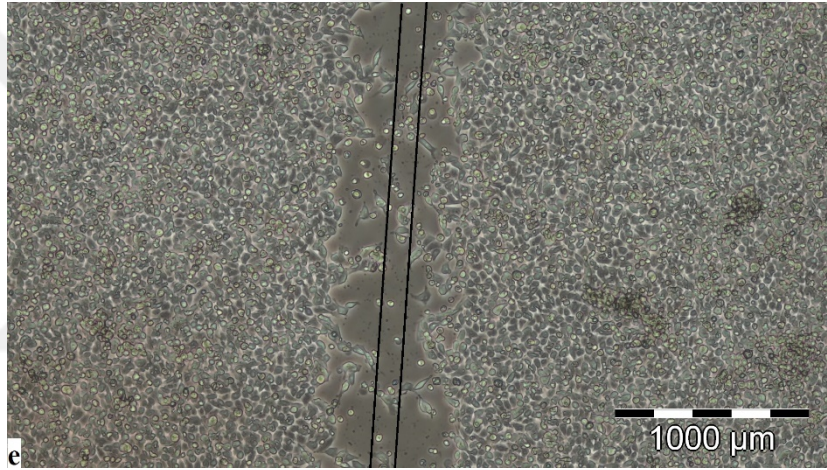
Şekil 4.6.b: MIAPaCa-2 IC_{50} doz uygulaması yapılmış grup, 24. Saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



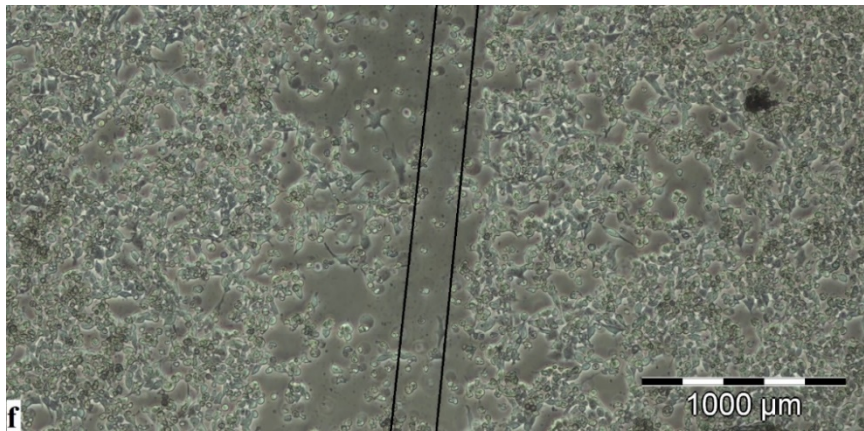
Şekil 4.6.c: MIAPaCa-2 $IC_{50}/2$ doz uygulaması yapılmış grup, 24. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



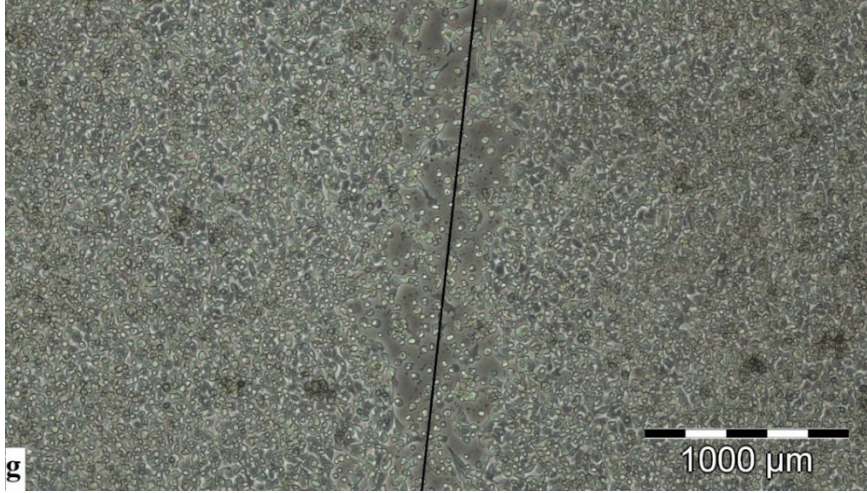
Şekil 4.6.d: MIAPaCa-2 IC₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



Şekil 4.6.e: MIAPaCa-2 IC₅₀/2 doz uygulaması yapılmış grup, 48.saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.

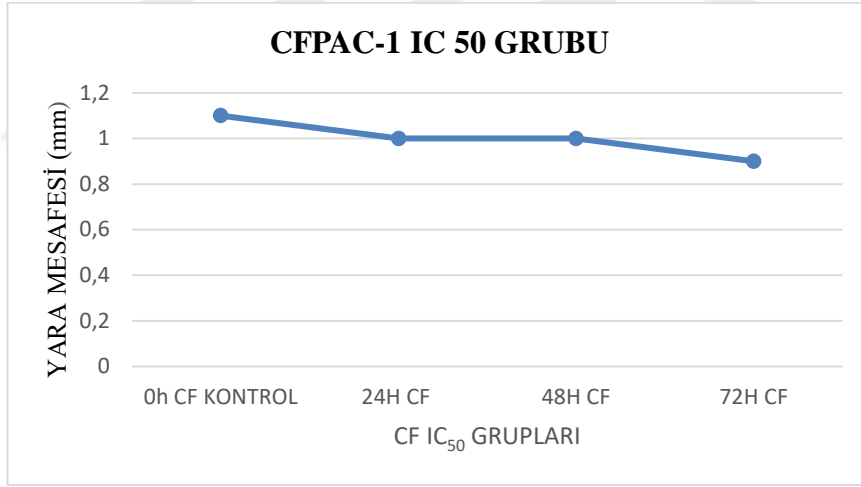


Şekil 4.6.f: MIAPaCa-2 IC₅₀ doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.

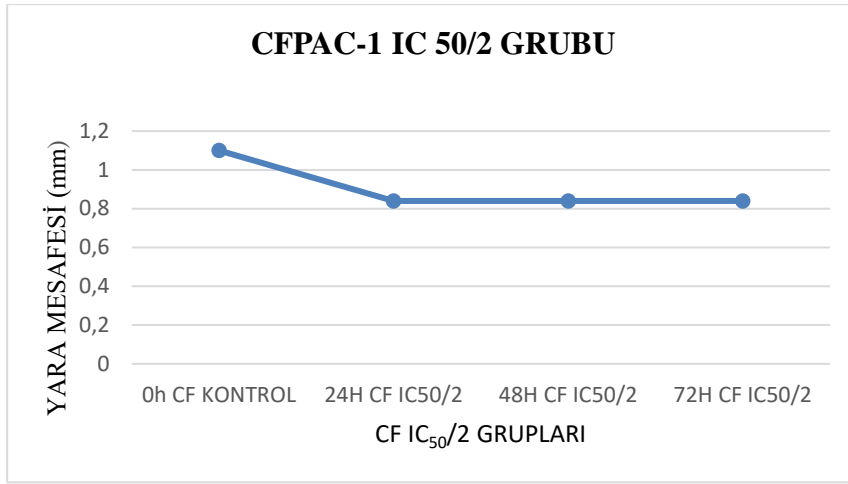


Şekil 4.6.g: MIAPaCa-2 IC₅₀/2 doz uygulaması yapılmış grup, 72. saat, 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.

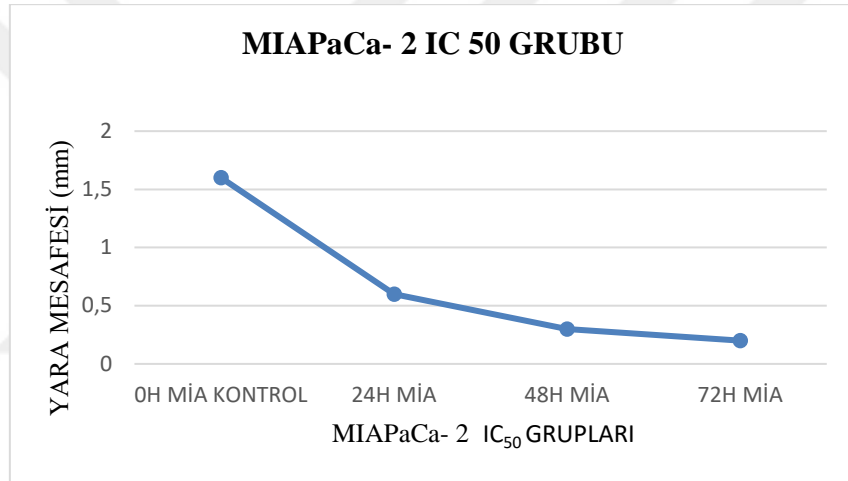
Wound- Healing deneyi için doz ve zamana bağlı olarak yara mesafeleri ve yara kapanma oranları aşağıdaki gibidir.



