

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

PANKREATİK KANSER HÜCRE HATTINDA
DİAPOSİNİN'İN APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ
ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet KİRAZLAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ahmet KOYU

İZMİR,
KASIM, 2023

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

PANKREATİK KANSER HÜCRE HATTINDA
DİAPOSİNİN'İN APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ
ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

İÇ KAPAK

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet KİRAZLAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ahmet KOYU

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2022-TDU-TIPF-0010 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İZMİR,
KASIM, 2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her zaman yol gösteren ve tez dönemimde de desteklerini üzerimden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet KOYU'ya,

Eğitimim süresince, bilgi birikimini, güler yüzünü ve tükenmek bilmeyen anlayışını esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a,

Eğitim sürecimde bilgi birikimi, makale yazımı üzerine bana öğrettikleri ve tez çalışmamda her an yanımda olan Sayın Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN hocama,

Eğitim sürecimde bilgi, deneyim ve tecrübelerini içtenlikle paylaşan her zaman kapısını çalabildiğim Dr. Öğr. Üyesi Ali Yücel KARA hocama,

Tez çalışmama kaynak oluşturan üniversitemiz BAP Koordinatörlüğü'ne, tez çalışmasında katkısı olan Arş. Gör. Derviş BİRİM'e,

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, birlikte güzel işler yaptığımız ve yapacağımıza inandığım Uzm. Dr. Emine ÇAKIRGÖZ, Dr. Burçin BİLAL, Arş. Gör. Gülçin DURDAĞI, Arş. Gör. Deniz Yıldız PEHLİVAN ve Şeniz GENİŞ başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, başarı ve mutluluklarımın kaynağı, üzerimde sonsuz emekleri olan canım annem Kadriye ve babam Hüsamettin KİRAZLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZİN KABULU VE ONAYI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri	3
2.1.1. Pankreasın Anatomi ve Fizyolojisi	3
2.1.2. Pankreas Kanseri	7
2.1.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	9
2.1.4. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	11
2.1.5. Pankreas Kanserinde Tanı.....	14
2.1.6. Pankreas Kanserinde Tedavi.....	15
2.2. Apoptoz	17
2.2.1 Kaspazlar.....	18
2.2.2 Bcl-2 Ailesi	19
2.2.3 İntrensik Apoptoz Yolağı.....	20
2.3.4. Reseptör Aracılı Apoptoz Yolağı.....	20
2.3. Aposinin ve Diaposinin	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Deney Planı	23
3.2. Deneyde Kullanılan Gereçler	23
3.2.1. Kanser Hücre Hatları.....	23
3.2.2. Kullanılan Malzemeler.....	24
3.3. Deneyde Kullanılan Yöntemler.....	25
3.3.1. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları.....	25
3.3.2. MTS Hücre Proliferasyon Testi	28
3.3.3. Koloni Formasyon Testi.....	29
3.3.4. Hücre Migrasyonu Testi (Wound-healing/Yara İyileşmesi).....	29
3.3.5. Western Blot Analizi.....	30

3.4. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. MTS Hücre Proliferasyonu Testi.....	32
4.2. Hücre Koloni Formasyon Testi	33
4.3. Hücre Migrasyonu (Wound-healing/Yara İyileşmesi) Testi	36
4.4. Western Blot Analizi	38
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
ÖZET.....	61
ABSTRACT.....	62
KAYNAKLAR	63



SİMGELER VE KISALTMALAR

3-NP: 3 Nitropropiyonik Asit

ACS: Amerikan Cancer Society

AP: Aktivatör protein

APAF-1: Apoptotic protease activating factor-1

APO: Aposinin

AR: Androjen reseptörü

BAX: Bcl-2 ilişkili X proteini

Bcl2: B-cell lenfoma 2

BFTC-90: Mesane karsinomu hücre hattı

BSA: Bovine Serum Albumin

BID: BH3 interacting-domain

CA: Kanser

CAM: Chick Chorioallantois Membran test

CARD: Caspase Activation And Recruitment Domains

CL-KASPAZ 3: Cleaved Kaspaz 3

COLO 205: kolorektal karsinom hücre hattı

COX 2: Siklooksijenaz-2

DIA: Diaposinin

DED: Ölüm ilişkili Domain

DHT: dihidrotestosteron

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DMSO: Dimetil Sülfoksit

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epithelial-Mesenchymal-Transition/Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

EPIC: Avrupa Prospektif Kanser Araştırması

ERK: Extracellular Signal Regulated Kinase

FADD: Fas-ilişkili ölüm bölgesi (Fas-associated death domain)

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FAK: Fokal Adezyon Kinaz

FBS: Fetal Bovine Serum

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FITC: Fluorescein İsothiocyanate

5FU: 5 Fluorouracil

HepG2: Hepatosellüler karsinoma hücre hattı

HCC: Hepatosellüler karsinom

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

HUVEC: İnsan Umbilikal Endotelial Hücreleri

IARC: International Agency on Cancer for Research

IBA-1: İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekül 1

IR: γ -İyonlaştırıcı Radyasyon

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

LRRK-2: Leucine-Rich Repeat Kinase 2

LPS: Lipopolisakkarit

MAP: Mitogen-Activated Protein Kinase

MDA MB 231: Triple Negatif Meme Kanseri hücre hattı

MTT Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromid

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme

NF- κ B: Nuclear Factor κ B

NOX: NAD(p)H Oksidaz

p21: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1/CDK-İnteracting Protein 1

p27: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B

p27KIP1: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B

p53: Tümör süpresör protein geni

PANC-1: Pankreas Kanseri hücre hattı

PARP: Poly ADP Ribose Polymerase

PBS: Phosphate Buffered Saline

PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDAC: Pankreas Duktal Adenokarsinomu

PDGFR: Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü

PI: Propidyum İyodür

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz

PKA: Protein kinaz A

P-NFκB: Phospho-Nuclear Factor κB

P-PI3K: Phospho-Phosphoinositide 3-Kinase

PS: Fosfatidilserin 3

PSA: Prostat spesifik antijenin

RB1: Retinoblastoma

RNA: Ribonükleik Asit

RNaz: Ribonükleaz

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RTK: Reseptör tirozin kinaz

RSV: Resveratrol

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

Sa OS-2: Osteosarkom hücre hattı

SBP: Soybean peroxidase

SE: Status Epileptikus

sGC: Çözünebilir Guanilat siklaz

SIRT1: Silent information regulator 1

SK-MEL-1: Melanom hücre hatları

TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif maddesi

TBE: Tris Borat EDTA

TBS: Tris Buffered Saline

TPTZ: Tetrazolyum kırmızı demir reaktanı

TRAIL: TNFr-apoptoz-tetikleyici ligand (TNFr-apoptosis-inducing ligand)

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VKI: Vücut Kitle İndeksi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü/ World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Pankreas Anatomisi

Şekil 2: Pankreas Langerhans adacıkları ve Pankreas içinde yerleşimleri

Şekil 3: Pankreas Adenokarsinomaların Görüldükleri Bölgeler ve Sıklıkları

Şekil 4: Pankreas İntraepitelyal Neoplazilerin ilerleme aşamaları

Şekil 5: 2020 Yılında Her İki Yaş ve Cinsiyet için Yeni Vaka Sayıları ve Dağılımı

Şekil 6: 2020 Yılında Her İki Yaş ve Cinsiyet için Ölüm Sayıları ve Dağılımı

Şekil 7: Pankreatik Kanser Evreleri

Şekil 8. Apoptozun mekanizmaları

Şekil 9: Aposinin Moleküler şekli ve Dimerizasyonu

Şekil 10: Diaposinin Moleküler şekli (a) ve 3 boyutlu yapısı (b)

Şekil 11: Hücre Proliferasyon Testi sonuç Grafiği

Şekil 12: Koloni Formasyonu Deneyinin Sonuç Grafiği

Şekil 13: Koloni Formasyon Deneyi sonunda Boyanmış kolonilerin gösterimi

Şekil 14: Yara İyileşmesi Hücre Migrasyonu Deneyi sonuçları

Şekil 15: Yara İyileşmesi Hücre Migrasyonu Deneyi Mikroskopi Görüntüleri

Şekil 16: BAX protein Western Blot Görüntüsü

Şekil 17: Gruplar içinde BAX protein ekspresyonu

Şekil 18: Bcl-2 protein Western Blot Görüntüsü

Şekil 19: Gruplar içinde Bcl-2 protein ekspresyonu

Şekil 20: Gruplar içinde BAX/Bcl-2 proteinlerinin oranı

Şekil 21: Bütün Kaspaz 3 ve C1-Kaspaz 3 proteinlerinin Western Blot Görüntüsü

Şekil 22: Gruplar içinde Bütün Kaspaz 3 protein ekspresyonu

Şekil 23: Gruplar içinde C1-Kaspaz 3 protein ekspresyonu



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Değiştirilebilen ve Değiştirilemeyen Pankreas Ca Risk Faktörleri

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Malzemeler Listesi

Tablo 3: Diaposinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Tablo 4: Hücre Proliferasyon Testi Kontrole göre Oranlanmış Sonuçları

Tablo 5: Deney Gruplarında görülen Koloni Oluşturabilme yeteneklerinin oranları



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün GLOBOCAN 2020 verilerinde 2020'de Pankreas kanseri sebebiyle, her iki cinsiyet ve her yaştan 466.003 ölüm görülmüştür ve bu rapordaki verilerden yola çıkılan tahminlerde Amerikan Kanser Topluluğu'na (American Cancer Society) göre 2023 yılında ABD'de yaklaşık 2 milyon kanser vakası beklenmektedir (1). Aynı zamanda 2023 yılında beklenen kanser ilişkili ölüm sayısı 600bin kişi olup bu sayılarda pankreatik kanserin payı 64bin yeni vaka ve 50bin ölüm olarak tahmin edilmektedir (1,2). Tüm yeni kanser vakaları içinde pankreas kanseri %3,2 hacim kaplarken ölüm istatistiklerinde %8,2 yeri bulunmaktadır. Bununla birlikte pankreas kanseri tanısı alan hastaların 5 yıllık yaşam beklentisi; lokalize evrede %42, bölgesel tutulum ile tanı alanlarda %14, uzak tutulum görülmüş vakalarda ise %3 olmak üzere tüm evreler hesaba katıldığında %11,5 oranındadır (2).

Retroperitoneal bir organ olan pankreasın anatomik komşulukları ve hem çölyak arter hem de süperior mezenterik arterden beslenen kanlanması sebepleriyle malignitelerinde metastaz görülmesi kolaydır (3). Tanı esnasında uzak tutulum gösterme olasılığının yüksek olması hastalığın prognozunun kötü ve mortalitesinin yüksek olmasıyla ilişkilidir. Tüm maligniteler arasında ölümlerde önemli yer tutmasıyla birlikte; cerrahi tedavilerin morbiditesi yüksek olmakta ve konvansiyonel ilaç tedavilerine iyi yanıt vermemektedir (4). Malignite türleri arasında insidansının artış göstermesi pankreas kanserinin gelecekte kansere bağlı ölümlerde çok daha önemli hale geleceğine işaret etmektedir.

Mevcut tedavilerin yan etki profilinin yüksek olması, tedaviye verilen cevap oranındaki yetersizlik ve kanser türlerinin prevalans artışları sebebiyle bilim insanları yeni veya yardımcı tedaviler hakkında araştırmalara yönelmişlerdir (4-6). Aynı zamanda ümit verici görünen yeni bir molekülün hücrelerde apoptoza neden olması immün yanıtı sınırlayarak hastaya immün yan etkiler oluşmaması açısından önemlidir (7).

Günümüzde bitkisel kaynaklı antioksidan molekül araştırmaları hız kazanmıştır. Vanilya bitkisi içeriğinde bulunan Vanillin molekülü ve bu molekülün derivasyonu olan Aposinin anti kanser araştırmalarda umut verici olarak görülmüştür

(8). Diaposinin aposinin homo-dimeri olup nöroprotektif etkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir. Diaposinin molekülü hakkında antikanser çalışmalar kısıtlı kalmıştır.

Çalışmamızda Diaposinin molekülünün insan pankreas kanseri hücre hattı PANC-1 üzerinde antikanser etkinlik gösterip göstermediğini, hücre ölümüne neden olup olmadığını araştırmak ve apoptoz ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri

2.1.1. Pankreasın Anatomi ve Fizyolojisi

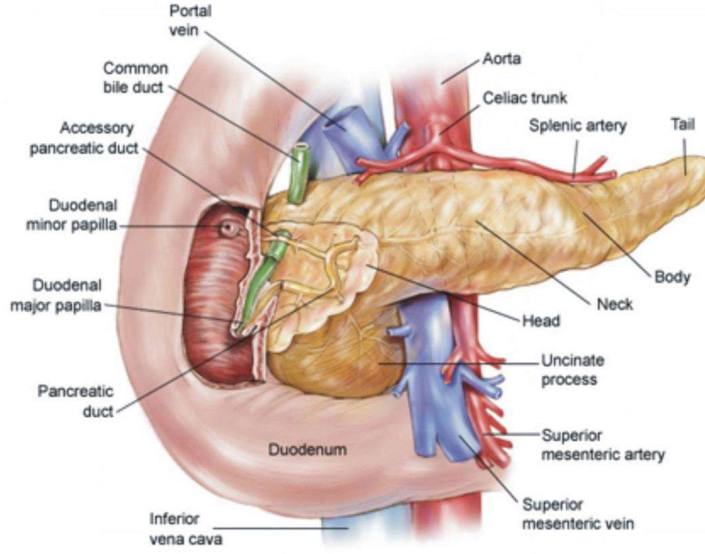
Pankreas, midenin posteriorundan dalağın latereline uzanan retroperitoneal bir organ olarak konumlanmıştır. Pankreas vücuda saklanmış bir organdır. Çünkü çok önemli görevleri olan bir organ olduğu için çok iyi korunmak amacıyla saklanmıştır. Normalde omurların önünde ve karın boşluğunun hemen arkasında -ki bu bölgeye tıbbi anlamda retroperitoneal bölge diyoruz- arka peritonun da arkasına yerleşmiştir. Önünde mide vardır ve pankreasın başını da onikiparmak bağırsağı adeta çepeçevre sarmıştır (C harfi şeklinde). Bu bez hem sindirim sisteminin ekzokrin fonksiyonlarına hem de endokrin sistemin hormon üretimine katkı sağlar. Anatomik olarak, pankreas baş, boyun, gövde ve kuyruk olarak dört ana bölümde incelenmektedir (Şekil 1) (9).

1- Baş (Caput): Pankreasın en geniş bölümüdür ve duodenumun C şeklindeki kıvrımının içine yerleşir. Sindirim enzimlerinin salgılandığı hücreler içerir.

2- Boyun (Collum): Baş ile gövde arasında yer alan bölümdür. Superior mezenterik arter ve venin arkasında konumlanmıştır.

3- Gövde (Corpus): Pankreasın en uzun bölümüdür. Superior mezenterik arter ve venin üzerinde yer alarak karnın merkezine doğru uzanır.

4- Kuyruk (Cauda): Bez, sol lateral bölgede dalağın yanında yer alan daha ince bir uzantı şeklinde sonlanır.



Şekil 1: Pankreas Anatomisi (9)

Pankreas, insan vücudunun sindirim sisteminin ayrılmaz bir parçası olarak ekzokrin fonksiyonlarıyla önemli bir role sahiptir. Ekzokrin pankreas, sindirim enzimlerini ve bikarbonat gibi salgıları üreten özelleşmiş hücre grupları aracılığıyla besin maddelerinin sindirimine ve emilimine yönelik kritik bir katkı sunar. Bu işlev, pankreatik ekzokrin hücrelerin sentez, salgı ve düzenlenme yolları ile sağlanır (10,11).

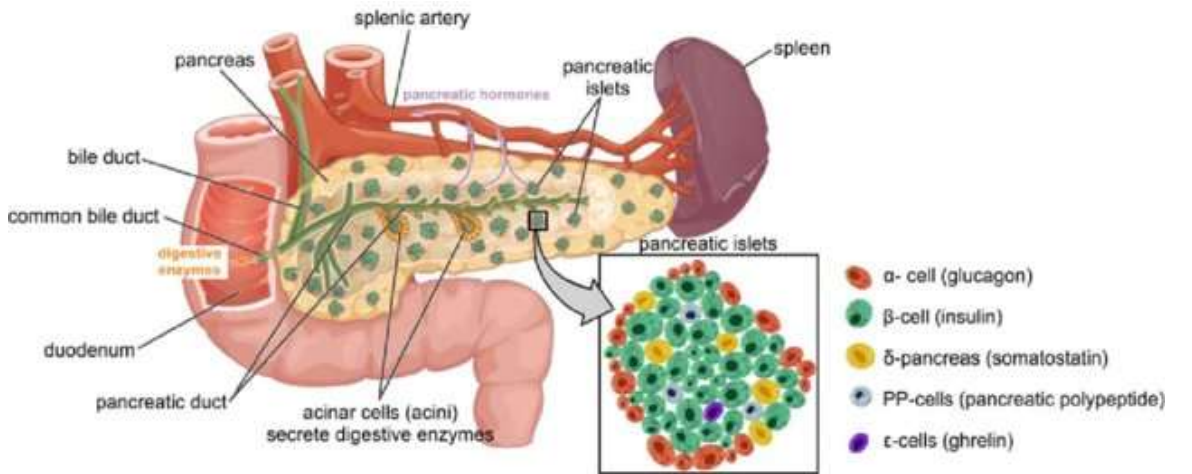
Pankreatik ekzokrin işlevlerin temel taşıyıcıları asiner hücrelerdir. Bu hücreler, pankreasın büyük bir kısmını oluşturur ve enzimlerin üretildiği ve salındığı yerlerdir. Protein, yağ ve karbonhidratların sindirimi için gereken sindirim enzimleri asiner hücrelerinde üretilir. Proteazlar, lipazlar ve amilazlar gibi çeşitli enzimler, proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların moleküler yapılarını parçalayarak daha küçük, sindirilebilir bileşenlere dönüştürmekte etkin rol oynar (10,11).

Asiner hücreleri, sitoplazmalarında yüksek miktarda endoplazmik retikulum ve ribozomlar içerir. Bu organeller, sindirim enzimlerinin üretildiği yerlerdir. Protein sentezi sonucu üretilen enzimler, granüllerde toplanır ve hücrenin apikal yüzeyine doğru taşınır. Burada, besin maddelerinin sindirimi için gereken enzimler bağırsak lümenine salgılanır. Bu salgılama işlemi, ekzokrin pankreasta yüksek düzeyde aktif olan sekresyon granüllerinin hızlı bir şekilde hücre zarına birleştirilmesiyle gerçekleşir (10-12).

Pankreastan salgılanan sıvı, sadece sindirim enzimlerini içermez; aynı zamanda bikarbonat (HCO_3^-) iyonları ile zenginleştirilmiştir. Bikarbonat iyonları, pankreas tarafından üretilen sodyum bikarbonatın yüksek seviyeleriyle birleştirilir. Bu bikarbonatlı sıvı, sindirim enzimlerinin aktivitesini optimize ederek sindirim süreçlerini destekler. Ayrıca, mide asidini nötralize ederek on iki parmak bağırsağına daha uygun bir pH sağlamaya yardımcı olur (10-12).

Pankreasın ekzokrin fonksiyonları, hormonal ve nöral mekanizmalarla sıkı bir şekilde düzenlenir. Gastrointestinal sistemin farklı bölgelerinde salgılanan hormonlar, pankreasın enzim üretimini ve salgılamasını yönlendirir. Örneğin, duodenumdan salgılanan sekretin hormonu, pankreasın bikarbonat salgısını artmasına ve mide asidinin nötralize olmasında fonksiyon görmektedir. Benzer şekilde, duodenumdan salgılanan kolesistokinin hormonu da pankreasın sindirim enzimlerini salgılamasını artırır (10-12).

Pankreas, endokrin sistemin önemli rol alan Langerhans adacıkları aracılığıyla endokrin hormonların üretildiği ve düzenlendiği bir organdır. Bu adacıklar, vücudun enerji metabolizmasını dengelemek için vital bir rol oynarlar (Şekil 2) (13).



Şekil 2: Pankreas Langerhans adacıkları ve Pankreas içinde yerleşimleri (14)

Beta Hücreleri: Langerhans adacıklarının ana hücre tipi olan beta hücreleri, insülin hormonunu salgılar. İnsülin, glikoz metabolizmasını düzenlemede merkezi bir oyuncudur. Glikoz, sindirim sonrası bağırsakta emilir ve kana karışarak kan glikoz seviyesini yükseltir. Beta hücreleri, yüksek plazma glikoz seviyelerini algılayarak insülin üretirler. İnsülin, hücre zarları üzerindeki GLUT-4 reseptörleri aracılığıyla hücre içine glikozun girişini kolaylaştırır. Bu, hücrelerin glikozu enerji üretimi için kullanmasını sağlar ve aynı zamanda karaciğerde glikozun depolanmasını teşvik eder (14).

Alfa Hücreleri: Langerhans adacıklarının diğer bir hücre tipi olan alfa hücreleri, glukagon hormonunu üretir. Glukagon, düşük kan glikoz seviyelerinde aktive olur. Alfa hücreleri, açlık veya egzersiz sırasında glukagon üretimini artırır. Glukagon, karaciğerde depolanan glikojenin glikoza dönüşümünü teşvik eder. Bu, kandaki glikoz seviyesini artırarak enerji kaynaklarını sağlar (14).

Delta Hücreleri: Delta hücreleri, somatostatin hormonunu üreten hücrelerdir. Somatostatin, sindirim sisteminin işleyişini düzenler. Bu hormon, mide ve bağırsaklardaki hareketleri inhibe eder, bu da sindirim süreçlerinin kontrolünü sağlar. Ayrıca insülin ve glukagon salınımını düzenleyerek kan glikoz düzeylerini dengelemeye yardımcı olur (10,11).

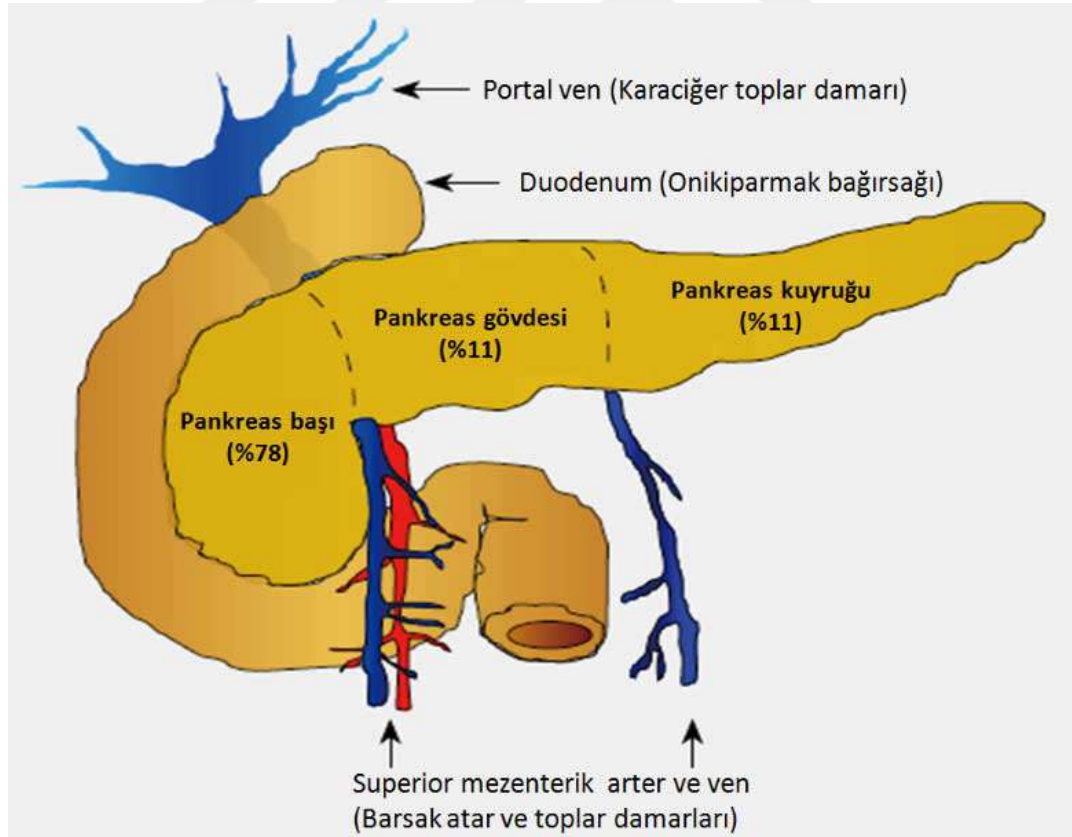
Pankreas Polipeptid (PP) Hücreleri: Langerhans adacıklarının daha az yaygın olan PP hücreleri, pankreas polipeptid hormonunu üretir. Bu hormonun işlevleri hala tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, sindirim sistemi salgılarını etkileyebileceği düşünülmektedir (10,11).

