

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ONKOLOJİ VE KANSER BİYOLOJİSİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**KURUTULMUŞ İNCİR YAĞI'(OLEUM FİCUS CARİCA L)
NIN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNDE ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

SUMA GARİBOVA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. KEMAL ERGİN

AYDIN-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Adnan Menderes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kemal ERGİN'e şükranlarımı sunarım. Bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Sabri BARUTCA'ya ve Panc-1 hücre hattını bizlere hediye ettiği için Sayın Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olan bana manevi güç veren desteklerini hep hissettiğim çok değerli arkadaşlarım Temel Onkoloji AD Sayın Rahmi ÇETİNKAYA'ya, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Disiplinlerarası Sayın Büşra AYDINOĞLU'na, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Disiplinlerarası Sayın Bahar OTU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde gösterdiği sabır, maddi ve manevi destekleri için eşim Toğrul Garibov'a, tüm hayatım boyunca yanımda oldukları gibi eğitim hayatımda da beni destekleyen ve bugünlere gelmemde yardımcı olan, sevgilerini her zaman hissettiğim çok sevgili Annem Sadakat MAMMADOVA'ya ve sevgili Babam Reşat İBRAHİMOV'a teşekkür ederim.

Ayrıca ailemin birer parçası olan sevgili dostlarım Sayın Uzm. Mol. Biyolog Firuze RZAYEVA'ya, Sayın Biyolog ve İnsan Genetik bilimci Zümrüd MEHTİYEVAYA, Sayın Üreme Biyoloğu Aytac ABUŞOVA'ya ve Temel Onkoloji AD Sayın Aydan ALİZADA'ya teşekkür etmeyi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pankreas Kanseri	3
2.1.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.1.1.1. İnsidans	4
2.1.1.2. Mortalite	5
2.1.2. Risk Faktörleri	5
2.1.3. Pankreas Kanserinin Sebepleri.....	6
2.1.4. Onkogenler	12
2.2. Apoptoz	13
2.2.1. Apoptozun Morfolojisi	14
2.2.2. Apoptoz Mekanizmaları	15
2.2.3. Apoptoz Yolakları.....	16
2.2.4. Pankreas Kanserinde Apoptoz Yolları ve bu yolların terapötik kullanımı.....	19
2.3. Ficus Carica.L.....	21
2.4. Ficus Carica ve Kanseri İlişkisi.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Araştırmanın Tipi.....	27
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	27

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	27
3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	28
3.5. Çalışma Planı	28
3.6. Hücre Kültürü	29
3.6.1. Hücrelerin Pasajlanması.....	29
3.6.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi	30
3.7. Doze Belirleme ve MTS/PMS Proliferasyon Deneyi.....	30
3.8. Muse Analizi	32
3.8.1. Hücre Kültürü Kabına Hücre Ekimi	32
3.8.2. Deney Gruplarının Muse Analizine Hazırlanması.....	32
3.9. Klonojenik Deney	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Hücre Kültürü	34
4.2. Doz Belirleme ve MTS/PMS	35
4.3. Muse Analizi	37
4.4. Klonojenik Deney.....	39
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR.....	45
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	55
ÖZ GEÇMİŞ.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APAF	: Apoptotic Protease Activating Factor
BCL	: B-cell lymphoma 2
BRCA1	: Breast cancer gen 1
BRCA2	: Breast cancer gen 2
CARD	: Crystal Structure of caspase recruiting domain
CD	: Classification Determinant
CDK2	: Cyclin-dependent kinase 2
CEA	: Carcinoembryonic antigen
CIAP	: Cellular Inhibitor of Apoptosis
DED	: Death Effector Domain
DISC	: Death-Inducing Signaling Complex
DM	: Diabetes Mellitus
DPC	: Deleted in pancreatic cancer
ECM	: Extracellular Matrix
ER	: Endoplasmic Reticulum
ERK	: Extracellular signal Regulated Kinase
FAP	: Familial Adenomatous Polyposis
GP	: Gen Programı
IAP	: Inhibitors of apoptosis proteins
ICE	: Interleukin converting enzyme
IPMN	: Intraductal papillary mucinous neoplasms
KRAS	: Kirsten rat sarcoma virus
LEC	: Lymphoendotelial Cyst
LKB	: Liver Kinase B1
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MEN	: Multiple Endocrine Neoplasm
MCN	: Mucinous Cystic Neoplasms
MRI	: Magnetic Resonance Imaging
MYC	: Master Regulator of Cell Cycle

PANIN	: Pancreatic intraepithelial neoplasia
PCD	:Programmed Cell Death
PCL	:Pancreatic Cystic Lesion
PDAC	:Pancreatic Ductal Adenocarcinom
PNEN	:Pancreatic Neuroendocrin Neoplasms
PKC	:Protein Kinase C
RTK	: Receptor tyrosine kinases
SCA	: Serous cystadenoma
SCN	: Serous cystic neoplasm
SMA	: Serous microcystic adenomas
SOA	: Serous oligocystic adenoma
SPT	:Solid pseudopapiller tümör
TNFR	:Tumor necrosis factor receptor
TGFB	:Transforming growth factor beta
TSG	: Tumor supressor genes
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	:Von Hippel Lindau
XIAP	: X-linked inhibitor of apoptosis protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	BCL-2 protein alt grupları	18
Şekil 2.	Gıdalarda en çok görülen antosiyaninlerin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 3.	Çalışma planı.....	28
Şekil 4.	Panc-1 hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüleri.....	34
Şekil 5.	DMSO/İncir yağı doz belirleme sonuçları	35
Şekil 6.	Gemcitabine doz belirleme sonuçları	36
Şekil 7.	İncir yağı, Gemcitabine, Gem+İncir proliferasyon sonuçları	36
Şekil 8.	Kontrol grubu sonuçları	37
Şekil 9.	Gemcitabine grubu sonuçları	38
Şekil 10.	İncir yağı grubu sonuçları	38
Şekil 11.	Kombine grubu sonuçları	39
Şekil 12.	Klonojenik deney koloni verileri.....	40

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Kontrol grubu klonojenik deney sonucu.....	39
Resim 2.	Gemcitabine, incir ve kombine gruplarının klonojenik deney sonuçları.....	40



ÖZET

KURUTULMUŞ İNCİR YAĞI' (Oleum Ficus Carica L) NİN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDE ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Garibova S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Temel Onkoloji ve Kanser Biyolojisi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Bu araştırma *Oleum Ficus Carica L.*'deki antosiyaninlerin pankreas kanseri hücrelerine olan etkisinin değerlendirilmesi amacı ile yapıldı.

Gereç ve Yöntem: Araştırmamız Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılmıştır. Araştırmaya Eylül 2020 tarihinde literatür taraması ile başlanmış olup, araştırma proje materyelleri Mart 2021 tarihinde tamamlanmıştır. Mart 2021-Haziran 2021 tarihleri arasında deney grupları oluşturularak elde edilen örneklerden MTS/PMS, Muse Analyzer ve Klonojenik analizleri yapılmıştır.

Bulgular: İncir Yağı, Gemcitabine ve Kombine (Gem+İncir) gruplarında IC₅₀ değerlerini belirlemek için MTS/PMS deneyi yapıldı. Muse Analyzer deneyinde annexinV kiti kullanılarak kontrol, gemcitabine, incir, kombine (gemcitabine+incir) gruplarında apoptotik değerlendirme için yapıldı. Tüm gruplarda canlılık ve apoptoz sonuçları yüzdelik oranla gösterildi. Son olarak Klonojenik Deney yapılarak, kontrol grubunda hücrelerin koloni oluşturduğu, ancak ilaç uygulanan kuyucuklarda (incir yağı, gemcitabine, gemcitabine+incir) koloni oluşturmadığı gözlemlendi.

Sonuç: Yaptığımız çalışmanın sonucuna göre kurutulmuş incir yağının pankreas kanseri hücrelerinde hücre ölümünü tetiklediği kanısına varıldı. Çalışmanın pankreas kanseri tedavisi için gelecekte yeni araştırmalara ışık tutabileceği, incir yağının tümördeki hücre ölümünü tetikleyen bir ilaç/kimyasal olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Antosiyanin, Apoptoz, Ficus Carica L , Flavonoid, Pankreas Kanser Hücresi.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THE DRIED FIG OIL (OLEUM FICUS CARICA L.) ON CELL DEATH IN PANCREATIC CELLS.

Garibova S. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Basic Oncology and Cancer Biology Program, Master's Thesis, Aydın, 2021.

Objective: This study was carried out to evaluate the effect of anthocyanins in Oleum Ficus Carica L. on pancreatic cancer cells.

Material and Methods: Our research was carried out at Adnan Menderes University. The research started with a literature review in September 2020, and the research project materials were completed in March 2021. MTS/PMS, Muse Analyzer and Clonogenic analyzes were performed on the samples obtained by creating experimental groups between March 2021 and June 2021.

Results: MTS/PMS experiment was performed to determine IC50 values in Fig Oil, Gemcitabine and Combined (Gem+Fig) groups. In the Muse Analyzer experiment, the annexinV kit was used for apoptotic evaluation in control, gemcitabine, fig, combined (gemcitabine+fig) groups. Viability and apoptosis results in all groups were shown in percentages. Finally, by performing the Clonogenic Experiment, it was observed that the cells in the control group formed colonies, but did not form colonies in the wells (fig oil, gemcitabine, gemcitabine+fig) in which the drug was applied.

Conclusion: According to the results of our study, it was concluded that dried fig oil triggered cell death in pancreatic cancer cells. It can be hypothesized that the study may shed light on new research in the future for the treatment of pancreatic cancer, and that fig oil may be a drug/chemical that triggers cell death in the tumor.

Keywords: Anthocyanin, Apoptosis, Ficus Carica L, Flavonoid, Pancreatic Cancer Cell.

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Tanımı ve Önemi

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde hızlıca ölüme götüren türlerdendir ve dünyadaki en ölümcül malign neoplazmalardan biridir (Chakupurakal ve diğerleri, 2017). Dünyada pankreas kanseri insidansı, ölüm oranı eğilimleri önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. Pankreas kanserinin bilinen nedenlerinden biri tütün kullanmaktır. Bu risk faktörü, bazı uluslararası cinsiyet farklılıklarını açıklayabilir ve beş yıllık hayatta kalma oranı tahmini % 6 olarak bilinmektedir. Sigara, genetik, obezite, diyet, hareketsizlik gibi bazı risk faktörleri tanımlanmış olmasına karşın, şimdiye kadar pankreas kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemektedir (Ilic ve diğerleri, 2016).

İncir (*Ficus Carica L.*), Moraceae botanik familyasına ait olup, yetiştirilen en eski meyve ağaçlarından biridir. Günümüzde incir, taze ve kuru şekilde tüketilen dünya çapında bir meyvedir. ABD Tıp Enstitüsü Gıda ve Beslenme kurulu tarafından yayınlanan Diyet Referans Alım Miktarları verilerine istinaden kuru incir birçok mineral ve vitaminlerle zengin olmasına rağmen sodyum, yağ ve kolesterol içermemektedir (Lianju ve diğerleri, 2003). Meyve ve sebzelerdeki ana antioksidan aktivitesinin polifenol ve flavonoid bileşiklerinin varlığı ile doğru orantılı olmaktadır (Eberhardt ve diğerleri, 2000). İncir meyvesinde polifenollerin bilhassa antosiyaninlerin içeriği arttıkça, antioksidan aktiviteleri de artmaktadır (Solomon ve diğerleri, 2006a).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, zararlı, önemsiz veya hasar görmüş hücrelerin vücuttan atılmasına yol açan fizyolojik bir prosesdir. Vücutta homeostazi sürdürmek için proliferasyon ve apoptoz süreçleri arasındaki balans esastır (Hengartner, 2000). Apoptoz, bir sıra enzime bağlı biyokimyasal süreçle birlikte hücrenin yapısında bir sıra karakteristik morfolojik değişiklik yapması ile karakterize edilir (D'Arcy, 2019). Kanser biyolojisi ile bağlantılı son çalışmalar, apoptozun ve onu kontrol eden genlerin karsinogenez süreçleri üzerinde önemli bir izlenime sahip olduğunu göstermektedir. İlaveten, apoptoz yollarının deregülasyonu, günümüzde kullanılan tedaviye direnç oluşumuna katkıda bulunur (Fulda ve Debatin, 2006). Apoptozdan kaçınma kanserin önemli niteliklerinden biridir, hem tümörün büyümesini hem de metastazların ilerlemesini desteklemektedir (Simone Fulda, 2009).

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu tez çalışmasında *Oleum Ficus Carica L.*'nin pankreas kanseri hücrelerine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle *Ficus Carica L.* 'de bulunan antosiyaninlerdeki hidroksifenil yapısının ve flavonoidlerin kanser hücrelerinin büyümesini ve gelişmesini engellemesi, ayrıca *Ficus Carica L.* 'in pankreas hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

1.3. Araştırmanın Hipotezi

Ficus Carica L. 'nin pankreas hücre hattında hücre ölümü üzerinde etki eder.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pankreas kanseri

Pankreas, karın boşluğunda, omurganın bel bölümünün ön kısmında, midenin arkasında yerleşen salgı bezidir. Retroperitoneal bir organ olduğu için, ağrısı bele yayılmaktadır. Yunan kökenli kelime olan pankreas; pan (tüm, bütün) ve kreas (et) kelimelerinin birleşmesidir.