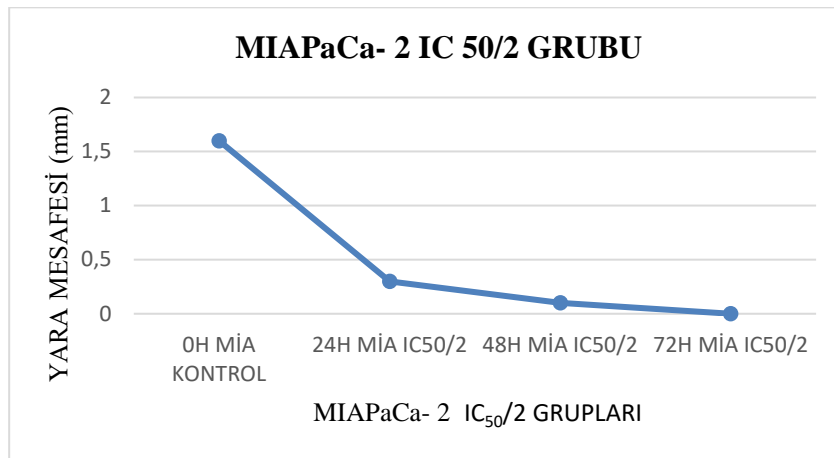
Şekil 4.7. CFPAC-1 IC₅₀ gruplarında zamana bağlı olarak yara kapanma mesafesi.



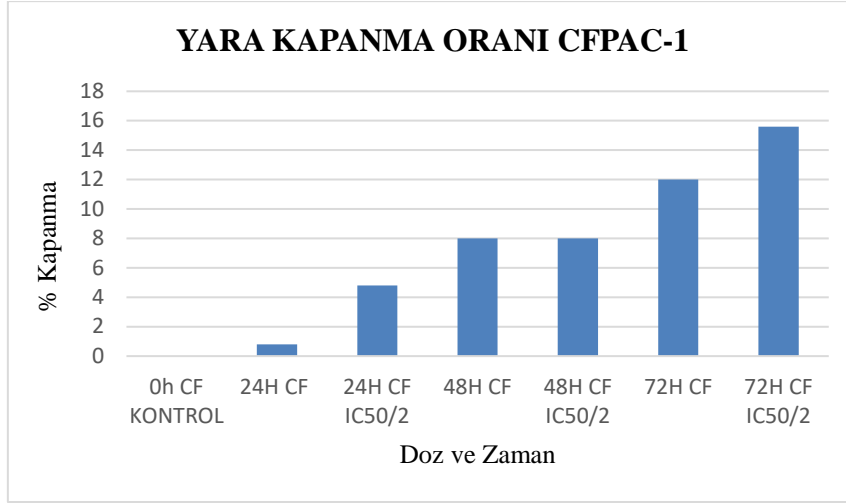
Şekil 4.8. CFPAC-1 IC₅₀/2 gruplarında zamana bağlı olarak yara kapanma mesafesi.



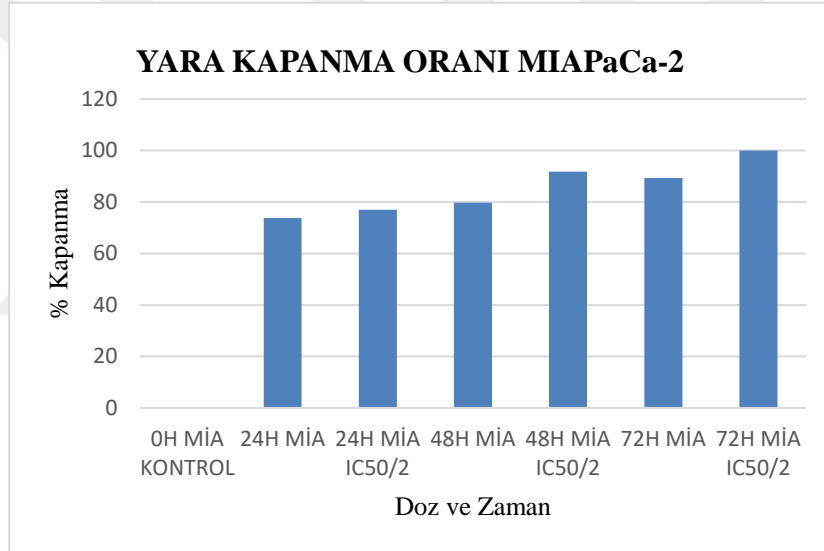
Şekil 4.9. MIAPaCa- 2 IC₅₀ gruplarında zamana bağlı yara kapanma mesafesi.



Şekil 4.10. MIAPaCa- 2 IC₅₀/2 gruplarında zamana bağlı yara kapanma mesafesi.



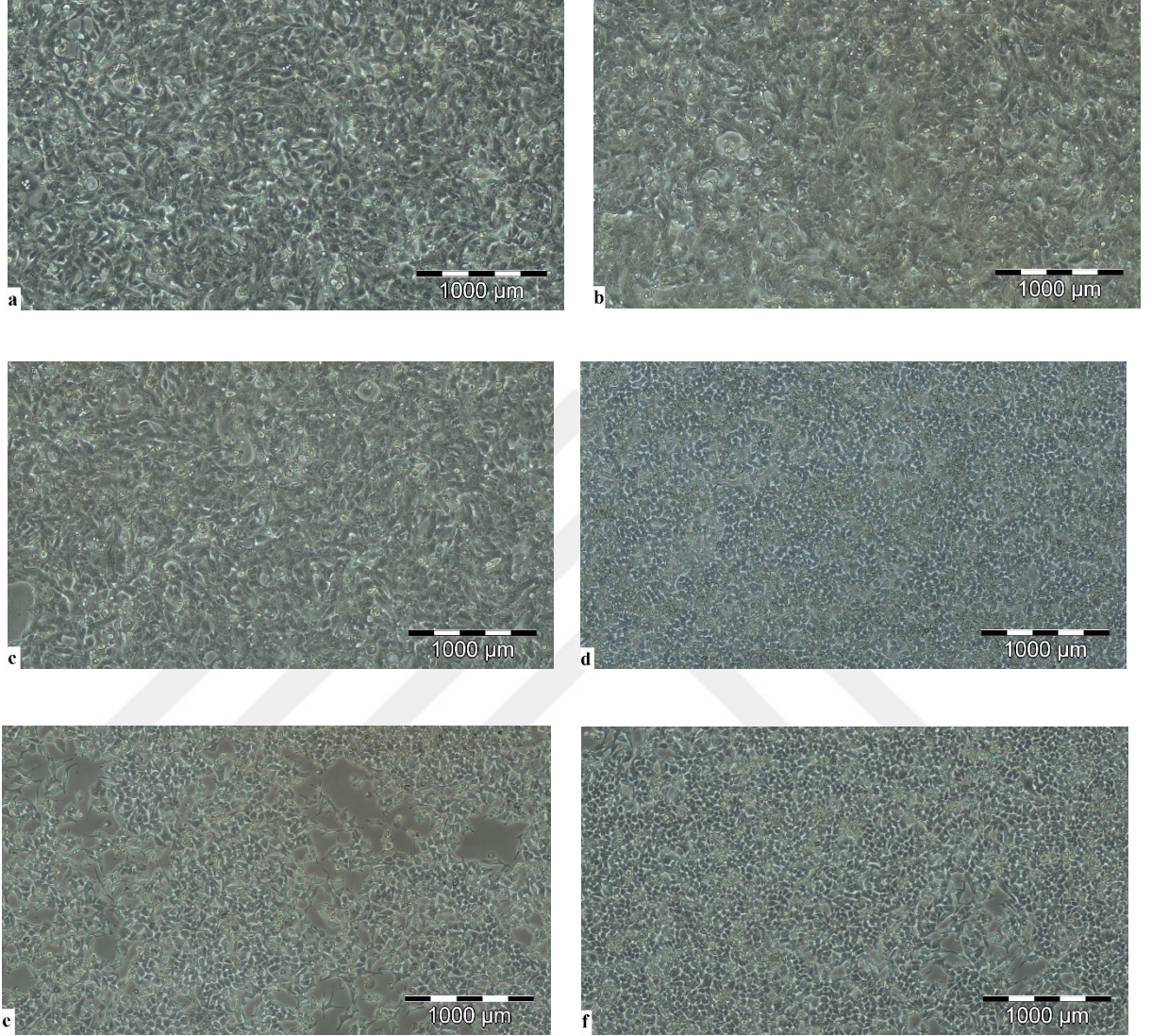
Şekil 4.11. CFPAC-1 IC₅₀ ve IC₅₀/2 gruplarında doz ve zamana bağlı yara kapanma oranları.