Pankreas, zengin bir kan damar ağına sahiptir. Arteriyel beslenme, superior ve inferior pankreatikoduodenal arterler aracılığıyla gerçekleşir. Venöz drene ise portal ven sistemine bağlı olarak sağlanır. Aynı zamanda otonom sinir sistemi, pankreası inerve ederek hormonal salınımı ve sindirim süreçlerini düzenler (15).

2.1.2. Pankreas Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü'nün GLOBOCAN 2020 verilerinde 2020'de Pankreas kanseri sebebiyle, her iki cinsiyet ve her yaştan 466.003 ölüm görülmüştür ve dünya genelinde kanserler arasında yedinci sıradadır (2). Başka kanser türlerinin aksine, pankreas kanseri görülme sıklığı artış göstermektedir (1,2). İnsidansı ve mortalitesi artan yaşla ilişkili olduğu görülen Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (2). Tanı alan hastalarda genellikle ileri evreler veya uzak organ metastazları bulunmaktadır (16). Bu konudaki çok önemli bir unsur olarak karşımıza hastalığın erken evresinde belirgin spesifik semptomlar görülmemesi çıkmaktadır.

Duktal adenokarsinoma, pankreas kanserinin %85-90'ını oluşturmakta ve çevre dokulara ve uzak organlara metastaz yapma kabiliyeti yüksek bir kanser türüdür (17). Pankreas kanserlerinin büyük oranı yaklaşık %78'i pankreas başında (3), %11'i gövdesinde ve %11'i kuyruk kısmında bulunur.

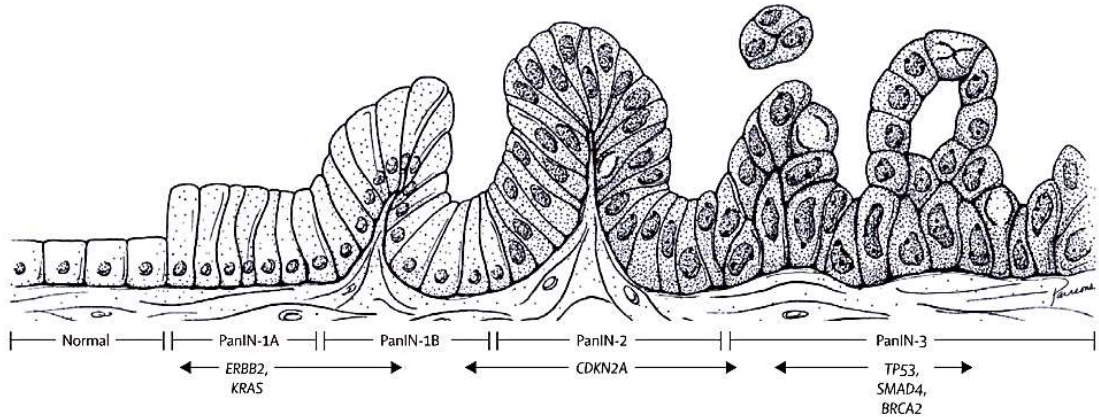


Şekil 3: Pankreas Adenokarsinomaların Görüldükleri Bölgeler ve Sıklıkları (3)

Dünya çapında yaygın kanser çeşitleri arasında 14. sırada ve kansere bağlı mortalite sıralamasında 7. sırada yer alan pankreas kanseri, teşhisi ve tedavisi zor bir hastalıktır (3,18). Agresif yapısı nedeniyle hızlı yayılır ve öldürücü olabilir. Bu nedenle erken tanı, tedavi için en önemli bileşen olarak görülüyor (16-19). Modern tekniklerin kullanılmasına rağmen henüz etkili bir ilaç geliştirilememiştir. Erken tanı konulmuş hastalar için cerrahi rezeksiyon iyileştirici bir tedavi seçeneği sunar. Tedavi sonrası nüks görülme ihtimali düşük değildir (16-19). Çalışmamızda kullanacağımız PANC-1 hücre hattı sıklıkla görülen adenokarsinom kaynaklı pankreas kanserinin izole edilmiş hücre hattıdır. Pankreas adenokarsinomu oldukça kötü prognozludur, genel olarak 1 yıllık sağkalım oranı %24 ve 5 yıllık sağkalım oranı %9 olarak görülür.

Pankreas duktal adenokarsinomların karsinogenezinde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanINs) olarak da adlandırılan non-invaziv, neoplastik lezyonlar invaziv karsinomaya dönüşür (Şekil 4). PanIN'ler pankreatik kanallarda bulunan küçük, 5 mm'den küçük lezyonlardır. 1 cm'den büyük intraduktal papiller mucus neoplazmaları (IPMN) bu özelliklerinden farklıdır (21).

PanIN-1A ve 1B gibi erken evrelerde telomer kısalması ve onkogen K-RAS mutasyonları görülmektedir. PanIN-2, ara evrede p16 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunu, PanIN-3 ise geç evrede p53, BRCA2 ve SMAD4 (DPC4) tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu gösterir (Şekil 2). İnvaziv duktal adenokarsinoma dönüşümü, klonal seçim yoluyla kazanılmış bu özelliklerden oluşur (22). IPMN'ler, kalın mukus sekresyonu ve intraduktal papiller büyüme ile tanımlanır.



Şekil 4: Pankreas İntraepitelyal Neoplazilerin ilerleme aşamaları

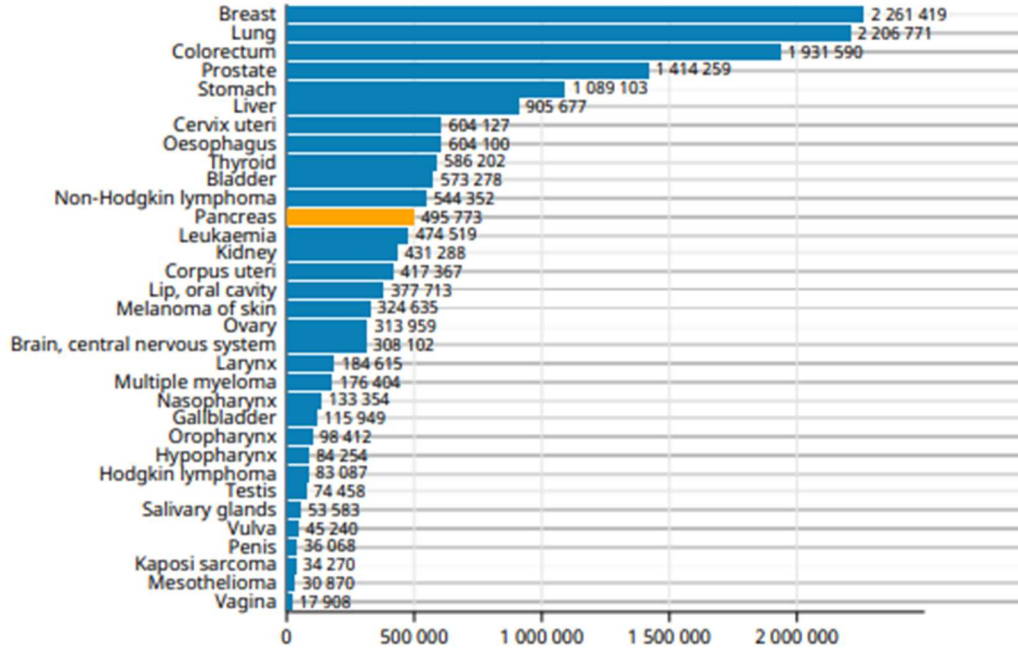
IPMN'ler patolojik olarak, invaziv karsinomlara kadar uzanan farklı derecelerde displaziler gösterebilir.

IPMN'ler, epitelyal displazinin derecesine göre üç kategoriye ayrılabilir: düşük dereceli displazi (adenom veya benign), orta dereceli displazi (sınır) ve yüksek dereceli displazi (malign). Ana kanal IPMN'lerin yaklaşık %60'ı yüksek derece displazi gösterir ve %45'i invaziv karsinomla bağlantılıdır (23).

2.1.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

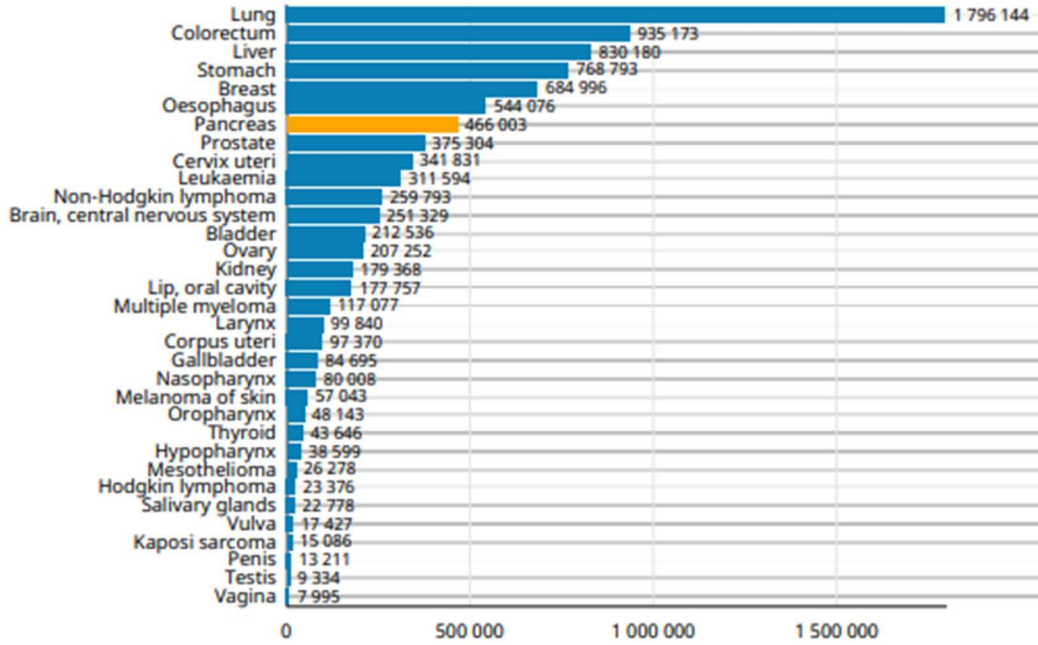
Pankreas kanserinde sağkalım, yaş, cinsiyet, kanser türü, tanı anında evreleme, tümör boyutu, tedavi yöntemlerinin farklılıkları ve sağlık sistemlerinin bulunabilirliği gibi birçok faktörden etkilenir. Yaşam tarzı da en önemli faktörlerden biridir (24). Pankreas kanseri, agresif bir hastalıktır ve gelişmiş ülkelerde kanser ölüm nedenleri arasında yedinci sırada yer almaktadır. Ayrıca, Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser ölümleri açısından üçüncü sırada yer almaktadır (1). Pankreas kanseri, GLOBOCAN'a göre ölüme neden olan yedinci en yaygın kanserdir (2). Arjantin, Orta Avrupa, Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri en yüksek insidans oranlarına sahipken, Afrika ve Doğu Asya ülkeleri en düşük insidans oranlarına sahiptir (21). Pankreas kanseri, Orta-Doğu Avrupa ve Japonya'da erkeklerde kadınlardan daha yaygındır. Malawi ve Gine en düşük oranları kaydetti (25). Kadınlarda pankreas kanseri görülme sıklığının en fazla olduğu ülkeler Batı ve Kuzey Avrupa ülkeleri, Kuzey Amerika ve Avustralya'dır. Doğu Afrika ve Güneydoğu Asya, kadınlarda pankreas kanseri riskinin en düşük olduğu yerlerdir (25). Sigara içmenin kadın ve erkeklerde zamansal eğilimleri, pankreas kanseri mortalitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (26). Gelişmiş ülkelerde, özellikle erkeklerde sigara içmenin azalması, pankreas kanserinde ölüm oranlarının azalmasına katkıda bulunuyor (27).

Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Şekil 5: 2020 Yılında Her İki Yaş ve Cinsiyet için Yeni Vaka Sayıları ve Dağılımı

Number of deaths in 2020, both sexes, all ages



Şekil 6: 2020 Yılında Her İki Yaş ve Cinsiyet için Ölüm Sayıları ve Dağılımı

2021’de yapılmış bir araştırmada Türkiye’de yıllık insidans erkeklerde ve kadınlarda değişmekle birlikte, tanı anında hastalarda hastalığın %52 oranında uzak dokulara yayıldığı ve %26 oranında hasta popülasyonunda bölgesel yayıldığı belirlenmiştir. Hastaların yüzde on ila yirmisinde tümör cerrahi olarak çıkarılabilir aşamadaydı. Bu veriler, pankreas kanserinin bir yıllık genel sağ kalım oranının %26 ve beş yıllık sağ kalım oranının %6 olduğunu göstermektedir. Hastaların %70’i 55-84 yaşları arasındaydı (28).

2.1.4. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Değiştirilebilen	Değiştirilemeyen
Sigara kullanımı	Cinsiyet
Alkol kullanımı	Yaş
Obezite	Sosyoekonomik Durum
Diyabetes mellitus	İrk
Vitamin D düzeyi	
Beslenme Alışkanlıkları	

Tablo 1: Değiştirilebilen ve Değiştirilemeyen Pankreas Ca Risk Faktörleri

Sigara Kullanımı: Pankreas kanseri riski, sigara içme süresi ve günlük içilen sigara sayısı ile artar. Sigara içenlerde, içmeyenlere göre risk yaklaşık iki kat daha fazladır (27). 2012 yılında, Avrupa Prospektif Kanseri Araştırması (EPIC) çalışması, günde içilen her beş sigara için pankreas kanseri riskinin arttığını ve ayrıca pasif içiciliğin pankreas kanseri riskini %50 oranında artırabileceğini göstermiştir (29).

Alkol Tüketimi: Pek çok çalışmaya göre, pankreas kanseri riski yüksek alkol tüketimi (günde üçten fazla içki) ile artmış ilişkisi var iken, düşük ila orta düzeyde alkol alımı ile bir ilişki bulunamamıştır (30). Ancak, düşük ila orta düzeyde alkol alımı, yanında sigara içenler arasında artan pankreas kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (31),

bu da sigara içmenin alkol-kanser ilişkisini arttırabildiğini düşündürmektedir. Bu nedenle, düşük düzeyde alkol tüketimini alkolü pankreas kanseri için bağımsız bir risk faktörü olarak dahil etmek zor olabilir.

Obezite: Pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri için artan risk ile ilişkilidir (32). Bazı araştırmalar obezitenin pankreas kanseri insidansını ve mortalitesini artırdığını bulmuştur (32-34). Yapılan bir araştırmada, erken erişkinlik döneminde fazla kilolu olmanın (vücut kitle indeksi (BMI): 25,0 ile 29,9 kg/m² arasında) veya obez olmanın (BMI \geq 30 kg/m²) daha pankreas kanseri riski yüksekliği ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Ayrıca, ileri yaşlarda (30 - 79 yaş) obezite, daha düşük genel sağkalım ile ilişkilidir(35). Güncel bir meta-analiz hem genel hem de abdominal bölgede yoğunlaşmış kilolu hastalarda artmış pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (36). Amerikan Kanser Derneği (ACR) çalışmasına göre, her iki cinsiyette de obez düzeyinde BKİ'ye sahip hastalar arasında pankreas kanseri riski, daha sağlıklı BKİ'ye (18,5 - 24,9 kg/m²) sahip hastalara kıyasla daha yüksek gözlenmiştir (37). Sedanter yaşamın da kilo alımına yol açabileceğinin yanı sıra kanser riskini arttırdığı da öne sürülmüştür (38).

Diyabet: Diyabeti olan hastalarda pankreas kanseri görülme sıklığı artmış bulunmuştur (39,40). Epidemiyolojik çalışmalar tip 2 diyabet ile pankreas kanseri arasında karmaşık ve çok yönlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Pankreas kanseri riski, diyabet tanısından hemen sonra en yüksek seviyeye ulaşır ve daha sonra azalır, tanıdan yıllar sonra ise yüksek kalır. Diyabet ile pankreas kanseri arasındaki ilişkinin zamana bağlı yönleri, uzun süredir devam eden diyabetin pankreas kanseri için bir risk faktörü olduğunu, riski 1,5 ila 2 kat artırdığını, yeni başlayan diyabetin ise tümörün erken bir belirtisi olduğunu göstermektedir. Uzun süredir devam eden diyabet ile pankreas kanseri arasında doğrudan bir bağlantının olası mekanizmaları arasında direnç ve telafi edici hiperinsülinemi, dolaşımdaki insülin benzeri büyüme faktörlerinin yüksek seviyeleri, hiperglisemi ve düşük kronik inflamasyon yer alır. Uzun süredir devam eden diyabet ile pankreas kanseri arasındaki ilişki, kısmen aşırı kilo/obezite gibi iki durum arasındaki ortak risk faktörlerinin yanı sıra diyabet veya pankreas kanseri tanısı alan hastaların artan tıbbi gözetiminden kaynaklanıyor olabilir. Pankreas kanseri ile ilişkili diyabet muhtemelen paraneoplastik bir etkidir. Pankreas

kanserinin neden olduğu diyabet, altta yatan asemptomatik kanserin klinik bir belirtici olabilir. Kanserle ilişkili diyabeti tip 2 diyabetten ayırt etmek için klinik özelliklerin ve biyobelirteçlerin belirlenmesi, pankreas kanserinin daha erken tespit edilmesine olanak tanıyabilir ve dolayısıyla yönetim ve sağkalımı iyileştirebilir (41).

Diyet faktörleri: Diyetin, pankreas hastalıkları da dahil olmak üzere farklı sindirim sistemi hastalıkları ve kanser riskini etkilediği düşünülmektedir. Diyet pankreas kanseri riski üzerinde %30-50'ye kadar etkilidir ve bazı gıdaların pankreas kanserinde risk oluşturduğuna, bazılarının ise koruyucu olduğuna dair kanıtlar vardır (42). Kırmızı et tüketimi (özellikle yüksek sıcaklıkta pişirildiğinde), işlenmiş etler, kolesterol, kızarmış yiyecekler nitrozamin içeriğinden ötürü pankreas kanseri riskini artırabilir (43). Öte yandan, özellikle narenciye ve antioksidanlarla zenginleştirilmiş sebze ve meyvelerin tüketimi, koruyucu bir etkiye sahiptir (44).

Mesleki maruziyetler: Mesleki maruziyetlere bağlı (metal işleme ve pestisitlere maruz kalmayı içeren) pankreas kanserinin riskinin popülasyondaki etiyolojik fraksiyonu %12 olarak tahmin edilmiştir (45). Mesleki maruziyetler ve pankreas kanserine ilişkin bir meta-analiz, nikel maruziyeti ile riskin arttığını bildirmiştir (45). Kadmiyum, insan pankreasında biriken ve pankreas kanseri riskini ve mortalitesini arttırdığı bilinen, non-esansiyel bir metaldir (47). Arsenik maruziyeti artmış kanser riski ile ilişkili olduğu düşünülmekte fakat bu konu hakkında çok az yayın yapılmıştır. Yakın zamanda, arsenikle kirlenmiş süt tozuna çocuklukta maruz kalma ile pankreas kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık iki katı arasında bir bağlantı bulundu (48,49). Bununla birlikte, mikro besinlerin önemli bir bileşeni olan selenyum ile ters orantılıdır (50). Selenyumun antioksidan reaksiyonlarda kilit rol oynamasına ek olarak, selenyum, arsenik, kadmiyum ve kurşuna maruz kalmanın neden olduğu oksidatif stresi azalttığı düşünülmektedir (50-52).

Cinsiyet: Pankreas kanseri erkekler cinsiyetli bireylerde kadın cinsiyetli bireylere göre daha sık görülmektedir. Global olarak, pankreas kanseri insidansı erkekler için 100.000'de 5.5 iken kadınlar için 100.000'de 4.0'dır (2).

Etnik köken: Pek çok araştırma, ırklar arasında pankreas kanseri insidansında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Pasifik Adalıların ve Asyalı-Amerikalıların

pankreas kanseri insidansı en düşüktür, ancak Afrikalı-Amerikalılar Kafkasyalılarından daha yüksektir. Siyahlar genellikle diğer ırk gruplarına göre pankreas kanseri riski daha yüksektir (21).

Aile öyküsü: Pankreas kanserli bireylerin yaklaşık %5-10'unun ailede pankreas kanseri öyküsüne sahip olduğu tahmin edilmektedir (53).

Genetik faktörler: Genetik varyasyon ve mutasyonlar (Germ-line mutasyonu), pankreas kanseri riskinin artmasında önemli bir rol oynar (53,54). Pankreas kanserli hastaların yaklaşık %10'unda gen varyasyonları veya hastalığı geliştirmeye yönelik değişiklikler gibi bazı genetik yatkınlıklar vardır. Pankreas kanserinin ayrıca Lynch sendromu (kalıtsal polipoz olmayan kolon kanseri) gibi ailesel kanser gibi bazı kanser sendromları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (54).

GIS (Gastro İntestinal Sistem) operasyonları: GİS kanamalarına yönelik geçirilmiş operasyonlar sonrasında pankreas kanseri riskinin artabileceği düşünülmektedir (55).

2.1.5. Pankreas Kanseri Tanı

Hastaların %80-90'ında pankreas kanseri tanı anında rezeke edilmeye uygun olmayan tümörler bulunur ve çoğunlukla ileri evrede teşhis edilir. Bunun meydana gelmesinin çeşitli nedenleri vardır. İlk olarak, pankreas kanseri erken evrelerinde klinik olarak sessizdir. Safra yollarındaki bir tıkanıklığın bir sonucu olarak karın ağrısı, sarılık, kaşıntı, koyu renkli idrar ve alkolik dışkı gibi semptomlar pankreasa özel değildir. Ayrıca anoreksi, (anoreksiyadan kaynaklanabilen) kilo kaybı, erken doyma, hazımsızlık ve mide bulantısı görülür. Pannikülit ve depresyon daha az yaygın belirtilerdir (56).

Spesifik olmayan semptomların geniş bir yelpazesi göz önüne alındığında, ayırt edilmesi gereken çok sayıda hastalık vardır: ülser, gastrit, pankreatit, abdominal aort anevrizması, lenfomalar ve safra yolları, karaciğer, pankreas, mide veya bağırsak kanserlerinin yanı sıra kolanjit, kolesistit, kolelitiazis, koledokolitiazis, koledok kistleri, duodenal veya gastrik kistler (57).

Sonuç olarak, tanı gecikebilir veya atlanabilir. Abdominal Ultrasonografi ve trifazik pankreas protokolü bilgisayarlı tomografi (BT) (tanı ve evreleme için yaygın olarak), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve sitolojik tanı için endoskopik ultrason ile ince iğne aspirasyonu (duyarlılığın yaklaşık %80 olduğu bildirilmektedir) tanıda kullanılmaktadır (58). Ek olarak, kanser antijeni 19-9'un kan düzeylerinin ölçümü, semptomatik hastalarda tanıyı doğrulamaya ve rezeksiyon sonrası prognozu ve nüksü tahmin etmeye yardımcı olabilir; ancak, tümöre özgü olmadığı için asemptomatik hastalar için bireysel bir tarama yöntemi olarak kullanılamaz (59,60). Tanı araçları ve farklı tanı yöntemlerinin kullanımındaki değişiklik, gelişmiş ülkelerden gelişmemiş ülkelere farklılık gösterir.

2.1.6. Pankreas Kanseri Tedavi

Pankreas kanseri tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyasyon ve palyatif tedaviler kullanılır. Pankreas kanserinin evresine bağlı olarak, multidisipliner yaklaşımlar kullanılarak tedavi seçenekleri belirlenir.

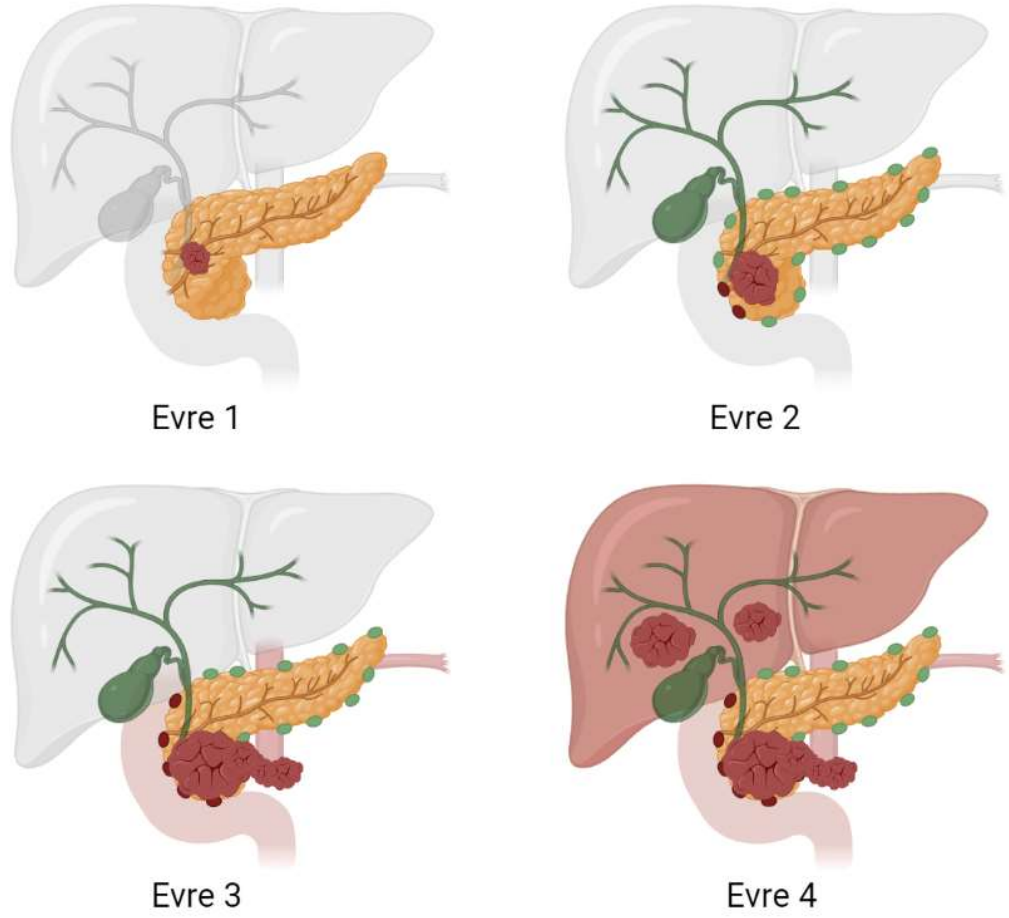
Evre 0: Yayılma yoktur. Pankreas kanseri sadece tek katman hücrelerle sınırlıdır. Pankreas kanseri görüntüleme testlerinde kendini göstermez.