Pankreas ekzokrin ve endokrin organ olmakla, %85'ini ekzokrin pankreas, %2'sini endokrin pankreas, diğer kısmı ise ekstraselüller matriks ve damarlar oluşturmaktadır. Ek olarak, pankreasın endokrin ve ekzokrin salgı görevleri de bilinmektedir. Endokrin salgı görevini Langerhans Adacıkları olarak bilinen salgı hücreleri yapıp, salgıladığı insülin ve glukoz metabolizmada büyük rol oynamaktadır. Yetersizliği diyabete sebep olmaktadır. Ekzokrin salgı görevi asinus keseciklerine mensup olup, pankreas özsuyu olarak tanınan ve onikiparmak bağırsağına dökülen alkali bir sıvı salgılamaktadır.

Pankreas kanseri, en ölümcül kanser türlerinden biri olarak bilinmektedir. Diğer kanser tipleri için hayatta kalma oranlarında önemli gelişmelere rağmen, pankreas kanseri hayatta kalma oranları 1960'lardan beri nispeten değişmeden kalmıştır. Pankreas kanseri genellikle ileri bir aşamada tespit edilir ve çoğu tedavi yöntemlerine etkisiz olup, kötü genel prognoza katkıda bulunmaktadır (Ansari ve diğerleri, 2016). Genel olarak pankreas tümörlerinin 2 grubu vardır; Non-endokrin pankreas tümörleri ve Endokrin pankreas tümörleri (Wolfgang ve diğerleri, 2013). Non-endokrin pankreas tümörleri kendi içinde benign ve malign gruplarını bulundurmaktadır. Pankreasın bir grup iyi huylu endokrin tümörüne adenom, fibroma, lipom, kistadenom, hemanjiyom, lenfanjiyom nöroma, denir. Pankreasın endokrin olmayan maligniteleri duktal adenokarsinom, kistadenokarsinom ve başka malignitelerdir (sarkomlar vb.) ve farklı histolojik özel niteliklere sahiptirler. Bu türe başka hastalıklar da sebep olmaktadır. Bu hastalıklara 45 yaşından sonra başlayan Diabetes Mellitus (DM) ve akut pankreatiti (aniden oluşan pankreas iltihabı) örnek gösterebiliriz. Günümüzde pankreas kanserinin genetik bir eğilimden (kök hücre hastalığı) kaynaklandığına dair fikirler vardır (Hezel ve diğerleri, 2006).

2.1.1 Pankreas kanseri epidemiyolojisi

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde hızlıca ölüme götüren türlerdendir ve dünyadaki en ölümcül malign neoplazmalardan biridir (Chakupurakal ve diğerleri, 2017). Pankreas kanserinin iki esas tümör tipi adenokarsinom (vakaların yaklaşık% 85'ini oluşturur) ve pankreas endokrin tümörleridir (tüm vakaların% 5'inden azını oluşturur) ("Global Cancer Observatory", y.y. 2017).

Pankreas kanserinin erkeklerde en sık görülen agresif, ölümcül malignite türlerinden biri olduğu ve daha yaşlı kişilerde (40-85 yaş) daha yaygın olduğu bilinmektedir (Wolfgang ve diğerleri, 2013). Erkeklerde ve kadınlarda görülme oranı yaklaşık olarak eşittir ve son yıllarda yoğunluğu artmaktadır. Pankreas kanseri tüm kanserlerin %2'sini ve kansere ilişkin ölümlerin %5'ini oluşturmaya rağmen semptomsuz ilerleyen kanser türlerinin başında gelmektedir. Vakaların %90'ı adenokarsinogeniktir. Vakaların %10'unda bir aile eğilimi (familial predispozisyon) görülmektedir. Ailede veya bir kişinin geçmişinde belirli tipte kolon poliplerinin varlığı pankreas kanseri olasılığını artırmaktadır. Durdurulması çok zor olan ve hızla çevre organlara yayılan hastalık, erken dönemde hiçbir belirti göstermediği için en ölümcül kanser türlerinden biri olarak bilinmektedir.

GLOBOCAN 2012 verilerine göre, pankreas kanseri yılda 331.000'den fazla ölüme sebep olmakla birlikte (tüm ölümlerin% 4.0'ını oluşturur) her iki cinsiyette de görülen kanser ölümlerinde yedinci sırada yer almaktadır (Ilic ve diğerleri, 2016). Pankreas kanseri için varsayılan 5 yıllık sağkalım oranı% 5'in altındadır. Dünya çapında pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi, artan yaşla alakalıdır ve kadınlara kıyasla erkeklerde daha yaygındır. Geçtiğimiz son yıllarda, pankreas kanseri ölümleri her iki cinsiyette de arttığı görülmüştür (örneğin, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ülkeleri, Japonya, Çin). Sigara içimi, pozitif aile öyküsü ve genetik, diabetes mellitus (DM), obezite, diyet faktörleri, alkol kullanımı, fiziksel hareketsizlik gibi bazı risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen, pankreas kanserinin nedenleri hala yeteri kadar bilinmemektedir (Parkin ve diğerleri, 2011).

2.1.1.1 İnsidans

Pankreas kanseri görülme insidansı bölgeler ve popülasyonlar arasında büyük değişiklikler göstermektedir. 2012'de pankreas kanseri görülme oranları en yüksek Kuzey Amerika (100000 kişi başına 7,4) ve Batı Avrupa'da (100000 kişi başına 7,3), ardından Avrupa ve Avustralya / Yeni Zelanda'daki diğer bölgelerde (100000 kişi başına eşit olarak

yaklaşık 6,5) görülmüştür. En düşük oranlar (100.000 kişi başına yaklaşık 1.0) Orta Afrika ve Güney-Orta Asya'da belirtilmiştir. En yüksek orana sahip popülasyonlar (Çek Cumhuriyeti - 9,7) ile en düşük orana sahip nüfus (Pakistan - 0,5) arasında insidans oranlarındaki farklılıklar ise yirmi kat olmuştur. Yeni vakaların yarısından fazlası (% 55,5) daha gelişmiş ülkelerde kaydedilmiştir (Ilic ve diğerleri, 2016). 2012'deki tüm yeni pankreas kanseri vakalarının yarısından daha azı (% 41,0; vakaların 139363'ü) Asya ülkelerinde kaydedildi. Cinsiyete göre pankreas kanseri insidansında önemli coğrafi farklılıklar vardır.

2.1.1.2 Mortalite

Pankreas kanseri için uluslararası ölüm rasyonları, farklı bölgelerde önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Her iki cinsiyette de 2012'de pankreas kanserinden ölüm oranları en yüksek Kuzey Amerika (100.000 kişi başına 6,9), Batı Avrupa'da (6,8), ardından diğer Avrupa bölgeleri ve Avustralya / Yeni Zelanda (sırasıyla yaklaşık - 6,0) görülmüştür. En az ölüm oranı Orta Afrika ve Güney-Orta Asya'daki ülkelerde kaydedildi (1000000 kişi başına 1.0'dan az). Pankreas kanserinden hayatını kaybedenlerin üçte birinden fazlası (111029 ölüm) Avrupa'da ikamet etmektedir. 2012 yılında Asya ülkelerinde pankreas kanserinden tüm ölümlerin yarısından biraz daha azı (% 41,5; 137251 ölüm) kaydedilmiştir (Ilic ve Ilic, 2016). Pankreas kanserinden ölenlerin yarısından fazlası (% 55,8, 184429 ölüm) daha gelişmiş ülkelerde kaydedilmiştir.

Pankreas kanseri mortalitesi ve insidansı hemen hemen aynıdır, çünkü en ölümcül malign tümörlerden biridir (Kenner ve diğerleri, 2021). Hem erkek hemde kadınlarda pankreas kanseri mortalitesi yaşla birlikte artar ve tüm ölümlerin neredeyse % 90'ı 55 yaşından sonra görülmektedir. Pankreas kanserinin ölüm oranlarındaki önemli farklılıkların nedenleri tam olarak bilinmemektedir. İnsidans oranlarındaki farklılıklar açık ve yanıltıcı olabilir. Pankreas kanserinin gözlemlenmesi oldukça zordur. Malign pankreas neoplazmı, otopsi çalışmalarında saptanan en yaygın kanserler türleri arasında yer almaktadır.

2.1.2. Risk faktörleri

Yaşlılık, tütün tüketimi, fazla kilo (obezite), uzun vadeli alkollü içecekler kullanmak, aile ağacı, kronik pankreatit önemli etkenlerdir (Wolfgang ve diğerleri, 2013). Bu faktörlerden en çok etki eden tütün olduğu tespit edilerek, sigara içenlerde pankreas kanseri riski içmeyenlere göre 2,2 kat daha fazladır. Yapılan araştırmalar sonucunda sigara içenlerde

saptanan pankreas kanseri, sigara içmeyenlerde görülen pankreas kanserine kıyasla parmak izi (fingerprint) yöntemi ile daha fazla mutasyon olduğu kanısına varılmıştır. Ek olarak, Diabetes Mellitus (DM) hastalığına uzun süre maruz kalan bireylerin soz konusu hastalığı pankreas kanseri ile ilişkili olduğu söylenebilmektedir. Vücut kitle indeksi (VKİ), alkol tüketimindeki artış, daha az alkol tüketenlere kıyasla pankreas kanserine sebep olan faktörlerdendir. Düşük veya orta düzeyde alkol tüketimi hastalık riskini artırmaz. Kronik pankreatitte, pankreas kanseri riski kronik pankreatiti olmayanlara göre 2,71 kat daha fazladır.

Familiyal pankreas kanseri (FAP) ve farklı germline genetik mutasyon öyküsü olan kişiler pankreas kanseri gelişimine katkı sağlamaktadır. Ek olarak, Lynch sendromu, Peutz-Jeghers sendromu, kalıtsal pankreatit, kronik pankreatit, pankreasin kistik fibrozu, BRCA2 mutasyonu pankreas kanseri riskini artırmaktadır. BRCA2 mutasyonu yalnız pankreas kanseri değil, meme, yumurtalık ve prostat kanseri riski de oluşturmaktadır (Wolfgang ve diğerleri, 2013).

2.1.3. Pankreas kanserinin sebepleri

Pankreas kanseri, kanser ile ilişkili genlerdeki herediter germ hattı veya somatik mutasyonlardan (onkojenler, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü genleri, apoptoz ve genom koruma genleri) ayrıca kanser progresyonundan ve metastazından kaynaklanır. Ayrıca pankreas kanseri ilerlemesinde hücre tsikli, kısalmış telomeraz, genomik instabilite, pankreas epitel hücrelerinin önemli rol vardır.

Belirlenmiş yüksek risk grupları arasında, pankreas kistik lezyonu (PCL) tanısı olanlar bulunmaktadır. Kistik bir lezyon barındıran hastaların kansere ilerleme olasılığı, ailede PDAC öyküsü olanlara göre daha olasıdır, onları tarama ve gözetim yöntemleri için birincil hedef popülasyon yapar. Bundan başka, PCL'ler malign progresyon için değişken bir risk sunduğundan karmaşıklıklar ortaya çıkar: bazı PCL'ler üç kata kadar artmış PDAC geliştirme riski taşıırken, diğerlerinin marjinal bir risk veya PDAC'ye gelişme olasılığı düşük olmaktadır. Genel popülasyondaki tüm PCL tiplerinin genel yaygınlığı, kesitsel görüntüleme yöntemlerinin her yerde kullanılması nedeniyle son yıllarda arttığı görülmektedir. Amerikan Gastroenteroloji Derneği'ne göre, ilgisiz bir nedenle manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yapılan hastalarda rastlantısal PCL keşiflerinin oranı% 15'tir. Genel asemptomatik

popülasyonun% 0.7-2.6'sının bir tür PCL barındırdığı tahmin edilmektedir. Bu lezyonların prevalansı yaşla birlikte artar; 70 ile 79 yaşındaki hastaların otopsileri,% 25'inin pankreas kisti barındırdığını ortaya çıkarmıştır ve 80'den büyük hastalarda% 37'ye yükseldiği görülmektedir (De Jong ve diğerleri, 2012). Bu oranlar, yalnızca ABD'de kistik lezyonları olan tahmini 3,5 milyon insanı tahmin edebilmektedir.

WHO sınıflandırmasına göre (2000) PCL'ler; 1) Pankreatik intraepitelyal neoplazm (PanIN) ; 2)Seröz tümörler - seröz kistadenom, seröz kistadenokarsinom; 3) Müsinöz kistik neoplazmalar (MCN)-müsinöz kistadenom, müsinöz kistadenokarsinom, 4) İntraduktal papiller neoplazi (İPMN) -müsinöz adenom ve intraduktal papiller-müsinöz adenokarsinom; 5) Katı psödopapiller tümörler şeklindedir. Pankreas kanseri kök hücrelerinin bu 3 prekürsörü oluşturduğuna inanılmaktadır.