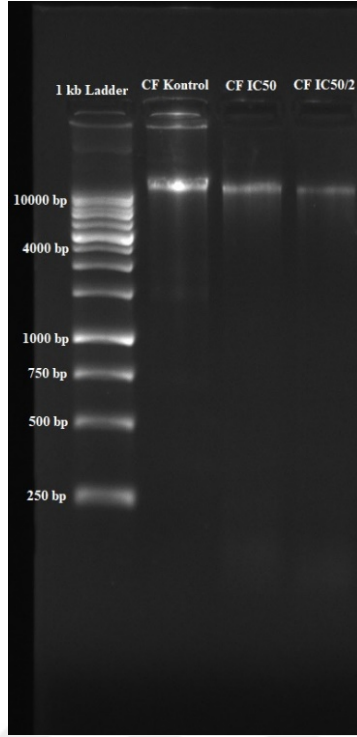
Şekil 4.12. MIAPaCa-2 IC₅₀ ve IC₅₀/2 gruplarında doz ve zamana bağlı yara kapanma oranları.

4.1.3. DNA jel elektroforez ile apoptoz tayini

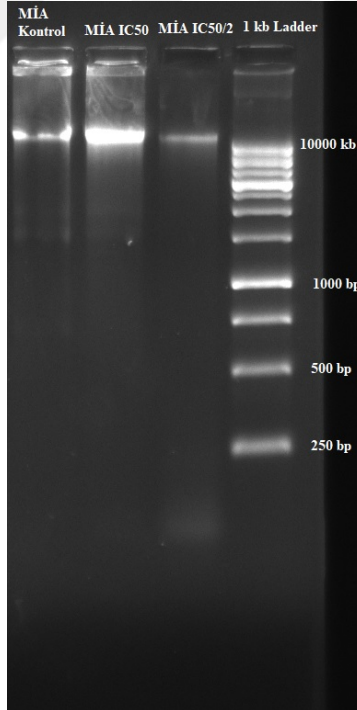
DNA ve RNA izolasyon öncesi 6 lı kuyucuklarda hücre morfolojileri şekildeki gibidir.



Şekil 4.13 Viteksin maddesi ile 48 saat uygulama yapılmış hücre morfolojileri görüntüleri. **a:** CFPAC-1 Kontrol grubu, **b:** CFPAC-1 IC₅₀ dozu, **c:** CFPAC-1 IC₅₀/2 dozu, **d:** MIAPaCa-2 Kontrol grubu, **e:** MIAPaCa-2 IC₅₀ dozu, **f:** MIAPaCa-2 IC₅₀/2 dozu. 4x büyütme, bar uzunluğu 1mm.



Şekil 4.14. CFPAC-1 hücre hattına ait doz ve zamana bağlı jel elektroforez görüntüsü, Ladder; 1 kb.



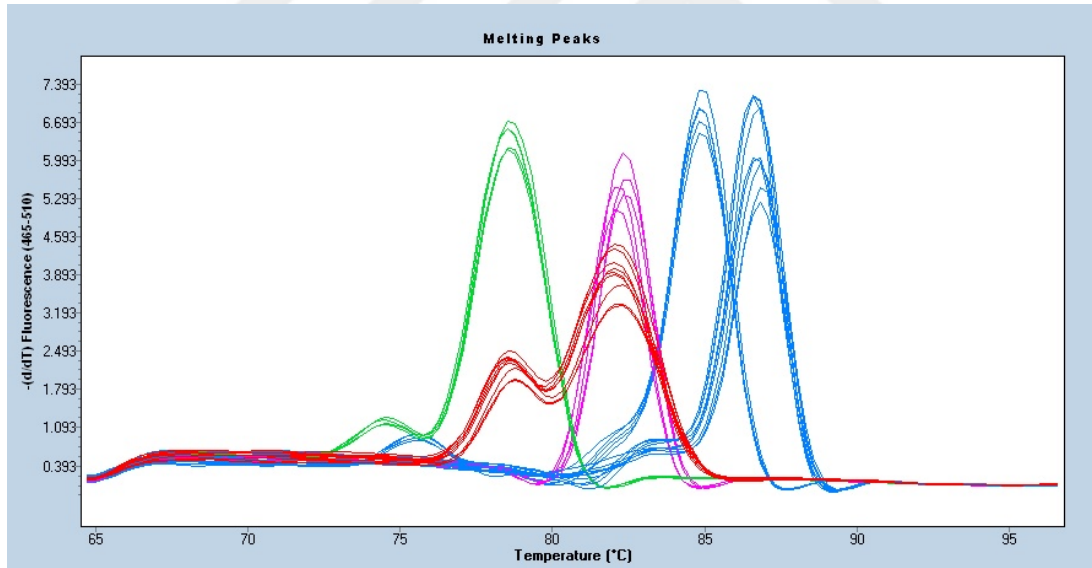
Şekil 4.15. MIAPaCa-2 hücre hattına ait doz ve zamana bağlı jel elektroforez görüntüsü, Ladder; 1 kb.

4.1.4. CFPAC-1, MIAPaCa-2 Hücrelerinde Apoptoz ve Metastaz Yolağı ile ilişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

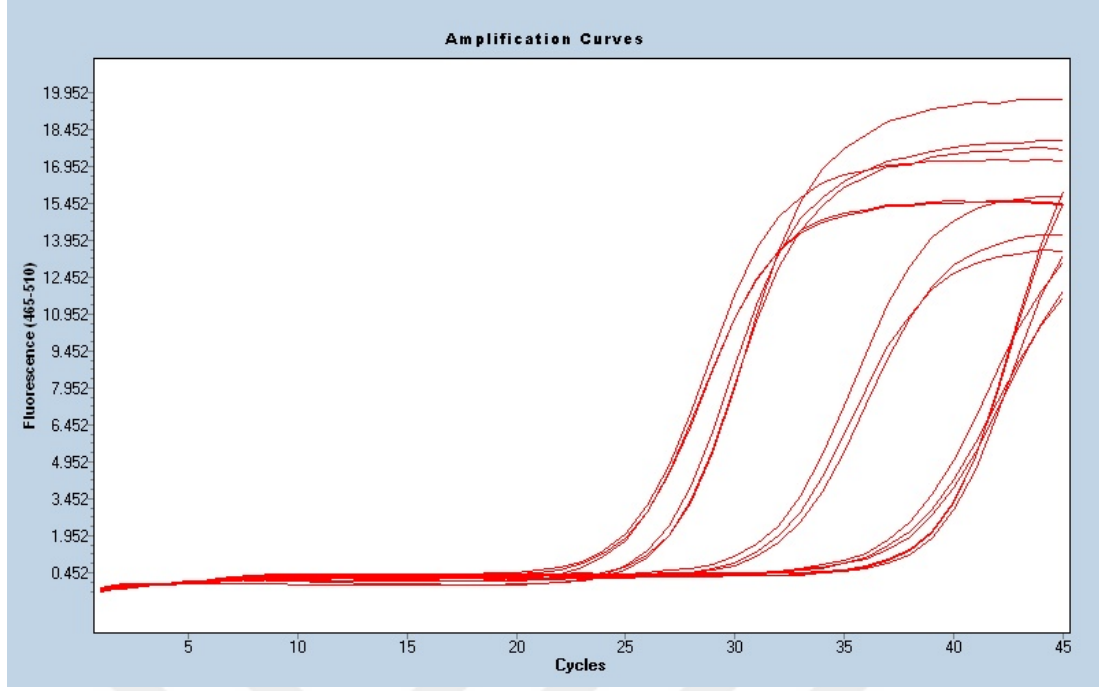
CFPAC-1 VE MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat kontrol ve doz uygulaması yapılmış, RNA'lar izole edilmiş ve Nanodrop cihazında ölçülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.3. CFPAC-1 VE MIAPaCa-2 hücre hatlarına ait RNA'ların Nanodrop ölçüm sonuçları ve cDNA sentezi için gerekli nükleik asit miktarları.

Örnek adı	Nükleik asit miktarı (ng/µl)	260/280 (Abs)	260/230 (Abs)	Örnek Tipi	cDNA için kullanılan miktar
Kör	0.3	1,96	1,17	Blank	
Cfpac-1 Kontrol	284,4	2,03	2,05	RNA	4 µl
Cfpac-1 IC50	274,2	2,03	2,16	RNA	4 µl
Cfpac-1 IC50/2	308,6	2,4	2,16	RNA	4 µl
Miapaca-2 Kontrol	539,8	2,11	2,12	RNA	2 µl
Miapaca-2 IC50	444,4	2,03	2,16	RNA	3 µl
Miapaca-2 IC50/2	418,1	2,01	2,21	RNA	3 µl



Şekil 4.16. Genlere ait erime pikleri.