Evre I: Bölgesel büyüme gösterir. Pankreas kanseri, pankreasla sınırlı ancak, 2 (evre 1A) veya 2 cm'den fazla (evre 1B) büyür.

Evre II: Bölgesel yayılma gösterir. Pankreas kanseri, pankreas dışında büyür veya lenf bezlerinin yakınına yayılır.

Evre III: Daha geniş yayılma gösterir. Tümör, yakınındaki ana damarlara veya sinirlere yayılır ancak metastaz göstermez.

Evre IV: Bu evrede pankreas kanseri, karaciğer gibi uzak organlara yayılım yapar.



Şekil 7: Pankreatik Kanser Evreleri

Evre I/II hastaları, önce cerrahi rezeksiyon ve ardından adjuvan tedavi ile tedavi edilmelidir (16,61). Evre III sınırında rezektabl kanserli hastalar rezeksiyondan önce neoadjuvan tedavi görmelidir. Bununla birlikte, bu hasta grubunda neoadjuvan tedavi kabul edilebilir ancak tartışmalıdır. Evre III lokal ileri hastalığı olan hastalara kemoterapi ve/veya kemoradyoterapi uygulanmalıdır. Bu hastaların çoğu sonunda metastatik hastalığa yakalanır, ancak bazılarında cerrahi rezeksiyon düşünülebilir. Genel sağlık durumu kötü olanlara destekleyici tedavi verilmelidir; evre IV ve performans durumu iyi olan hastalar sistemik tedavi alabilir. (16,62).

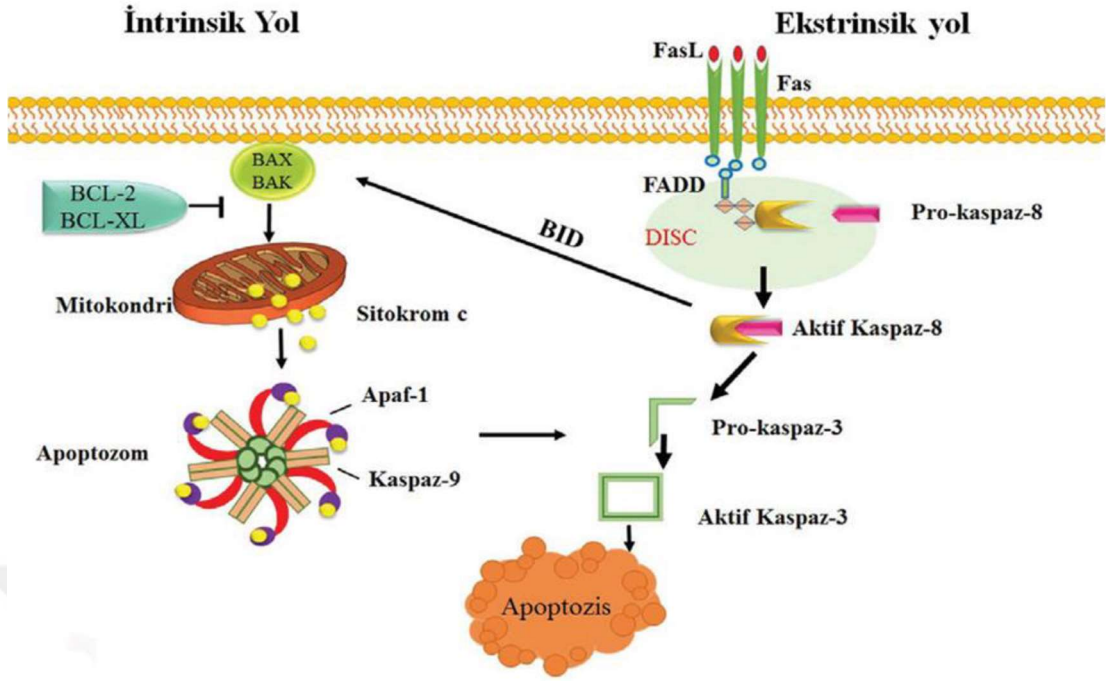
2.2. Apoptoz

Apoptoz Tip I hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, yaşlanmış, işlevsiz ve zarar görmüş hücrelerin belirli mekanizmaları kontrol ederek programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Hücrenin apoptoz sürecinde, büzülme, yoğunluk artışı, organellerin bir araya kümelenmesi, endonükleaz aktivitesi nedeniyle DNA'nın parçalanması ve hücre zarında tomurcuklanma başlaması gibi morfolojik değişiklikler meydana gelir. Apoptoz, embriyo döneminde başlayan ve yaşamın birçok evresinde normal gelişimin sürdürülebilmesi için devam eder. Bu mekanizma kanser gelişimini önlemede aktif rol oynar.

Apoptozda hücre bileşenleri hücre zarından dışarı dağılmadığı için iltihaplanma meydana gelmez ve apoptozda enerji harcanmaz.

Apoptoz, içsel (reseptör aracılı) ve dışsal (reseptör aracılı) yollar tarafından başlatılır. İçsel yolak endoplazmik retikulum (ER) stresi, DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği, aşırı üretimdeki reaktif oksijen türleri (ROS), replikasyon stresi ve diğer birçok içsel uyaran apoptozu başlatabilir (63).

Dışsal yolak, hücre zarı yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine ligand bağlama yoluyla sinyal iletimi ile tanımlanır (64). Her iki apoptotik yolda da hücre içinde inaktif olarak bulunan özelleşmiş proteazlar olan kaspazların kademeli aktivasyonu apoptozun başlamasına neden olur. Apoptoz düzenleyici protein ailesinin (BCL-2) proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri, içsel apoptoz mekanizmasını kontrol eder (63, 64). (Şekil 8).



Şekil 8. Apoptozun mekanizmaları

2.2.1 Kaspazlar

Kaspazlar, bağışıklık sistemini etkileyen apoptozun tetiklenmesinde aktif rol alan proteinlerdir. Kaspazlar katalitik bölgelerinde sistein kalıntılarını taşırlar ve hedef proteinleri C- uçlarında bulunan asparttan ayırırlar. Bu kaspazların enzim işlevi görmesini sağlar. İnsan vücudunda on üç çeşit kaspaz bulunur (Şekil 4) ve kaspazlar yalnızca apoptozu değil, aynı zamanda enflamasyonu, hücre döngüsü ve hücre farklılaşmasını da kontrol ederler (66). Başlatıcı kaspazlar (8,9,10) ve efektör kaspazlar (3,6,7) amino terminal bölgelerinde kaspaz alım alanı (CARD) veya ölüm efektör alanı (DED) bulundurur. Efektör kaspazlar, başlatıcı kaspazların aksine, amino terminal alanları içermez ve bu nedenle başlatıcı kaspaz tarafından belirli parçaların kesilmesi ve aktifleştirilmesi gerekir.

Kaspazlar doğru aktivasyon sinyalleri gelene kadar inaktif kalır. Kaspaz-2 ve kaspaz-9, reseptör aracılı apoptoz yolağında görev yapan başlatıcı kaspazlardır; kaspaz-8 ve kaspaz-10 ise reseptör aracılı apoptoz yolağında görev yapan başlatıcı kaspazlardır. Aşırı ROS üretimi nedeniyle, kaspaz-9 veya kaspaz-2 CARD ile apoptoz proteaz aktivasyon faktörüne (Apaf-1) bağlanır. Apaf-1 kaspaz-9'u belirli bir bölgeden ayırarak aktifleştirir. Efektör kaspaz-3 kaspaz-2'yi apoptozom kaspaz aktivasyon

yolunda aktiveştirir, bu nedenle başlatıcı kaspaz yerine efektör kaspaz olarak çalışır. Ancak DNA hasarı nedeniyle meydana gelen apoptoz mekanizmasını göstermek için yapılan araştırmada kaspaz-2'nin erken aktivasyonu gösterilmiştir (67). Kaspaz-2, DNA hasarı nedeniyle oluşan içsel apoptotik yola katkıda bulunur. İnflamatuvar hastalıklarda doku yıkımını başlatan tümör nekroz faktör (TNF) veya T lenfositlerden sentezlenen transmembran ölüm reseptörü ligantı olan FAS varlığında gerçekleşir. Bu, reseptör aracılı apoptoz yolağında görevli olan kaspazların aktiveştirilmesini sağlar. FAS reseptörü doğru reseptöre bağlanır ve FAS ile ilişkili ölüm domaini olan (FADD) hücre içi proteinini çeker. Kaspaz-8 veya kaspaz-10, DED bölgesi aracılığıyla FADD'ye bağlanır ve ardından kesilerek aktiveştirilir. Başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktiveştirir ve bu da ölüme neden olur. Efektör kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-7, başlatıcı kaspazlar tarafından küçük ve büyük alt birimleri arasındaki boşluk kesildiğinde aktif kaspazlar haline gelir. Bu kaspazlar homodimer yapıda inaktiftir (66). Apoptotik hücre ölümünün sırasında morfolojik değişimlerinin oluşumu, apoptotik cisimcik oluşumu gibi apoptotik efektör kaspazlar tarafından sağlanır.

2.2.2 Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 Bcl-2 ailesi İnsanlarda foliküler lenfomadan klonlanan Bcl-2 geni apoptotik bir etkiye sahiptir. Bu genin mutasyona uğramış taşıyanları, kromozom yeniden düzenlenmesi nedeniyle lenfoma geliştirir. İnsan Bcl-2 proteini ve C. elegans'ta bulunan CED-9 proteini aynı işlevi gören düzenleyici proteinlerdir. Bcl-2 proteini mitokondri dış zarı, nükleus zarı ve ER zarında bulunur. Bcl-2 Homoloji (BH) motifleri olarak da bilinen doğrusal dizi motifleri veya alanlarının varlığı, Bcl-2 proteinlerinin tanımlanmasını sağlar (68). Bcl-2 proteinleri antiapoptotik, pro-apoptotik, Bcl-2-etkileşim hücre ölüm düzenleyicisi (BİM), BH3-etkileşim ölüm agonist domeni (BİD), P53 anlatımı artmış apoptoz başlatıcısı (PUMA) ve pro-apoptotik. Pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleri, BH alanı olarak bilinen korunmuş bölgelerde bulunur ve bu alanın yapı ve işlevlerini belirler. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinde bulunan BH bölgesi, apoptotik kaskadın meydana gelmesine izin verir (68).

2.2.3 İntrensik Apoptoz Yolağı

Mitokondriye bađımlı iřsel bařlangıřlı apoptotik yolak, řeřitli stres kořullarına mitokondriyal dűzeyde hűcre iři sinyallerle yardımcı olur. İřsel mitokondriyal yol, onarılamaz DNA hasarı, hipoksi ve yűksek dűzeyde ROS űretimi tarafından bařlatılabilir (69). Bad mitokondri dıř zarının proapoptotik proteini olan Bcl-2/Bcl-x ile bađlanır. Bcl-2/Bcl-x Bad etkileřimi, antiapoptotik proteinlerin Bax ile etkileřimini engelleyerek sitozole sitokrom c'nin mitokondriden salınımını sađlar. Apaf-1 prokaspaz-9, mitokondriden sitokrom c salınımıyla CARD bűlgesine bađlanır. Sitokrom C salınımı kaspaz aktivasyonunu kontrol eder ve elektron tařıma zincirini bozur, bu da hűcrede enerji űretimini azaltıp ROS űretimini artırır. Apaf-1 tarafından kesilen kaspaz-9, kaspaz-3 ile bađlanır ve kaspaz-3'űn aktifleřmesini sađlar.

2.3.4. Reseptűr Aracılı Apoptoz Yolađı

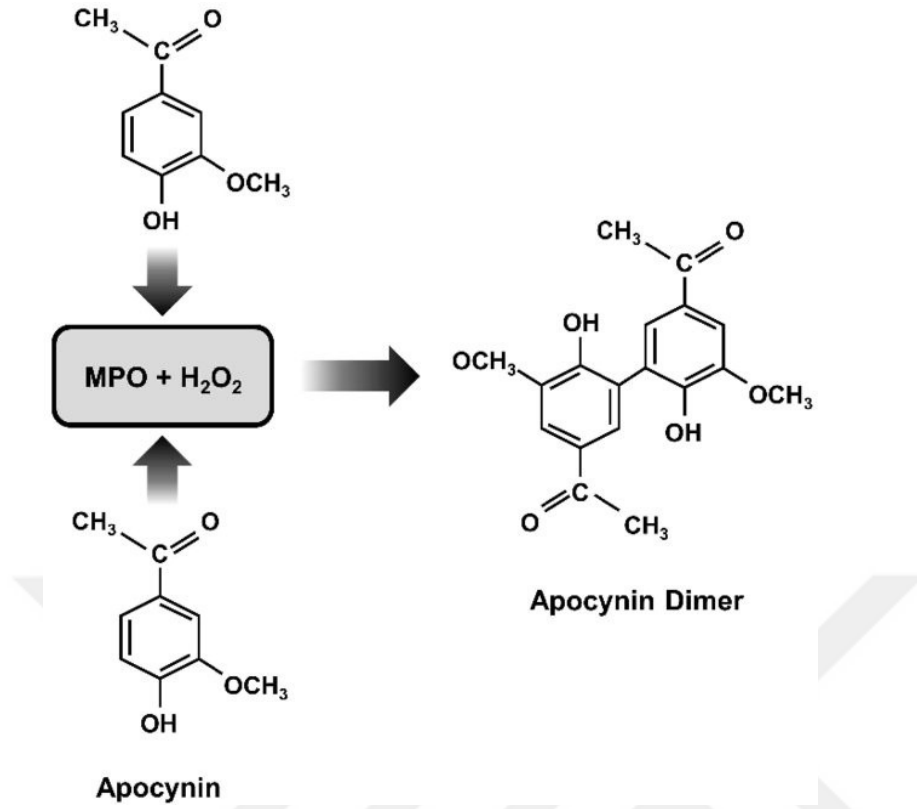
Ekstrinsik yolak adı da verilen bu yol, membran űlűm reseptűrlerine bađlanarak belirli ligandların veya apoptotik sinyallerin paręalanmasını sađlar. Bu, programlanmış hűcre űlűműne neden olur. űlűm reseptűrleri TNF ailesine dahildir. Ligandın Fas/TRAIL reseptűrlerine bađlanması, reseptűr aracılı apoptoz yolunu aktive eder. Apoptoz ile bađlantılı protein FADD űlűm alanı ve űlűm efektűr alanı ięerir (64,69). Aktifleřen Fas FADD, űlűm alanından bađlanır ve prokaspaz-8 FADD, űlűm indűkleyici sinyal kompleksi (DISC) oluřturur. DISC, prokaspaz-8'in oproleotik paręalanmasını sađlar. Kaspaz-3 veya kaspaz-8 aktifleřtirerek hűcrenin mitokondriyal yoldan paręalanmasını sađlar (70).

2.3. Aposinin ve Diaposinin

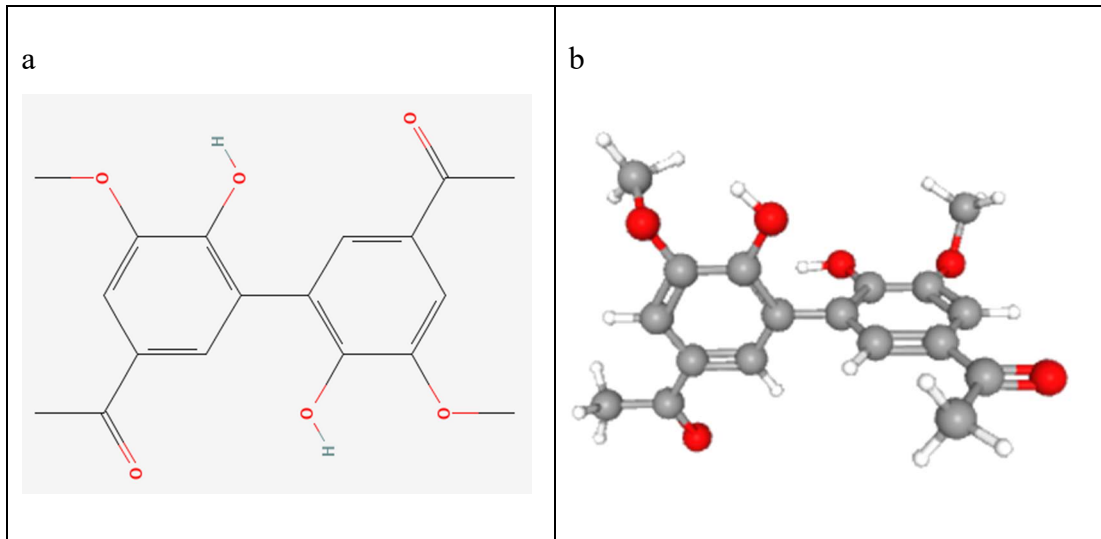
Aposinin, aynı zamanda acetovanillone diye de anılan; 4. pozisyonda bir hidroksi grubu ve 3. pozisyonda bir metoksi grubu ile ikame edilmiş 1-feniletanon olan aromatik bir ketondur. Narkotik olmayan analjezik, steroid olmayan antiinflamatuvar, antiromatizmal, periferik sinir sistemi ilacı olarak rol oynar. NAD(P)H oksidaz (H_2O_2 oluşturan) inhibitörü ve bir bitki metabolitidir. Asetofenonlar, metil ketonlar ve aromatik ketonların bir üyesidir.

Aposinin (APO, 4-hidroksi-3metoksi-asetofenon) ilk defa 1883'de Oswald Schmiedeberg isimli bir farmakolog tarafından tariflenmiş ve doğal yolla metoksi katekol yer değişimi meydana getiren bir bitki olan Apocynum Cannabinum (Kanada keneviri) bitkisinin köklerinden elde edilmiştir. Sonraki dönemde, Nepal, Tibet, Hindistan ve Pakistan bölgelerinde yetişen bir bitki olan Picrorhiza kurroa kök ekstratından 1971 yılında aposinin elde edilerek kullanılmıştır. Elde edilen ekstratlar ödem atmayı kolaylaştırıcı ve kalp sorunları için iyileştirici etki beklenerek kullanılmıştır. APO, 166,17 molekül ağırlığına sahiptir ve asetofenon olarak gruplandırılır. Hafif bir vanilya kokusuna sahiptir ve 115 °C'lik bir erime noktasına sahiptir. Çözünürlüğü soğuk suda az düzeyde olsa da sıcak su, alkol, kloform, benzen ve eterde serbest olarak çözünmektedir (71).

Diaposinin, Aposinin molekülünün homo-dimeridir. 330.33 molekül ağırlığına sahip bileşiğin kapalı formülü $C_{18}H_{18}O_6$ şeklindedir. Erime noktası 310 °C olup kaynama noktasının 540 seviyelerinde olduğu hesaplanmıştır. Hücre içinde Myeloperoxidaz etkinliği ile Aposinin dimerleşerek Diaposinin'e dönüşür. Yapılan çalışmalarda Aposinin yerine Diaposinin verildiğinde NOX inhibisyonu etkinliği ve antiinflamatuvar etkinlik çok daha yüksek görülmüştür (72).



Şekil 9: Apocynin Moleküler şekli ve Dimerizasyonu



Şekil 10: Diaposinin Moleküler şekli (a) ve 3 boyutlu yapısı (b)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Planı

Yöntem / Teknik: PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında Diaposinin'in in vitro antikanser etkinliği hücre proliferasyonu, koloni formasyonu ve hücre migrasyonu testleri ile değerlendirildi ve sonrasında belirlenen etkin dozlarda western blot ile hücre ölümüne ilişkin proteinlerin düzeylerindeki değişimler incelendi. Elde edilen veriler SPSS v15.0 kullanılarak analiz edildi.

Proje kapsamında aşağıda belirtilen materyal ve yöntemler kullanıldı:

- 1) Hücre Kültürü
- 2) MTS Hücre Proliferasyonu Testi
- 3) Hücre Koloni Formasyon Testi
- 4) Hücre Migrasyonu Testi (Wound-healing/Yara İyileşmesi)
- 5) Western Blot Analizi

3.2. Deneyde Kullanılan Gereçler

3.2.1. Kanser Hücre Hatları

Çalışmamızda kullanılan PANC-1 (pankreas kanseri hücresi) hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)'dan temin edilerek kullanıldı.

Çalışma için kullanılan solüsyonlar; Fosfat Tamponlu Salin (PBS-Phosphate buffered saline), Tris Tamponlu Salin (TBS-Tris buffered saline) stok solüsyonu, Elektroferez işleminde kullanılan Yürütme/Transfer tamponu stok solüsyonu, Yürütme tamponu, Transfer tamponu, Tween-20 ilaveli Tris bafırlı salin (TBS-Tween-20), Protein lizis tamponu çalışma solüsyonu, % 10'luk stok SDS çözeltisi, PCR yürütme tamponu (Tris Borat EDTA-TBE), yükleme tamponu.

3.2.2. Kullanılan Malzemeler

Malzeme	Marka
DMEM Besiyeri 10 x 500 ml	GIBCO
Tripsin 0.25% EDTA 100 ml	GIBCO
96 kuyucuklu plaka (steril)	BD FALCON
15 ml falcon tüp (steril)	FISHER
50 ml falcon tüp (steril)	FISHER
10 ml'lik Pipet (steril)	BD FALCON
25 cm ² flask (steril)	BD FALCON
75 cm ² flask (steril)	BD FALCON
Otomatik pipet uçları (0-10 µl)	
Otomatik pipet uçları (10-100 µl)	
Otomatik pipet uçları (200-1000 µl)	
Ependorf (0,2-0,5 ve 1,5 ml)	
Şarj edilebilir pipetleme cihazı	FISHER
DPBS (steril)	GIBCO
Penisilin Streptomisin kombinasyonu 100 ml	GIBCO
Fetal Bovine Serum 500 ml	GIBCO
Diaposinin 5mg	SIGMA ALDRICH

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Malzemeler Listesi

3.3. Deneyde Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

PANC-1 pankreatik adenokarsinoma hücre hattı besiyeri ortamında ve 37°C, %5 CO₂'lik inkübatörde inkübe edilerek çoğaltıldı, pasajlandı. Besiyeri ortam içeriği ise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/F12, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-streptomycin ve L-glutamin'dir. Hücreler 75cm²'lik flasklar içinde konfluent olduğunda (%80-90 oranında, yaklaşık 5-7 gün içinde) tripsin ile hücreler yüzeyden ayrılıp bir falcon tüpe aktarıldı ardından 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan hücre pelletine tekrar besiyeri eklendi, ardından tripan mavisi ve thoma lamı ile canlı/ölü hücre oranı ve hücre yoğunluğu hesaplandı.

3.3.1.1. Malzemelerin Sterilizasyonu

Kültür çalışmaları için kullanılan tüm malzemeler ve kimyasal ajanlar sterilize edildi. Radyoaktivite ile sterilize edilmiş kültür şişeleri ve hazır şişelenmiş hücre ortamları şirketlerden alındı. Fazla ısıya dayanamayan malzemeler 115 °C ve 8 kg basınç altında 20 dakika süreyle otoklavlandı. Cam malzemeleri de 160 °C ve 60 ila 90 dakika süreyle otoklavlandı. 0.22 µm por çaplı mikrobiyolojik şırınga filtreleri sıvı maddeleri temizledi. %70 alkol ve bazı özel dezenfektanlar kullanılarak ortam ve kabin temizlendi. Steril kabin içine sokulan malzemeler %70 alkolden geçirildi. Tüm prosedürlerde ise steril nitril eldivenler kullanılmıştır.