PanIN: PanIN'ler non-invaziv mikroskopik epitel neoplazmlardır ve genel olarak küçük pankreas kanalında görünmektedirler (Gnoni ve diğerleri, 2013). Epitelyal atipiyeye uygun olarak 3 alt gruba ayrılır. Bunlardan ilki PanIN-1'(minimalatipi) dirki, kendisinin de iki kolu bulunmaktadır; A) PanIN-1A (flat tip) B) PanIN-1B (papiller tip). Diğer epitelyal atipiyeye uygun 2 alt grub ise PanIN-2 ve 3) PanIN-3' (sınırlı atipi) tür. Bu alt gruplar mutasyonlarla ilişkilidir, ve ayrıca görülme sıklığı yaşla pozitif korelasyon göstermektedirler.

KRAS mutasyonları 12, 13 ve 61 kodonlarında meydana gelir ve HER-2 / neu ekspresine ayrıca PanIN 1A'nın %82'sinde, PanIN 1B'nin %86'sında ve PanIN-2'nin %92'sinde meydana gelmektedir.

Seröz kistadenomlar/Ciddi kistik neoplazmalar (SCA / SCN'ler): seröz mikrokistik adenoma (SMA) ve seröz oligokistik adenoma (SOA) olarak alt bölümleri olan iyi huylu tümörlerdir. Verilerin % 50-75'inde SMA'lar vücuda veya kuyruğa eğilim gösterirken geri kalanı pankreasın başını tutmaktadır (Alpert ve diğerleri, 1988). SMA'lar tüm ekzokrin pankreas tümörlerinin% 1-2'sini oluşturur. Yapılan araştırmalar sonucunda, kadınlar (% 70) ortalama 66 yaş (dağılım 34-91 yıl) olan erkeklerden daha fazla etkilenmektedir. SOA'lar cinsiyet tercihi olmayan SMA'dan çok daha az yaygındır ve esas olarak pankreasın başında ve gövdesinde bulunur. Bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile kesitsel görüntüleme, SCA'lar genellikle bal peteği benzeri bir görünüme sahip multilokülerdir ve merkezi bir yıldız şeklinde yara içermektedir. Bu karakteristik görünüm, genellikle görüntüleme yoluyla kesin bir tanıya yol açabilmektedir. SCN'ler, malign ilerleme riski daha yüksek olan diğer PCL tiplerine göre nispeten daha düşük karsinoembriyonik

antijen (CEA) seviyelerine sahiptir . Bununla birlikte, CEA seviyeleri ile malign ilerleme riski arasında doğrudan bir korelasyonu destekleyen somut kanıt yoktur (Cizginer ve diğerleri, 2011).

SCA'lar pankreas kanalları ile iletişim kurmayan iyi huylu lezyonlar olarak kabul edilmektedir. 2622 hastadan üç kistadenokarsinom vakası bildiren en büyük seri dahil olmak üzere,% 1'in altında bir insidans oranı ile seröz kistadenokarsinoma ilerlemeleri son derece nadirdir (Jais ve diğerleri, 2016). Bu nedenle klinik öneri, tümörün büyüme oranını kontrol etmek için seri görüntüleme ile seröz kistadenomları gözlemlemektir. Yalnızca karın ağrısı, mide bulantısı, sarılık veya hızlı kistik büyüme gibi kitle etkisi semptomları mevcutsa rezeksiyon garanti edilmektedir. Palyatif rezeksiyon, lezyon seröz bir kistadenokarsinoma dönüşür ve malign hale gelirse düşünülebilmektedir.

IPMN: İntraduktal papiller-müsinöz neoplazmalar ana pankreas kanalı veya dallarından kaynaklanan müsin üreten tümörlerdir. Bu lezyonlar, muazzam mukus üretimi ve duktal epitelin papiller büyümesinden kaynaklanan pankreas kanalının genişlemesi ile karakterize edilir. IPMN'ler, yılda 100.000'de 1 insidans oranıyla ekzokrin pankreas neoplazilerinin% 1-3'ünü oluşturmaktadır. Sıklığı erkeklerde, kadınlara göre daha yüksektir. IPMN'ler, yüksek riskli ve düşük riskli olarak ikiye ayrılabilir; yüksek riskli, genişlemiş ana pankreas kanalı > 5 mm veya duvar nodülü varlığı olarak tanımlanmaktadır. Düşük riskli IPMN'ler için yüksek dereceli displazi veya pankreas kanserinin kümülatif insidansı, 1 yılda % 0,02, 5 yılda % 3,12 ve 10 yılda % 7,77'dir. Yüksek riskli IPMN'ler için bu veri 1 yılda % 1,95, 5 yılda % 9,77 ve 10 yılda % 24,68'dir. IPMN'ler, ana kanalı (MD-IPMN) veya yan dalları (BD-IPMN) veya her ikisini de karışık IPMN olarak içerebilmektedir. BD-IPMN'ler yalnızca en yaygın IPMN'ler değil, aynı zamanda en yaygın pankreas kistidir. MD-IPMN'ler BD-IPMN'den daha yüksek malignite riski taşır ve rezekte edilen MD-IPMN örneklerinin% 38-68'i yüksek dereceli displazi göstermektedir (Stark, ve diğerleri, 2016). Multifokal IPMN'ler için malign transformasyon riski, tek bir kistik lezyonla karşılaştırıldığında daha yüksek risk göstericisi değildir. Karışık tip IPMN'ler her ikisinin özelliklerini içerir, ancak ilerleme ve malign potansiyel açısından MD-IPMN'lere en çok benzer şekilde davranmakta ve klinik olarak bu şekilde tedavi edilmektedir. Malign/ invaziv olan IPMN'leri benign tümörlerinden ayırmak, çözülmesi gereken kalıcı ve önemli bir sorun olamaya devam etmektedir. Sitolojik özelliklerine ve müsin immünohistokimyasına (MUC1, MUC2 ve MUC5AC) dayalı olarak, IPMN'ler dört histopatolojik tipte sınıflandırılmıştır; gastrik (% 49-63), bağırsak (intestinal) (% 18-36), pankreatikobiliyer (% 7-18) ve onkositik (% 1-8) (Hisaka ve diğerleri, 2013). Son

araştırmalar iyi huylu (kist boyutu <5 mm ve duvar nodülünün yokluğu) mide tipinin IPMN ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulguyu doğrulayan Furukawa ve ark. mide tipi olan hastaların intestinal tip IPMN'leri olan hastalardan daha iyi prognoza sahip olduğu IPMN sınıflandırmasıyla prognostik ilişki bulmuşlardır (Furukawa ve diğerleri, 2011)Gastrik tip daha sessiz BD-IPMN ile ilişkiliyken, intestinal tip sıklıkla MD-IPMN ile ilişkili olmaktadır. Pankreatikobiliyer tip, bazıları tarafından mide tipinin yüksek dereceli bir versiyonu olarak kabul edilmiştir. Bu lezyonlar nadirdir, iyi karakterize edilmez ve bu tip ile ilişkili invaziv karsinom daha agresiftir. Onkositik tip nispeten nadirdir ve daha az invazivdir ("Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasms of the Pancreas: The American Journal of Surgical Pathology", y.y.). Gastrik tip IPMN'nin intestinal tipten daha iyi bir prognoza sahip olduğu bilinmektedir. Fakat gastrik tipin invaziv hastalık geliştirenleri, intestinal tipten kaynaklanan progresyonu olanlara kıyasla daha kötü sonuçlara sahip olduğu görölmektedir. Bunun nedeni, gastrik IPMN'lerin intestinal IPMN'lerden kaynaklanan kolloid (müsinöz) karsinomun aksine daha agresif tübüler (duktal) karsinom geliştirme potansiyeline sahip olmasıdır.

MCN: Genellikle tek olup, boyutları 5 ve 35 cm arasında değişebilmektedir. Kalın ve fibrotik duvarlara sahip olup, müsin, hemorajik sıvı ek olarak nekrotik materyal içerebilmektedir. Nadir görölmekte olup, tanısı genellikle tesadüfi ve semptomsuzdur lakin, bazen mide bulantısı, sırtta ağrı ve kilo kaybına rastlanmaktadır. Genellikle pankreasın baş ve boyun kısmında yer almakta olup görölme oranı 20:1 (kadın-erkek), yaş ortlaması ise 40-50 arasındır. Mikroskobik olarak incelendiğinde displazinin derecesine göre hafif, orta ve şiddetli MCN olarak gruplandırılırlar. Makroskopik olarak bakıldığı zaman soliter, multiloküler ve uniloküler olan 3 grubu mevcuttur. MCN'ler tipik olarak tek bir lezyondur, tek gözlü veya multiloküler olabilir ve pankreas kanalıyla iletişim kurmaz. Morfolojik olarak, MCN'ler müsin ve hemorajik materyal karışımı içeren bir psödo-kapsülü olan büyük, soliter, bölmeli, kalın duvarlı bir kist ile karakterizedir.

Histolojik analiz, bol miktarda müsin üretimi olan sütunlu hücrelere ek olarak yumurtalık benzeri stromayı ortaya çıkarabilmektedir. 2004'teki uluslararası fikir birliğine göre, benzersiz yumurtalık tipi stromanın histolojik varlığı, MCN'lerin teşhisini doğrulamak için gerekli olmaktadır (Tanaka ve diğerleri, 2006).

Yukarıda bahsedilen seröz kistik lezyonların aksine, MCN'lerin kötü huylu olma veya kötü huylu bir duruma ilerleme eğilimi artmıştır. Bu nedenle, birkaç çalışma, ikisi arasında ayırım yapabilen bir belirteç belirlemeye çalışmıştır. Müsinöz adenokarsinom insidans oranı% 6 ile 36 arasında değişmektedir (Reddy ve diğerleri, 2004). Lezyon multiloküler ise, papiller

projeksiyonlar içeriyorsa ve / veya mural nodüller içeriyorsa malignite riski büyük ölçüde artar.

Pankreasın diğer kistik lezyonları arasında solid psödopapiller tümörler (SPT), lenfoendotelyal kistler (LEC) ve nöroendokrin neoplazmalar (PNEN'ler) yer almaktadır. SPT, 20'li yaşlarındaki genç kadınlarda en sık görülen nadir bir tümördür. SPT'lerin <% 10'u patolojik olarak agresif tümör davranışına sahiptir ve 5 yıllık hastalığa özgü sağkalım% 98'in üzerindedir. Metastazlar mevcutken bile hastaların yüksek sağkalım oranları göz önüne alındığında tümörün ağrısız olduğu düşünülmektedir. LEC'ler, çoğunlukla erkeklerde ortaya çıkan, son derece nadir kompleks lezyonlardır (Borhani ve diğerleri, 2017). Bu lezyonlar malignite barındırabilirken, nadir olmaları yeterli patolojik karakterizasyonu engellemektedir. PNEN'ler de nadirdir ve katı, kistik veya morfolojide karışık olabilir. Genellikle işlevsizdirler ve multiple endokrin neoplazi tip 1 (MEN1) ve Von Hippel-Lindau (VHL) sindromu olan bireylerde ortaya çıkabilmektedir. Genellikle altmışlı yaşlarda ortaya çıkar ve eşit cinsiyet yatkınlığına sahip olmaktadır.

İnflamatuvar psödokistler, sıklıkla nekrotik ve hemorajik materyal ile pankreas enzimleri ile dolu, malign olmayan sıvı dolu keselerdir. Epitel astarı olmadığı için bunlar gerçek kistler değildir. Herhangi bir klinik semptomun yokluğunda, bunlar görüntüleme ile izlenebilirken semptomatik lezyonlar, steroidler ve / veya cerrahi drenaj ile etkin bir şekilde tedavi edilebilmektedir (Kamal ve diğerleri, 2019). Özellikle, psödokistler sıklıkla kronik veya akut pankreatit alkolik pankreatit veya otoimmün pankreatit öyküsü ile ilişkili olmaktadır. Yapılan çalışmalar, pankreatit hastalarının% 42-56'sının psödokist barındırdığını bulmuştur. Ek olarak, malign potansiyele sahip olanlar da dahil olmak üzere bazı kistik neoplazmalar başlangıçta pankreatit ile ortaya çıkabilir ve hatta tekrarlayan pankreatit ataklarına neden olabilmektedir (Brugge, 2008). Bununla birlikte, kliniklerde pankreatitin değerlendirildiği standart ölçütler olan serum amilaz ve lipaz seviyeleri, ek görüntüleme ve invaziv prosedürler olmaksızın MCN'ler ve pankreatit arasında ayırım yapılamamaktadır. Pankreatit ile başvuran IPMN hastalarının% 15 kadarı bir immün yanıtı ortaya çıkararak otoimmün pankreatiti indükleyebilir.

Pankreas duktal adenokarsinom: Pankreas kanserlerinin% 90'ını oluşturan pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), dünyada kansere ilişkin ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. Genetik mutasyonların geniş heterojenliği ve yoğun stromal mühit nedeniyle PDAC, kemoterapiye en dirençli kanser türlerinden biridir. Mevcut tedavilerin çoğu, hastalığa bağlı semptomları hafifletmek ve sağkalımı uzatmak amacıyla palyatiftir. Günümüzde mevcut

tedavi seçenekleri ameliyat, radyasyon, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik ilaçların kullanımınıdır. Ek olarak bugüne kadar, kanserle ilişkili moleküler yolları hedefleyen tedaviler tatmin edici sonuçlar vermemiştir, bunun nedeni yoğun desmoplastik reaksiyondur (Garrido-Laguna ve Hidalgo, 2015).