Şekil 4.17. Genlere ait amplifikasyon eğrileri.

4.1.4.1. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 Hücre Hatlarında Metastas ile ilgili Genlerin İfade Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

Tablo 4.4. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve ZEB-1 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları

GRUPLAR	ACTB	ZEB-1	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ortalama \pm st.sapma	Medyan[Min-Max]
Kontrol CF	24,67	24,6	-0,07	0	1	24.6 \pm 0.0608	-
CF IC₅₀	24,08	24,98	0,9	0,97	0,51050606 \downarrow **	25 \pm 0.150	-
CF IC₅₀/2	21,98	25,12	3,14	3,21	0,10806715 \downarrow **	25.1 \pm 0.101	-
KONTROL MIA	26,83	27,86	1,03	0	1	-	23.6
MIA IC₅₀	28,75	26,15	-2,6	-3,63	12,3805199 \uparrow	-	25.9
MIA IC₅₀/2	28,68	24,63	-4,05	-5,08	33,8245773 \uparrow	-	24.6

İSTATİSTİKSEL SONUÇ;

P<0.05; *, P<0.01; **

Kontrol CF ve CF IC₅₀; p=0.013.

Kontrol CF ve CF IC₅₀/2; p= 0.003.

MIAPaCa-2 hücre hattında gruplar arası anlamlı bir farklılık yoktur (P>0.05).

Metastaz ile ilişkili ZEB-1 geni, referans gen ACTB ile ele alındığında CFPAC-1 hücre hattında yüksek dozda 0,5 kat azalış gösterirken, düşük dozda yaklaşık 0,9 kat azaldığı görülmektedir. MIAPaCa-2 hücre hattında ise yüksek dozda yaklaşık 11 kat arttığı, düşük dozda yaklaşık 32 kat arttığı gözlenmiştir.

4.1.4.2. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 Hücre Hatlarında Apoptoz ile ilgili Genlerin İfade Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

Tablo 4.5. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve Kaspaz-3 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları

GRUPLAR	ACTB	KASPAZ-3	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT	Ortalama±st.sapma
Kontrol CF	24,67	34,89	10,22	0	1	34.9±0.101
CF IC₅₀	24,08	34,8	10,72	-0,5	1,41421356↑	34.8±0.387
CF IC₅₀/2	21,98	34,78	12,8	2,58	0,16724094↓	34.8±0.594
KONTROL MIA						37.6±0.348
MIA IC₅₀	26,83	37,6	10,77	0	1	35.3±0.121
MIA IC₅₀/2	28,75	35,37	6,62	-4,15	17,7531116↑**	35.7±1.16
MIA IC₅₀/2	26,97	35,66	8,69	-2,08	4,22807216↑**	
İSTATİSTİKSEL SONUÇ;						
P<0.05; *, P<0.01; **						
CFFAC-1 hücre hattı grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktur (P>0.05).						
KONTROL MIA ve MIA IC ₅₀ ; p= 0.017.						
KONTROL MIA ve MIA IC ₅₀ /2; p= 0.034.						

Apoptoz ile ilişkili kaspaz-3 geni, referans gen ACTB ile ele alındığında CFPAC-1 hücre hattında yüksek dozda 0,4 kat artış gösterirken düşük dozda bu miktarın yaklaşık olarak 0,8 kat azaldığı görülmektedir. MIAPaCa-2 hücre hattında yüksek dozda yaklaşık 16 kat, düşük dozda yaklaşık 3 kat arttığı gözlenmiştir.

Tablo 4.6. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve Kaspaz-8 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları

GRUPLAR	ACTB	KASPAZ-8	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT	Ortalama±st.sapma
Kontrol CF	24,67	29,59	4,92	0	1	29.6±0.147
CF IC₅₀	24,08	29,28	5,2	0,28	0,82359102↓	29.3±0.599
CF IC₅₀/2	21,98	40	18,02	13,1	0,0001139↓***	40±0.00577
KONTROL MIA						34±0.300
MIA IC₅₀	26,83	34,01	7,18	0	1	35.4±0.202
MIA IC₅₀/2	28,75	35,97	7,22	0,04	0,97265495↓**	35.5±0.527
MIA IC₅₀/2	26,97	35,97	9	1,82	0,28322097↓**	
İSTATİSTİKSEL SONUÇ;						
P<0.05; *, P<0.01; **, P<0.001; ***						
Kontrol CF ve CF IC ₅₀ /2; p<0.001						
CF IC ₅₀ ve CF IC ₅₀ /2; p<0.001						
KONTROL MIA ve MIA IC ₅₀ ; p= 0.009.						
KONTROL MIA ve MIA IC ₅₀ /2; p= 0.005.						

Apoptoz ile ilişkili kaspaz-8 geni, referans gen ACTB ile ele alındığında CFPAC-1 hücre hattında yüksek dozda 0,2 kat azalış gösterirken, düşük dozda bu miktarın yaklaşık 1 kat azalış gösterdiği görülmektedir. MIAPaCa-2 hücre hattında ise yüksek dozda değişim göstermemekle birlikte, düşük dozda yaklaşık 0,7 kat azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.7. CFPAC-1, MIAPaCa-2 hücre hatlarında 48. saat ACTB ve Kaspaz-9 genleri ifadesi ve verilerin istatistiksel analiz sonuçları

GRUPLAR	ACTB	KASPAZ-9	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Ortalama \pm st.sapma
Kontrol CF	24,67	29,37	4,7	0	1	29.4 \pm 0.117
CF IC₅₀	24,08	29,05	4,97	0,27	0,82931955↓	29.1 \pm 0.375
CF IC₅₀/2	21,98	32,07	10,09	5,39	0,0238478↓***	32.1 \pm 0.350
KONTROL MİA	26,83	30,29	3,46	0	1	37.6 \pm 0.348
MİA IC₅₀	28,75	29,86	1,11	-2,35	5,09824251↑	35.3 \pm 0.121
MİA IC₅₀/2	26,97	29,53	2,56	-0,9	1,86606598↑	35.7 \pm 1.16
İSTATİSTİKSEL SONUÇ;						
P<0.05; *, P<0.01; **, P<0.001; ***						
CF IC ₅₀ ve CF IC ₅₀ /2; p<0.001.						
Kontrol CF ve CF IC ₅₀ /2; p<0.001.						
MİAPaCa-2 hücre hattında gruplar arası anlamlı bir farklılık yoktur (P>0.05).						

Apoptoz ile ilişkili kaspaz-9 geni, referans gen ACTB ile ele alındığında CFPAC-1 hücre hattında yüksek dozda yaklaşık 2 kat azalış gösterirken, düşük dozda yaklaşık 1 kat azaldığı görülmektedir. MIAPaCa-2 hücre hattında ise yüksek dozda yaklaşık 4 kat arttığı, düşük dozda yaklaşık 1 kat arttığı gözlenmiştir.

Tablo değerleri genler ve hücre hatları açısından yorumlandığında;

CFPAC-1 hücre hattına bakıldığında yalnızca Kaspas-3'te 1,4 kat artış gözlenmiştir. Diğer apoptotik genler açısından viteksin uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde apoptoz anlamlı çıkmamıştır. Ancak, Zeb-1 gen ifadesi ve Wound-healing (yara kapanma) deneyi açısından oldukça anlamlıdır. Viteksinin anti-migratif ve anti-metastatik etkinliğine işaret etmektedir.

Viteksin uygulanan primer bir tümör olan MIAPaCa-2 hücre hattında Kaspaz-3, Kaspaz-9 gen ifadesine bakıldığında apoptozun oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. DNA fragmantasyon deneyinde belirgin apoptotik bantlar (180bp ve katları) gözlenmemiştir. Yüksek Zeb-1 gen ifadesi ve Wound-healing (yara kapanma) deneyi açısından bakıldığında, viteksinin primer tümör hücresi olan MIAPaCa-2' de anti-migratif ve anti-metastatik bir etkide olamayacağını düşündürmektedir.