3.3.1.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Sürekliliğinin Sağlanması

Hücrelerin kültüre edilmesi, laminar hava akımına sahip steril Class II kabininde gerçekleştirildi. -80°C'lik bir ortamda dondurulmuş hücreler, önce 37°C'lik bir su banyosu içinde çözülüp santrifüje edildi. Ardından, hücreler düşük devirde santrifüje edildi ve DMSO içeren üst kısmı çıkarıldı. Ardından hücreler T75 filtreli hücre kültürü flasklara ekildi. Çalışmada kullandığımız PANC-1 hücre hatları, DMEM/F12 besiyerine %10 oranında ısıyla inaktive fetal sığır serumu (FBS) eklenmiş bir ortam içinde 37°C, %5 CO₂ ve neme sahip bir inkübatör içinde çoğaltıldı. Streptomisin ve penisilin her kültür ortamına 100 ünite/ml olarak eklendi. Hücre hatlarının canlılığı, çoğalma yoğunluğu ve enfeksiyon durumları günlük olarak

inverted mikroskop altında izlenmiştir. Kültür flasklarında %80'lik bir hücre yoğunluğu belirlendiğinde, hücreler pasajlanarak çoğalmaya devam etti.

3.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Yeterli miktarda çoğalma gösterdikten sonra şişenin içindeki kültür ortamı, steril bir pipet kullanılarak çekilerek çıkarıldı. Kültür ortamı uzaklaştırılmış hücrelerin üzerine 1X Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 mililitre kadar eklendi. Kültür flaskları %5 CO₂'li bir inkübatörde 37°C'de yaklaşık beş dakika bekletildikten sonra, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılma durumları mikroskop altında incelendi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra, aynı şişeye tripsin miktarının yaklaşık iki katı kadar taze besiyeri eklendi. Hücreler, bir steril pipet yardımı ile bas-çek yapıp karıştırıldı ve sonrasında tüm içerik (yaklaşık 6 ml) falcon bir tüpe aktarıldı. Ardından, yaklaşık altı mililitrelik karışım steril falcon santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler yaklaşık beş dakika boyunca 1000 rpm devir hızında santrifüje edildi. Ardından, tüplerden süpernatantlar uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti iki ila üç mililitre taze besiyeri ile çözüldü. Tüp içindeki çözülmüş hücre pelleti süspansiyonundan istenilen hücre yoğunluğuna göre, T25 için 4 mililitre ve T75 için 10 mililitre besiyeri içerecek şekilde yeni pasaj flaskları hazırlandı. Yeni şişelerin içindeki hücre yoğunluğu düzenli olarak mikroskop altında incelendi.

3.3.1.4. Hücrelerin Dondurulması, Saklanması ve Çözülmesi

Dondurulma işleminden önce şişelerin içindeki hücreler tripsin ile yüzeyden çıkarıldı ve 1000 rpm'de 31 devirde 5 dakika santrifüje edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet halindeki hücrelere %10 DMSO ve %90 taze besiyeri karışımı eklenerek yavaşça süspansiyon edildi. 1,5 mililitrelik süspansiyon, -80 derecelik dondurucuda bir gece bırakıldıktan sonra sıvı azot içeren dondurma tankına alındı. Hücrelerin çözülmesi işlemi uygulanırken, sıvı azot tankında saklanmış kriyo tüp içindeki hücre süspansiyonu hızlı bir şekilde 37°C'lik bir su banyosunda çözüldü. Ardından santrifüj tüpüne alınan bu 1-1,5 ml süspansiyonlar üzerine taze kültür ortamı eklendi. Süpernatant, 1000 rpm devirde beş dakika kadar santrifüj edildikten sonra atıldı. Hücre pelleti, yaklaşık 4 mililitre serum içeren taze kültür ortamıyla yeniden karıştırılıp T25 kültür flasklarına ekildi.

3.3.1.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı yapılmadan önce, hücreler pasajlanma sürecindeki gibi tripsinizasyona tabi tutuldu. Santrifüjden sonra süpernatantlar çıkarıldı ve dipteki hücre peleti beş mililitrelik bir kültür ortamı içinde yeniden süspansedildi. 20 µl'lik bir örnek, muamele sonrası Thoma lamındaki sayım alanında Tripan Blue boyası ile incelendi.

3.3.1.6. Tripan Blue ile Boyama

Ölmüş dokuların veya hücrelerin boyanmasında, tripan çok önemli bir ajandır. Bu yöntem, canlı hücrelerin boyayı içlerine almazken, ölmüş hücreler zar bütünlüklerindeki bozulmalar nedeniyle boyayı içlerine alırlar. Bu, hücre membranının seçici geçirgenliğinden yararlanır. Bu nedenle, sayım sırasında ölmüş hücreler mavi renge boyanmıştır. Boyama işlemi alttaki basamaklar takip edilerek uygulandı:

1. Tripan Blue boyası ve ölçülen hücre süspansiyonundan alınan bir örnek, Ependorf tüpü içine pipetlendi.
2. Yeni karışımdan on ila on beş mikrolitre alınır ve hemositometri lamı üzerinde lamel ile kapatılır.
3. Bu lam üzerindeki 1 mm karelik alandaki tüm hücreler sayıldı. Bu rakam üç kez tekrarlandı ve ortalama değerini bulduk.
4. Mavi renge boyanmış ölü hücreler ve boya almamış canlı hücreler ayrı olarak sayıldı. Sayım alanında yoğun kümeler olarak görülen hücrelerin yüzde onundan fazla olduğu durumlarda, hücre yayılmasını sağlamak için basamaklar başından yenilendi.
5. Hemositometri, lam sayım alanındaki her bir kare 0.1 mm³ veya 10⁻⁴ cm³ olarak bilinen toplam hacmi göstermektedir. 1 cm³, yaklaşık olarak 1 ml düzeye eşit olduğundan, her ml içinde bulunan hücrelerin miktarı şu formülle tespit edildi: Hücrelerin Sayısı = Her Bir Kare İçindeki Hücre Sayısı X Dilüsyon Faktörü (2) X 10⁴ / ml

3.3.2. MTS Hücre Proliferasyon Testi

Hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu ölçmek için kullanılan MTS testi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium tuzunun suda çözünebilir formazan ürünü olan tetrazolium tuzunun renkli bir yapıya dönüşmesini ve bunun ölçülmesini içerir. 37°C'de yaşayan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazan miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır ve 490 nm'de ölçülür.

PANC-1 hücrelerine üç kez reaksiyonlar kuruldu. 100 µl'de 1×10^3 hücre/kuyucuk içerecek şekilde 96 kuyucuklu plakalara hücreler ekildi. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve 72 saat boyunca hücrelere farklı dozlarda Diaposinin uygulandı (5-10-25-50-100 µM).

Cisplatin, kanser tedavisinde kullanılan en etkili ve en yaygın kemoterapötik ajanlar arasında yer almaktadır (73). Cisplatin hücre içinde DNA ile reaksiyona girerek DNA platin bileşikleri oluşturur. Bu DNA platin bileşikleri, DNA'nın sarmal yapısını deforme ederek transkripsiyonun, replikasyonun, hücre döngüsünün durdurulması ve sonuç olarak hücre apoptozuyla sonuçlanan DNA hasarına neden olmaktadır (74). Ayrıca yapılan çalışmalar, cisplatin ile indüklenen kanser hücresi ölümünün P53'ün aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (75). Biz de bu sebeple çalışmamızda pozitif kontrol olarak Cisplatine deney gruplarımızda yer verdik.

Diaposinin dozlarının uygulanması öncesinde 10 mM'lık ana stok DMSO çözeltisi içerisinde hazır hale getirildi. 10 mM ana stok üzerinden her bir uygulama dozu için (1,10,25,50 ve 100 µM) ara dozlar aşağıdaki tablodaki şekilde hazırlandı.

1 µM Diaposinin için 0,1 µL ana stok+999,9 µL DMEM
10 µM Diaposinin için 1 µL ana stok+999,5 µL DMEM
25 µM Diaposinin için 2,5 µL ana stok+999 µL DMEM
50 µM Diaposinin için 5 µL ana stok+995 µL DMEM
100 µM Diaposinin için 10 µL ana stok+990 µL DMEM

Tablo 3: Diaposinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

72 saat ilaç uygulaması sonrasında MTS ve PMS içeren solüsyondan (20:1 v/v) 20 µl alınarak 100 µl besiyeri içeren her bir kuyuya eklendi. 37°C'de 1-2 saat inkübasyondan sonra 490 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Elde edilen optik dansite değerleri Microsoft Excel programı kullanılarak hesaplandı ve ortalama optik dansite ± standart sapma değerleri baz alınarak kontrol grubuna göre % grafik şeklinde bulgular kısmında gösterildi. Bu test, hücre proliferasyonu üzerindeki etkiyi incelemek ve diaposinin için etkin doz (IC50) belirlemek için kullanıldı.

3.3.3. Koloni Formasyon Testi

PANC-1 hücreleri, 6 kuyucuklu plakalara her 2 ml'de ortalama 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24-48 saat inkübasyon sonrası hücrelerin yüzeye tutunduklarından emin olunduktan sonra diaposinin uygulaması (IC50, yarısı ve iki katı düzeyde) gerçekleştirildi. Kuyucuklara sırasıyla konulanlar;

- Kontrol
- DMSO
- Cisplatin 5µg/ml
- Diaposinin 5 µM
- Diaposinin 10 µM
- Diaposinin 20 µM

1 hafta sonra ikinci kez ilaç uygulamaları yapıldı ve yaklaşık 2. hafta sonunda tedavi uygulanmamış kontrol kuyucuğundaki koloni sayısı ve yoğunluğu dikkate alınarak deney sonlandırıldı. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar bir kez PBS ile yıkandı ve %10'luk kristal viyole ile boyandı. Son olarak da plakalardan resimler çekilerek kuyulardaki koloni sayıları ya da histogramik değerleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.3.4. Hücre Migrasyonu Testi (Wound-healing/Yara İyileşmesi)

Yara iyileşmesi testi, in vitro hücre migrasyonunun değerlendirilmesinde ilk olarak geliştirilmiş basit, ucuz ve kolay uygulanabilir bir metottur. Bu yöntem, in vivo yara iyileşmesi sırasında hücrelerin nasıl hareket ettiğini açıklar. PANC-1 hücreleri 6-kuyucuklu plakalara 15 x 10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat kadar

inkübasyona bırakıldı. Sonrasında uygun dozda (IC50, yarısı ve iki katı düzeyde) Diaposinin ile uygulamalar gerçekleştirildi (Diaposinin 5-10-20 μ M). Diğer 3 kuyucuğa kontrol, DMSO ve Cisplatin 5 μ g/ml olarak sırasıyla eklendi. İlaç uygulaması sonrası her bir kuyu için 100 μ l'lik pipet ucu ile çizik atılarak yara modelleri oluşturuldu. Hemen ardından inverted mikroskopta her kuyucuk için oluşturulan yaraların yaklaşık olarak aynı yerlerinden iki fotoğraf alındı ve bu süre 0. saat olarak kaydedildi. Hücreler ilaçlarla 72 saat boyunca tedavi edildi. Oluşturulan yaralar 0, 24, 48 ve 72 saat için görsel olarak karşılaştırıldı.

3.3.5. Western Blot Analizi

İlk deneylerde elde edilen sonuçların protein düzeyinde doğrulanması ve incelenmesi için Western Blot yöntemi kullanıldı. 72 saat kadar 5 ve 10 μ M Diaposinin tedavilerinden sonra, hücreler tripsinize edildi, ardından santrifüj işlemi ile toplandı, -80 derecede saklandı. Tüm hücre (wholecell) lizatları daha önce belirtildiği şekilde lizis tamponu kullanılarak elde edildi.

Hücrelerin Lizisi: 5 adet pellet ile çalışıldı

Lizis Tamponu:

- 1,2 ml için 1M Tris (pH 7.5) = 24 μ l
- 1,2 ml için 0.5 M EDTA = 12 μ l
- 1,2 ml için NP-40= 12 μ l
- 1,2 ml için Distile su= 1,128 ml
- 1,2 ml için Halt Proteaz inhibitör kokteyli (Pierce)= 12 μ l

Hücreler – 80 °C den çıkarıldıktan sonra 30 dk buzda bekletildi. Üzerine 80 μ l lizis tamponu ilave edilip her 5 dakikada bir önce 20 sn sonra 10 sn en son 5 sn süreyle vortekslenerek 20 dakika buz üzerinde lizis işlemi gerçekleştirildi. Bekletilme işlemi sonunda lizatlar 14.000 rpm'de 15 dk +4 °C de santrifüj edilmiştir. Supernatant protein miktar tayini için kullanıldı.

Total protein konsantrasyonu protein assay kit kullanılarak belirlendi. Her örnekten 40 μ g total protein içeren alikotlar % 4-20 akrilamid içeren sodium dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) tabi tutuldu ve ardından PVDF

(Polyvinylidene Difluoride) membranlara transfer edildi. Tris-buffered saline–Tween 20 (TBS-T) içinde %5 yağsız süt tozu ile bloklanan membranlar, Bax, Bcl-2 antikoru gibi hücre ölümü ile ilgili primer antikolar ile muamele edildi. Antikolar %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T içerisinde dilüe edilecek ve 4°C’de bir gece boyunca inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile yıkandıktan sonra horseradish peroxidase-konjuge antitavşan ya da antifare sekonder antikolar ile inkübe edildi. Eşit protein yüklemesi yapıp yapılmadığının değerlendirilmesinde β -aktin ekspresyonu yükleme kontrolü olarak değerlendirildi. Kemiluminesens belirleme Chemi-glow tespit araçları ile gerçekleştirildi. Blotlama sonuçları kemiluminesens filtreye sahip kameralı bir sistem ile görüntülenmiş ve miktarlar cihaza ait uygulama programındaki dansitometre ya da ImageJ programı vasıtasıyla belirlendi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada in vitro deneyler üç kez birbirinden bağımsız olarak tekrarlandı. İn vitro veriler, grafiklerde ortalama \pm standart sapma (SD) değerleri ile gösterildi. Bulgular SPSS v15.0 paket programı kullanılarak Tukey's Post Hoc testi ve tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) yöntemiyle analiz edildi. Önemlilik düzeyi $P<0.05$ olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

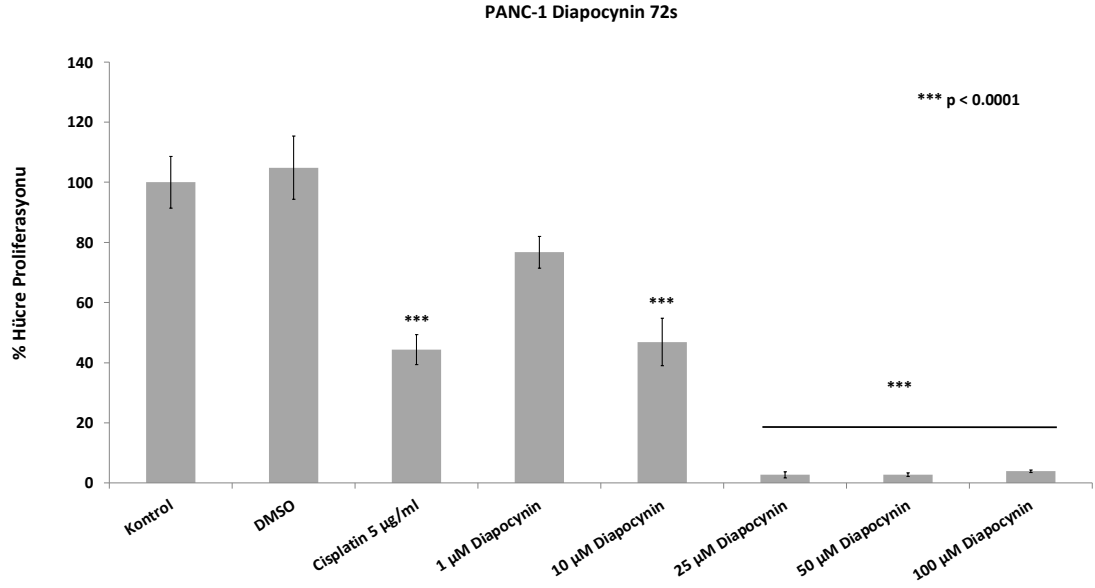
4.1. MTS Hücre Proliferasyonu Testi

Diaposinin'in farklı dozlarda PANC-1 hücre hattında hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelendi. 72 saatlik uygulama sonucunda PANC-1 hücrelerinde proliferasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyaslanarak yüzdesel olarak değerlendirildiğinde alınan değerler tabloda sunulmuştur

Kontrol grubu	%100 ± 8,56
DMSO grubu	%104,89 ± 10,47
Cisplatin grubu	%44,35 ± 5,03
1 µM Diaposinin grubu	%76,73 ± 5,32
10 µM Diaposinin grubu	%46,88 ± 7,86
25 µM Diaposinin grubu	%2,72 ± 0,96
50 µM Diaposinin grubu	%2,75 ± 0,55
100 µM Diaposinin grubu	%3,90 ± 0,46

Tablo 4: Hücre Proliferasyon Testi Kontrole göre Oranlanmış Sonuçları

MTS testi sonuçlarımızda Diaposinin 10µM doz uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre proliferasyonunda azalma görüldü. Diaposinin 25-50-100 µM doz uygulanan gruplarda ise istatistiksel anlamlı olmanın yanında hücre proliferasyonu etkin olarak durarak benzer sonuçlar verdikleri gözlemlendi. (p<0,0001)



Şekil 11: Hücre Proliferasyon Testi sonuç Grafiği (***, p<0,0001)

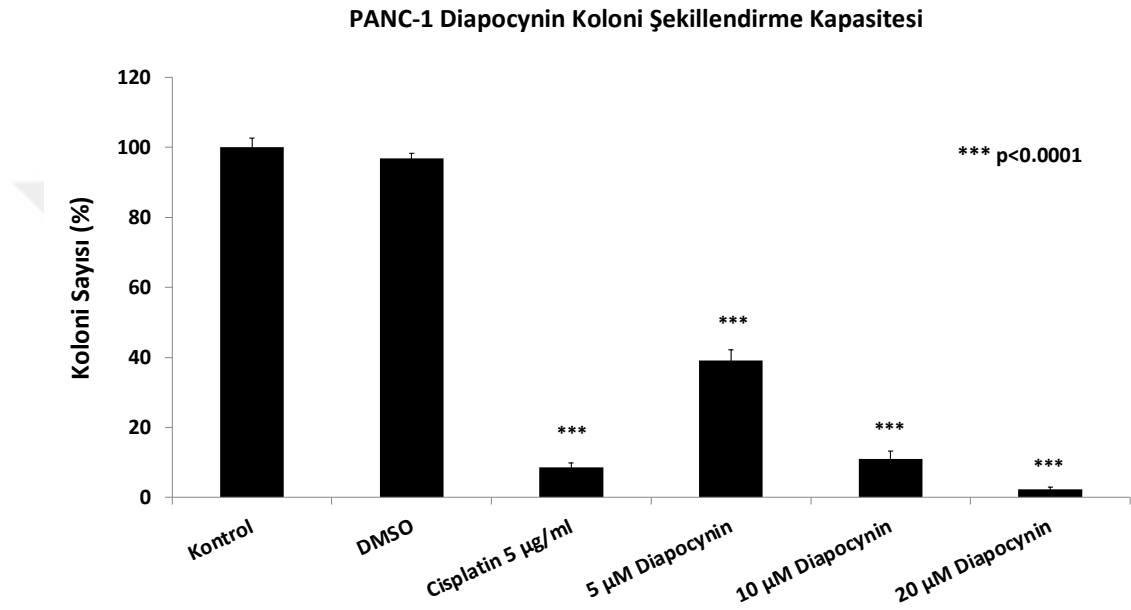
4.2. Hücre Koloni Formasyon Testi

PANC-1 hücre hattı üzerinde yapılan uygulamaların sonucu koloni oluşturabilme yeteneği kontrol grubu ile kıyaslanarak yüzdelik değerlere çevrildiğinde elde edilen değerler tabloda verilmiştir.

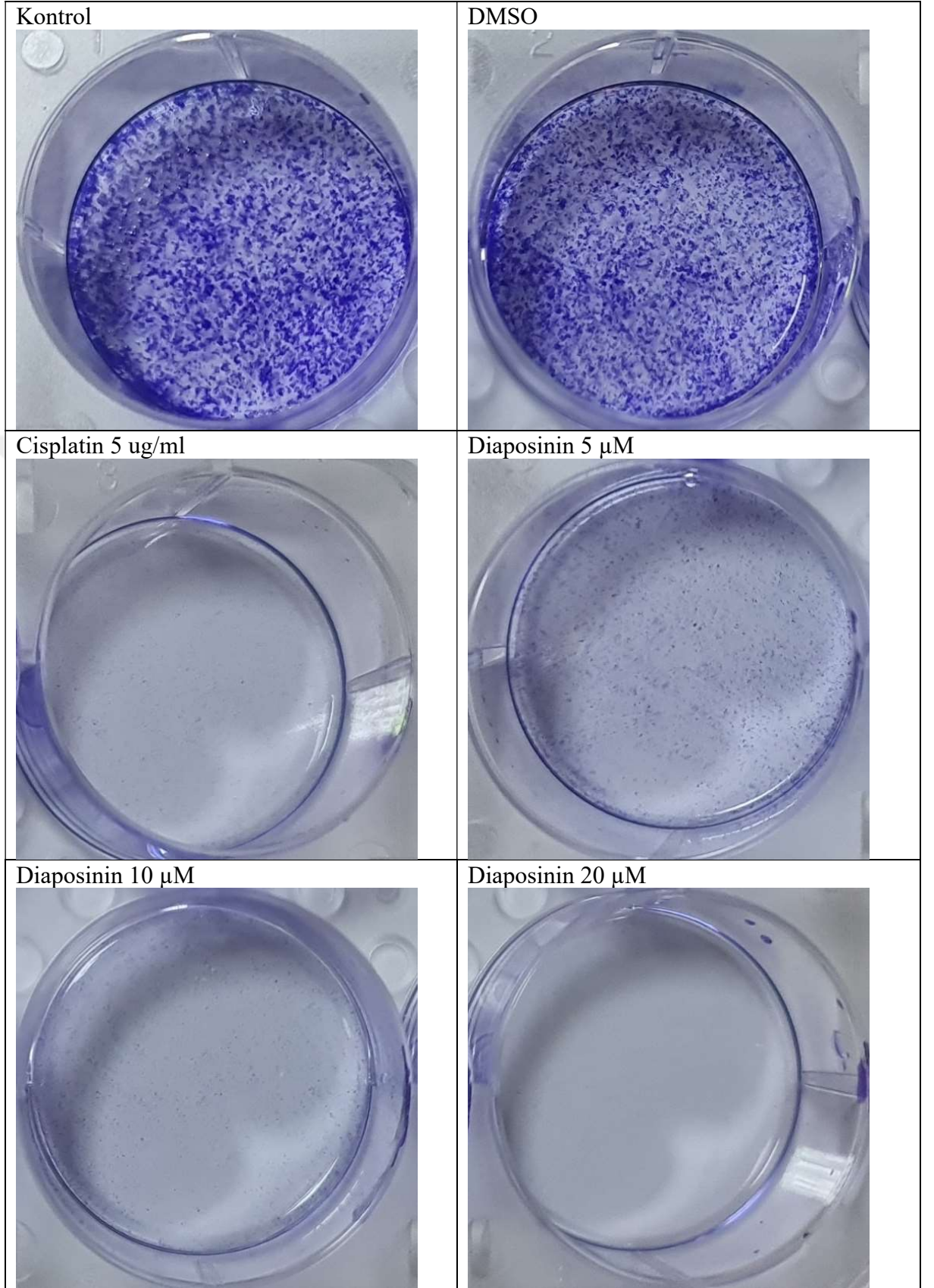
Kontrol grubu	%100 ± 2,56
DMSO grubu	%96,79 ± 1,58
Cisplatin grubu	%8,65 ± 1,18
1 µM Diapocinin grubu	%39,05 ± 3,16
10 µM Diapocinin grubu	%11,02 ± 2,17
20 µM Diapocinin grubu	%2,23 ± 0,79

Tablo 5: Deney Gruplarında görülen Koloni Oluşturabilme yeteneklerinin oranları

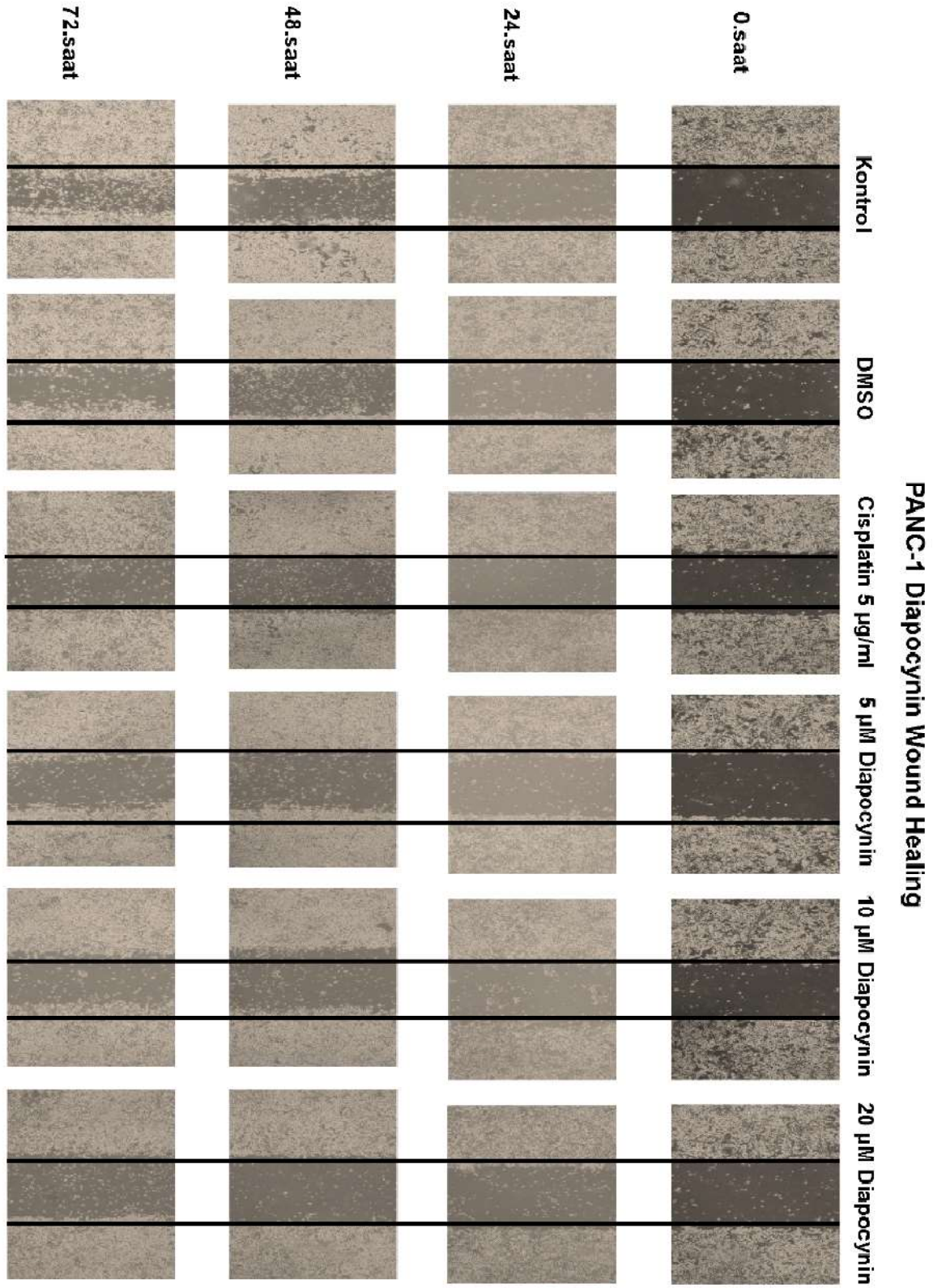
Elde ettiğimiz verilerde koloni formasyonu oluşumunu engellemede 5-10-20 μ M Diaposinin dozlarının anlamlı şekilde koloni oluşmasını azalttığı görülmüştür. 10 μ M Diaposinin grubunda Cisplatin verilen grup ile yakın değerler tespit edilmiştir. 20 μ M Diaposinin ise üremeyi ciddi oranda engellediği için çok daha az sayıda koloni oluşumuna izin vermiştir.