Hastalığın ardışık aşamalarda ilerlemesine morfolojik ve genetik değişikliklerin artması eşlik eder. Sonuç olarak, sinyal yollarındaki sapmalar, PDAC'ın ilerlemesine sebep olur. Büyüme ve çoğalmaya dahil olan birçok sinyal yolunun aşırı aktivasyonu tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonu düzenli olarak PDAC'de tespit edilir ve hücre proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve akını etkiler. Genetik ve metabolik yeniden şekillenmenin geniş repertuarı, PDAC'ın sert koşullar altında hayatta kalmasına izin verir ve proliferatif yeteneği artırır. Ayrıca, gen ekspresyonu ve aktivitesinin son analizine göre, PDAC'ın alt tipde sınıflandırılmış 4 farklı fenotipik mutasyonları saptanmıştır: 1) skuamöz; 2) pankreas progenitör; 3) immünojenik; ve 4) anormal diferansiye endokrin ekzokrin (ADEX). Kanser alt tiplerinin erken teşhisi ve tanımlanması solid tümörlü hastaların hayatta kalmasına etki etmektedir. Bu pankreas duktal adenokarsinom kanseri (PDAC) için biraz kaçamak olsa da, bu tümörün alt tiplmesi son 8 yılda gelişti ve 2017 yılında dört temel moleküler alt tip için genetik imza sağlayan bir Nature yayınında sonuçlanmıştır (Bailey ve diğerleri, 2016). Değişen gen ekspresyon seviyelerinin sınıflandırılması, benzer hücre sinyalleri veya fonksiyonel üniteye yer alan gen programlarının (GP'ler) oluşturulmasına yol açmıştır. Gen gruplarını tek bir varlık şeklinde kabul edilerek, her bir alt tipin bir moleküler profilini tanımlayarak, gerçekten, bu alt tiplerin benzer ancak farklı genetik ve epigenetik imzalara (örn. DNA metilasyonu) sahip olduğu gösterilmektedir.

Skuamöz Alt Tip (% 31 insidans), diğer tüm alt tiplere göre en büyük ve en çeşitli GP setine (GP2–5) sahiptir ve önemli ölçüde daha kötü hastalık sonuçlarıyla (13,3 ay) ilişkilidir ve ortalama ile karşılaştırıldığında sağkalım oranının neredeyse yarısı diğer üç alt tipdir. Bunun nedeni muhtemelen, değiştirilmiş transkripsiyonel aktivite (p53), inflamasyon, hipoksi, metabolizma (muhtemelen oksidatif stres dahil), ECM (ekstra sellüler matriks), TGFβ (transforming growth factor beta) ve WNT sinyal basamakları, aktif MYC ve otofajidir.

Pankreas Progenitör Alt Tipi (% 19 insidans), PDX1, HNF1B, FOXA1, HES1 gibi gelişimsel transkripsiyon faktörlerinden ve yağ asidi oksidasyonu, glikosilasyon, steroid hormonu ve ilaç metabolizmasına bağlı olanlar dahil olmak üzere metabolik özelliklerden oluşan tek bir GP (GP1) ile karakterize edilir. Bundan başka, müsinler üzerinde de etkiye sahiptir ve bu alt tipte gözlenen daha fazla IPMN varlığına işaret eder. Bu alt tipe sahip bazı

hastalar 4 yıl veya daha uzun süre hayatta kalırken, genel sonuçlar (23.7 ay), İmmünojenik (25.6 ay) ve ADEX (30.0 ay) alt tiplerinden marjinal olarak daha azdır.

İmmünojenik Alt Tip (% 29 insidans), Pankreatik Progenitör Alt Tipi (PG1) ile aynı GP'yi yakalar, amma ek olarak B hücre fonksiyonu ile ilgili aberasyonlar dahil olmak üzere immün hücre fonksiyonu ile ilgili bir gen ailesini içeren ek üç GP'ye (GPS 6-8) sahiptir. Bunlar, antijen sunumu, CD4 + ve CD8 + T hücre sinyalleme, Toll benzeri reseptör (TLR) sinyalleşmesi ve CTLA4 ve PD1'in yukarı regülasyonunda rol almaktadır. Bu özel hasta grubu için kritik bağışıklık sistemi işlevlerinin restorasyonunun bazı yararlar sağlayabileceği ve sonuçları iyileştirebileceği düşünülmektedir.

Anormal diferansiyasyon endokrin ekzokrin (ADEX) Alt Tipi (% 21 insidans), biri ekzokrin fonksiyon / sekresyona (MIST1, NR5A2, vb.) odaklanan ve diğeri β -hücresinde yer alan genlerin geliştirilmesi (MODY, INS, NEUROD1, NKX2-2, vb.) ve mutant KRAS ekspresyonunu takip ederek yukarı regüle edilmesini temin eden iki GP (GP 9-10) içermektedir. Endokrin ve ekzokrin disfonksiyonun muhtemel doruk noktası, pankreas kanseri ve diyabet arasında nedensel bir bağlantı oluşturmaktadır (Torres ve Grippo, 2018).

2.1.4. Onkogenler

Mutasyona uğrayıp aktifleştikleri zaman onkogenler kanser tekamülünde rol oynar ve farklı mekanizmalarla (örneğin, nokta mutasyon, amplifikasyon) aktive olmaktadır. Yapılan araştırmalarda, pankreas kanserinden sorumlu birkaç onkogen tanımlanmaktadır (Jamieson ve diğerleri, 2012). Pankreas kanserinde genel olarak germline genetik değişimler, ve somatik mutasyonlar mes'ul tutularak, mutasyona uğrayan 16 onkogen saptanmıştır ki, bunlara TP53, CDKNA2A, KRAS, SMAD4, MLL3, ARID1A, SF3B1, EPC1, TGFB2, ARID2, ATM, ZIM2, NALCN, MAP2K4, SLC16A4, MAGEA6 aittir.

Semptomlar: Pankreas kanserli hastaların yaklaşık %70-80'inde epigastrik ağrı görülür. Bu hastalarda ağrı, mide bölgesinde, yanlara doğru ve bazen sırtta vuran ağrıların olmasını gösteren kaynaklarda mevcuttur. Ayrıca bu şikayetlerle gelen hastalarda kolestaz belirtileri, ishal-steatore, iştahsızlık, izah edilemeyen kilo kaybı, sarılık, depresyon görülmektedir. Pankreasın baş kısmında saptanan kanserlerde, koyu bir sarılık görülmektedir buna sebep ana safra kanalının tıkanmasıdır. Doktor özellikle göbek, karın, hazımsızlık, şişkinlik,

mide,iştahsızlık, kilo kaybı, çevresinde kalıcı ve inatçı ağrıların varlığında pankreas kanseri olasılığını göz önünde bulundurmalıdır. Safra kesesi; ana safra kanalının bir tümör tarafından tıkanması durumunda muayenede kese hidrops (Courvoisier-Terrier bulgusu) olarak ele gelmektedir. (Goral, 2015).

2.2 Apoptoz

Yapılan son güncellemelerde, Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death - NCDD) tarafından hücre ölümü alt tipleri sınıflandırmasına bir sıra ölüm tipi eklenmiştir ki, bunlara intrinsik (içsel), ekstrinsik(dışsal) apoptoz, mitokondriyal geçirgenlikle ilişkin ferroptoz, nekroptoz, parthanatos, piroptoz, entozis, netozis hücre, otofaji bağımlı, hücre ölümü ve mitotik katastrofi dahil olmaktadır. (Galluzzi ve diğerleri, 2018).

Apoptoz, eski Yunanca "apo" (ayrı) ve "ptosis" (düşmek) kelimelerinin birleşmesinden oluşarak, Homeres sonbahar döneminde yaprak dökümünü ifade etmek için kullanılmıştır. Bu sebepten dolayı hücrelerin bazıları adeta sonbahar yaprakları şeklinde kuruyarak vücuttan ayrılması ve yeni hücrelere yer vermesiyle sonuçlanan hücre ölüm tipini, Klasik Yunan tarihçisi James Cormack "apoptoz" olarak adlandırmayı önermiştir. "Apoptoz" terimi, 1970'de yayınlanan Kerr ve arkadaşlarının programlanmış hücre ölümü (PCD) ile eşanlamlı olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Apoptoz, enerjiye bağımlı fizyolojik bir olaydır, çok hücreli organizmaların hücreleri için önemli bir terminal yoldur ve enfekte olmuş hücreleri uzaklaştırmak için koruyucu bir strateji olarak zararlı hücrelerin çoğalması / homeostazisi, farklılaşması, gelişmesi ve ortadan kaldırılması gibi çeşitli biyolojik olaylara neden olmaktadır (Elmore, 2007). Apoptoz, insidansı, morfolojisi ve biyokimyasına bağlı olarak temelde diğer hücre ölümü türlerinden farklı olmaktadır. Kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, dinamik membran kabarması, DNA'nın nükleozomlar arası fragmanlara bölünmesi, fosfatidilserin eksternalizasyonu ve kaspazlar olarak tanınan ölüm reseptörü ailesine mahsus apoptozu indukleyen, sitotoksik T lenfositler, membran protein olarak bilinen Fas, TNFR-1'in (tümör nekroz faktör reseptörü-1) aktivasyonu, lenfositler ve oksidatif stres önemli faktörlerdendir. Küçük bir PCD disfonksiyonu, insanlarda farklı kanserler türleri gibi çeşitli patolojik bozukluklara neden olmaktadır.

Apoptoz, farklı gruplar ve düzenleyici moleküller tarafından düzenlenen hücresel bir süreçtir. Ayrıca anormal fonksiyonlar, tümör büyümesi ve anti-kanser ilaç direncinin gelişmesi için önemlidir. Bu nedenle apoptoz, kanser gibi hastalıklara yönelik ilaçların keşfi ve geliştirilmesi için ana moleküler hedeflerden biri haline gelmiştir. (Mukhopadhyay, ve diğerleri,2014)

2.2.1 Apoptozun morfolojisi

Apoptoz, dokunun belirli bir bölgesindeki tüm hücreleri etkilemek yerine tek tek hücrelere etki eder ve genellikle inflamasyon gibi değişiklikler göstermemektedir. Apoptotik hücreler tarafından sergilenen belirli morfolojik değişiklikler iyi tanımlanmış ve belgelenmiştir. Bu değişiklikler, hücre kabarması, büzülme, nükleer parçalanma, genetik materyallerin (kromatin ve nükleozomal DNA) yoğunlaşması ve parçalanması ve ApoBD'ler (apoptotik cisimler) olarak bilinen küçük veziküllerin oluşumunu içerir. Hücreler, apoptozun erken evresinde karakteristik bir büzülme geçirerek, içindekiler daha yoğun bir paketlenme yaşarken hücre boyutu küçülür. Piknoz (kromatinin geri dönüşümsüz yoğunlaşması) olarak bilinen başka bir fenomen de apoptozun erken evresinde eş zamanlı olarak ortaya çıkar. Bu değişiklikler ışık mikroskobu ile gözlemlenebilirken elektron mikroskobu piknoz gibi hücre içi değişiklikleri daha iyi görselleştirebilmektedir. Apoptozun erken evresi takip edildiğinde, çekirdeğin parçalanmasına atıfta bulunan karyoreksis olarak bilinen başka bir fenomen de, apoptotik hücreleri küçük ApoBD'lere ayıran plazma zarının daha fazla kabarması ile birlikte görülür. Mevcut bilgiler, ApoBD'lerin, apoptotik hücre kalıntılarını (yani sitoplazma, organeller ve nükleer içerikler) içerdiğini belirttiği için bu sebeple, herhangi bir apoptotik gövdede belirli bir organel veya nükleer içerik bulunabilir yada bulunmayabilir. Apoptotik cisimler daha sonra nihai bozunma için fagositler, örneğin nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) tarafından yutulur. Fagositoz, apoptotik döngünün son adımını işaret eder ve apoptotik hücreler içinde paketlenmiş tehlikeli maddelerin çevreye yayılmasını önlemektedir (Xu ve diğerleri, 2019).

Apoptoz fizyolojik ve patolojik mekanizmalar düzeyinde meydana gelebilmektedir. Apoptozun fizyolojik tipi, insan vücudunun gelişiminde ve embriyogeneizde önemli bir rol oynarak, fetüsün el ve ayak parmakları arasındaki doku apoptozu, embriyogeneizde meydana gelen apoptozu örnek olarak gösterilebilmektedir. Ayrıca menstrüasyon döneminde

endometriyumun üst dokusunun dökülmesi de apoptotik bir mekanizma yoluyla gerçekleşir. Apoptoz, yara iyileşmesi sırasında başta lökositler olmak üzere inflamatuvar hücrelerin ölümü için de gerekli mekanizma olup, bu mekanizmanın deaktive olması durumunda patolojik skarlaşma ve fibrozis gelişmektedir (Elmore, 2007). Ek olarak apoptoz, DNA hasarı, yanlış bağlanan proteinlerin birikmesi, radyasyona ve sitotoksik ilaçlara maruz kaldıktan sonra apoptozun iç yolunu (mitokondriyal) aktive eden viral enfeksiyonlar sırasında da görülebilir.