4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada, CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hatlarında bir doğal flavonoid olan viteksinin MTT, DNA Jel elektroforez, Wound-healing, Real Time PCR deneyleri ile anti-metastatik/migratif, anti-proliferatif, apoptotik etkinlikleri incelenmiştir. MTT testi ile 48. saat sonunda yüzde canlılık CFPAC-1 hücre hattında 500 μM için %35.13, 200 μM için %74.77, MIAPaCa-2 hücre hattında 500 μM için yüzde canlılık %78.73 200 μM için %83.04 bulunmuştur. 72. saatte ise yüzde canlılık CFPAC-1 hücre hattında 500 μM için %15.70, 200 μM için %85.12 bulunmuştur. MIAPaCa-2 hücre hattında 500 μM için %48.97, 200 μM için yüzde canlılık %82.52 bulunmuştur. MIAPaCa-2 hücre hattında 72. saatte 48.saatte nazaran etkinliği gözlemlenmiş ve iki hücre hattında sonraki uygulamalar için ortak deney saati olarak 72. saat temel alınmıştır. Deney uygulaması kabul edilen saat üzerinden zaman ve doza bağlı yüzde canlılık grafiği çıkarılıp IC_{50} dozu belirlenmiştir. MIAPaCa-2 hücre hattı için yaklaşık olarak IC_{50} dozu: 500 μM , $\text{IC}_{50}/2$: 250 μM , CFPAC-1 hücre hattı için IC_{50} dozu: 312 μM , $\text{IC}_{50}/2$: 156 μM olarak bulunmuştur.

DNA Jel elektroforez deneyinde her grup için 1 milyon hücre kullanılmış, 48. saat maruziyetten sonra hücrelerden DNA izole edilip %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Yapılan DNA fragmantasyon deneyinde belirgin bir genomik DNA hasarı her iki hücre hattında da gözlenmemiştir.

Wound-healing deneyinde her grup için 1 milyon hücre kullanılmış, prosedür uygulandıktan sonra 0. saatten itibaren görüntülemeler alınmış ölçümler belirtilen programdan yapılmıştır. Deney sonucuna bakıldığında yara kapanma oranı CFPAC-1 hücre hattında %16'de iken, MIAPaCa-2'da %100 oranında olduğu görülmüştür.

Real Time PCR ile gen ifadesi deneyinde her grup için 1 milyon hücreden maruziyet sonrası total RNA'lar izole edilmiş, cDNA'ya çevrilip kontrol gen ACTB, metastatik gen ZEB-1, apoptotik genler; Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ile sonuçlara bakıldığında, Viteksin IC_{50} uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz-3'te 0,4 kat artış gözlenirken, MIAPaCa-2 hücrelerinde kaspaz-3'te 16 kat artış ($P<0.05$), kaspaz-9'da 4 kat artış gözlemlenmiştir. Zeb-1 açısından incelendiğinde, CFPAC-1 hücre hattında 0,5 kat azalma ($P<0.05$), MIAPaCa-2 hücre hattında da 11 kat artış gözlemlenmiştir. Viteksin $\text{IC}_{50}/2$ uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz-3'te 0,8 kat azalış ($P<0.05$) gözlenirken, MIAPaCa-2 hücrelerinde kaspaz-3'te 3 artış ($P<0.05$), kaspaz-9'da 1 kat artış gözlemlenmiştir. Zeb-1 açısından incelendiğinde CFPAC-1 hücre hattında 0,9 kat azalma, MIAPaCa-2 hücre hattında da 32 kat artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-8 ifadesi her iki hücre hattında da azalmıştır. MIAPaCa-2 hücre hattında apoptozun iç yoldan gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

Lee vd., 2012'de yaptığı çalışmada Vitexinin U937 hücre hattı üzerine yaptığı çalışmada MTT testinde 1×10^4 hücre kullanarak 0, 50, 100, 200 ve 400 μM doz uygulaması yapmıştır. IC_{50} dozunu 24. Saat için $\sim 200.34 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır. 200 ve 400 μM uygulama dozu olarak seçilip Jel elektrofozle DNA fragmantasyon deneyi yapmışlardır. Deney sonucunda 48 saat maddeye maruz kalan hücreler jelde yürütülmüş ve DNA fragmantasyonları gözlemlenmişlerdir. Aynı çalışmada Viteksinin aktif

kaspaz-3, aktif kaspaz-7 ve aktif kaspaz-9 ifadelerinin doz ve zamana bağlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. Western blotting yöntemiyle incelendiğinde Bcl-2 protein seviyesinin azaldığı gözlemlemişlerdir. Böylece apoptotik etkiyi iç yolak kaynaklı olarak yorumlamışlardır. Akış sitometrisiyle mitokondri membran potansiyeli incelenmiş ve doz ve zamana bağlı olarak azalma gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamıza bakıldığında MIAPaCa-2 hücre hattında apoptotik genler olan Kaspas-3 ve -9 un belirgin olarak artarak iç yoldan gerçekleştiğini bu çalışmada olduğu gibi gözlenmiştir.

Liu vd., 2019'da yaptığı Viteksin'in A549 (human lung carcinoma) ve 16HBE (human bronchial epithelial) hücre hattı üzerinde yaptığı MTT çalışmasında 5×10^3 hücre ve 0, 10, 20, 40 μM doz uygulaması yapılmıştır. Doz ve zamana bağlı olarak A549 hücre hattında hücre canlılığında azalma gözlenirse de 16HBE hücre hattında herhangi bir toksisite oluşturmadığı gözlenmiştir. Diğer deney setlerine bu dört grup ile devam etmişlerdir. A549 hücre hattında Mitokondri fonksiyon bozukluğu, western blot yöntemi sonucu ile de p-PI3K, p-Akt ve p-mTOR sinyal yollarını inaktive ettiği gözlemlemişlerdir. Bcl-2/Bax oranında azalma, aktif kaspaz-3 oranında artış gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da iki hücre hattında da kaspas-3 oranında artış gözlenmiştir.

Li vd., 2020'de Viteksinin OS-RC-2, ACHN (Renal karsinom hücre hatları) ve HK-2 (normal tubular) hücre hattı üzerine yaptığı çalışma kapsamında CCK-8 deneyinde 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM doz grupları kullanmış ve 70 μM 'in HK-2 hücre hattı üzerine belirgin bir etkisini gözlemlemişlerdir. Devam eden deney setinde 0, 10, 20, 40 μM uygulamaları OS-RC-2, ACHN hücre hatları için yapmışlardır. Doza bağlı olarak Kaspaz-3, Kaspaz-9, aktif Kaspaz-3, aktif Kaspaz-9 apoptotik marker proteinlerinde artış gözlemlemişlerdir. AMPK/mTOR, PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarını Western Blot yöntemi ile incelenmek istendiğinde OS-RC-2 hücre hattına 40 μM Viteksin uygulaması yapılmış ve hücre büyümesinin inhibe edildiği apoptozu ve otofajinin indüklendiği gözlemlenmiştir. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hattında kaspaz-3 atışı gözlenirse de kaspas-9 artışı MIAPaCa-2 hücre hattında mevcuttur.

Yang vd., 2013'te Viteksin (Apigenin-8-C-D-glucopyranoside)'in OC2 (Human oral cancer) Hücre hattında yaptığı çalışmada hücre canlılık testinde 0, 12.5, 25, 50, 100 μM doz gruplarını kullanmış 25 μM doz grubundan itibaren canlılıkta bir azalma gözlemlemişlerdir. Makalede paylaşılan % canlılık grafiğinde 100 μM doz grup karşılığında canlılık %85 görülmektedir. Diğer deney setlerinde doz uygulaması olarak 0, 12.5, 25, 50 and 100 μM grupları kullanılmıştır. Transwell chamber yöntemi ile migrasyonu incelediklerinde migrasyonun %20 oranında inhibe edildiği gözlemlenmiştir. P53'e bağlı metastatik ve apoptotik yolların (p53-PAI1-MMP2 ve p53-PPARg-kaspaz-3 kaskadları) indüklendiğini keşfetmişlerdir. Bizim çalışmamızda CFPAC-1 hücre hattında migrasyon inhibasyonu, MIAPaCa-2 hücre hattında apoptoz indüklenmesi gözlenmiştir.

Choi vd., 2006'da Viteksinin PC12 (rat pheochromocytoma) hücre hattı üzerinde yaptığı MTT testinde 5×10^3 hücre, doz grupları olarak 0.2, 2, 20, and 50 μM dozlarını kullanmış ve hücre ölümünü 50 μM 'da %86 bulmuşlardır. Ekip 20 μM 'dan daha az doz grubu kullanmaya karar vermişlerdir.

Viteksinin HIF-1 α protein seviyesini etkilemediği gözlemlenince de hipoksiye bağlı genlerin mRNA seviyesini azalttığını keşfetmişlerdir. *In-vitro* invazyon ve migrasyon deney sonucuna bakıldığında 20 μ M'da %66 invazyonun inhibe edildiği gözlemlenmiştir. CFPAC-1 hücre hattında yapılan Wound-healing deneyinde migrasyonun inhibe olduğu gözlemlenmiştir.