Şekil 12: Koloni Formasyonu Deneyinin Sonuç Grafiği (***; p<0,001)



Şekil 13: Koloni Formasyon Deneyi sonunda Boyanmış kolonilerin gösterimi



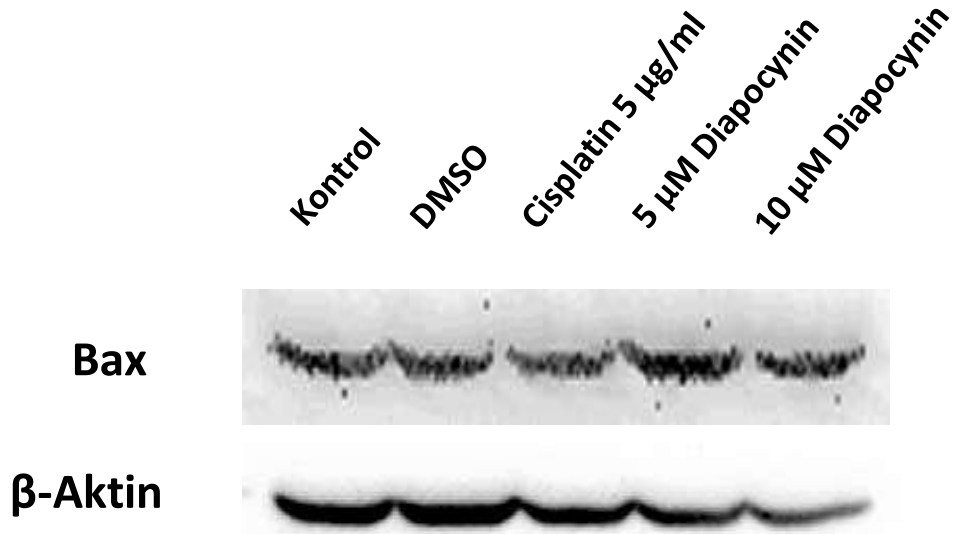
Şekil 15: Yara İyileşmesi Hücre Migrasyonu Deneyi Mikroskopi Görüntüleri

4.4. Western Blot Analizi

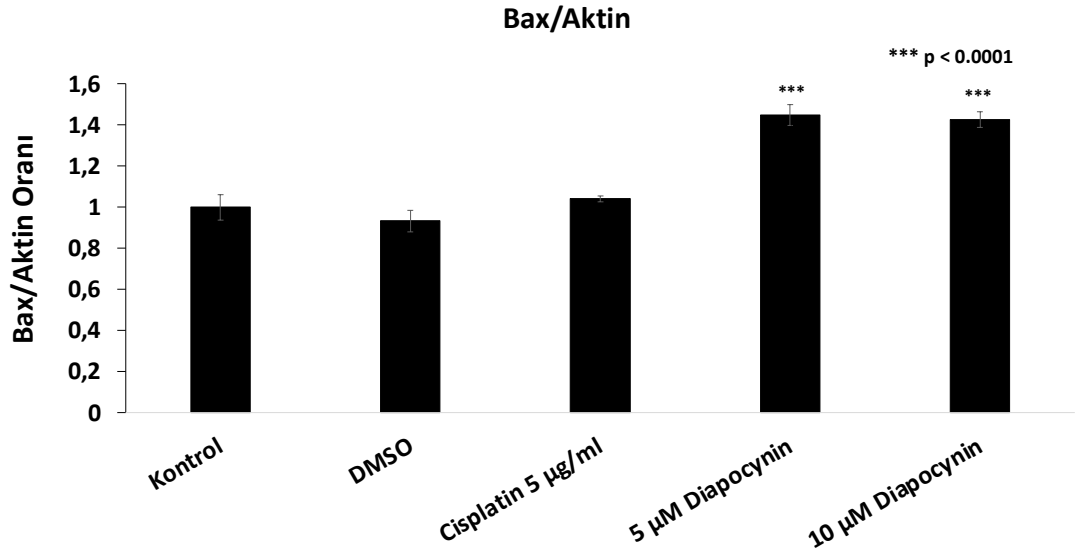
Western Blot analizi için koloni formasyon ve hücre migrasyonu deneylerinde kullanılan gruplar olan Kontrol, DMSO, Cisplatin, 5-10-20 μ M Diaposinin grupları oluşturularak uygulandı. Ancak 20 μ M Diaposinin grubunda blotlama işleminde kullanmaya yeterli hücre peleti elde edilemediği için bulgularına yer verilememiştir.

Protein miktarı sonuçlarının Western Blot kuyucuklarına pelet yükleme miktarlarından etkilenmemesi amacıyla sonuçları yüklenen miktara oranlayabilmek için β -aktin proteiniyle oranlanarak sonuçlar verilmiştir.

Bax protein ekspresyonuna bakıldığında karşılaştırma için; Kontrol grubunda ölçülerek β -aktin ile oranlanan immünfloresan dansite değeri 1 kabul edilmiş ve diğer gruplar bu değer ile kıyaslanmışlardır. DMSO grubu 0,93; Cisplatin grubu 1,05; 5 μ M Diaposinin grubu 1,44 ve 10 μ M Diaposinin grubu 1,42 olarak tespit edilmiştir. Burada 5 ve 10 μ M Diaposinin gruplarında anlamlı artış görülmektedir.

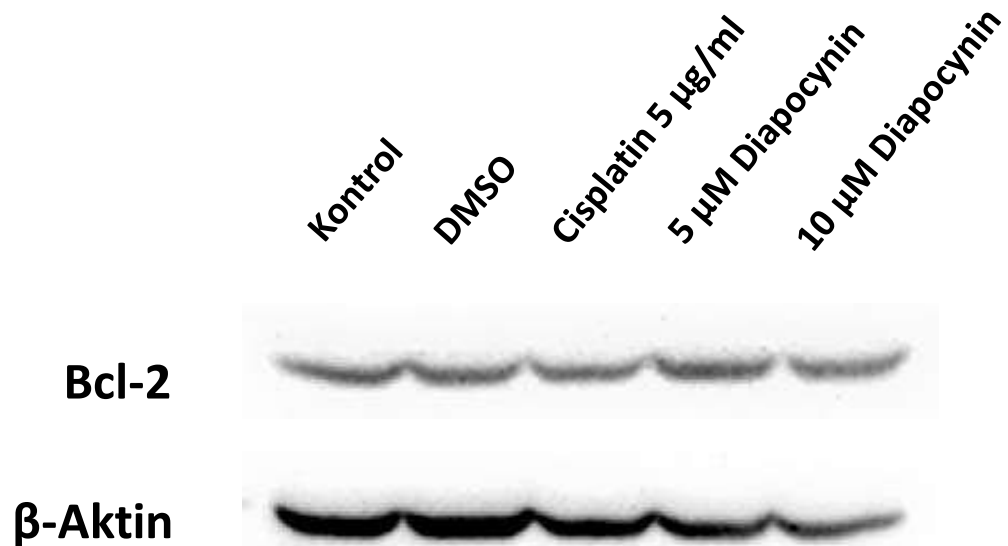


Şekil 16: BAX protein Western Blot Görüntüsü

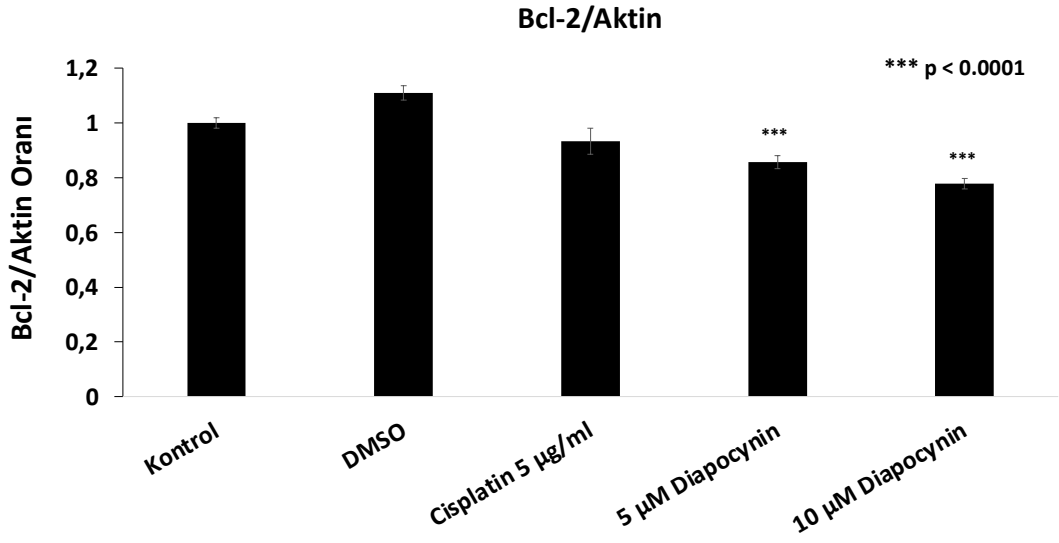


Şekil 17: Gruplar içinde BAX protein ekspresyonu (***) ; $p < 0,0001$)

Bcl-2 protein ekspresyonuna aynı şekilde yapılan kıyaslamada; DMSO grubu 1,11; Cisplatin grubu 0,93; 5 µM Diapocynin grubu 0,85 ve 10 µM Diapocynin grubu 0,77 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda 5 ve 10 µM Diapocynin gruplarında anlamlı bir şekilde Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir.

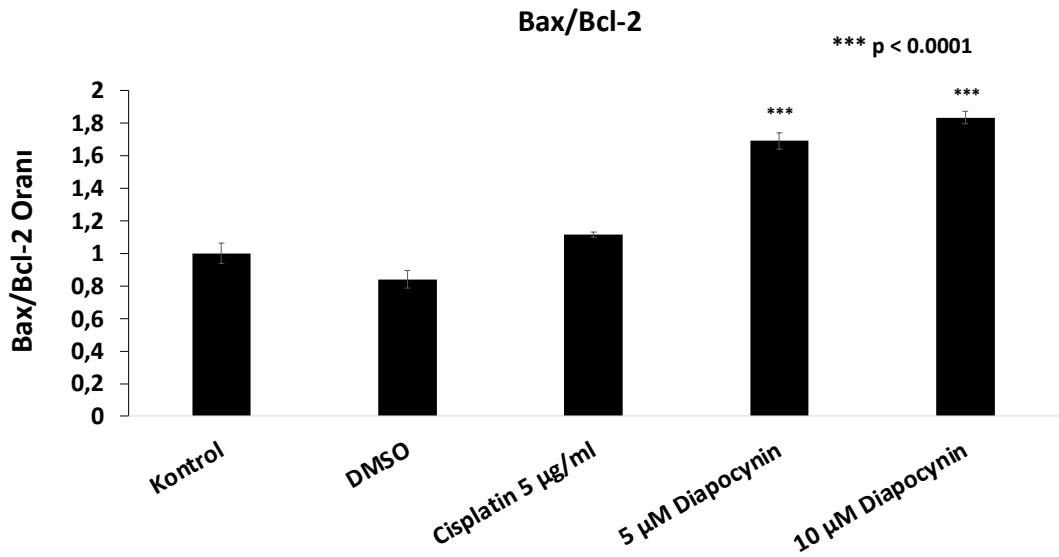


Şekil 18: Bcl-2 protein Western Blot Görüntüsü

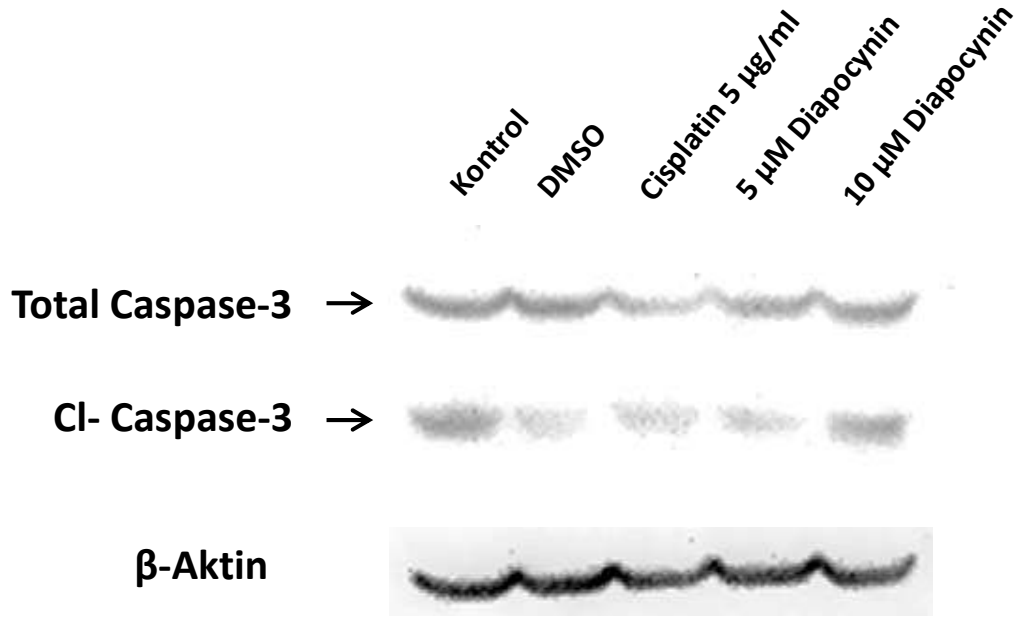


Şekil 19: Gruplar içinde Bcl-2 protein ekspresyonu (***; $p < 0,0001$)

Gruplar arasında Bax ekspresyonu ile Bcl-2 ekspresyonları oranlandığında Bcl-2 protein ekspresyonuna aynı şekilde yapılan kıyaslamada; DMSO grubu 0,86; Cisplatin grubu 1,11; 5 µM Diapocynin grubu 1,69 ve 10 µM Diapocynin grubu 1,83 olduğu görülmüştür. Elde edilen tablo önceki sonuçlara benzer şekilde 5 ve 10 µM Diapocynin uygulamalarında anlamlı Bax/Bcl-2 oranı artışı gözlenmektedir.



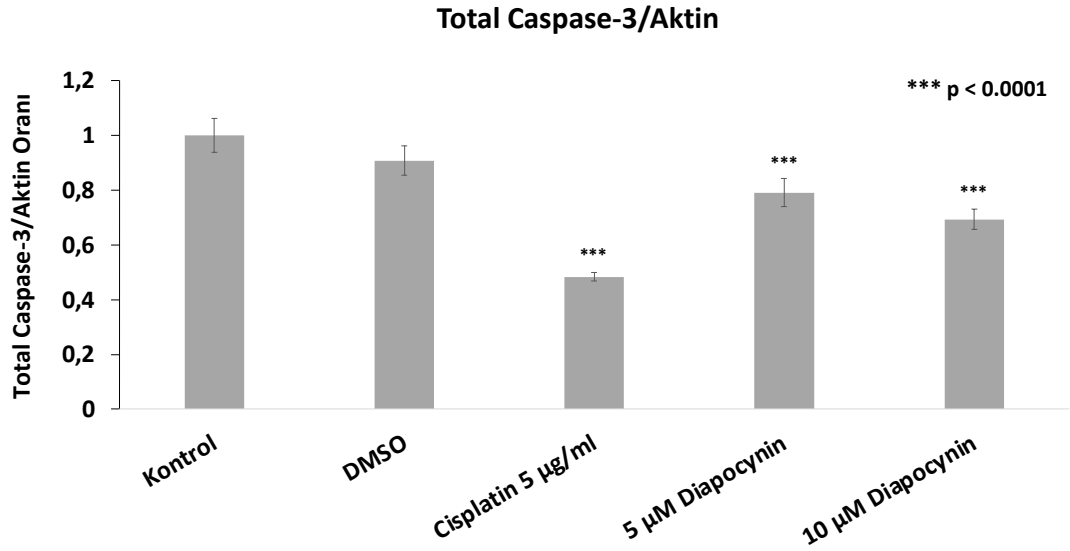
Şekil 20: Gruplar içinde BAX/Bcl-2 proteinlerinin oranı (***; $p < 0,0001$)



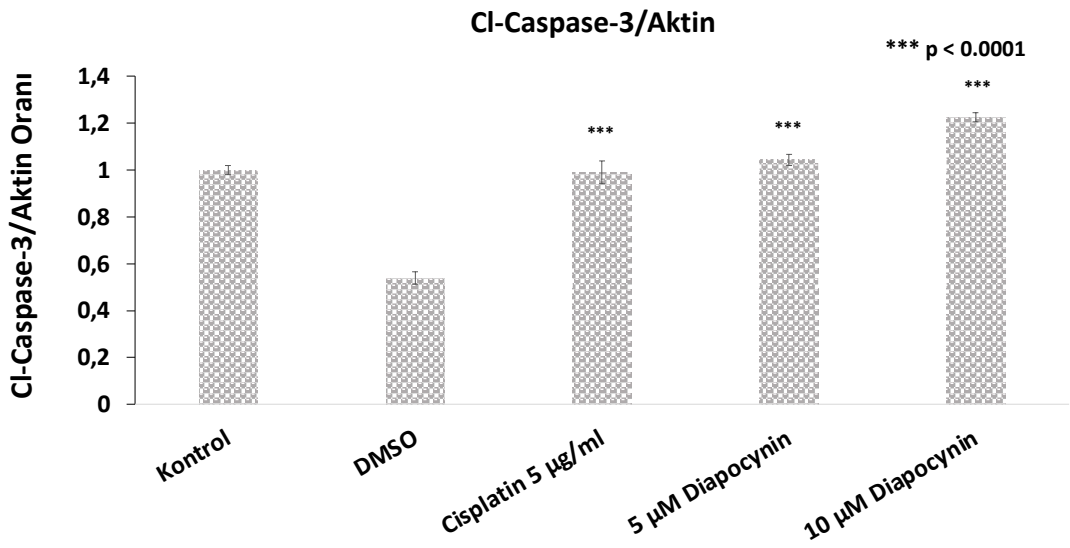
Şekil 21: Bütün Kaspaz 3 ve Cl-Kaspaz 3 proteinlerinin Western Blot Görüntüsü

Gruplar arasında Bütün Kaspaz 3 proteinleri kıyaslandığında; DMSO grubu 0,90; Cisplatin grubu 0,48; 5 µM Diapocynin grubu 0,79 ve 10 µM Diapocynin grubu 0,69 olduğu görülmüştür. Kaspaz 3'ün aktifleştirilmiş hali olan Cl-Kaspaz 3 değerlendirildiğinde ise DMSO grubu 0,53; Cisplatin grubu 0,98; 5 µM Diapocynin grubu 1,04 ve 10 µM Diapocynin 1,22 değerleri elde edilmiştir.

Apoptozun düzenlenmesine pek çok mekanizma işlev görmektedir. Bunlardan bir tanesi Bcl-2 ailesi genleri ve bunların ürünleri olan proteinlerdir. Bcl-2 ailesine ait olan Bcl-2 proteini antiapoptotik, Bax proteini ise pro-apoptotik etki oluştururlar. Western Blot analizinde Diapocynin 5 ve 10 µM dozlarda apoptozu indüklediği, bunu Bax proteini ekspresyonunda anlamlı artış ve Bcl-2 proteini ekspresyonunda anlamlı azalma ile yaptığı, bunlara bağlı olarak da apoptozun ortak yolağının başlangıcında bulunan aktif (cleaved) Kaspaz 3 proteinlerinde anlamlı artış görüldüğü western blot sonuçlarımızda görülmüştür.



Şekil 22: Gruplar içinde Bütün Kaspaz 3 protein ekspresyonu (***, p<0,0001)



Şekil 23: Gruplar içinde Cl-Kaspaz 3 protein ekspresyonu (***, p<0,0001)

5. TARTIŞMA

Dünya çapında kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer alan pankreas kanseri, en ölümcül hastalıklardan biridir. Hastaların %80'inden fazlası tanı sırasında lokal veya uzak metastaz gösterdiği görülmüştür ve bu hastalarda küratif cerrahi tedavi için uygun görülmemektedir. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan istatistiklere göre 5 yıllık sağkalım oranı %6'dan düşüktür. Cerrahi operasyona uygun hastaların takibinde ise %70 oranda bir yıl içinde metastatik hastalık geliştiği kaydedilmiştir. Pankreas kanseri tanı ve tedavisindeki bu zorluklardan ötürü 21. yüzyılda hala baş etmesi oldukça güç bir kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonuç olarak, pankreas kanseri tedavisinde yeni yöntemlerin keşfi çok önemlidir (16, 78).

Karsinogenez, hücrenin yaşamasını, büyümesini ve diferansiyasyonu etkileyen genetik mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesiyle meydana gelmektedir. Kanser gelişirken tümör hücreleri çok sayıda fenotipik özellik kazanır. Bu değişiklikler, tümör hücrelerinin sınırsızca çoğalarak hızlı bir şekilde yayılmasına neden olur. Ayrıca, bu hücreler belirli mikroçevreden bağımsız olarak metastaz yapma ve yaşamlarını sürdürebilir. Tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerin seri mutasyonları, bir dizi farklı mekanizmanın bir sonucu olarak malign fenotipin gelişmesine katkıda bulunur (79).