2.2.2 Apoptoz Mekanizmaları

Apoptotik mekanizmaların belirlenmesi kritiktir ve disfonksiyonel apoptozun bir sonucu olarak hastalıkların patogenezinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu da, spesifik apoptotik yolları ya da genleri hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Memelilerde, iki merkezi apoptotik yol vardır: dışsal yol (ölüm reseptörünün aracılık ettiği yol) ve içsel yol (mitokondriyal aracılı yol) (Hassen, 2012). Bu iki yola ek olarak, endoplazmik retikulum stresi (ER) tarafından aktive edilen apoptozda kaspaz-12 veya kaspaz-2'nin başlatıcı rolü de dahil olmak üzere daha az bilinen ek kaspaz aktivasyon yolları da bilinmektedir. Bu yollara kaspaz-2 bağımlı yolak, granzim-B ve granzim-A yolağı aittir. Bu yolakların çalışma prensibi p53 geninin aktivasyonu (kaspaz-2 ilişkin yol), kaspazın direkt aktive edilmesi (granzim-B) ve DNA fragmanstasyonu (granzim-A) gibidir. (Grilo ve Mantalaris, 2019). Hem içsel hem de dışsal yollardaki anahtar düzenleyici proteinler kaspazlardır. Gelişimsel, enflamatuvar ve apoptotik yollar dahil olmak üzere farklı yollardaki spesifik işlevler temelinde üç grup memeli kaspazları mevcuttur. Bu nedenle, kaspaz-1 gibi bazı kaspazlar apoptoz yolunda bir role sahip değilken, birkaç kaspaz hem apoptotik olmayan hem de apoptotik sinyallemede ikili role sahip olmaktadır. Ek olarak, kaspazlar apoptotik sinyalleme kademelerindeki konumlarına göre başlatıcı (kaspaz-8 ve -9) ve efektör veya uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılır (Hu, ve diğerleri, 2013). Otomatik bölme ile etkinleştirilen başlatıcı kaspazları, aşağı akış "yürütücü" kaspazlarını sırayla ayırır ve etkinleştirir. Daha sonra, uygulayıcı kaspazları, hücrenin proteolitik parçalanmasını düzenlemek için temel hücresel bileşenleri ayırır.

İntrinsik apoptoz(içsel yol) büyüme etkenleri gibi uyarıcıların eksikliği, yokluğu, mutajenik değişkenlik, onkojene ilişkin hücre ölümü v.b sebeplerden belirli uyarılar tarafından aktif hale gelmektedir. Uyarılar, içsel yolun esas organizatör proteini olan BCL-2

proteinlerinin kompleks düzenlemesine izin vermektedir. Özellikle mitokondri başta olmak üzere diğer organeller, genler, proteinler (p53), iyonlar (Ca) görevlendirilmektedir. Hücre içi kalsiyum iyonu seviyesindeki artı, pH'ta ki azalış apoptozu stimule etmektedir. Apoptozda görevlendirilen proteinlerden interlökin dönüştürücü enzim (ICE) ,ona benzer proteinler Fas, Fas-ligand (FasL), p53, BCL-2 görülmektedir. Bütün apoptoz yolları p53 bağlantılı transkripsiyon akışı ve ICE-benzer proteazların aktifleşmesi ile ilişkili olmaktadır. BCL-2'nin aşırı üretimi, ICE gibi proteinlerin aktivasyonunu engellemektedir. Transmembran proteinlere tümör nekrozis ailesinin üyelerinden olan Fas ve FasL dahildir. FasL, Fas'a bağlandıkta apoptoz aktif hale gelir ve bu kompleksin immün cevabın sonlandırılmasında mühim rolü vardır. Fas aracılı apoptoz için ICE proteazların aktivasyonu gerekli olmakla beraber, apoptoz direncinde de Fas ekspresyonun miktarının önemli olduğu bilinmektedir (Pfeffer ve Singh, 2018).

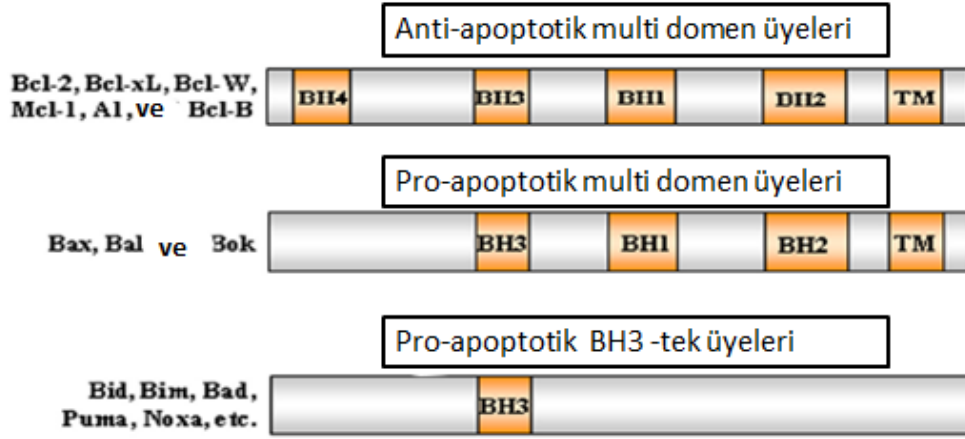
2.2.3 Apoptoz Yolları

Hücre içinde başlatılan intrinsik apoptozis birkaç iç indükleyici faktörler tarafından tetiklenmektedir. Bu iç uyaranlara, hipoksi, Ca^{2+} iyonlarının hücrede normalden yüksek oranda görülmesi, oksidatif stres aittir. Mitokondriden salınan etkenlere bağlı olarak apoptoz, pozitif ve negatif yoldan başlatılmaktadır. Negatif sinyallerin indüklenmesi, hücre etrafında sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Bu prosurvival sinyaller olmadan, normalde inhibe edilen puma, noxa ve bax gibi hücre içindeki pro-apoptotik moleküller aktifleşerek apoptozu başlatmaktadır. Apoptozu başlatan diğer etkenler pozitif olup, hipoksiye, toksinlere, radyasyona, reaktif oksijen türlerine, virüslere ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmayı içerir (Brenner ve Mak, 2009). Lakin nötrofiller gibi birtakım hücreler söz konusu olduğunda, hipoksi, hücrenin hayatta kalmasını teşvik edebilir. Sonuç olarak bu yol, uyaranlar olmaksızın artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom gibi proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının neticesidir .

Ekstrinsik Apoptozis (dışsal yolak) apoptotik sinyal verme, hücre dışı ligandların, örneğin tümör nekroz faktörü (TNF), Fas ligandının (Fas-L) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligandın (TRAIL) transmembran reseptörlerinin hücre dışı alanına bağlanmasıyla başlamaktadır. Ölüm reseptörleri içerisinde TNF reseptörü (TNFR1), Fas (CD95)

proteinlerinin kendilerine has ligandları olduğu bilinmektedir (TNF, FasL). Ligandın reseptöre bağlanması üzerine, ölüm reseptörleri, hücre içi ölüm alanları yoluyla, Fas ile bağlantılı ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörü ile bağlı ölüm alanı (TRADD) gibi adaptör proteinlerinde uygun gelen bir protein motifi ile bağlanır. Bu adaptör proteinleri, Death Effector Domain (DED) adı verilen başka bir protein etkileşim alanına da sahip olmaktadır. Pro-kaspaz-8 ayrıca, FADD'nin DED'si ile etkileşime giren DED'yi de içermektedir (Khosravi-Far ve Esposti, 2004). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanarak, adaptör proteine özel bağlanma bölgesi oluşturarak, ölüm indukleyen sinyal kompleksini (DISC) oluşturmuştur. DISC bir sonraki adımda pro-kaspaz 8'in birleşmesini ve aktive olmasını başlatır. Kaspaz-8 ve onun aktivasyonu için pro-kaspaz 8 ve 10 DISC'in adaptör proteinlerine bağlanır. Aktive olan, 8 ve 10 olarak bilinen bu kaspazlar, kaspaz 3 ve 7'yi aktive eder. Cellat kaspaz olarak bilinen bu kaspazlar hücre ölümüne yol açan proteinlerin ve sitoskeletin yıkımını başlatır. Kaspaz 8, 10'dan farklı olarak mitokondriden sitokrom-c salınımında iştirakından dolayı intrinsik yolun aktivasyonuna neden olur.

İçsel yol Hodgkin olmayan lenfomada BCL-2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmekte olup, her bir BCL-2 protein homolog alanlar ve α sarmalını içerir. Apoptotik fonksiyonu idare eden homo ve hetero dimerleri BH3 etkileşimleri sayesinde oluşmaktadır ve ayrıca BH3-hidrofobik oluk mekanizması yoluyla BCL etkileşimini düzenleme yetkisine sahiptir. Ek olarak, BH'nin apoptozisten sorumlu olan alanıdır. Sahip olduğu BH alanlarında göre BCL-2 üyeleri üç ayrı protein grubunda birleşmektedir. Birinci protein grubu anti-apoptotik aktiviteye sahip olan proteinleri içerir. Bu gruba tüm BH alanları dahildir. Aynı zamanda Bcl-XL, MCL-1, Bcl-W ve A1 bu protein grubuna dahil olmaktadır. Bu gruptaki proteinler apoptozisi önlemek için mitokondri membranında olan BAX ve BAD proapoptotik proteinlerini durdurur. İkinci protein grubunda ise proapoptotik aktiviteye sahiplik eden Bcl-2 ailesine rastlanmaktadır ve üç BH alanı (BH1/2/3), BAX ve BAK proteinleri bu gruba dahildir. Dış mitokondrial zarındaki geçirgenliğin artmasını ve apoptotik faktörlerin sitozole salgılanmasını sağlamaktadır. Üçüncü protein grubuna dahil olan proteinler, proapoptotik aktiviteye sahip BCL-2 ailesinin üyeleri olup sadece BH3 alanı vardır. Direk mitokondrial BAX veya BAK ile birleşerek köklü değişimlere neden olmaktadır. Bu proteinler mitokondrial dış zar geçirgenliği (MOMP) için önemli olup, bazı örnekleri BID, BIM, PUMA ve NOXA'dır (Osterlund ve Andrews, 2018).



Şekil 1. Bcl-2 protein alt grupları. Bcl - 2 proteinleri, BH1'den BH4'e kadar listelenen tipik BH alanlarının bileşimine bağlı olarak, biri anti-apoptotik ve ikisi pro apoptotik işlevli olmak üzere üç alt grupta sınıflandırılmıştır. Her alt ailenin temsili üyeleri gösterilmektedir (Pistritto ve diğerleri, 2016).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler, zıt mekanizmalarla çalışmaktadır, böyle ki ilke sitokrom-c'nin mitokondriden salınımını aktive etmekle apoptozu düzenlerken, ikincisi bloke ederek bu işi görür. Apoptozun başlatılmasını belirleyen kesin bir miktar yoktur, bu pro ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge ile düzenlenektedir. MOMP'un artması içsel yolun esas adımıdır ve bu molekülün artması ile beraber mitokondri membranının iç kısmında yerleşen sitokrom-c sitozole geçer. Sitozole geçen sitokrom-c ve Apaf-1 kaspaz-9'a bağlanmakta olup, bu üçünün ATP ile birleşmesinden meydana gelen komplekse apoptozom ismi verilir. Apoptozum oluşması ile kaspaz-3 aktive olunur ve böylelikle kaskapaz kaskadı başlatılmış bulunur (Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

Apoptozun içsel yolunu kontrol eden başlatıcı kaspaz olarak bilinen kaspaz 9, kaspaz alım alanının (CARD alanı) açığa çıkmasının ardından adaptör protein apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (APAF1) bağlanabilmektedir. Apoptotik olmayan bir hücrede APAF1, genellikle CARD alanı bloke edilecek ve başka bir CARD alanı içeren procaspase 9 ona bağlanamayacak şekilde katlanmaktadır. Smac / Diablo ve HtrA2 / Omi, apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörlerini inhibe ederek apoptozu başlatmaya yardımcı olur, ancak sitokrom c salınımı olmadan, IAP'leri tek başına inhibe etmek apoptozu başlatmak için yetersizdir (Rolland ve Conradt, 2010).

2.2.4 Pankreas kanserinde apoptoz yolları ve bu yolların terapötik kullanımı

Pankreas kanseri tedavisi için ölüm reseptörü yolunun kullanılması; CD95 (APO-1/Fas), TNF reseptörü 1 (TNFR1) ve TRAIL reseptörleri en iyi karakterize edilmiş ölüm reseptörleri olarak bilinmektedir. TNF süper ailesinin bu reseptörlere karşılık gelen ligandları CD95 ligandı, TNF- ve TRAIL'dir. CD95 reseptörü/CD95 ligand sistemi, kanser immün gözetiminde olduğu kadar bağışıklık sisteminde de apoptozun anahtar düzenleyicisi olarak bilinmektedir. CD95, aktive lenfositlerde, çeşitli lenfoid kökenli dokularda ve ayrıca tümör hücrelerinde eksprese edilir (Krammer, 2000). CD95 ligandı sitotoksik T hücreleri tarafından üretilerek, lenfositlerde otokrin intiharı veya parakrin ölümünü tetikleyebilir ve ayrıca kanser hücrelerini öldürerek tümör immün gözetimine katkıda bulunmaktadır. Örneğin, pankreas kanseri hücrelerinin, işlevsel olmayan bir CD95 reseptörü ifade ederek veya sitotoksik T hücrelerine "karşı saldırı" yapmak için yüzeylerinde CD95 ligandının anormal ekspresyonu yoluyla Fas aracılı immün gözetimden kaçtıkları bildirilmiştir.