He vd., 2016'da yaptığı çalışmada Viteksin'in SK-Hep1 ve Hepa1-6 hücre hatlarında yaptığı MTT testinde 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300 μ M doz uygulaması yapmış, IC₅₀ değerini iki hücre hattı için yaklaşık 100 μ M bulmuşlardır. İki hücre hattında yapılan apoptoz ile ilgili çalışmada 50, 100, 150 μ M doz uygulaması yapılmış, iki hücre hattında Kaspaz-3 ve aktif Kaspaz-3 protein miktarının western blotting inceleme sonucunda arttığı apoptozla ilişkili Bcl-2 ailesi proteininin azaldığını gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışmada iki hücre hattında da kaspas-3 oranında artış gözlemlenmiştir.

Öztürk 2017'de yaptığı çalışmada *Arum dioscoridis* bitkisinde etanol, aseton ve hekzan özütlerinde miktar olarak viteksin maddesini gözlemlenmiştir (sırasıyla 1125 μ g/mL, 1411.6 μ g/mL, 23.4 μ g/mL). Etanol ekstraktı baz alınarak kullanılan özütte CFPAC-1 için IC₅₀ dozajı ise 540 μ g/ml (Viteksin 15,4 μ M) olarak seçilmiştir. Annexin V APC ve Propidium iyodid boyama ile 48. Saat özüt ile incelenmiş apoptozun %42,63 oranında, 72. saatte 84,24 olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan gen ifadesi çalışmasında Kas-3,-8,-9 incelenmiş. Kas-8 in özüt uygulamasında azaldığı, Kas-9 ve Kas-3'ün ifadesinin arttığını gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda'da MIAPaCa-2 hücre hattında apoptotik genler olan Kaspas-3 ve -9'un belirgin olarak artarak apoptozun iç yoldan gerçekleştiğini bu çalışmada olduğu gibi gözlemlenmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında viteksin maddesinin CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hatlarında anti-proliferatif, anti-migratif/metastatik, apoptotik etkinliği MTT, Wound-Healing, DNA Jel Elektroforez, Real Time PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda;

MTT çalışması sonucunda; 48. saat sonunda yüzde canlılık CFPAC-1 hücre hattında 500 μ M için %35.13, 200 μ M için %74.77, MIAPaCa-2 hücre hattında 500 μ M için yüzde canlılık %78.73, 200 μ M için %83.04 bulunmuştur. 72. saatte ise yüzde canlılık CFPAC-1 hücre hattında 500 μ M için %15.70, 200 μ M için %85.12 bulunmuştur. MIAPaCa-2 hücre hattında 500 μ M için %48.97, 200 μ M için yüzde canlılık %82.52 bulunmuştur. 72. saat Grafik yorumlandığında; MIAPaCa-2 hücre hattı için IC_{50} dozu: 500 μ M, $IC_{50}/2$: 250 μ M ve CFPAC-1 hücre hattı için IC_{50} dozu: 312 μ M, $IC_{50}/2$: 156 μ M olarak bulunmuştur. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hatlarında gruplar arası anlamlılık istatistiksel açıdan bulgularda verilmiştir.

Wound-Healing yöntemi ile migrasyon tayini çalışması sonucunda; Doz ve zamana bağlı olarak iki hücre hattı ve uygulama dozları incelendiğinde, CFPAC-1 hücre hattında kapanma oranı %16'da kalmış, MIAPaCa-2 hücre hattında kapanma %100 oranında gerçekleşmiştir.

DNA jel elektroforez yöntemi ile apoptoz tayini sonucunda; Doz ve zamana bağlı gruplarda CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hattı incelendiğinde, belirgin bir apoptotik bant gözlenmemiştir.

Real Time PCR sonucunda; Viteksin IC_{50} uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz-3'te 0,4 kat artış gözlenirken, MIAPaCa-2 hücrelerinde kaspaz-3'te 16 kat artış, kaspaz-9'da 4 kat artış gözlenmiştir. Zeb-1 açısından incelendiğinde, CFPAC-1 hücre hattında 0,5 kat azalma, MIAPaCa-2 hücre hattında 12 kat artış gözlenmiştir. Zeb-1 gen ifadesi ve Wound-healing (yara kapanma) deneyi açısından oldukça anlamlıdır. Bu durum viteksinin anti-migratif ve anti-metastatik etkinliğine işaret etmektedir. MIAPaCa-2 hücre hattında yüksek Zeb1 gen ifadesi ve Wound-healing (yara kapanma) deneyi açısından bakıldığında, viteksinin primer tümör hücresi olan MIAPaCa-2'de anti-migratif ve anti-metastatik bir etkide olamayacağını düşündürmektedir. Viteksin $IC_{50}/2$ uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz-3'te 0,8 kat azalış gözlenirken, MIAPaCa-2 hücrelerinde kaspaz-3'te 3 kat artış, kaspaz-9'da 1 kat artış gözlenmiştir. Zeb-1 açısından incelendiğinde, CFPAC-1 hücre hattında 0,9 kat azalma, MIAPaCa-2 hücre hattında 32 kat artış gözlemlenmiştir. Bu durum MIAPaCa-2 hücre hattında apoptozun iç yoldan gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. CFPAC-1 ve MIAPaCa-2 hücre hatlarında gen ifadesi deney sonuçlarında gruplar arası anlamlılık istatistiksel açıdan bulgularda verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde viteksin maddesinin CFPAC-1 hücre hattında anti-migratif/metastatik, MIAPaCa-2 hücre hattında apoptotik özellikte olabileceği düşünülmektedir.

Viteksin maddesinin diğer pankreatik kanser hücre hatlarında uygulaması yapılabilir, ilaç etkileşimleri araştırılabilir, model organizmalar ile *in-vivo* çalışmalar desteklenebilir.



KAYNAKLAR

Afifi, F. U., Kasabri, V., Litescu, S. C., Abaza, I. M. (2016). "In vitro and in vivo comparison of the biological activities of two traditionally and widely used Arum species from Jordan: Arum dioscoridis Sibth & Sm. and Arum palaestinum Boiss." Natural product research, Vol. 30, No. 16, pp. 1777-1786.

Al-jeboory, A., Dizaye, K. F. (2006). "Cardiovascular effects of vitexin isolated from Prosopis farcta." Iraqi Journal of Pharmacy, Vol. 6, No. 1, pp. 14-19.

Alabaş, E. (2018). "Pan-aurora kinaz inhibitörü olan danusertib'in pankreas kanseri hücrelerinde otofaji, metastaz ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) üzerine etkilerinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye.

Alabaş, E., Özçimen, A.A. (2023)a. "Epitelyal mezenkimal dönüşüm." SAĞLIK & BİLİM 2023: Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp-I, L. Bahar, M. Akkuş, Ed., Vol. 1, Efeakademi Yayınları, İstanbul, İST., pp. 21-39.

Alabaş, E., Özçimen, A.A., (2023)b. "Embriyonik Gelişimde Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)" SAĞLIK & BİLİM 2023: Genel Embriyoloji-II, M. Akkuş, S. İ. Söker, Ed., Vol. 1, Efeakademi Yayınları, İstanbul, İST., pp. 97-108.

An, F., Wang, S., Tian, Q., Zhu, D. (2015). "Effects of orientin and vitexin from Trollius chinensis on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells." Oncology letters, Vol. 10, No. 4, pp. 2627-2633.

Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. Diabetologia, Vol. 63, pp. 1966-1973.

Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., Rustgi, A. K. (2020). "EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis." Trends in cell biology, Vol. 30, No. 10, pp. 764-776.

Brenner, D., Mak, T. W. (2009). "Mitochondrial cell death effectors." Current opinion in cell biology, Vol. 21, No. 6, pp. 871-877.

Brumatti, G., Salmanidis, M., Ekert, P. G. (2010). "Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals." Cellular and molecular life sciences, Vol. 67, pp. 1619-1630.