Kanserleşmiş bir hücre, normalde yaşamsal faaliyetlerini kontrol eden mekanizmalar ve kurallar bütününden sıyrılıp kendi başına kontrolsüzce sağkalım avantajı elde eden asi bir hücredir. Bu özellik, kanserleşmiş hücrelerin organizmanın bağışıklık ve savunma sistemlerine uyarlanmasını ve bu savunma sistemleriyle mücadele etmesini sağlar. Bu, daha saldırgan ve yayılımcı bir hücre davranış paterni oluşturur. Bu nedenle, kanserleşmiş hücreler buldukları dokudan ayrılabilir ve vücut içinde dolaşma yeteneğine sahip olabilirler. Ardından, kendi yapılarına daha uygun olan başka organ ve dokulara yerleşerek metastaz oluşturabilirler. Metastatik kanser hücreleri, sitotoksik ilaçlara veya radyasyon gibi tedavilere direnç gösterirler çünkü bu farklı ve yeni koşullara alışırma yeteneği kazanmışlardır. Bu hücrelerin adaptasyon yetenekleri henüz kısıtlı olduğu ve tedavinin etkilerine direnç gösteremeyecek bir safhada daha kolay tedavi edilebilir olmaları, birçok kanserin başlangıç döneminde daha kolay tedavi edilmesini sağlar (80).

Somatik bir hücrenin kanser hücresine dönüşebilmesi için en az 3 hücrenel düzenleme mekanizmasını atlayabilmesi gereklidir. Bunlardan ilki; normalde sadece bölünme sinyalini aldığı doğru zamanda bölünen hücre artık kendi kendine otonom bir şekilde bölünebilmelidir. Bu sinyal aldıktan sonra aktifleşen regülatör proteinlerin sürekli aktif tutulması ile aşılır. İkinci bypass etmesi gereken mekanizma; stres altında DNA replikasyonuna izin vermeyen veya DNA hasarı tespit edildiğinde aktifleşen programlı hücre ölümünü tetikleyen sigorta sistemidir. Bu sistemin temelinde RB1 Retinoblastoma ve TP53 (p53 proteini üretiminden sorumlu gen) bulunur ve bu genlerin mutasyonu ile sigorta sistemi atlatılır. Üçüncü olarak; somatik hücrelerin DNA iplikçiklerinin sonlanmalarında telomer adı verilen uç gen bölgeleri bulunur ve her bölünmede bu bölge kayba uğrar ve tamir edilemez. Telomer burada genetik bilgi içeren bölgeleri uç kısımda olmamasını sağlayarak defansif fonksiyonu vardır ve azalmasıyla bir nevi bölünme hakkının belirleyicisi olarak işlev görür. Telomer uzunluğu azalmış/bitmiş hücre artık bölünemez. Kanserleşme yolundaki hücre telomeraz enziminin aktivasyonu sayesinde telomerde azalan kısımları uzatarak hücrenin bölünebilirlik sayısındaki sınırı ortadan kaldırır. Telomeraz enzimi aynı zamanda kök hücrelerde de aktif olarak çalışır ve bölünebilirliği sürdürür (79-81).

Somatik hücrelerde bu 3 değişikliğin simültane olarak ortaya çıkabilmesi esasında zordur. Pek çok aşamada hücrede apoptozu tetikleyebilecek bekçi moleküller bulunur. Burada hücrenin hızlı değişim gösterebilmesi gereklidir. Genetik materyalde var olan yatkınlık bu değişimleri kolaylaştırarak aynı anda bu mekanizmalardan kurtularak kanserleşme ihtimalini arttırmaktadır. Aynı zamanda çevresel faktörlerde bulunan olumsuz şartlar hücrenin adaptasyon yeteneğini geliştirerek sağkalım gücünü arttırmakta ve kanserleşmenin önünü açmaktadır. Karsinogenezde hem genetik yükün hem de çevresel faktörlerin çok etkili olmasının temel sebepleri bunlardır (80).

Pankreas kanseri, genetik temelli bir hastalık olarak diğer kanserlerle aynı mekanizmaları içermektedir. Bu hastalığın patogenezi anlama konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İnvaziv olmayan kanal lezyonlarından invaziv kanser türüne olan progresyon, özellikle pankreatik adenokarsinomların yaklaşık %90'ında gözlenen KRAS onkogenindeki aktive edici mutasyonların birikmesi ile

ilişkilendirilmiştir. Pankreas kanseri tümörlerinin büyük bir kısmında KRAS ve p16INK4a CDKN2A mutasyonları gözlenmektedir. Bu mutasyonlar, KRAS genindeki değişiklikler yoluyla PI3K/AKT sinyal yolunun yeniden düzenlenmesine yol açabilir, bu da hücre sağkalımı ve hücre göçü mekanizmalarını etkileyebilir. Aynı zamanda birçok sinyal kaskadını etkinleştirebilir. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı olarak bilinen p53 ve SMAD4/DPC4 genlerindeki inaktive edici mutasyonlar da progresyon sürecine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, diğer bazı genlerdeki mutasyonlar da pankreas kanserinin gelişiminde etkili olabilir. CDK2NA (p16) ve TP53 genlerinin aktivasyon kaybı, kontrolsüz hücre çoğalmasını teşvik edebilir (82-84). Bu nedenle, bu genetik değişiklikler pankreas kanserinin kökeninde önemli bir rol oynar ve terapötik müdahale stratejilerinin geliştirilmesinde dikkate alınmalıdır. Bu genetik değişikliklerin daha iyi anlaşılması, yeni pro-onkogenik hedeflerin tanımlanması ve sonuç olarak pankreas kanserinin patogenezi ile ilgili daha derin bir anlayış geliştirilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Bu, hastaların sağkalımını artırmak için yeni nesil terapötik stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), pankreas kanserlerinin en sık görülen ve en maalesef en kötü prognoza sahip olan formudur. Bu tür kanser, genellikle son derece düşük sağkalım oranlarına sahiptir ve etkili tedavi ile ortalama olarak sadece yaklaşık altı aylık ortalama sağkalım süresi sunar (84, 85). PDAC'ın olumsuz prognozunu belirleyen temel faktörler, tümörün geniş bir şekilde yerel dokulara invazyon yapma eğiliminde olması, erken aşamalarda sistemik yayılım ve metastaz oluşturma yeteneği, aynı zamanda hastaların klinik semptomlarının tanı için yeterince belirgin hale gelmesinin gecikmesidir (86). Günümüzde mevcut tedavi seçenekleri, pankreas kanseri hastalarına genellikle sınırlı sağkalım artışı sunabilmektedir. Hastaların yalnızca küçük bir bölümü (<%20), uygun bir cerrahi rezeksiyon için uygun adaylardır ve bu cerrahi müdahale, tedavi edilmemiş durumlarda beş yıllık sağkalım oranlarını <%4 düzeyinden rezeksiyon sonrası %25-30'lara yükseltebilir (87). Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar, pankreas kanseri tedavi stratejileri alanında bazı ilerlemeler kaydetmiş olsa da, bu ciddi hastalığın prognozu hala kötüdür. Pankreas kanseri, kötü prognoza ve düşük hayatta kalım süresine sahip olması nedeniyle gerçekten önemli bir sağlık sorunudur. Günümüzde kullanılan standart kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi, pankreas kanseri tedavisinde sınırlı

etkilere sahiptir ve pankreas kanseri hücreleri bu tedavilere karşı direnç geliştirebilirler. Bu nedenle, yeni ve daha etkili tedavi yöntemleri geliştirmek için önemli bir ihtiyaç vardır. Ancak bu, pankreas kanserinin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasıyla mümkün olacaktır. Ne yazık ki, önemli ve etkili yeni tedavi seçenekleri henüz öne çıkmamıştır (84,88). Dolayısıyla, PDAC tedavisi için daha fazla araştırma ve geliştirme çalışmalarına olan ihtiyaç belirgindir.

Diaposinin öncül formu olan Aposinin üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar nöroprotektifi, antiinflamatuvar, antikanser etkinlik ve apoptoz ilişkisi üzerine yoğunlaştığı görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada aposinin, hasarlı PC12 hücrelerinde MDA üretimini azaltmış ve SOD aktivitesini artırmıştır. Elde edilen veriler, CoCl₂'ye bağlı PC12 hücre hasarına bağlı indüklenen oksidatif stresin düzenlenmesinde endojen p38-MAPK-kaspaz-3 yolundaki aposinin ön tedavisinin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Aposinin, CoCl₂ kaynaklı PC12 hücre hasarını kısmen p38-MAPK-kaspaz-3 yolunu inhibe ederek azaltabileceği ve Endojen p38-MAPK kaspaz-3 ekspresyonu ve aktivitesinin ve oksidatif stres üretiminin modülasyonu, aposinin uygulaması aracılığıyla terapötik bir hedef olarak düşünülebileceği öne sürülmüştür (89).

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, aposinin'in MTX kaynaklı hepatotoksisite modelinde hepatositleri koruyucu etkileri olduğuna dair kanıt sağlamıştır. Karaciğer hücrelerini korumasının arkasında altı çizilen mekanizmalar arasında, NADPH oksidazın aşağı regülasyonu ve Nrf2/ARE, SIRT1, PPAR γ ve sitogloblin sinyallerinin yukarı regülasyonu yoluyla MTX'in neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesi yer alır. Ek olarak AV, IL-6/STAT-3 ve NF- κ B/AP-1 sinyallemesinin aşağı regülasyonu yoluyla hepatik inflamasyonu hafiflettiği görüldü. Ayrıca aposinin, MTX'in PC-3, HeLa ve K562 kanser hücre hatlarına karşı in vitro sitotoksik aktivitesini arttırdı (90).

Turkish Journal of Medical Sciences'ta yayınlanan bir çalışmada metotreksat uygulanan sıçanlarda testisler incelenmiş ve mtx ile birlikte aposinin uygulandığında inflamasyon belirteci MDA ve MPO değerlerinde anlamlı düşüş görülmüştür. Aynı zamanda MTX grubu ile MTX + Aposinin grubu kıyaslandığında hasarlanan testis

hücrelerinin apoptoz indeksini aposinin'in düşürdüğü gözlenmiştir. Bu etkisini antioksidan oluşu ile gösterdiği ileri sürülmüştür (91).

Bir çalışmada Androjene bağımlı benign prostat hiperplazisi (BPH) modelinde, AR ve NOX4 yollarının katılımıyla ortaya çıkan aşırı ROS salınımı olduğu görülmüştür. BPH in vitro ve in vivo modelinde, NADPH oksidaz inhibitörü Aposinin, AR/NOX4/TGF- β sinyali yoluyla BPH'yi baskılamak için inflamasyonu ve proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (92).

Yapılmış bir çalışmada aposinin, in vitro hücre döngüsünün G1de tutulması yoluyla PLS10 hücrelerinin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu çalışmada şaşırtıcı bir şekilde reaktif oksijen türlerini (ROS) etkilemediği ancak NADPH oksidaz kompleksinin bir bileşeni olan Rac1'in fosforilasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Aposinin Rac1 ve NF- κ B'nin yanı sıra siklin D1'in fosforilasyonunu azaltmıştır. Ayrıca, PLS10'lu prostat kanserinin bir ksenograft modelinde aposinin, tümörlerdeki hücre çoğalmasını ve damar sayısını azaltarak, in vivo doza bağlı bir şekilde tümör büyümesini ve metastazı baskılamıştır. Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonu ve salgılanması, in vivo ve in vitro deneylerde aposinin tedavisiyle azaltılmıştır. Sonuç olarak, androjenden bağımsız prostat kanseri patofizyolojisinde oksidatif stres ile belirgin bir doğrudan ilişki olmamasına rağmen aposinin, kanserin büyümesini in vitro ve in vivo olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (93).

NADPH oksidaz inhibitörü olan aposinin'in prostat adenokarsinomu transgenik sıçan (TRAP) modeli kullanılarak prostat karsinogenezi üzerindeki etkileri incelenen bir çalışmada aposinin tedavisinin toksik etkileri gözlemlenmemiştir. Hem ventral hem de lateral prostattaki karsinomların yüzdeleri ve sayıları, aposinin tedavisi sonucunda doza bağlı olarak önemli ölçüde azalmıştır. Aposinin tarafından reaktif oksijen türlerinin azaldığı, 8-OHdG'nin immünohistokimyası ve dihidroetidyum boyaması ile doğrulanmıştır. Ayrıca, aposinin tedavisiyle Ki67 pozitifliği önemli ölçüde azalmıştır ve klusterin ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile birlikte MEK-ERK1/2 yolunun etkisizleştirilmesi, aposininle tedavi edilen grupların bir özelliği olarak gözlemlenmiştir. İnsan prostat kanseri hücre dizisi LNCaP üzerinde yapılan deneylerde aposinin, reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe etmiş ve klusterin ile

siklin D1'in aşağı regülasyonunu teşvik ederek G0 / G1 hücre döngüsü tutuklanmasını indüklemiştir (94).

Güncel bir yayında Aposinin'in HepG2 hücrelerinde sitotoksitesini gösterilirken; aposinin serbest formda, nanopartiküller içinde ve GS veya GC kaplı nanopartiküller içinde verilmiş. Hücre içine alımın NP ve GS ve GC kaplı NP ile arttığı gösterilmiştir. Hedefe yönelik tedavilerde kullanılabilmesi öne sürülmüştür (95).

Yeni bir çalışma, hamsterda N-Nitrozobis(2-oksopropil)amin kaynaklı pankreas karsinogenezinde resveratrol (RSV) ve aposinin (APO)'nin kemopreventif etkilerini değerlendirmeyi amaçlamış. Yapılan çalışmada RSV ve APO ile tedavi edilen hamsterler, displastik lezyonlarda Ki-67 etiketleme indeksinde bir azalma ile pankreas kanseri vakasında önemli bir azalma göstermiştir. RV ve APO, hücre döngüsünün G1 fazını siklin D1 aşağı regülasyonu ve AKT-GSK3 β ve ERK1/2 sinyalleşmesinin etkisizleştirilmesiyle inhibe ederek insan ve hamster pankreas kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, RV veya APO ile tedavi edilen hücrelerde nükleer fraksiyonda azalan GSK3 β ve ERK1/2 fosforilasyon seviyeleri ve siklin D1 ekspresyonu gözlenmiştir. Fosforile GSK3 β 'un nükleer ekspresyonu, in vivo RV veya APO ile tedavi edilen hamsterlerin displastik lezyonlarında ve adenokarsinomlarında da azaldığı görülmüş. Bu sonuçlar, RV ve APO'nin çekirdekte fosforile edilmiş GSK3 β ve ERK1/2'yi azalttığını, bunun da AKT-GSK3 β ve ERK1/2 sinyal yollarının inhibisyonuna ve in vitro ve in vivo hücre döngüsü durmasına yol açtığını göstermektedir (96).

Bir çalışmada aposininin SBP ile katalizlenen okside türevlerinin meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB 435 hücrelerinde sitotoksik olmayan dozlarda migrasyona engel olduğu ancak MCF10A hücrelerinde etkisiz kaldığı gösterilmiştir (97).

Mevcut bir çalışmada, aposininin, NOX1/EGFR'ye bağımlı azalmış MMP geni yoluyla MMP-2 ve MMP-9'u aşağı regüle ederek kolorektal karsinom invazyonunu engelleyebildiğine dair kanıt sağlamıştır. NOX1'in EGFR'nin, aşağı akış sinyal yollarının ve MMP-2 ve MMP-9 mRNA seviyelerinin aktivasyonunun arttırılmasında merkezi bir rol oynadığını gözlemlenmiştir. Dolayısıyla aposininin NOX1 aktivitesini

ve ekspresyonunu inhibe etme kapasitesi, kolorektal karsinom hücre istilasını inhibe etme kapasitelerinde merkezi bir mekanizma olarak ortaya çıkar. EGFR, MMP'ler ve NOX1'in aşırı aktivasyonunun veya aşırı ekspresyonunun kolorektal karsinom gelişimi ve metastazında rol oynadığı gözlenmiştir (98).

Aposinin tedavisi uygulanan bir çalışmada tedavi edilmemiş farelerle karşılaştırıldığında KK-Ay farelerinde kolorektal anormal kript odaklarının sayısını %21 oranında ve Min farelerinde bağırsak poliplerinin sayısını %40 oranında azalma gözlenmiştir. Her iki fare grubu da yağ dokularında serum düşük yoğunluklu lipoprotein ve 8-okso-20-deoksiguanozin katkı maddelerinin oksidasyonunda iyileşme gösterme eğiliminde olduğu ayrıca polip dokularındaki iNOS düzeylerine azalış olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca aposininin nükleer faktör-kB aktivitesini in vitro olarak baskıladığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar aposinin ve diğer NADPH oksidaz inhibitörlerinin kolorektal kanserde etkili kemopreventif ajanlar olabileceğini düşündürmektedir (99).

Hücrel mikrotübüller hedeflenerek farelerde yapılan bir çalışmada; Aposinin, normal akciğer fibroblast hücrelerinden ziyade akciğer kanseri hücrelerine karşı seçici sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir. Aposinin'in, akciğer kanseri hücrelerinde büyüme, proliferasyon, koloni oluşumu, istila ve sferoid oluşumu dahil onkogenik özellikleri inhibe ettiği gösterilmiştir. Belirlenen diğer özelliklerin yanı sıra aposininin, tübüline bağlanan ve hücrel mikrotübül ağını depolimerize eden yeni ve güçlü bir bileşik olduğu bulunmuştur. Aposinin aracılı hücrel mikrotübül depolimerizasyonu, otofaji aracılı apoptotik hücre ölümünü tetikleyen itici mekanizma olduğu ve bu da akciğer kanseri ilerlemesini geciktirdiği ileri sürülmüştür (100).

2016 yılında yapılmış bir çalışmada, UVB'nin hücrelerdeki NADPH oksidaz aktivitesini artırdığı ve bunun kanserojen sinyalleme yollarına katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Aposinin'in, UVB'nin neden olduğu NADPH oksidaz aktivitesini baskılama yeteneği göstermiştir. Bu data, aposinin'in hücrelerdeki oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağladığını göstermektedir. Aynı zamanda aposinin, MAPK ve Akt sinyal yollarını inhibe etmiştir. Bu, hücrel sinyallemenin kontrolünde rol oynayan önemli protein kinazların etkilenmesini ifade eder. UVB'nin kanserojen etkileri genellikle bu sinyal yollarının aşırı aktivasyonu ile ilişkilendirilir. Aposinin'in bu

sinyal yollarını baskılaması, UVB'nin zararlı etkilerini azaltmada önemli bir rol oynar. Ayrıca, aposinin'in UVB tarafından indüklenen AP-1 ve NF-kB aktivasyonunu ve COX-2 promoter aktivitesini de inhibe ettiği gözlemlenmiştir. UVB'nin hücrelerdeki inflamatuvar yanıtı artırdığı ve kanserojen süreçleri tetiklediği bilinmektedir. Aposinin'in bu transkripsiyon faktörlerini ve gen aktivitesini baskılaması, UVB'nin pro-inflamatuvar etkilerini azaltmada önemli bir potansiyele sahip olduğu öne sürülmüştür (101).

Aposinin'in hepatik hücrelerde karsinogenez üzerinde etkilerini inceleyen bir çalışmada; Glutasyon S-transferaz plasental form pozitif (GST-P+) odaklarının sayısı ve boyutu, doza bağlı bir şekilde aposinin tarafından önemli ölçüde azaltıldığı gözlemlenmiştir. ROS oluşumunun aposinin tarafından azaltılması, dihidroetidyum boyama ile doğrulanmıştır. Aposinin tedavisi ayrıca Ki-67 pozitifliğini önemli ölçüde azalttığı, siklooksijenaz 2'yi aşağı regüle ettiği ve c-Myc yolunun aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bunlarla birlikte, ROS üretimi seviyelerinde Glutasyon S-transferaz plasental form pozitif (GST-P+) odakları ile Glutasyon S-transferaz plasental form negatif (GST-P-) alanları arasında fark olmadığı görülmüştür (102).

Bir çalışmada aposinin'in antimetastatik potansiyelini vanilin, vanilik asit, vanilil alkol ile kıyaslanarak insan akciğer kanseri hücrelerinde hepatosit büyüme faktörü (HGF) kaynaklı göçünü Transwell testi ile incelenmiş ve vanilin ile aposininin hücre göçünü inhibe ettiği görülmüştür. Vanilin ve aposinin hücre göçünü engellediği gibi her iki bileşik de Met ve Erk'in fosforilasyonunu etkilemeden HGF sinyalinin Akt fosforilasyonunu seçici olarak engellediği görülmüştür. Vanilin ve aposinin, in vitro lipid kinaz deneyi ile ortaya çıkan sonuçlara göre, fosfoinositit 3-kinazın (PI3K) enzimatik aktivitesini engellediği, bu da kanser hücre göçünü engelleme etkisinin temelinde yatan mekanizmanın PI3K aktivitesinin inhibe edilmesi olduğunu önermektedir. Ayrıca vanilin ile aposinin antioksidan etkilerinin olduğu ve Tavuk Korioallantois Zarı (Chick Chorioallantois Memran CAM) Testi ile anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (103).

Aposinin hakkında yüksek yağ diyeti verilen farelerde yapılan farmakokinetik ve farmakodinamik bir çalışmada aposinin'in oksidatif stresi beyinde, kalpte ve

karaciğerde önemli ölçüde azalttığı ancak plazma, idrar, beyin, kalp, karaciğer ve beyin doku örneklerinde diaposinin'e rastlanmadığı kaydedilmiştir (104).

In vitro yapılan pek çok çalışmada aposinin'in diaposinin'e dimerizasyonu gösterilmiştir. Ancak in vivo yapılan bir çalışmada aposinin biyoyararlanımı için intraperitoneal uygulanan sıçanların karaciğer, plazma ve beyin analizlerinde diaposinin tespit edilemediği gözlenmiştir. Burada verilen aposinin'in glukronide olduğu ileri sürülmüştür (105). In vivo yapılan başka bir çalışmada ise aposinin verilen farelerin beyin dokularında diaposinin'e rastlandığı ortaya konulmuştur (106). Birbiriyle uyumsuz olan bu gibi bazı yayın sonuçları aposinin'in diaposinin'e in vivo dönüşüm şartları farmakokinetik olarak açıklanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Diaposinin ve aposinin'in vazorelaksan etkisini in vivo ortamda inceleyen bir grup araştırmacı diaposinin'in antioksidan etkisine dair veriler ortaya koymuşlardır. Aposinin ve diaposinin'in, Fe³⁺ TPTZ kompleksini asidik ortamda konsantrasyona bağlı bir şekilde Fe²⁺'ya indirgeyebildiğini gözlemlemişler. Diaposininin test edilen çeşitli konsantrasyonlarının antioksidan kapasitesi (10 µmol/L: 0,118; 100 µmol/L: 0,953; 1000 µmol/L: 3,937 mmol/g/FeSO₄), aposinin antioksidan kapasitesinden (10 µmol/L) önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (10 µmol/L: 0.050; 100 µmol/L: 0.348; 1000 µmol/L:1,793, mmol/g/FeSO₄). Ayrıca çalışmada Aposinin ve diaposinin, kalp hızını değiştirmeden hipotansif etki yarattığı, aposinin ve diaposinin kaynaklı endotel bağımlı ve bağımsız gevşemeye sebep olduğu görülmüştür. Bu etkide NOS, sGC ve potasyum kanalları diaposinin tarafından indüklenen vazorelaksasyonda etkili olduğu öne sürülmüştür. Diaposinin endotel hücrelerinde NO düzeylerini arttırdığı ve ROS düzeylerini azalttığı kayda alınmıştır (107).

Diaposinin ROS üretimini baskıladığını gösteren bir çalışmada EDL-MDX-2 miyoblast hücre kültürü üzerinde deneyler yapılmış. Musküler distrofi modelinde etkiler incelenmek için yapılan çalışmada ekip hücre içi Ca²⁺ artışı, aşırı ROS üretimi ve artan fosfolipaz A2 aktivitesi, distrofin eksikliği olan kastaki patolojiye katkıda bulunduğunu not etmiştir. Ayrıca Ca²⁺, ROS ve fosfolipaz A2'nin, özellikle iPLA2'nin pozitif geri besleme döngülerinde birbirini güçlendirdiği düşünülmektedir. NADPH oksidazlar (NOX), kastaki ROS'un ana kaynağı olarak kabul edilmiştir ve MDX

farelerinin kaslarında aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir. Distrofik miyotübüllerde diaposinin, ROS üretimini inhibe ettiği, iPLA2 aktivitesini ortadan kaldırdığı ve distrofik kasta aşırı Ca²⁺ girişinden sorumlu iki ana yol olan, gerilerek aktive edilen ve depo ile çalıştırılan kanalların aktivitesini azalttığı görülmüştür. Diaposinin ayrıca mdx kasının vahşi tip kas değerine yakın eksantrik kasılmalarının neden olduğu kuvvet kaybını önlediği ve membran hasarını azalttığı kayda alınmıştır (72).