İnsan kanserlerinde ölüm reseptör sistemini terapötik amaçlarla kullanma konsepti caziptir, çünkü ölüm reseptörleri, kanser hücrelerinde yerleşik bir genetik hücre ölümü programını doğrudan devreye sokabilmektedir. Bu sebeple TRAIL, ölüm reseptörü ligandları arasında en umut verici klinik aday olarak kabul edilir, çünkü TRAIL, malign olmayan hücrelere göre kanser için bir miktar seçicilik göstermiştir (Ashkenazi ve Herbst, 2008). TRAIL reseptör sistemi karmaşıktır, çünkü farklı fonksiyonlara sahip beş TRAIL reseptörü vardır; TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 ve TRAIL-R5. TRAIL'e bağlanan TRAIL-R4 ve TRAIL-R5 bir ölüm sinyali iletmeyen antagonistik tuzak reseptörleridir. TRAIL-R3, bir glikosil-fosfatidilinositol (GPI) - sabitlenmiş hücre yüzeyi proteindir ve ölüm alanıyla birlikte sitoplazmik kuyruğundan tamamen yoksundur, TRAIL-R4 ise kesilmiş bir sitoplazmik ölüm alanına sahiptir. Bu dört zarla ilişkili TRAIL reseptörünün yanı sıra, osteoprotegerin, TRAIL'i bağlayabilen ve osteoklastogenezin düzenlenmesinde rol oynayan çözünür bir tuzak reseptördür (Ashkenazi ve Herbst, 2008). İnsan pankreas kanseri örneklerinde TRAIL ve reseptörlerinin analizi, agonistik TRAIL reseptörlerinden en az birinin genellikle pankreas karsinomu dokusunda eksprese edildiğini gösterir. Bu amaçla, TRAIL, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin aynı anda olduğu açıklanarak, pankreas kanseri dokusunda mRNA ve protein seviyelerinde eksprese edilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir immünohistokimyasal analiz, kanser olmayan hastalara kıyasla pankreas duktal adenokarsinomunda TRAIL-R1 ve TRAIL-R4 ekspresyonunun arttığını göstermiştir.

(Sanlioglu ve diğ erleri, 2008). Karşılaştırıldığında, TRAIL-R3 mRNA ve protein ekspresyonu, pankreas kanserlerinde ve normal pankreas dokularında düşük seviyelerde tespit edildi. TRAIL-R4 mRNA ve protein, pankreas kanseri dokularında orta ila y    k seviyelerde bulunurken, normal pankreasta zayıf veya hiç ekspresyon saptanmadı. Ek olarak, pankreas karsinomu h  re hatlarının     nlu  unun, agonistik TRAIL reseptörlerinden en az biri ve kaspaz-8 dahil olmak üzere TRAIL sisteminin temel sinyal moleküllerini ifade ettiği rapor edilmiştir. Bundan başka, TRAIL reseptörlerinin ekspresyonuna rağmen, pankreas kanseri h  re hatlarının     nlu  unun, TRAIL aracılı apoptoza karşı duyarsız olduğu kanıtlanmıştır (M. Vogler ve diğ erleri, 2007). Bu nedenle, pankreas karsinomu hücrelerinin TRAIL'e karşı direncini atlamak için çeşitli kombinasyon tedavileri geliştirilmiştir. Örneğin, TRAIL'in gemitabin ile kombinasyonunun, şiddetli kombine immün yetmezlik hastalığı (SCID) farelerinde ksenograft olarak büyütülen hasta pankreas adenokarsinomlarında tek başına kullanılan tedavilerden daha büyük bir antitümör etkisi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Pankreas karsinomu, tam insan TRAIL-R1 monoklonal antikörleri, gemitabin ve sisplatin ile kombinasyon halinde ilerlemiş katı tümörler için bir faz I klinik deneyde bu günlerde değerlendirilmektedir (Oldenhuis ve diğ erleri, 2008).

Pankreas kanseri tedavisi için apoptoz proteinlerinin inhibitörünü (IAP'ler) hedefleme; IAP'ler, sekiz insan analogunu, yani XIAP, cIAP1, cIAP2, hayatta kalan, yaşayan (ML-IAP), NAIP, Bruce (apollon) ve ILP-2'yi içeren bir endojen kaspaz inhibitörleri ailesidir. IAP ailesi proteinleri arasında, XIAP'nin en güçlü anti-apoptotik etkileri uyguladığı ve aktif kaspaz-3 ve -7'yi ba  layarak ve inhibe ederek ve kaspaz-9 aktivasyonunu önleyerek apoptozu bloke ettiği kabul edilir. Pankreas kanserinde birçok IAP proteininin y    k seviyelerde eksprese edildiği bildirilmiştir. Ksenograft taşıyan farelerdeki bir tümör regresyon modelinde, XIAP'nin inhibisyonu, yerleşik pankreas karsinomunun gerilemesine neden olmak için TRAIL ile işbirliği yaptı (Meike Vogler ve diğ erleri, 2008). Bazı pankreas kanseri h  re hatlarında, XIAP veya cIAP2'nin aşağı regülasyonu, doksorubisin, paklitaksel, gemitabin ve sisplatin dahil antikanser ilaçlara yanıtı artırırken, 5-florourasilin etkisi sadece marjinal olarak etkilenmiştir.

Kanser tedavisi için mitokondriyal yolun kullanılması; Bcl-2 protein ailesi, her iki anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeden oluşur; Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1'in yanı sıra Bax, Bak, Bad ve BH3 domaini (Adams ve Cory, 2007). Anti-apoptotik moleküllerde nispi bir artış ile anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin oranındaki dengesizlikler birkaç insan kanserinde g  r  lm  ştir. Pankreas karsinomunda özellikle y    k seviyelerde saptanan Bcl-

XL'dir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucu, anti-apoptotik Bcl-2 ile ilgili proteinlerin anormal ekspresyonunu hedeflemek için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu alandaki en umut verici yaklaşımlardan biri, Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'yi antagonize eden küçük bir molekül inhibitörünün geliştirilmesidir. Bu amaçla, anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri ile Bax veya Bak arasındaki protein-protein etkileşim bölgesini hedef alan multidisipliner bir çaba, Bcl-2, Bcl-XL'nin yüzey oluğuna bağlanan küçük moleküllü antagonistlerin üretilmesiyle sonuçlanan ABT-737, klinik öncesi modellerde kapsamlı bir şekilde incelenen prototipik bileşiktir (Zhang, ve Yu, 2007). Bu anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin Bax veya Bak'a bağlanmasını önleyerek, küçük moleküllü inhibitör, bazı duyarlı hücre dizilerinde doğrudan apoptozu tetikleyebilir veya kanser hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirebilir. Son zamanlarda, ABT-737'nin, dışsal ve içsel apoptotik yolaklar arasındaki çapraz iletişimi teşvik ederek pankreas kanseri hücre dizilerinde TRAIL aracılı sitotoksiteyi sinerjistik olarak arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'ye ek olarak Mcl-1'i de antagonize eden BH3 mimetik obatoklaksın yakın zamanda insan pankreas kanseri hücrelerinde TRAIL kaynaklı apoptozu güçlendirdiği bildirilmiştir. Ayrıca, Bcl-XL antisens oligonükleotitleri, pankreas kanseri hücrelerinin gempitabine veya ışınlamaya duyarlılığını arttırmıştır.

Apoptozdan kaçınma, tümör oluşumunu tetikleyen ve aynı zamanda tedavi direncine katkıda bulunan pankreas kanseri de dahil olmak üzere insan kanserlerinin bir özelliğidir. Ek olara, klinik öncesi çalışmalar, apoptotik mekanizmanın bileşenlerinin, deneysel kanser tedavilerinin geliştirilmesi için hedefler olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. şimdiki zorluk, bu kavramları pankreas karsinomunun tedavisi için klinik bir uygulamaya dönüştürmektir. Pankreas kanserinde apoptoza karşı dirence neden olan moleküler mekanizmalardan bazıları tanımlanmıştır. Bu tür apoptoza dayalı terapötikler, pankreas kanserli hastaların kötü sonuçlarını iyileştirmek için yeni yollar açabilir (Simone Fulda, 2009).

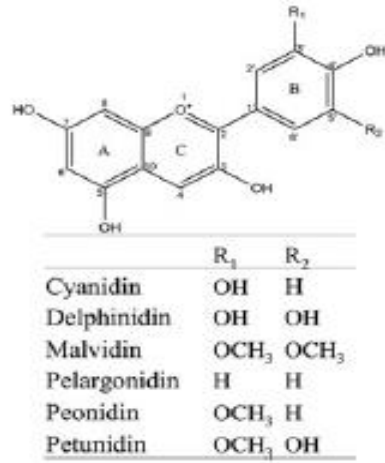
2.3 Ficus Carica L.

Doğal ürünleri araştırmacılar ve farmakologlar, doğal kaynaklardan elde edilen çok çeşitli biyoaktif moleküllerin tıbbi değerini araştırmaktadır. Daha da önemlisi, farklı bitkilerden elde edilen biyoaktif kimyasalların, farklı kanserlerde sinyal yollarını ve apoptozu verimli bir şekilde modüle ettiği görölmektedir (Celik Aydın ve diğerleri, 2018). Nitekim

doğal ürünler genellikle çeşitli hastalıklar için alternatif tedavi olarak kullanılmakta ve küçük yan etkileri olduğu düşünülmektedir. *Ficus carica L.* (Moraceae) antik çağlardan beri çeşitli kültürler tarafından geleneksel olarak şifalı incir ağacı olarak kullanılmıştır. İncir meyvesi (*Ficus carica L.*) yüksek düzeyde polifenoller, flavonoidler, antosiyaninler içerir ve yüksek antioksidan kapasite sergilemektedir (Solomon ve diğerleri, 2006b). Tüketiciler incirleri farklı şekillerde; kurutulmuş, taze, reçel veya meyve suyu olarak tüketmektedirler. Çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar, incir bitkisinin gastrointestinal, solunum, inflamatuvar, kardiyovasküler bozukluklar ve kanserler gibi çeşitli rahatsızlıklarda tedavi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. İncir potasyum, kalsiyum, demir, K vitamini kaynağıdır. Polifenoller, flavonoidler ve antosiyaninler yüksek antioksidan kapasiteye sahiptirler. İncirin antosiyanin içeriği, sağlıklı kan lipid seviyelerinin korunmasına yardımcı olabilir ve obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalık ve bazı kanserlerin önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. İncir çekirdeği yağının fenolik bileşikleri aşağıdaki özelliklere sahiptir: antikarsinojenik, antioksidatif, antimutajenik olarak adlandırılan, serbest radikalleri tutan ve lipid peroksidasyonunu inhibe eden özelliklerdir.

Yapılan bir sıra araştırmalarda, çeşitli hayvan modellerinde bir dizi flavonoidin karsinogenezi baskıladığı gösterilmiştir (Yang ve diğerleri, 2001). Kanser patogeneziinde yer alan birkaç anahtar mekanizma üzerinde faydalı bir etki gösterdikleri için günümüzde bu bileşiklere büyük ilgi vardır. Flavonoidlerin antioksidan özelliği, özellikle kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileriyle ilgili olarak incelenen ilk etki mekanizmasıydı. Flavonoidlerin, DNA hasarına ve tümör gelişimine dahil olan çoğu oksitleyici molekül türüne etki gösterdiği bilinmektedir. Flavonoidler ayrıca kanserojenlerin biyoaktivasyonu üzerindeki etkileriyle de faydalı bir etkiye sahip olabilmektedir. Flavonoller quercetin, kaempferol, galangin ve flavon apigenin'in CYP1A ailesinin sitokrom P450 enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Lautraite ve diğerleri, 2002). Bu enzimler, polisiklik hidrokarbonlar ve heterosiklik aminler gibi bir dizi şüpheli insan kanserojeninin aktivasyonunda önemli bir rol oynadığı görülmektedir. İnsan kanser hücre hattında çeşitli flavonoidler için bir büyüme önleyici aktivite gösterilmiştir. Östrojene bağımlı tümör hücrelerinde veya hayvan modellerinde, bu antiproliferatif etki, belirli flavonoidlerin (örn., izoflavonoidler, kersetin) antiöstrojenik özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Diğer in vitro modellerde, flavonoidlerin hücre sinyali ve hücre döngüsü ilerlemesini de etkilediği gösterilmiştir. Son olarak, apigenin, luteolin ve quercetin'in p53'e bağlı bir mekanizma ile hücre döngüsü durmasına ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir.

Antosiyaninler, kardiovasküler hastalıklarda, obezite, antitümör aktivitesi gibi bir dizi farmakolojik etki eden, suda çözülen bir flavonoid sınıfıdır. Doğal ürünlerde, esas olarak glikoz, galaktoz ve ramnoz ile birleştirilmiş bir formda bulunmaktadır (Liu, ve Xie, 2010). Ek olarak, flavylium B-halkası üzerindeki farklı ikame gruplarına göre pelargonidin, siyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin ve malvidin gibi en az altı yaygın türe ayrılabilir. Araştırma, flavyum B halkası üzerindeki orto-dihidroksifenil yapısının, tümör büyümesini ve metastazı engelleyen aktif bölge olduğunu göstermiştir.