- Cain, K., Bratton, S. B., Cohen, G. M. (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." *Biochimie*, Vol. 84, No. 2-3, pp. 203-214.
- Cao, D., Li, H., Yi, J., Zhang, J., Che, H., Cao, J., Yang, L., Zhu, C., Jiang, W. (2011). "Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress." *PloS one*, Vol. 6, No. 6, pp. e21071.
- Carneiro, B. A., El-Deiry, W. S. (2020). "Targeting apoptosis in cancer therapy." *Nature reviews Clinical oncology*, Vol. 17, No. 7, pp. 395-417.
- Carpio, M. A., Michaud, M., Zhou, W., Fisher, J. K., Walensky, L. D., Katz, S. G. (2015). "BCL-2 family member BOK promotes apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 112, No. 23, pp. 7201-7206.
- Che, X., Wang, X., Zhang, J., Peng, C., Zhen, Y., Shao, X., Zhang, G., Dong, L. (2016). "Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation." *American journal of translational research*, Vol. 8, No. 8, pp. 3319.
- Chen, B., Chen, B., Zhu, Z., Ye, W., Zeng, J., Liu, G., Wang, S., Gao, J., Xu, G., Huang, Z. (2019). "Prognostic value of ZEB-1 in solid tumors: a meta-analysis." *BMC cancer*, Vol. 19, pp. 1-8.
- Choi, H. J., Eun, J. S., Kim, B. G., Kim, S. Y., Jeon, H., Soh, Y. (2006). Vitexin, an HIF-1 α inhibitor, has anti-metastatic potential in PC12 cells. *Molecules and cells*, Vol. 22, No.3, pp. 291-299.
- Czemplik, M., Mierziak, J., Szopa, J., Kulma, A. (2016). "Flavonoid C-glucosides derived from flax straw extracts reduce human breast cancer cell growth in vitro and induce apoptosis." *Frontiers in pharmacology*, Vol. 7, pp. 282.
- D'arcy, M. S. (2019). "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy." *Cell biology international*, Vol. 43, No. 6, pp. 582-592.
- Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Firpo, M. A., Mulvihill, S. J. (2010). "Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines." *Pancreas*, Vol. 39, No. 4, pp. 425.

Drápela, S., Bouchal, J., Jolly, M. K., Culig, Z., Souček, K. (2020). "ZEB1: a critical regulator of cell plasticity, DNA damage response, and therapy resistance." *Frontiers in molecular biosciences*, Vol. 7, pp. 36.

Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., Shipley, P. R. (2012). "A review of the chemistry of the genus *Crataegus*." *Phytochemistry*, Vol. 79, pp. 5-26.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology*, Vol. 35, No. 4, pp. 495-516.

Ensembl (2023). *Gene: ZEB1, ENSG00000148516, Human (GRCh38.p14)*, Erişim tarihi; 29.09.2023, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Ortholog?db=core;g=ENSG00000148516;r=10:31110573-31321893.

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., Fares, Y. (2020). "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited." *Signal transduction and targeted therapy*, Vol. 5, No. 1, pp. 28.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. (2021). "Cancer statistics for the year 2020: An overview." *International journal of cancer*, Vol. 149, No. 4, pp. 778-789.

Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., Segall, J. E. (2012). "Classifying collective cancer cell invasion." *Nature cell biology*, Vol. 14, No. 8, pp. 777-783.

Fu, Y., Zu, Y., Liu, W., Zhang, L., Tong, M., Efferth, T., Kong, Y., Hou, C., Chen, L. (2008). "Determination of vitexin and isovitexin in pigeonpea using ultrasonic extraction followed by LC-MS." *Journal of separation science*, Vol. 31, No. 2, pp. 268-275.

Gaitan, E., Lindsay, R. H., Reichert, R. D., Ingbar, S. H., Cooksey, R. C., Legan, J., Meydrech, E. F., Hill, J., Kubota, K. (1989). "Antithyroid and goitrogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 68, No. 4, pp. 707-714.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Turk, B. vd., (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death & Differentiation*, Vol. 25, No. 3, pp. 486-541.

Ganesan, K., Xu, B. (2017). "Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review." *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1401, No. 1, pp. 102-113.

Gao R. In vitro development of islets from human adult pancreatic tissues. Academic dissertation, Gao, R. (2007). In vitro development of islets from human adult pancreatic tissues. Program of Developmental and Reproductive Biology Faculty of Medicine and Pediatric Graduate School Hospital for Children and Adolescents University of Helsinki, Finland (2007).

Georgakopoulos-Soares, I., Chartoumpakis, D. V., Kyriazopoulou, V., Zaravinos, A. (2020). "EMT factors and metabolic pathways in cancer." *Frontiers in oncology*, Vol. 10, pp. 499.

Geredeli, Ç., Cihan, Ş., Yaşar, N., Sakin, A., Can, O., Artaç, M., Koral, L. (2018). "Metastatik Pankreas Kanseri Hastalarda FOLFİRİNOX Rejiminin Etkinlik ve Tolerabilitesi." *Okmeydanı Tıp Dergisi*, Vol.34, No. 2, pp. 76-81.

Girish, T. K., Kumar, K. A., Rao, U. P. (2016). "C-Glycosylated flavonoids from black gram husk: Protection against DNA and erythrocytes from oxidative damage and their cytotoxic effect on HeLa cells." *Toxicology Reports*, Vol. 3, pp. 652-663.

Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." *The Journal of pathology*, Vol. 221, No. 1, pp. 3-12.

Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., Falanga, V. (2017). "Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay." *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 137 No.2, pp. e11-e16.

Green, D. R. (2022). "The mitochondrial pathway of apoptosis Part II: The BCL-2 protein family." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 14, No. 6, pp. 1-24.

Grooteclaes, M. L., Frisch, S. M. (2000). "Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis." *Oncogene* Vol. 19, pp. 3823–3828.

Hajdú, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupkó, I., Falkay, G., Cossuta, D., Máthé, I. (2007). "Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, Vol. 21, No. 4, pp. 391-394.

Hanahan, D. (2022). "Hallmarks of cancer: new dimensions". *Cancer discovery*, Vol. 12, No. 1, pp. 31-46.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell*, Vol. 100, No. 1, pp. 57-70.

Hay, E. D. (1968). "Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo." In *Epithelial-Mesenchymal Interactions; 18th Hahnemann Symposium*, pp. 31-55.

He, J. D., Wang, Z., Li, S. P., Xu, Y. J., Yu, Y., Ding, Y. J., Yu, W. L., Zhang, R. X., Zhang, H. M., Du, H. Y. (2016). Vitexin suppresses autophagy to induce apoptosis in hepatocellular carcinoma via activation of the JNK signaling pathway. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 51, pp. 84520.

He, M., Min, J. W., Kong, W. L., He, X. H., Li, J. X., Peng, B. W. (2016). "A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin." *Fitoterapia*, Vol. 115, pp. 74-85.

Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., Sarkar, S. (2015). "EMT and tumor metastasis." *Clinical and translational medicine*, Vol. 4, No. 1, pp. 1-13.

Heinemann, V., Boeck, S., Hinke, A., Labianca, R., Louvet, C. (2008). "Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer." *BMC cancer*, Vol. 8, No. 1, pp. 1-11.

Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature*, Vol. 407, No. 6805, pp. 770-776.

Huang, Y., Hong, W., Wei, X. (2022). "The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis." *Journal of Hematology & Oncology*, Vol. 15, No. 1, pp. 129.

Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C. (2011). "Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, Vol. 1807, No. 6, pp. 735-745.

Jan, R., Chaudhry, G. (2019). "Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics." *Advanced pharmaceutical bulletin*, Vol. 9, No. 2, pp. 205-218.

Jiang, J., Jia, Y., Lu, X., Zhang, T., Zhao, K., Fu, Z., Pang, C., Qian, Y. (2019). "Vitexin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced osteolysis." *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 234, No. 10, pp. 17549-17560.

Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *The Journal of clinical investigation*, Vol. 119, No. 6, pp. 1420-1428.

Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., Takaori, K. (2016). "Pancreatic cancer." *The Lancet*, Vol. 388, No. 10039, pp. 73-85.

Kashyap, D., Garg, V. K., Goel, N. (2021). "Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis." *Advances in protein chemistry and structural biology*, Vol. 125, pp. 73-120.

Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E., Dow, L. E. (2022). "CRISPR in cancer biology and therapy." *Nature Reviews Cancer*, Vol. 22, No. 5, pp. 259-279.

Kılıç, H. (2022). Meme kanseri epitel hücrelerinde pan-aurora kinaz inhibitörü danusertib ile apijenin 8-C glukozidin (viteksin) antikanser etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye.

Krebs, A. M., Mitschke, J., Lasierra Losada, M., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, D., Reichardt, W., Bronsert, P., Brunton, V., G., Pilarsky, C., Winkler, T., H., Brabletz, S., Stemmler, M., P., Brabletz, T. (2017). "The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer." *Nature cell biology*, Vol. 19, No. 5, pp. 518-529.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nature reviews Molecular cell biology*, Vol. 15, No. 3, pp. 178-196.

Lee, C. Y., Chien, Y. S., Chiu, T. H., Huang, W. W., Lu, C. C., Chiang, J. H., Yang, J. S. (2012). "Apoptosis triggered by vitexin in U937 human leukemia cells via a mitochondrial signaling pathway." *Oncology reports*, Vol. 28, No. 5, pp. 1883-1888.