Aposinin, aldosteron enjeksiyonu yapılan sıçanların aort ve böbreğinde p47phox ve gp91phox mRNA ifadesini azaltma yeteneğine sahip oluşu gösterilmiştir (108) ve PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinde testosteronun p47phox RNA ifadesi üzerindeki inhibisyon etkisini artırdığı kaydedilmiştir (109). Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada insan periferik kanında mononükleer hücreler izole edilerek aposinin ve diaposinin çalışılmıştır. İnsan PBMC'lerinde gp91phox mRNA ifadesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, aposinin'in sadece bir NADPH oksidaz aktivite inhibitörü olmadığını aynı zamanda NOX bileşenlerinin mRNA ifadesini azaltabilen bir etki gösterdiğini doğrulamaktadır (110,111). Bu çalışmada etkinin aynı dozlarda aposinin yerine diaposinin kullanılarak önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle, sonuçlarımız aposinin'in diaposinin'e dönüşümünün sadece enzimatik aktivite inhibisyonu ile sınırlı olmayan önemli bir olay olduğunu göstermektedir. Gp91phox mRNA ifadesini inhibe etmenin yanı sıra, LPS uyarımı sonrası PBMC'lerle inkübasyondan sonra aposinin veya diaposinin ile TNF- α salınımının azaldığını gözlemlenmiş, ancak diaposinin 100 μ M konsantrasyonunda aposinin'e göre daha etkiliydi. TNF- α , farklı hücre tiplerinde NOX aktivasyonu aracılığıyla ROS oluşumunu indüklediğinden, TNF- α salınımının inhibe edilmesi aposinin ve diaposinin'in oksidatif stresin azaltılmasına başka bir katkı olabilir (112).

Diaposinin ile ilgili çalışan bir grup araştırmacı LRRK2 mutant farelerde yaptığı bir çalışmada; Parkinson hastalığının patogenezinde reaktif oksijen substratlarının aktif rol aldığını ve Diaposinin'in ROS ortaya çıkışını engelleyici etkisiyle PD'ye karşı kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu fareler genelde 10 aylık dönemlerinde PD semptomları vermeye başladığı rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmadaki koloni ancak 16 aylık dönemde motor koordinasyon defektleri göstermişlerdir. Fareler 12 haftadan itibaren gruplara ayrılıp bir gruba oral gavaj ile

diaposinin (200 mg/kg) haftada 3 kez verilmiştir. Diaposinin verilen grup direğe tırmanma testi ve Rotor-rod testlerinde bariz şekilde kontrole göre motor koordinasyonu korunmuş olarak görülmüştür. PD'ye karşı nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabilir olduğu öne sürmüştür (113). Daha sonra bu çalışmayı Mito-aposinin adı verilen bir türevini sentezleyerek devam ettirmiş ve daha düşük dozlarda terapötik etki oluşturmayı başarmışlardır (114).

Parkinson hastalığı üzerine yapılmış farklı bir çalışmada MPTP uygulanarak hastalık modeli oluşturulan farelerde Diaposinin koruyucu etkinliği gösterilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada oral gavaj kullanılarak verilen diaposinin'in kan beyin bariyerini geçebildiği substantia nigra ve striatumda var oluşu ile gösterilmiştir. Diaposinin'in MPTP'nin neden olduğu striatal nörotransmitter tükenmesini düşük dozlarda (100 ve 150 mg/kg) istatistiksel olarak anlamlı olmayarak ancak 300 mg/kg dozda istatistiksel anlamlı azalttığı veriler arasındadır. Diaposinin MPTP ile oluşan Substantia nigra glial aktivasyonuna, iNOS ekspresyonuna, oksidatif stres oluşumuna ve mikrogial hücre aktivasyonuna engel olduğu gösterilmiştir. Tüm bunların sonucu olarak nörodejenerasyonu engellediği gözlenmiş ve bu özelliğini hem simültane hem de MTPT hasarı sonrası uygulandığında göstermiştir. Ayrıca kronik hastalık modelinde hastalığın ilerleyişini durdurduğu gösterilmiştir (115).

Metoksifenol grubu moleküllerin uygulandığı bir çalışmada A549 akciğer karsinomu ve BEAS2B normal hava yolu epitel hücre hatlarına; diaposinin ve aposinin uygulanmış. Antiinflamatuvar etkiler değerlendirilirken; Aposinin tek başına uygulanarak salınan sitokinlerin TNF-a uygulanmış hücrelere oranla düşük olduğu, TNF-a ile uyarılmış hücreler ile Aposinin ve Diaposinin tedavisi verilerek TNF-a ile uyarılan hücreler arasında CCL2 salınımının Diaposininde çok daha düşük olmakla birlikte aposininde de anlamlı şekilde düşük olduğu kayda alınmıştır (116).

Bir çalışmada aposinin ile diaposinin; LPS ile uyarılan RAW264.7 makrofajlarındaki çeşitli inflamatuvar araçlar üzerindeki aktivitesi ve farelerde dekstran sodyum sülfat (DSS) tarafından indüklenen ülseratif kolit üzerindeki antiinflamatuvar etkisi analiz edilmiştir. Diaposininin aposininden daha yüksek anti inflamatuvar etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Diaposinin, ROS üretimini, TNF-a, IL-6 ve IL-1 β seviyelerini azalttığı ve iNOS ve COX-2 ekspresyonunu inhibe etmenin

yanı sıra LPS ile uyarılmış RAW264.7 hücrelerinde PGE2 üretimini azalttığı gösterilmiştir. Diaposininin antiinflamatuvar moleküler mekanizması, NF- κ B aktivasyonunun baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ancak bu sonuçlar in vivo çalışmalarla paralellik göstermediği not edilmiştir. Haftada üç kez aposinin ve diaposinin (100 mg/kg) oral yoldan uygulanması, DSS'nin neden olduğu deneysel inflamatuvar barsak hastalığına karşı benzer koruma sergilemiştir, bu nedenle aposinin bir ön ilaç olarak düşünülmemesi gerektiği öne sürülmüştür. Ancak diaposinin dozunun (0,3 mmol/kg) aposinin dozunun yarısı kadar iken benzer etkinlik gösterdiği kayda alınmıştır (117).

SOD1G93A transgenik ALS hastalık modeli farelerde yapılan bir çalışmada aposinin ve diaposinin (200 μ M ve 10 μ M, sırasıyla) izole nöron kültüründe nöroinflamasyona bağlı nöron ölümlerini anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Ayrıca yirmi birinci ve yüzüncü günlerde yapılan ölçümlerde aposinin verilen farelerin dokularında diaposinin miktarı HPLC ile tespit edilmiş ancak 5te 1 oranda diaposinin olarak karşımıza çıktığı görülmüştür. Ayrıca diaposinin tedavisinin nöroinflamasyonu baskılamasının yanında sözkonusu farelerin yaşam ömrünü uzatmadığı kaydedilmiştir (106).

Mevcut bir çalışmada diaposinin, sıçanlarda D-galaktoz enjeksiyonu ile birlikte ovariektominin neden olduğu Alzheimer hastalığı modeli ve diaposinin kaynaklı etkileri düzenleyen sinyal mekanizmalarını açıklamaya çalışmıştır. Dişi sıçanlara ovariektomi veya sahte operasyon uygulandı. Yumurtalıkları alınmış sıçanlara 70 gün boyunca intraperitoneal olarak D-galaktoz (150 mg/kg/gün) enjekte edildi ve 43. günde 28 gün boyunca diaposinin (10 mg/kg/gün) ile oral olarak tedavi edildi. Diaposinin, histopatolojik iyileşmenin yanı sıra yeni nesne tanıma ve Morris su labirenti testleri kullanılarak doğrulandığı gibi bilişsel işlevleri koruyucu etki göstermiştir. Hipokampustaki α -sekretaz yükselmesinin aksine β -sekretaz, p-tau ve amiloid β 'da belirgin bir azalmaya neden olduğu görülmüş ve azalan NOX1, tümör nekroz faktörü- α ve nükleer faktör- κ B seviyeleriyle kendini gösteren nöroinflamasyon ve oksidatif stresi engellediği kaydedilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, diaposinin, sinaptofizin, beyin türevli nörotrofik faktör ve fosfo-cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein ekspresyonunu artırmış ve fosfoinositit 3-kinaz (PI3K), glikojen sentaz kinaz-

3 β (GSK-3 β), protein kinaz B (Akt), hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK) 1/2, ERK kinaz kinaz (Raf-1) ve ERK kinaz (MEK) 1/2'nin fosforlu formlarının protein ekspresyonunu artırmıştır. Ayrıca, c-Jun ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ekspresyonunu inhibe etmiştir. Sonuç olarak, diaposinin, JNK/c-Jun sinyalleşme basamaklarını inhibe ederken, Raf-1/MEK/ERK ve PI3K/Akt/GSK-3 β 'yi aktive ederek hafıza bozukluğunu ve AD benzeri anomalileri hafiflettiği görülmüştür (118).

2022 yılında yayınlanmış bir çalışmada Huntington hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarda hayvanlar 14 gün boyunca her gün 10 mg/kg/gün dozunda diaposinin (p.o) oral olarak aldılar ve bu dozu 3-NP'yi (i.p) intraperitoneal olarak almalarından 30 dakika önce aldılar. Araştırma sonuçları, diaposinin uygulamasının 3-NP'nin neden olduğu oksidatif stresi etkili bir şekilde azalttığını göstermektedir. Bu azaltma, azalmış glutatyon, glutatyon-S-transferaz, nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkilendirilen faktör 2 (Nrf2) ve beyinden türetilen nörotrofik faktörün (BDNF) striatal içeriğinde önemli ölçüde artışla belirginleşmektedir. Bu antioksidan savunma mekanizmalarındaki artış, özellikle gp91phox alt birimi olan NADPH oksidazı (NOX2) ifadesindeki azalmayla birlikte meydana gelmiştir, bu da oksidatif stresin azaldığını göstermektedir. Ayrıca, diaposinin 3-NP ile ilişkilendirilen nöroenflamasyonu ve glial aktivasyonu hafifletmiştir. Bu hafifletme, nükleer faktör-K β p65 (NF-K β p65) ekspresyonunun belirgin bir şekilde azalması ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) içeriğinin belirgin bir azalması ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, mikroglial ve astroglial aktivasyonun belirteçleri olan iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül 1 (Iba-1) ve glial fibriller asidik protein (GFAP) için azalan immünreaktivite eklenmiştir. Diaposinin tedavisinin nöroprotektif özellikleri 3-NP ile ilişkilendirilen apoptozu engellemiştir. Bu etki, tümör baskılayıcı protein ve Bcl-2 ile ilişkilendirilen X protein (BAX) içeriğinde belirgin bir azalma ile kendini göstermiştir. Bunun aksine, antiapoptotik belirteç olan B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) içeriği dikkate değer bir şekilde artmıştır, hücre sel hayatta kalma yönündeki bir değişikliği göstermektedir. Son olarak, diaposinin'in nörokoruyucu etkilerinin en azından kısmen sessiz bilgi düzenleyici 1 (SIRT1) upregülasyonuna bağlanabileceğini belirtmek önemlidir. Bu upregülasyon, 3-NP maruziyeti ile ilişkilendirilen tehlikeleri azaltmada kilit bir rol oynamaktadır ve sonuç olarak açık alan, rotarod ve kavrama gücü testleri sırasında gözlemlenen motor fonksiyonlarda iyileşmeyi sağlamıştır. Dahası,

histopatolojik analiz, beyin dokusundaki 3-NP ile ilişkilendirilen bozulmaların hafiflediğini göstermiştir (119).

Diaposinin etken olarak kullanılan bir çalışmada diaposinin'in bir nanopartiküle yüklenerek kullanılabilirliği araştırılmıştır. Parçacığın gövdesi albümin ve süperoksit dismutaz (SOD) kullanılarak üretilmiş ve antikor, yönelim kontrollü bir şekilde parçacığın yüzeyine dahil edildi. Oluşturulan komplekste albüminin ilaç bağlama kabiliyeti aracılığıyla partiküle yüklenen diaposinin partikülden salınarak hücrelerde ROS üretimini engellediği gösterilmiştir. Bu çalışma diaposinin'in güncel olarak çok üzerinde çalışılan bir konu olan hedefe yönelik tedaviler arasında yer alabileceğine dair ümit verici bir çalışmadır (120).

Yapılan bir çalışmada; DFP ile intoksike edilen sıçanlar, diazepam ile davranışsal status epilepticusun sonlandırılmasından 2 saat sonra diaposinin (300mg/kg, oral, altı doz, 12 saat aralıklarla) veya araç ile tedavi edilmiştir. Diaposinin tedavisi, DFP'nin neden olduğu motor bozukluğu önemli ölçüde azaltmış, hafif SE sıçanlarında araç ve diaposinin grupları arasında epileptiform diken hızında fark olmamasına rağmen, şiddetli nöbet geçiren sıçanlarda DFP sonrası ilk 72 saat boyunca epileptiform dikenleri zayıflatmıştır. DPO, hipokampüste DFP kaynaklı reaktif astroglioz, nörodejenerasyon, GP91phox, glutatiolatlı protein, serum nitriti veya interlökinler (IL) IL-1 α , IL-6, IL-2, IL-17A, Leptin, IP-10 gibi pro-inflamatuar sitokinleri ve kemokinleri önemli ölçüde azaltmıştır. Toplu olarak, bu veriler OP kaynaklı nörotoksisite modelinde diaposininin nöroprotektif rolünü desteklemektedir (121).

Alzheimer modelinde kronik skopolamin uygulamasına karşı, aposinin ve galantaminin nörokoruyucu etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, davranışsal ve biyokimyasal deneylere başlamadan skopolamin kronik bir şekilde (6 hafta boyunca) uygulandıktan sonra aposinin ve galantamine uygulanarak 24 saat sonra deneyler yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, skopolaminin kronik tedavisinin bilişsel bozulmaya neden olduğunu gösterdi. Sıçanlar skopolamin ve aposinin ile tedavi edildiğinde hafıza etkilenmediği, gecikme sürelerinin skopolamin grubununkinden istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olduğu görüldü. Skopolamin grubunun artmış A β 1-42 konsantrasyonlarına sahip

olduğunu ve aposinin ve galantamin uygulanan gruplarının Sco grubundakinden daha düşük A β 1-42 konsantrasyonlarına sahip olduğunu gösterilmiştir. Bu nedenle, aposinin A β 1-42 üretimini baskıladığı görülmüştür (122). hAPP(751)SL mutant genetik farelerde yapılan kronik aposinin tedavisiv verilen bir çalışmada farelerde plak boyutlarının küçüldüğü ve nöroinflamasyonun azaldığı; TNF-a lipid peroksidasyonu protein nitasyonu ve NOX aktivasyonunda bariz azalma ile gösterilmiştir (123).

Hepatik karsinom HepG2 hücre hattı üzerinde vanilin türevleri ile yapılan bir çalışmada vanillin, divanillin, aposinin ve diaposinin moleküllerinin migrasyonu engelleyici etkisi incelenmiştir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda (vanilin ve aposinin için 0.5-2.0 mM ve divanilin ve diaposinin için 10-100 μ M; tedavi edilen hücrelerin canlılığı %90'dan fazla kaldığı durumlarda) tüm test bileşikleri invazyonu belirgin bir şekilde engellediği kaydedilmiş ve bu engelleme doza bağlı olarak %20 ila %80 arasında değiştiği görülmüştür. Vanilin (1.1 mM) ve aposinin (0.8 mM) IC50'leri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği ancak, diaposinin'in (23.3 μ M) IC50'si, divanilin'in (41.3 μ M) IC50'sinden istatistiksel olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Vanilin ve aposinin'in monomerik ve dimerik formlarının invazyonu engelleme özelliği kıyaslandığında dimer formlar olan divanilin ve diaposinin'in kanser hücresi invazyonunu engelleme açısından vanilin ve aposinin'den daha etkili olduğunu göstermiştir. İnvazyon ve migrasyon sırasında, hücre yüzeyi ECM'ye integrinler adı verilen bir hücre yüzeyi reseptör ailesi aracılığıyla bağlanır. Integrin-ECM etkileşimleri FAK, PI3K/Akt, ERK ve NF- κ B sinyal yollarını içeren aşağı yönlü sinyalleşmeyi aktive eder. Bu aşağı yönlü sinyalleşmenin bozulması kanser invazyonunu ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (124). Araştırmacılar divanilin ve diaposinin'in hücre-ECM bağlanmasının aktive ettiği intrasellüler sinyalleşimi inhibe edip edemediğini incelemek için, hücrelere 30 dakika boyunca Matrigel'e bağlanma izni vermiş. Sonrasında, hücre lizatından çıkarılan proteinler, sinyal proteinlerinin aktivasyon derecesini belirlemek için immünooblüt analizi yapmışlardır. İmmünooblüt analiz sonuçları, Matrigel bağlanmasının HepG2 hücrelerinde FAK, Akt ve ERK proteinlerinin fosforilasyonunu indüklediğini gösterdi, ancak p65 NF- κ B fosforilasyonunu değiştirmediği görülmüştür. Hem monomerik hem de dimerik vaniloid bileşiklerinin FAK ve Akt fosforilasyonunu özellikle baskıladığını gösterdi. Dahası, vaniloid dimerleri, monomerik formlarından Matrigel tarafından indüklenen

Akt fosforilasyonunu engellemede daha etkiliydi. Bu sonuçlar, divanilin, diaposinin ve monomerik formlarının hücre-ECM bağlanması tarafından aktive edilen FAK ve PI3K/Akt sinyalini inhibe ederek aynı hedeflere etki ettiğini göstermektedir (125).

ROS üretimi neredeyse tüm kanser türlerinde yüksektir ve onkojenik fenotipin sürdürülmesine ve tümör ilerlemesine katkıda bulunur. Ayrıca, ROS'un karsinogenez ve tümör ilerlemesinde önemli faktörler olduğu bilinmektedir (126). Diaposinin'in doğal bir NOX inhibitörü olmasından dolayı NOX yolağını baskılama aracılığıyla antioksidan fonksiyon yaparak tümör ilerlemesine engelleyici etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Kendi çalışmamızın sonuçları incelendiğinde Diaposinin 10µM ve daha yüksek doz uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü. Bu bulgumuzun literatürde taradığımız diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (117, 122, 125). Tümör hücrelerinin temel özelliklerinden biri kontrolsüz büyüme olduğu göz önüne alındığında bu veriler tümör gelişimini engellemede önemli yer tutmaktadır.

Tek bir hücrenin koloniler oluşturmak üzere süresiz olarak bölünmesi ve çoğalması özelliği klonojenik formasyon olarak tanımlanır ve hücrenin çoğalma ve hayatta kalma kapasitesine sahip olduğunun kanıtıdır (127). Bu çalışmada, diaposinin'in PANC-1 hücrelerinin bu yeteneğini doza bağlı bir şekilde önleyebildiğini gösterdik. Bu bulgumuz da literatürde Osteosarkom Sa-OS2 hücre hattıyla yapılmış bir tez çalışmasında alınan veriler ile aynı doğrultudadır (128).

Tümör hücrelerinin yayılması ile mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkileyen bir özelliği de migrasyon yeteneğidir. Diaposinin'in pankreatik kanser hücrelerinde migrasyon yeteneğini kısıtladığı bu yüzden yara iyileşme modelinde iyileşmenin anlamlı şekilde azaldığı yine verilerimiz arasındadır. Bu verimiz literatürdeki kaynaklarla uyumlu olduğu taramalarımızda görülmüştür (97, 125).

Diaposinin uygulanmış PANC-1 hücrelerinden elde ettiğimiz lizatlarda apoptoz ilişkili proteinler olan; Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 düzeyleri incelendiğinde diaposinin'in pankreatik kanser hücrelerine sitotoksik etkisini apoptotik yolak

aracılığıyla başardığı görülmektedir. Diaposinin'in antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri kullanılan bazı nöronal hastalık modellerinde diaposinin'in serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak hücreleri ölümünden koruduğu görülmektedir. Ancak burada hastalık modellerinin oluşturduğu hücrenel hasara cevaben oluşan bir apoptoza karşı etki ettiği göz önünde bulundurulmalıdır. Tümöral hücrelerde diaposinin ile yapılmış çalışmalar kısıtlıdır ancak diaposinin kullanılan çalışmalarda kanseröz hücreleri apoptoza yönlendirdiği görülmektedir (89, 100).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pankreas kanseri dünyada ve ülkemizde her yıl giderek daha çok görülen ve mortalitesi giderek artan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebeple Diaposinin'in anti kanser ve apoptotik etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmamızda pankreatik kanser hücre hattı kullanılmıştır. Diaposinin'in kanser türleri üzerinde yapılmış araştırmalarının çok kısıtlı olması ve monomer formu olan aposinin'in antikanser etkiler gösteriyor olması da bizi çok motive etmiştir. Bu noktada aposinin'in oral ve intraperitoneal verilen formlarında diaposinin'e dönüşme oranları üzerine daha çok çalışma yapılabilir.

Deneyimizde Diaposinin pankreatik kanser hücre hattı olan PANC-1 hücrelerinde proliferasyonunu konsantrasyona bağımlı olarak önemli ölçüde durdurduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda koloni formasyon testi ile diaposinin'in PANC-1 hücrelerinin koloni oluşturması üzerinde inhibe edici etkileri artan konsantrasyonlara bağılı olarak gözlenmiştir. Hücre migrasyonunu değerlendirmek için yaptığımız yara iyileşmesi testinde ise kontrol ve cisplatin grubuna göre yara iyileşmesi kapasitesini önemli ölçüde azaltığımız gördüğümüz diaposinin kanser hücrelerinin çoğalmasını, koloni oluşturabilme ve yayılabilme gibi önemli yeteneklerden mahrum bıraktığı sonucu çok önemlidir.

Western blot analizlerinde proteinlerin aktarıldığı membranlar Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 antikorları gibi hücre ölümü ile ilgili primer antikorlar ile muamele edilmiştir ve diaposinin'in apoptoz indükleyici etkiler sergilediğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, pankreas kanserinin vücutta yayılmasını ve ilerlemesini durdurabilecek diaposinin'in pankreas kanserine karşı savaşta önemli bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda mevcut tedavilerin etkinliğinin arttırılabilmesini sağlamak amacıyla ek tedavi olarak kullanılabilirliği yapılacak çalışmalarla ortaya konulabilir. Ayrıca, bu verilerin in vivo/in vitro ve transkripsiyonel araştırmalar için de bir referans olacağı kanaatindeyiz.

PANKREATİK KANSER HÜCRE HATTINDA DİAPOCYNİN'İN APOPİTOZ İNDÜKLEYİCİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

ÖZET

Dünya Sağlık Örgütünün GLOBOCAN 2020 verilerinde 2020'de Pankreas kanseri sebebiyle, her iki cinsiyet ve her yaştan 466.003 ölüm görülmüştür ve dünya genelinde kanserler arasında yedinci sıradadır. Her yıl artan insidansı ile önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir. Retroperitoneal bir organ olan pankreasın anatomik komşulukları ve hem çölyak arter hem de süperior mezenterik arterden beslenen kanlanması sebepleriyle malignitelerinde metastaz görülmesi kolaydır. Tanı esnasında uzak tutulum gösterme olasılığının yüksek olması hastalığın prognozunun kötü ve mortalitesi yüksek olmasıyla ilişkilidir.

Günümüzde bitkisel kaynaklı antioksidan molekül araştırmaları hız kazanmıştır. Bitki köklerinden elde edilmiş doğal bir NOX inhibitörü olan Aposinin anti kanser araştırmalarda umut verici olarak görülmüştür. Diaposinin aposinin homodimeri olup antioksidan antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir. Diaposinin molekülü hakkında antikanser çalışmalar kısıtlı kalmıştır.

Çalışmamızın deneylerinde diaposinin uygulaması sonrasında pankreatik kanser hücre hattı olan PANC-1 hücrelerinin proliferasyon yeteneğinin doz bağımlı azaldığı, koloni oluşturabilme yeteneklerinin doz bağımlı olarak inhibe olduğu ve hücrelerin apoptoza yöneldiği görülmüştür. Literatür ile uyumlu olan bu verilerimiz gelecekte kanser tedavilerinde diaposinin'in ümit verici bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler

Diaposinin, Pankreas Kanseri, Apoptoz, Antiproliferatif

APOPTOTIC EFFECT OF DIAPOCYNIN ON PANCREATIC CANCER CELL LINE

ABSTRACT

According to the World Health Organisation's GLOBOCAN 2020 data, in 2020, 466,003 deaths from pancreatic cancer occurred in both sexes and all ages, ranking seventh among cancers worldwide. It is an important cause of mortality and morbidity with an increasing incidence every year. Metastasis is easy to be seen in malignancies of the pancreas due to its anatomical neighbourhood as a retroperitoneal organ and its blood supply from both the celiac artery and superior mesenteric artery. The high probability of distant involvement at the time of diagnosis is associated with poor prognosis and high mortality.

Today, research on plant-derived antioxidant molecules has gained momentum. Apocynin, a natural NOX inhibitor obtained from plant roots, has been seen as promising in anticancer research. Diapocynin is the homo-dimer of apocynin and its antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective effects have been shown in many studies. Anticancer studies on diapocynin molecule have remained limited.

In the experiments of our study, it was observed that the proliferation ability of pancreatic cancer cell line PANC-1 cells decreased dose-dependently, their ability to form colonies was inhibited dose-dependently and the cells were directed towards apoptosis after diapocynin administration. These data, which are consistent with the literature, suggest that diapocynin may be a promising agent in cancer treatments in the future.