Şekil 2. Gıdalarda en çok görülen antosiyaninlerin kimyasal yapısı.

Antosiyaninlerin antioksidan etkisinin B halkası üzerindeki 3', 4', 5' hidroksil ve C halkası üzerindeki 3' hidroksil tarafından belirlendiğini buldu. Antosiyaninlerin (siyanidin, delphinidin ve malvidin) antioksidan yanıt elementi (ARE) üzerine etki ederek ve faz ekspresyonunu düzenleyerek sisteinil aspartat spesifik proteinaz-3'ün (kaspaz-3) aktivitesini inhibe edebilmektedir. Kanser hücrelerinin önemli bir özelliği, sürekli bölünme ve çoğalmaya yol açan kontrolsüz hücre döngüsüdür (Park, 2010). Antosiyaninler, kanser hücrelerinin proliferasyonunu seçici olarak inhibe edebilir, amma normal hücrelerin proliferasyonu üzerinde çok az etkiye sahiptir. Antosiyaninler, kaspaz bağımlı kaskad yoluyla apoptoz yanıtını aktive etmek için Bcl ailesinin proteinleri ve apoptoz protein ailesinin inhibitörü üzerinde hareket edebilmektedir. Anti-tümör etkilerinin ana moleküler mekanizmasının, Ras MAPK ve PI3K / Akt sinyal kademeli yolları üzerinde hareket ederek RTK'leri (EGFR, PDGFR ve VEGF / VEGFR) hedefleyerek kanser hücresi büyümesini ve metastazı inhibe etmektedir. Antosiyaninler, MAPK yolunu hedefleyerek ve kanserle ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlemek için RTK aktivitesini ve sinyal kaskadı yolunu inhibe ederek

karsinogenezi önler, bu da hücre döngüsü durmasına ve DNA onarımına yol açar. Ek olarak, antosiyaninler, MAPK'nın aracılık ettiği kaspazı aktive ederek kanser hücrelerinin apoptozunu indükler. Bundan başka, antosiyaninler, VEGF sinyal yolunu ve hücre dışı matris bozulmasını hedefleyerek kanser metastazını inhibe eder ve kanser hücrelerinin kemoterapi duyarlılıklarını iyileştirmek için çoklu ilaç direncini tersine çevirebilmektedir.

2.4 Ficus carica ve kanser ilişkisi.

Doğal ürünler ve moleküler çerçeveleri, ilaç keşfi ve tıbbi kimya için değerli başlangıç noktaları sağlar. En önemlisi, farklı bitkilerden elde edilen biyoaktif kimyasalların, farklı kanserlerde sinyal yollarını ve apoptozu verimli bir şekilde modüle ettiğini gösterilmektedir (Celik ve diğerleri, 2018). Nitekim doğal ürünler genellikle çeşitli hastalıklar için alternatif tedavi olarak kullanılmakta ve çok az yan etkileri olduğu düşünülmektedir. Rubnov ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada incirin birkaç kanser hücre hattında antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, Fig lateksinin farelerde ksenograftlı ve spontan tümörlerde antitümör aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, *Ficus carica*'nın kolorektal kanser hücrelerine karşı antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan araştırmadaki sonuçlar, hem HT-29 hem de HCT-116 kolorektal kanser hücreleri üzerinde *Ficus carica* özütlerinin büyük bir antiproliferatif ve pro apoptotik aktivitesini göstermiştir. İncir meyvesinin büyük antitümör aktiviteye sahip olduğu belgelemekte olup, antioksidan özellikleri ve zengin biyoaktif bileşikler ile ilişkili antikanser aktivitesi, onları kemoterapötik veya kemopreventif ajanlar olarak kullanılmak için harika adaylar haline getirmektedir. *Ficus carica*'dan etkilenen moleküler hedefleri ve yolları anlamak için daha ileri deneyler devam etmektedir (Soltana ve diğerleri, 2019).

Ficus, dünya çapında subtropikal ve tropik bölgelerde bulunan yaklaşık 750 tür odunsu bitki, ağaç ve çalı ile en büyük şifalı bitki cinslerinden biridir. Endonezya'da yaygın olarak "Kalay" olarak adlandırılan ve dünya çapında *F carica* olarak bilinen İncirin, sağlığı geliştirici özelliklerine bakılmıştır. Bu etkilere *F carica*'da bulunan fenolik asitler, klorojenik asitler, flavonlar ve flavonoller aracılık etmiştir. Quercetin bileşikler *F carica*'da bulunan başlıca fenolik bileşikler olarak görülmektedir. Quercetin, mitokondriden sitokrom c salınımını uyararak Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri ve HL-60 lösemi kanseri hücrelerinin apoptozunu

uyarma yeteneğine sahiptir. Ek olarak, protein kinaz C'nin (PKC) inhibisyonu yoluyla in vivo ve in vitro olarak. *F carica* ayrıca vücudun ihtiyaç duyduğu lif, A vitamini, C vitamini, kalsiyum, magnezyum ve potasyum içermektedir. *F carica*'nın diğer biyoaktif bileşikler, antioksidan bileşikler olan arabinoz, β -amirin, β karoten, glikozitler, β -sitosterol ve ksantoldur. *F carica*'nın antikanser aktiviteleri de olabilir. *F carica*'nın HeLa kanser hücrelerinin ve MDA-megabayt (MB)-231 meme kanseri hücrelerinin büyümesini engellediği de bilinmektedir. Bundan başka, yapılan son araştırmalarda *F carica*'nın Huh7it karaciğer kanseri hücreleri üzerinde etkisi test edilerek, *F carica* yaprağı özütü, meyve özü ile karşılaştırıldığında Huh7it kanser hücresi büyümesini inhibe etmede daha aktif olduğu görülmüştür. Polifenollerin antioksidan özelliklerinin olduğu, kanseri önlemede önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Nicolas Landrault ve diğerleri, 2001). *F carica* yaprak ve meyvelerinde bulunan polifenol türevlerinden biri flavonoidlerdir. Hidrojen atomlarını ve elektronları serbest bırakmak, koruyucu konjugat enzimlerin salınımını indüklemek, apoptozu arttırmak, lipid peroksidasyonunu inhibe etmek, anjiyogenezi inhibe etmek ve DNA oksidasyonunu inhibe etmek gibi kanser hücrelerini inhibe eden flavonoidleri içeren birçok mekanizmalar görülmektedir. *F carica* yaprağı ve meyve özlerinin hücre apoptozisine neden olma yeteneği, hücre döngüsü durdurmasını indüklemeye ve p53 ve p21 dahil apoptotik düzenleyici genlerin aktivitesini artırma yeteneğinden geçer. Bir flavonoid türü olan luteolin'in Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinin apoptozisini indükleyebildiği ve HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinin G1 fazında hücre döngüsü durmasına sebep olduğu gösterilmiştir. p53 gen aktivitesinin artması, p21 transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve p21'in aktivasyonu, sikline bağımlı kinaz 2'nin (CDK2) siklin E ile bağlanmasını tetikleyerek hücre döngüsünün durmasına neden olur. Sitozolde p53 aktivasyonunun artması da Bax aktivitesini tetikler ve Bcl-2 aktivitesini baskılar. Bu da mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirirerek, sitokrom c'nin sitozolden çıkmasına neden olur. APAF-1 ile reaksiyona giren sitokrom c, bir kaskad ve kaspaz reaksiyonunu aktive ederek DNA-se aktivasyonunu tetikler. DNA-se çekirdeğe girer ve DNA'nın parçalanmasına, PARP'nin (poli ADP-riboz polimeraz) bölünmesine ve apoptoza sebep olur. Quercetin'in p53'ün aktivasyonu, hücre döngüsünde durma gibi birçok hücreysel olayı tetiklediği de gösterilmiştir. Srivastava ve ark.30 tarafından yapılan yakın tarihli bir çalışma göstermiştir ki meme kanseri hücre kültürlerinde quercetin verilmesi, kanser hücrelerinin DNA'sında bir reaksiyona neden olmaktadır. Reaksiyonun birikmesi apoptoza yol açabilir. Bu apoptotik süreç aynı zamanda p53 ve p21'in rolü ile de ilgilidir. Quercetin, p21 ekspresyonunu uyararak hücre döngüsünün durmasına neden olan siklin D1 ekspresyonunu baskılar. Quercetin ayrıca Bax/Bcl-2 oranını

arttırır ve HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde apoptoza yol açan p53'ü stabilize edebilmektedir (Purnamasari ve diğerleri, 2019). Ek olarak, *Ficus carica* lateksinin antikanser etkisi de görülmektedir. *Ficus carica* ağacının lateksinden izole edilen bir sistein proteinaz olan Ficin9'in farklı şekillerde bulunduğu bilinmektedir. Sistein proteinazlar, kanser hücrelerinin apoptozisine yol açan bir enzim grubu olarak bilinmektedir. Bundan başka antikanser etkileri, polifenolik bileşenleri nedeniyle antioksidan özelliklerle ilişkilendirilebilir. Ek olarak, *Ficus carica* lateks kanser hücre hattının proliferasyonunu inhibe etti ancak in vitro olarak normal hücrelere karşı herhangi bir sitotoksik aktivite göstermediği gözlemlenmiştir (Purnamasari ve diğerleri, 2019)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılmıştır.

Araştırmaya Eylül 2020 tarihinde literatür taraması ile başlanmış olup, araştırma proje materyelleri Mart 2021 tarihinde tamamlanmıştır. Mart 2021-Haziran 2021 tarihleri arasında deney grupları oluşturularak elde edilen örneklerden MTS/PMS, Muse Analyzer ve Klonojenik analizleri yapılmıştır. Toplanan verilerin değerlendirilmesi 01-16 Temmuz 2021 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmamız herhangi bir bölge ile sınırlandırılmamış evrensel bir çalışmadır.

Örneklem seçiminde aşağıdaki kriterler dikkate alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- • Kültürdeki hücrelerin morfolojisinde herhangi bozukluk olmaması
- • Kültürdeki hücrelerin ikiye katlama sürelerine uygun olarak çoğalmaları

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

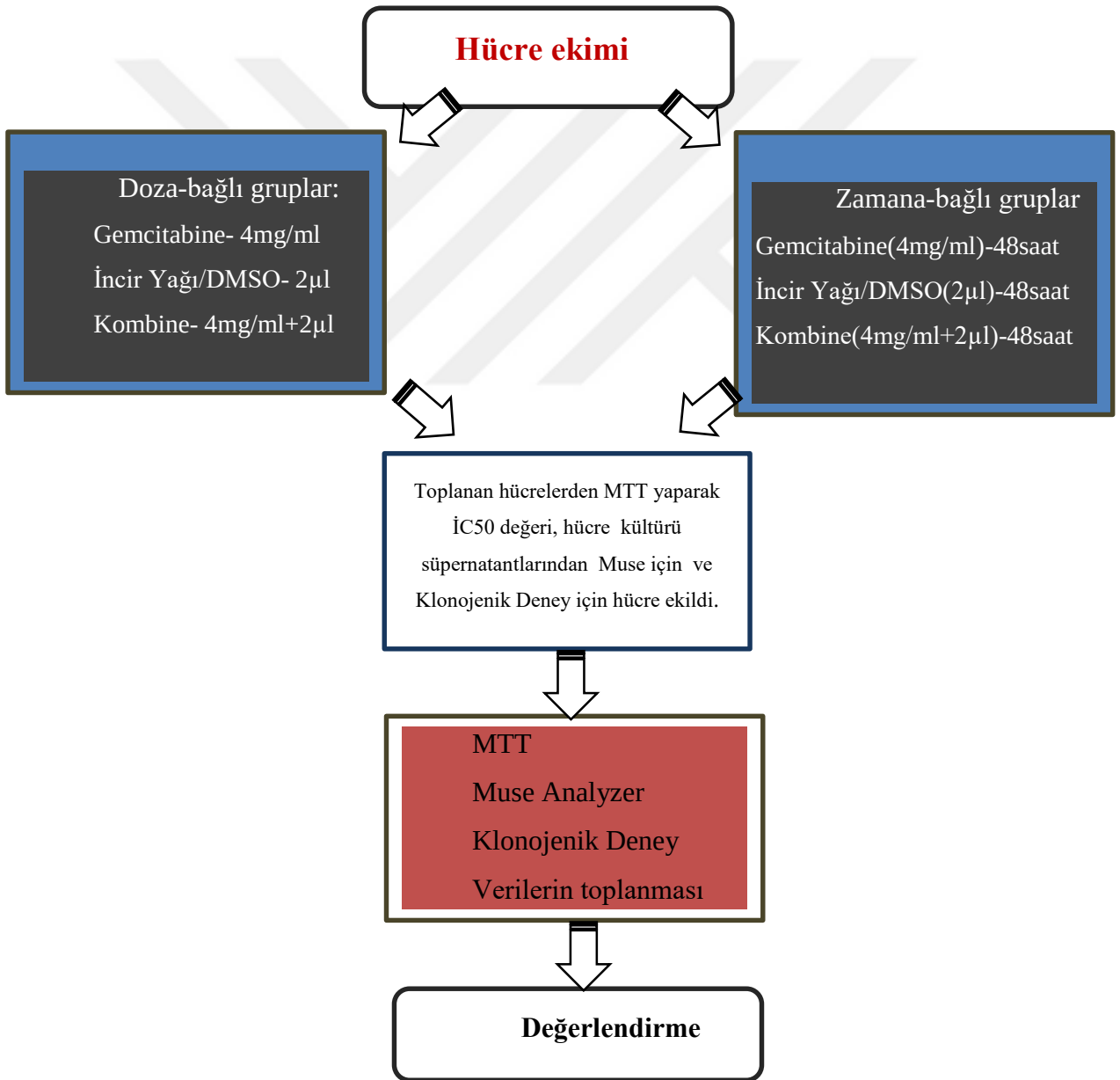
- • Kültürde kontaminasyon riski olması
- • MTS/PMS analizleri için gemcitabine konsantrasyonunun belirlenen standart aralığına dahil olmaması
- • Klonojenik analizlerinde için hücrelerin tutunmaması

3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma bulguları Panc-1 hücrelerinin incir çekirdeği yağı ile belirlenen konsantrasyonları ile muamelesi ve hücre ölümü üzerindeki analizi ile sınırlıdır.