Li, Y., Sun, Q., Li, H., Yang, B., Wang, M. (2020). "Vitexin suppresses renal cell carcinoma by regulating mTOR pathways." *Translational Andrology and Urology*, Vol. 9, No. 4, pp. 1700.

Liu, X., Jiang, Q., Liu, H., Luo, S. (2019). "Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells." *Biological research*, Vol. 52, pp. 1-7.

Longnecker, D. S., Gorelick, F., Thompson, E. D. (2018). *Anatomy, Histology, and Fine Structure of the Pancreas* (Hans G. Beger vd., Ed.). The Pancreas, UK, pp. 10–23.

Lu, W., Kang, Y. (2019). "Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis." *Developmental cell*, Vol. 49, No. 3, pp. 361-374.

Lyu, Z., Cao, J., Wang, J., Lian, H. (2018). "Protective effect of vitexin reduces sevoflurane-induced neuronal apoptosis through HIF-1 α , VEGF and p38 MAPK signaling pathway in vitro and in newborn rats." *Experimental and Therapeutic Medicine*, Vol. 15, No.3, pp. 3117-3123.

Majidpoor, J., Mortezaee, K. (2021). "Steps in metastasis: an updated review." *Medical Oncology*, Vol. 38, No. 1, pp. 1-17.

Malar, D. S., Prasanth, M. I., Shafreen, R. B., Balamurugan, K., Devi, K. P. (2018). "Grewia tiliifolia and its active compound vitexin regulate the expression of glutamate transporters and protect Neuro-2a cells from glutamate toxicity." *Life Sciences*, Vol. 203, pp. 233-241.

Martinotti, S., Ranzato, E. (2020). "Scratch wound healing assay." *Epidermal cells: methods and protocols*, pp. 225-229.

Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., Shroff, R. T. (2020). "Pancreatic cancer." *The Lancet*, Vol. 395, No. 10242, pp. 2008-2020.

Moheb, A., Ibrahim, R. K., Roy, R., Sarhan, F. (2011). "Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation." *Phytochemistry*, Vol. 72, No. 18, pp. 2294-2307.

Mortezaee, K. (2020). "CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis." *Life sciences*, Vol. 249, 117534.

Mossman, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, Vol. 65, No. 1-2, pp. 55–63.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, Vol. 1833, No. 12, pp. 3448-3459.

Öztürk, E. (2017). Arum dioscoridis bitki ekstraktının, tozasertıb ile birlikte CFPAC-1 Pankreas karsinoma hücre hattı üzerindeki antikanser etkisinin In-vitro araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye

Pal, A., Barrett, T. F., Paolini, R., Parikh, A., Puram, S. V. (2021). "Partial EMT in head and neck cancer biology: a spectrum instead of a switch." *Oncogene*, Vol. 40, No. 32, pp. 5049-5065.

Pietrasz, D., Sereni, E., Lancelotti, F., Pea, A., Luchini, C., Innamorati, G., Salvia, R., Bassi, C. (2022). "Circulating tumour DNA: a challenging innovation to develop "precision onco-surgery" in pancreatic adenocarcinoma." *British Journal of Cancer*, Vol. 126, No. 12, pp. 1676-1683.

Rainaldi, G., Romano, R., Indovina, P., Ferrante, A., Motta, A., Indovina, P. L., Santini, M. T. (2008). "Metabolomics using ¹H-NMR of apoptosis and Necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used." *Radiation research*, Vol. 169, No. 2, pp. 170-180.

Roos, W. P., Thomas, A. D., Kaina, B. (2016). "DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology." *Nature Reviews Cancer*, Vol. 16, No. 1, pp. 20-33.

Savill, J., Fadok, V. (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." *Nature*, Vol. 407, No.6805, pp. 784-788.

Schoumacher, R. A., Ram, J., Iannuzzi, M. C., Bradbury, N. A., Wallace, R. W., Hon, C. T., Kelly, D.,R., Schmid, S.,M., Gelder, F. B., Rado, T. A., Frizzell, R., A. (1990). "A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 87, No. 10, pp. 4012-4016.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., Jemal, A. (2023). "Cancer statistics, 2023." *Ca Cancer J Clin*, Vol. 73, No. 1, pp. 17-48.

Sigma Aldrich, Viteksin, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/49513>, Son erişim tarihi; 26.11.2023

Sommariva, M., Gagliano, N. (2020). "E-cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multifaceted actor during EMT." *Cells*, Vol. 9, No. 4, pp. 1040.

Tam, W. L., Weinberg, R. A. (2013). "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer." *Nature medicine*, Vol. 19, No. 11, pp. 1438-1449.

Tang, S. C., Chen, Y. C. (2014). "Novel therapeutic targets for pancreatic cancer." *World journal of gastroenterology: WJG*, Vol. 20, No. 31, pp. 10825-10844.

Tarin, D. (2023). "Understanding the Nature of Cancer–General Principles. In *Understanding Cancer: The Molecular Mechanisms, Biology, Pathology and Clinical Implications of Malignant Neoplasia*." Springer International Publishing, Switzerland, pp. 3-26.

The jamovi project (2022). *jamovi*. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression." *Nature reviews cancer*, Vol. 2, No. 6, pp. 442-454.

Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, Vol. 6, No. 1, pp. 112-118.

Welch, D. R., Hurst, D. R. (2019). "Defining the hallmarks of metastasis." *Cancer research*, Vol. 79, No. 12, pp. 3011-3027.

Welch, D.R., Hurst, D.R. (2017). *Beyond the Primary Tumor: Progression, Invasion, and Metastasis* (Coleman, W., Tsongalis, G., Editors) *The Molecular Basis of Human Cancer*, 2nd edition, Humana Press, New York, pp. 203-216.

World Health Organization "Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Males and Females, age [0-85+], Turkey". https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bubbles?types=0&sexes=1_2&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=13&populations=792&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=1 , [Erişim tarihi; 29.09.2023].

Yang, H., Huang, J., Mao, Y., Wang, L., Li, R., Ha, C. (2019). "Vitexin alleviates interleukin-1 β -induced inflammatory responses in chondrocytes from osteoarthritis patients: Involvement of HIF-1 α pathway." *Scandinavian journal of immunology*, Vol. 90, No. 2, pp. e12773.

Yang, J. H., Choi, M. H., Yang, S. H., Cho, S. S., Park, S. J., Shin, H. J., Ki, S. H. (2017). "Potent anti-inflammatory and antiadipogenic properties of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves extract and its major constituent flavonoids." *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 65, No. 31, pp. 6665-6673.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H., L., Fuxe, J., Herreros, G., A., Goodall, G., Hadjantonakis, A., K., Huang, R., Kalcheim, C., Kalluri, R., Kang, Y., Goodall, Y., K., Levine, H., Liu, J., Longmore, G., D., Mani, S., A., Massagué, J., Mayor, R., McClay, D., Mostov, K., E., Newgreen, D., F., Nieto, M., A., Puisieux, A., Runyan, R., Savagner, P., Stanger, B., Stemmler, M., P., Takahashi, Y., Takeichi, M., Theveneau, E., Thiery, J., P., Thompson, E., W., Weinberg, R., A., Williams, E., D., Xing, J., Zhou, B., P., Sheng, G., EMT International Association (TEMTIA). (2020). "Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition." *Nature reviews Molecular cell biology*, Vol. 21, No. 6, pp. 341-352.

Yang, S. H., Liao, P. H., Pan, Y. F., Chen, S. L., Chou, S. S., Chou, M. Y. (2013). "The novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells." *Phytotherapy Research*, Vol. 27, No. 8, pp. 1154-1161.

Yuan, S., Norgard, R. J., Stanger, B. Z. (2019). "Cellular plasticity in cancer." *Cancer discovery*, Vol. 9, No. 7, pp. 837-851.

Yunis, A. A., Arimura, G. K., Russin, D. J., (1977). "Human pancreatic carcinoma (mia paca-2) in continuous culture: Sensitivity to asparaginase." *International Journal of Cancer*, Vol. 19, No. 1, pp. 128–135.

Zhang, J., Yuan, K., Zhou, W. L., Zhou, J., Yang, P. (2011). "Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China." *Pharmacognosy magazine*, Vol. 7, No. 25, pp. 35.

Zhang, P., Sun, Y., Ma, L. (2015). "ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance." *Cell cycle*, Vol. 14, No. 4, pp. 481-487.

Zhang, Y., Xu, L., Li, A., Han, X. (2019). "The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications." *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 110, pp. 400-408.

Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F. A., Castellanos, L., Duque, C., Schenkel, E. P. (2012). "Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS." *Phytochemical analysis*, Vol. 23, No. 3, pp. 232-239.