Key Words

Diapocynin, Pancreatic Cancer, Apoptosis, Antiproliferatif

KAYNAKLAR

1. Cancer Facts and Statistics – American Cancer Society [Çevrimiçi] [Alıntı Tarihi: 20 Ağustos 2023] adres: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html>
2. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN. <https://gco.iarc.fr>. [Çevrimiçi] [Alıntı Tarihi: 21 Ağustos 2023] adres: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
3. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2018 Nov 21;24(43):4846-61.
4. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 12;364(19):1817-25.
5. Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, Gonnermann M, Schönekeas H, Rost A, Neuhaus H, Haag C, Clemens M, Heinrich B. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24:3946-52
6. Jun E, Kim SC, Lee CM, Oh J, Lee S, Shim IK. Synergistic effect of a drug loaded electrospun patch and systemic chemotherapy in pancreatic cancer xenograft. *Sci Rep*. 2017 Sep 28;7(1):12381.
7. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar 1;5(3):231-7.
8. Savla SR, Laddha AP, Kulkarni YA. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. *Drug Metabolism Reviews*. 2021 Oct 2;53(4):542-62.
9. Ellis H. Anatomy of the pancreas and the spleen. *Surgery (Oxford)*. 2013; 31:263-6
10. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 14.baskı. Elsevier inc, Güneş Tıp Kitabevi 2021. s. 961-976.
11. Ganong WF. *Tıbbi Fizyoloji*. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği. 20. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2001. s. 323-483.
12. Leung, P.S. (2010). Physiology of the Pancreas. In: *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 690. Springer, Dordrecht.
13. Kinasiewicz J, Antosiak-Iwańska M, Sabat M. Histomorphometrical analysis of porcine islets of Langerhans. *Transplant Proc*. 2011 Oct;43(8):3105-6.
14. Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Oct;295(4): E751-61.
15. Kern HF. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. [Çevrimiçi] 21 Mart 2014. [Alıntı Tarihi: 23 Ağustos 2023.] <https://www.pancreapedia.org>.
16. Koçatakan P., Ataseven H. PANKREAS KANSERİ. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 2021; 54(1): 59-65.
17. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63:318-48.
18. Modi B, Shires GT. Pancreatic cancer, cystic pancreatic neoplasms, and other nonendocrine pancreatic tumor. In: *Feldman M, Friedman L, Brandt L; eds. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*, 11th ed. Chapter 60, Philadelphia: Elsevier; 2020. p.947-965.

19. Fernandez-del Castillo C. Clinical manifestations, diagnosis and staging of exocrine pancreatic cancer. In: Tanabe K, Howell D. eds. Up to Date, Feb. 2020, Erişim Tarihi 20 Ağustos 2023.
20. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2021: syf. 43-44 [Çevrimiçi] 17/03/2023. [Alıntı Tarihi: 23 Ağustos 2023.]
21. R. H. Hruban, M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern, "Progression model for pancreatic cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 8, pp. 2969–2972, 2000.
22. R. E. Wilentz et al., "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 7, pp. 2002–2006, 2000.
23. E. G. Dumlu, D. Karakoç, and A. Özdemir, "Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: Current perspectives," *Int. Surg.*, vol. 100, no. 6, pp. 1060–1068, 2015.
24. M. Lambe, S. Eloranta, A. Wigertz, and P. Blomqvist, "Pancreatic cancer; reporting and long-term survival in Sweden," *Acta Oncol. (Madr.)*, 2011.
25. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018.
26. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2010 Apr 29;362(17):1605-17.
27. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(6):1252-61.
28. K. Helvacı, Ü. Üyetürk, Ö. Sönmez, İ. Türker, and Ü. Yalçıntaş Arslan, "Evaluation Of Demographic And Clinicopathological Characteristics Of Pancreatic Adenocarcinoma Patients," *Acta Oncol. Turc.*, 2016.
29. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, Kraft P, Mendelsohn JB, Hartge P, Canzian F, et al. 4, 2009, *Am J Epidemiol*, Cilt 170, s. 403-413.
30. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. Wang YT, Gou YW, Jin WW, Xiao M, Fang HY. 2016, *BMC Cancer*, s. 212.
31. Rahman F, Cotterchio M, Cleary SP, Gallinger S. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PLoS One.* 2015;10(4): e0124489.
32. Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021 Jul;18(7):493-502.
33. Davoodi SH, Malek-Shahabi T, Malekshahi-Moghadam A, Shahbazi R, Esmaili S. Obesity as an important risk factor for certain types of cancer. *Iran J Cancer Prev.* 2013 Fall;6(4):186-94. PMID: 25250133; PMCID: PMC4142931.
34. S. Midha, S. Chawla, and P. K. Garg, "Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review," *Cancer Letters.* 2016.
35. Michaud DS. Obesity and Pancreatic Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2016; 208:95-105.
36. Aune D, Greenwood DC, Chan DS, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Cade JE, Burley VJ, Norat T. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic

- review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol.* 2012 Apr;23(4):843-52. doi: 10.1093/annonc/mdr398. Epub 2011 Sep 2. PMID: 21890910.
37. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a pro-spectively studied cohort of U.S. adults. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. 2003, *N Engl J Med.*, s. 1625-1638.
38. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol.* 2021 Mar;15(3):790-800.
39. Carreras-Torres R, Johansson M, Gaborieau V, Haycock PC, Wade KH, Relton CL, et al. The Role of Obesity, Type 2 Diabetes, and Metabolic Factors in Pancreatic Cancer: A Mendelian Randomization Study. *J Natl Cancer Inst.* 2017 Sep 1;109(9):dix012.
40. Roy A, Sahoo J, Kamalanathan S, Naik D, Mohan P, Kalayarasan R. Diabetes and pancreatic cancer: Exploring the two-way traffic. *World J Gastroenterol.* 2021 Aug 14;27(30):4939-62.
41. Pizzato M, Turati F, Rosato V, La Vecchia C. Exploring the link between diabetes and pancreatic cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2019 Aug 3;19(8):681-7.
42. Zheng J, Guinter MA, Merchant AT, Wirth MD, Zhang J, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer: a systematic review. *Nutr Rev.* 2017 Nov 1;75(11):883-908.
43. Comment on 'Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies'. Lightsey D. 4, 2012, *Br J Cancer*, Cilt 107, s. 754-755.
44. Steel H, Park SY, Lim T, Stram DO, Boushey CJ, Hébert JR, et al. Diet Quality and Pancreatic Cancer Incidence in the Multiethnic Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2023 Jan 9;32(1):123-31.
45. Andreotti G, Silverman DT. Occupational risk factors and pancreatic cancer: a review of recent findings. *Mol Carcinog.* 2012 Jan;51(1):98-108.
46. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. Järjarvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulin-en T, Jourenkova N, Kauppinen TP, et al. 2000, *Occup Environ Med*, s. 316-324.
47. Serum cadmium levels in pancreatic cancer patients from the East Nile Delta region of Egypt. Kriegel AM, Soliman AS, Zhang Q, El-Ghawalby N, Ezzat F, Soultan A, Abdel-Wahab M, et al. 1, 2006, *Environ Health Perspect*, Cilt 114, s. 113-119.
48. Cancer excess after arsenic exposure from contaminated milk powder. Yorifuji T, Tsuda T, Doi H, Grandjean P. 3, 2011, *Environ Health Prev Med.*, Cilt 16, s. 164-170.
49. P. Unusual cancer excess after neonatal arsenic exposure from contaminated milk powder. Yorifuji T, Tsuda T, Grandjean P. 5, 2010, *J Natl Cancer Inst*, Cilt 102, s. 360-361.
50. Selenium, selenoproteins and human health: a review. Brown KM, Arthur JR. 2, 2001, *Public Health Nutr*, Cilt 4, s. 593-599.
51. Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. Fowler BA, Whittaker MH, Lipsky M, Wang G, Chen XQ. 5, 2004, *Biometales*, Cilt 17, s. 567-568.
52. Anticarcinogenic effects of selenium. GN Schrauzer. 13-14, *Cell Mol Life Sci*, Cilt 57, s. 1864-1673.

53. The epidemiology of pan-creatitis and pancreatic cancer. Yadav D, Lowenfels AB. 2013, Cilt 144, s. 1252-1261.
54. Genetic predisposition to pancreatic cancer. Ghiorzo P. 2014, World J Gastroenterol, s. 10778–10789.
55. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları. Perek S. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2002. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Cilt 28, s. 215-230.
56. Zhao Z, Liu W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. Technol Cancer Res Treat. 2020; 19:1533033820962117.
57. Korenevskiy NA, BelozeroV VA, Al-Kasasbeh RT, Al-Smadi MM, Aikeyeva AA, Al-Jundi M, et al. Differential Diagnosis of Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis According to Endoscopic Ultrasonography Based on the Analysis of the Nature of the Contours of Focal Formations Based on Fuzzy Mathematical Models. Crit Rev Biomed Eng. 2023;51(3):59-76.
58. Value of three-dimensional reconstructions in pancreatic carcinoma using multidetector CT: initial results. Klauss M, Schobinger M, Wolf I, Werner J, Meinzer HP, Kauczor HU, Grenacher L. 15, 2009, World J Gastroenterol, Cilt 46, s. 5827-5832.
59. Ge L, Pan B, Song F, Ma J, Zeraatkar D, Zhou J, et al. Comparing the diagnostic accuracy of five common tumour biomarkers and CA19-9 for pancreatic cancer: a protocol for a network meta-analysis of diagnostic test accuracy. BMJ Open. 2017 Dec 26;7(12): e018175.
60. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. Adv Exp Med Biol. 2015; 867:247-60.
61. Castellanos EH, Cardin DB, Berlin JD. Treatment of early-stage pancreatic cancer. Oncology (Williston Park). 2011 Feb;25(2):182-9. PMID: 21456390.
62. Ettrich TJ, Seufferlein T. Systemic Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer. Curr Treat Options Oncol. 2021 Oct 19;22(11):106. doi: 10.1007/s11864-021-00895-4. PMID: 34665339; PMCID: PMC8526424.
63. Galluzi, L., & Vitale, I., Molecular mechanism of cell death: recommendations of the Nomenclature on Cell Death 2018. Cell Death & Differentiation, 2018. p. 486–541.
64. Current understanding of apoptosis- programmed cell death. 2018.
65. Jan, R., & Chaudhry, G.-e-S., Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2019. 9(2), p. 205–218.
66. Lamkanfi. M., Opdenbosch, N., Caspases in cell death, inflammation, and disease. Immunity, 2019. p. 1352-1364.
67. Cullen, S. P., & Martin, S. J., Caspase activation pathways: Some recent progress. Cell Death & Differentiation, 2009. 16(7), p. 935–938.
68. Banjara, S., Suraweera, C. D., Hinds, M. G., & Kvensakul, M., The bcl-2 family: Ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms. Biomolecules, 2020. 10(1), p. 128.
69. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G., Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, Aging, 2016. 8(4), p. 603–619.

70. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C., Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 2019, 39(1).
71. Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem*. 2008 Jan 23;56(2):301-6. doi: 10.1021/jf072792n. Epub 2007 Dec 20. PMID: 18092754.
72. Ismail HM, Scapozza L, Ruegg UT, Dorchies OM. Diapocynin, a dimer of the NADPH oxidase inhibitor apocynin, reduces ROS production and prevents force loss in eccentrically contracting dystrophic muscle. *PLoS One*. 2014 Oct 17;9(10): e110708. Doi: 10.1371/journal.pone.0110708. PMID: 25329652; PMCID: PMC4201587.
73. Chen B, Xu M, Zhang H, Wang JX, Zheng P, Gong L, Wu GJ, Dai T. Cisplatin-induced non-apoptotic death of pancreatic cancer cells requires mitochondrial cyclophilin-D-p53 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437: 526-531.
74. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 573-584.
75. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*, 1999, 99: 2467-2498.
76. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 307-320.
77. Bragado P, Armesilla A, Silva A, Porras A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis*, 2007, 12: 1733-1742.
78. Y. X. Du, Z. W. Liu, L. You, W. M. Wu, and Y. P. Zhao, "Advances in understanding the molecular mechanism of pancreatic cancer metastasis," *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*. 2016.
79. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol* 1999; 12:53-6.
80. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer cell, 100(1), 57-70.
81. De Vitis M, Berardinelli F, Sgura A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 18;19(2):606. doi: 10.3390/ijms19020606. PMID: 29463031; PMCID: PMC5855828.
82. J. D. Maust, C. L. Frankowski-McGregor, A. Bankhead, D. M. Simeone, and J. S. Sebolt-Leopold, "Cyclooxygenase-2 influences response to cotargeting of MEK and CDK4/6 in a subpopulation of pancreatic cancers," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 12, pp. 2495–2506, 2018.
83. Van Cutsem, E., Vervenne, W. L., Bennouna, J., Humblet, Y., Gill, S., Van Laethem, J. L., ... & Moore, M. J. (2009). Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology*, 27(13), 2231-2237.
84. Guha, S., Tanasanvimon, S., Sinnott-Smith, J., & Rozengurt, E. (2010). Role of protein kinase D signaling in pancreatic cancer. *Biochemical pharmacology*, 80(12), 1946-1954.
85. Wang, P., Meng, Z. Q., Chen, Z., Lin, J. H., Zhou, Z. H., Chen, H., ... & Liu, L. M. (2008). Survival rate of pancreatic cancer in elderly patients. *Hepato-gastroenterology*, 55(82-83), 681-686.
86. Yeo, T. P., Hruban, R. H., Leach, S. D., Wilentz, R. E., Sohn, T. A., Kern, S. E., ... & Yeo, C. J. (2002). Pancreatic cancer. *Current problems in cancer*, 26(4), 176-275.

87. Maitra, A., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2006). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 20(2), 211-226.
88. Bramhall, S. R., Schulz, J., Nemunaitis, J., Brown, P. D., Baillet, M., & Buckels, J. A. C. (2002). A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 87(2), 161-167.
89. Jie Liu, Yuzhang Zhu, Shipiao Chen, Bin Shen, Fang Yu, Yi Zhang, Ruilin Shen; Apocynin Attenuates Cobalt Chloride-Induced Pheochromocytoma Cell Apoptosis by Inhibiting P38-MAPK/Caspase-3 Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* 23 August 2018; 48 (1): 208–214. doi: 10.1159/000491720
90. Abd El-Ghafar OAM, Hassanein EHM, Ali FEM, Omar ZMM, Rashwan EK, Mohammedsalem ZM, Sayed AM. Hepatoprotective effect of acetovanillone against methotrexate hepatotoxicity: Role of Keap-1/Nrf2/ARE, IL6/STAT-3, and NF- κ B/AP-1 signaling pathways. *Phytother Res.* 2022 Jan;36(1):488-505. doi: 10.1002/ptr.7355. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34939704.
91. Kavram Sarihan K, Yardimoğlu Yılmaz M, Eraldemir FC, Yazir Y, Acar E. Protective effects of apocynin on damaged testes of rats exposed to methotrexate. *Turk J Med Sci.* 2020 Aug 26;50(5):1409-1420. Doi: 10.3906/sag-1909-52. PMID: 32394677; PMCID: PMC7491294.
92. Bo-Ram Jin, Hyo-Jung Kim, Jung-Hyun Na, Won-Kyu Lee, Hyo-Jin An, Targeting benign prostate hyperplasia treatments: AR/TGF- β /NOX4 inhibition by apocynin suppresses inflammation and proliferation, *Journal of Advanced Research*, 2023, ISSN 2090-1232, doi: 10.1016/j.jare.2023.04.006.
93. Suzuki S, Pitchakarn P, Sato S, Shirai T, Takahashi S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. *Exp Toxicol Pathol.* 2013 Nov;65(7-8):1035-41. doi: 10.1016/j.etp.2013.03.002. Epub 2013 May 9. PMID: 23664830.
94. Suzuki S, Shiraga K, Sato S, Punfa W, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Shirai T, Takahashi S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2013 Dec;104(12):1711-7. doi: 10.1111/cas.12292. Epub 2013 Oct 28. PMID: 24118288; PMCID: PMC7654245.
95. Anter HM, Aman RM, Othman DIA, Elamin KM, Hashim IIA, Meshali MM. Apocynin-loaded PLGA nanomedicine tailored with galactosylated chitosan intrigue asialoglycoprotein receptor in hepatic carcinoma: Prospective targeted therapy. *Int J Pharm.* 2023 Jan 25; 631:122536. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122536. Epub 2022 Dec 23. PMID: 36572262.
96. Kato A, Naiki-Ito A, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Mori T, Tsutsumi M, Kuno T, Suzuki S, Kato H, Ohara H, Joh T, Takahashi S. Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 β and ERK1/2. *Oncotarget.* 2015 Dec 15;6(40):42963-75. doi: 10.18632/oncotarget.5981. PMID: 26556864; PMCID: PMC4767484.
97. Klees RF, De Marco PC, Salaszyk RM, Ahuja D, Hogg M, Antoniotti S, Kamath L, Dordick JS, Plopper GE. Apocynin derivatives interrupt intracellular signaling resulting in decreased migration in breast cancer cells. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(2):87246. doi: 10.1155/JBB/2006/87246. PMID: 16883056; PMCID: PMC1460968.
98. Zhu W, Oteiza PI. NADPH oxidase 1: A target in the capacity of dimeric ECG and EGCG procyanidins to inhibit colorectal cancer cell invasion. *Redox Biol.* 2023 Sep; 65:102827. Doi: 10.1016/j.redox.2023.102827. Epub 2023 Jul 25. PMID: 37516013; PMCID: PMC10410180.
99. Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal

tumorigenesis in obese KK-A(y) and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 2015 Nov;106(11):1499-505. doi: 10.1111/cas.12801. Epub 2015 Oct 16. PMID: 26310859; PMCID: PMC4714685.

100. Paul S, Chakrabarty S, Ghosh S, Nag D, Das A, Dastidar DG, Dasgupta M, Dutta N, Kumari M, Pal M, Chakrabarti G. Targeting cellular microtubule by phytochemical apocynin exhibits autophagy-mediated apoptosis to inhibit lung carcinoma progression and tumorigenesis. *Phytomedicine.* 2020 Feb; 67:153152. Doi: 10.1016/j.phymed.2019.153152. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31887479.

101. Byun S, Lee E, Jang YJ, Kim Y, Lee KW. The NADPH oxidase inhibitor apocynin inhibits UVB-induced skin carcinogenesis. *Exp Dermatol.* 2016 Jun;25(6):489-91. doi: 10.1111/exd.12989. Epub 2016 Apr 18. PMID: 26914271.

102. Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Suppresses Preneoplastic Liver Foci of Rats. *Toxicol Pathol.* 2017 Jun;45(4):544-550. doi: 10.1177/0192623317710013. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28573935.

103. Lirdprapamongkol K, Kramb JP, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap C, Dannhardt G, Svasti J. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *J Agric Food Chem.* 2009 Apr 22;57(8):3055-63. doi: 10.1021/jf803366f. PMID: 19368348.

104. Liu F, Fan LM, Michael N, Li JM. In vivo and in silico characterization of apocynin in reducing organ oxidative stress: A pharmacokinetic and pharmacodynamic study. *Pharmacol Res Perspect.* 2020 Aug;8(4):e00635.

105. Wang Q, Smith RE, Luchtefeld R, Sun AY, Simonyi A, Luo R, Sun GY. Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. *Phytomedicine.* 2008 Jun;15(6-7):496-503. doi: 10.1016/j.phymed.2007.09.019. Epub 2007 Oct 30. PMID: 17977702; PMCID: PMC2527211.

106. Trumbull KA, McAllister D, Gandelman MM, Fung WY, Lew T, Brennan L, Lopez N, Morré J, Kalyanaraman B, Beckman JS. Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD1 ALS mice. *Neurobiol Dis.* 2012 Jan;45(1):137-44. doi: 10.1016/j.nbd.2011.07.015. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21820513; PMCID: PMC3710723.

107. Potje SR, Troiano JA, Graton ME, Ximenes VF, Nakamune ACM, Antoniali C. Hypotensive and vasorelaxant effect of Diapocynin in normotensive rats. *Free Radical Biology and Medicine.* 2017 May; 106:148-57.

108. Y. Zhang, M.M. Chan, M.C. Andrews, T.A. Mori, K.D. Croft, K.U. McKenzie, C.G. Schyvens, J.A. Whitworth, Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat, *Am. J. Hypertens.* 18 (2005) 910–916.

109. P.A. Juliet, T. Hayashi, S. Daigo, H. Matsui-Hirai, A. Miyazaki, A. Fukatsu, J. Funami, A. Iguchi, L.J. Ignarro, Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1693 (2004) 185–191.

110. Y. Steffen, C. Gruber, T. Schewe, H. Sies, Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 469 (2008) 209–219.

111. M. Mora-Pale, M. Weiwer, J. Yu, R.J. Linhardt, J.S. Dordick, Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 5146–5152.

112. Kanegae MP, Condino-Neto A, Pedroza LA, de Almeida AC, Rehder J, da Fonseca LM, et al. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 12;393(3):551-4.

113. Dranka BP, Gifford A, McAllister D, Zielonka J, Joseph J, O'Hara CL, Stucky CL, Kanthasamy AG, Kalyanaraman B. A novel mitochondrially-targeted apocynin derivative prevents hyposmia and loss of motor function in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2(R1441G)) transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2014 Nov 7; 583:159-64. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.042. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25263790; PMCID: PMC4253647.
114. Dranka BP, Gifford A, Ghosh A, Zielonka J, Joseph J, Kanthasamy AG, Kalyanaraman B. Diapocynin prevents early Parkinson's disease symptoms in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2R^{1441G}) transgenic mouse. *Neurosci Lett*. 2013 Aug 9; 549:57-62. doi: 10.1016/j.neulet.2013.05.034. Epub 2013 May 28. PMID: 23721786; PMCID: PMC3729885.
115. Ghosh A, Kanthasamy A, Joseph J, Anantharam V, Srivastava P, Dranka BP, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2012 Oct 23; 9:241. doi: 10.1186/1742-2094-9-241. PMID: 23092448; PMCID: PMC3488558.
116. Houser, K.R., Johnson, D.K. & Ishmael, F.T. Anti-inflammatory effects of methoxyphenolic compounds on human airway cells. *J Inflamm* 9, 6 (2012). Doi: 10.1186/1476-9255-9-6
117. Marín M, Gimeno C, Giner RM, Ríos JL, Máñez S, Recio MAC. Influence of Dimerization of Apocynin on Its Effects in Experimental Colitis. *J Agric Food Chem*. 2017 May 24;65(20):4083-91.
118. Weam W. Ibrahim, Hesham M. Ismail, Mahmoud M. Khattab, Noha F. Abdelkader, Cognitive enhancing effect of diapocynin in D-galactose-ovariectomy-induced Alzheimer's-like disease in rats: Role of ERK, GSK-3 β , and JNK signaling, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 398, 2020, 115028, ISSN 0041-008X, doi: 10.1016/j.taap.2020.115028.
119. Ibrahim WW, Abdel Rasheed NO. Diapocynin neuroprotective effects in 3-nitropropionic acid Huntington's disease model in rats: emphasis on Sirt1/Nrf2 signaling pathway. *Inflammopharmacology*. 2022 Oct;30(5):1745-1758. doi: 10.1007/s10787-022-01004-z. Epub 2022 May 31. PMID: 35639233; PMCID: PMC9499906.
120. Yamazoe H. Multifunctional protein microparticles for medical applications. *Biomaterials*. 2018;155:1-12. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.10.045
121. Putra M, Gage M, Sharma S, Gardner C, Gasser G, Anantharam V, et al. Diapocynin, an NADPH oxidase inhibitor, counteracts diisopropylfluorophosphate-induced long-term neurotoxicity in the rat model. *Ann N Y Acad Sci*. 2020 Nov;1479(1):75-93.
122. Joseph E, Villalobos-Acosta DMÁ, Torres-Ramos MA, Farfán-García ED, Gómez-López M, Miliar-García Á, et al. Neuroprotective Effects of Apocynin and Galantamine During the Chronic Administration of Scopolamine in an Alzheimer's Disease Model. *J Mol Neurosci*. 2020 Feb;70(2):180-93.
123. Lull ME, Levesque S, Surace MJ, Block ML. Chronic apocynin treatment attenuates beta amyloid plaque size and microglial number in hAPP(751)(SL) mice. *PLoS One*. 2011;6(5):e20153. doi: 10.1371/journal.pone.0020153. Epub 2011 May 31. PMID: 21655287; PMCID: PMC3105011.
124. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):816-26. doi: 10.1038/nrm1490. PMID: 15459662.
125. Jantaree P, Lirdprapamongkol K, Kaewsri W, Thongsornkleeb C, Choowongkamon K, Atjanasuppat K, et al. Homodimers of Vanillin and Apocynin Decrease the Metastatic Potential of Human Cancer Cells by Inhibiting the FAK/PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Agric Food Chem*. 2017 Mar 22;65(11):2299-306.

126. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010 Jan;38(1):96-109. doi: 10.1177/0192623309356453. Epub 2009 Dec 17. PMID: 20019356.

127. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med.* 2005;110:21-8. doi: 10.1385/1-59259-869-2:021. PMID: 15901923.

128. Matos, Adriana Arruda. Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano [tese]. Bauru: , Faculdade de Odontologia de Bauru; 2018 [citado 2023-09-22]. doi:10.11606/T.25.2018.tde-24052018-175418.