3.5. Çalışma Planı

Çalışma planı ve araştırma takvimi aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3. Çalışma planı

3.6. Hücre Kültürü

Bu çalışmada hücre hattı olarak pankreas kanser hücresi Panc-1 kullanıldı. Panc-1 hücre hattı in vitro ortamda uygun kültür şartlarında çoğaltılmıştır. Uygun koşullarda çoğaltılıp, hayati faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli komponentlerden oluşan besi ortamları hazırlanmıştır. Bu komponentler; DMEM High Glukoz, Fetal Sığır Serum, L-Glutamin ve Penisilin-Streptomisin'dir. Panc-1 hücre hattının in vitro ortamda üremesi için ihtiyaç duyduğu komponentler her uygulamada gereken dozda hazırlanmıştır. Falcon tüplere (50 ml) serolojik pipet vasıtasıyla 44 ml DMEM High Glukoz, 5ml Fetal sığır serumu ve 1 ml Penisilin-Streptomisin eklenerek besiyeri elde edilmiştir.

Besiyeri değişiminde Panc-1 hücre hattının çoğalma hızı, flastaki hücre yoğunluğu ve besiyerinde renk değişimi ihtimali göz önüne alınmıştır. İki günde bir ortama yeni besi yeri eklenmiştir. Çalışmada kullandığımız hücre hattı adherent hücre hattı olduğu için herhangi bir santrifüj işlemi gerçekleştirilmemiş, ortamda var olan besi yeri ortamdaki uzaklaştırılarak, yeni besi yeri ortama eklenmiştir.

3.6.1 Hücrelerin Pasajlanması

Adherent olarak büyüyen hücrelerimiz mikroskop altında müşahade edilmiştir. Hücre yoğunluğu 10^5 - 10^6 aralığında olan flastlar pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde flastta olan besi yeri kenarlaştırılmıştır. Flastta 1 ml Tripsin/ EDTA solüsyonu eklenerek, flastın her bir nüfuz edecek şekilde muamele yapılmıştır. Tripsin/EDTA hücreleri süspanse etmesi için %5 CO₂ içeren 37° C inkubatörde 3 ila 5 dakika bekletildi. Hücreler süspanse hale geldikten hemen sonra flastta birkaç ml besi yeri eklenerek, flasttaki bütün sıvı 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak 1550 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, pellet birkaç taze besi yeri ile pipetlendi. Hücreler iki farklı flastta aktarıldı ve % 5 CO₂ içeren 37° C inkubatöre konuldu.

3.6.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi

Deneyimizde ihtiyaç fazlası hücreleri hem hücrelerimizin yaşlanmasının karşısını almak için, hem de ihtiyaç halinde başka deneylerde kullanmak amacıyla dondurularak saklandı. Dondurulmasını yapacağımız hücrelerin besi yeri uzaklaştırılarak, 1mL Tripsin/EDTA ekleyerek hücrelerin süspanse olmasını sağladık. Süspanse olan hücrelerin üzerine 2ml taze besi yeri eklendi daha sonra flaskdaki bütün sıvı çekilerek 15 ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 1550 rpm' de 5dakika satrifuje edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı, bu esnada hazırlanan %5lik DMSO:C-MEDIUM solüsyonundan 1mL pellete eklenerek pipetlendi. Pipetlenen hücreler kriyo tüplere aktarıldı. Kapakları parafilmlenen kriyo tüpler önce 1-2saat -20⁰C de bekletildi. Daha sonra buz üzerinde -86 ⁰C 'ye kaldırıldı ve -86 ⁰C' den alınan kriyo tüpleri birkaç dakika su banyosunda bekletilerek çözülmesi sağlandı. DMSO' nun toksik etkisini en aza indirmek için 15ml santrifüj tüpüne 2ml hazırladığımız besi yerinden eklendi ve üzerine kriyo tüpte bulunan sıvıyı ekleyerek pipetleme yapıldı. Daha sonra 1550 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak, pellet kısmına 1-2ml taze besi yeri eklendi. 25T flaska 6-7ml taze besi yeri konuldu ve pipetlenen pellet kısmı flaska akarıldı. %5 CO₂ içeren 37⁰C inkübatörde yerleştirilerek büyümesi ve çoğalması sağlandı.

3.7. Doz Belirleme ve MTS/PMS proliferasyon deneyi

İnkübatörde saklanan flasklar mikroskop altında gözlemlendi ve ekim yapılması için gereken miktarda hücre bulunan flask, kabine alındı. Flaskın içindeki besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı ve ortama 1 mL Tripsin/EDTA eklendi. 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin/EDTA sayesinde süspanse olan hücrelerin üzerine 1-2 ml taze besiyeri eklenerek, bütün sıvı 15 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu. 5dakika 1500rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı, pellet kısmı 1ml besi yeri ile çözdürüldü. 1-10µl pipet ucuyla 10µl sıvı çekilerek Thoma hücre sayımı lamına konuldu. Ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Sayılan hücreler $A \times SF \times 10000$ formülüne ($\times 10^4$ şeklinde) göre hesaplanarak mL başına düşen hücre sayısı belirlendi. Hücre ekimi için bu çalışmada 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Kuyucuk başına 3000 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak her bir kuyucuğa 100µl hücre ekildi. 24 saat inkübatörde bekletilen hücrelerin tutunması ve çoğalması sağlandı.

96 kuyucuklu plaka steril kabine alınarak blank hariç bütün sütunlardaki sıvı pipetle çekilerek atık kabına atıldı. İncir Yağı uygulanan grupta ilaç dozları sırasıyla 1µl, 2µl, 4µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 20 µl şeklinde uygulandı. Gemcitabine uygulanan grupta ilaç dozları sırasıyla; 500µg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml şeklinde uygulandı. Gemcitabine + İncir Yağı kombinasyonu uygulanan grupta ilaç dozları Gemcitabine 4mg/ml+2 µl şeklinde uygulandı.

İlaç dozları yapılan solüsyon hesaplaması sonrasında taze besi yeri ile seyreltildi ve her kuyucuğa 100µL şeklinde eklendi. İlaç uygulaması yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakalar 48 ve 72 saat inkübatörde bekletildi. 48 saat ve 72 saat inkübatörde ilaca maruz kalan hücreler kabine alındı. Bu kez ilaç uygulanan sıvılar çöpe atılmadı. 15ml falkona 2ml MTS, 100µl PMS eklenerek karıştırıldı. Her kuyucuğa 20µl MTS/PMS eklendi ve kuyucukların tabanına değmeden pipetle yapıldı. Bu iş karanlık ortamda yapıldı. Hazırlanan MTS/PMS falkonunun etrafını alüminyum folyo ile sararak ışık girişi engellenmiştir. Her kuyucuğa eşit şekilde MTS/PMS sıvısı uygulandıktan sonra 4saat 96 kuyucuklu plakalar inkübatörde bekletildi.

4 saatin sonunda inkübatörden çıkarılan 96 kuyucuklu plakaların üzeri alüminyum folyo ile sarıldı. Daha sonra, mikropate okuyucu hazırlandı, 96 kuyucuklu plakalar okuyucuya yerleştirilerek, 490nm dalga boyunda okutularak istatistiksel veriler alındı.

Sonrasında kombinasyonlarla MTT/PMS yapıldı. Bunun için 4 farklı grup oluşturuldu. Bunlar sırasıyla; 1. Kontrol, 2. Gemcitabine 4mg/ml, 3. İncir 2mg/ml 4. kombine 2µl +4mg/ml+medium (İncir+Gemcitabine) tedavi şeklindedir. Hücreler tutunması için 24 saat bekletildikten sonra steril kabine alındı ve içindeki besi yerleri çekilerek atık kabına atıldı. Her iki kontrol grubuna yeniden taze besi yeri eklendi. Diğer gruplara uygulanacak ilaçların doz miktarı gerekli olan hesaplamalar ile yapıldı. İlaçlar her bir deney grubu için ayrı falkonlarda hazırlandı. Hazırlanan ilaçlar deney gruplarına uygulandı ve her bir flaskın üzerine hangi deney grubu olduğu etiketlendi. Deney gruplarımız 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37⁰ C inkübatörde bekletildi. 4 saatin sonunda inkübatörden çıkarılan 96 kuyucuklu plakaların üzeri alüminyum folyo ile sarıldı. Daha sonra, mikropate okuyucu hazırlandı, 96 kuyucuklu plakalar okuyucuya yerleştirilerek, 490nm dalga boyunda okutularak istatistiksel veriler alındı.

3.8. Muse Analizi

3.8.1. Hücre Kültürü Kabına Hücre Ekimi

Büyümesi ve çoğalması için inkübatörde muhafaza edilen hücreler inkübatörden çıkartılarak mikroskop altında incelendi. Yeterli miktarda hücre bulunan flask kabine alındı ve içerisinde bulunan besi yeri uzaklaştırıldı. Flaska 1 ml Tripsin/EDTA eklendi ve 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildi. Adherent olan hücrelerin tabandan kaldırıldığını gözlemlediğimizde üzerine 2.5ml taze besi yeri konuldu. Flask içerisindeki bütün sıvı çekilerek 15ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 5 dakika 1550rpm'de 24⁰C'de santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra çıkan supernatant kısmı atıldı ve pellet kısmı 1 mL besi yeri ile çözüldü. Pipetlenen bu kısımdan 10 µl sıvı çekilerek Thoma Lamına konuldu ve mikroskop altında sayım yapıldı. $A \times SF \times 10000$ formülüne göre hesap yapıldı ve mL başına düşen hücre sayısı hesaplanarak belirlendi. Bu deneyde her bir deney grubuna 2×10^5 hücre ekimi yapıldı. 24 saat inkübatörde bekletildi, tabana tutunmaları ve büyümeleri sağlandı.

Bu deneyde 4 farklı grup oluşturuldu. Bunlar sırasıyla; Kontrol, Gemcitabine 4mg/ml, İncir 2 µl ve kombine (İncir2 µl +Gemcitabine 4mg/ml) tedavi şeklindedir. Hücreler tutunması için 24 saat bekletildikten sonra steril kabine alındı ve içindeki besi yerleri çekilerek atık kabına atıldı. Her iki kontrol grubuna yeniden taze besi yeri eklendi. Diğer gruplara uygulanacak ilaçların doz miktarı gerekli olan hesaplamalar ile yapıldı. İlaçlar her bir deney grubu için ayrı falkonlarda hazırlandı. Hazırlanan ilaçlar deney gruplarına uygulandı ve her bir flaskın üzerine hangi deney grubu olduğu etiketlendi. Deney gruplarımız 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37⁰ C inkübatörde bekletildi.

3.8.2. Deney gruplarının Muse Analizine Hazırlanması

48 saat inkübatörde bekletilen hücreler inkübatörden çıkartıldı ve mikroskop altında gözlemlendi. İncir ve Kombine gruplarında hücrelerin besi yeri üzerinde yüzdüğü görüldü. Flasklar steril kabine alındı. Kontrol grubu ve Gemcitabine gruplarında flaska yapışan hücre sayısı fazla olduğu için, flaskın içerisinde bulunan besi yeri uzaklaştırılarak 1ml Tripsin/EDTA eklendi, 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildikten sonra birkaç mL besi yeri eklendi ve 15ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Her bir deney grubunu farklı santrifüj tüpüne aktararak her birinin hangi deney grubu olduğu belirtildi. Deney gruplarımız 1550rpm'de 5

dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet kısmı 150µl taze besi yeri ile iyice pipetlendi. Her bir deney grubu 1.5µl ependorf tüplerine aktarıldı. Ependorfa 100µl örnek, 100µl Annexin v eklenerek pipetlendi. 20 dakika boyunca karanlık ortamda bekletildi. Karanlık ortamdan çıkarılan ependorflar, kontrol grubundan başlayarak, pipetaj yapılarak, kapakları kesilecek şekilde Muse cihazında saçılım grafiği alınmak üzere işleme alındı.

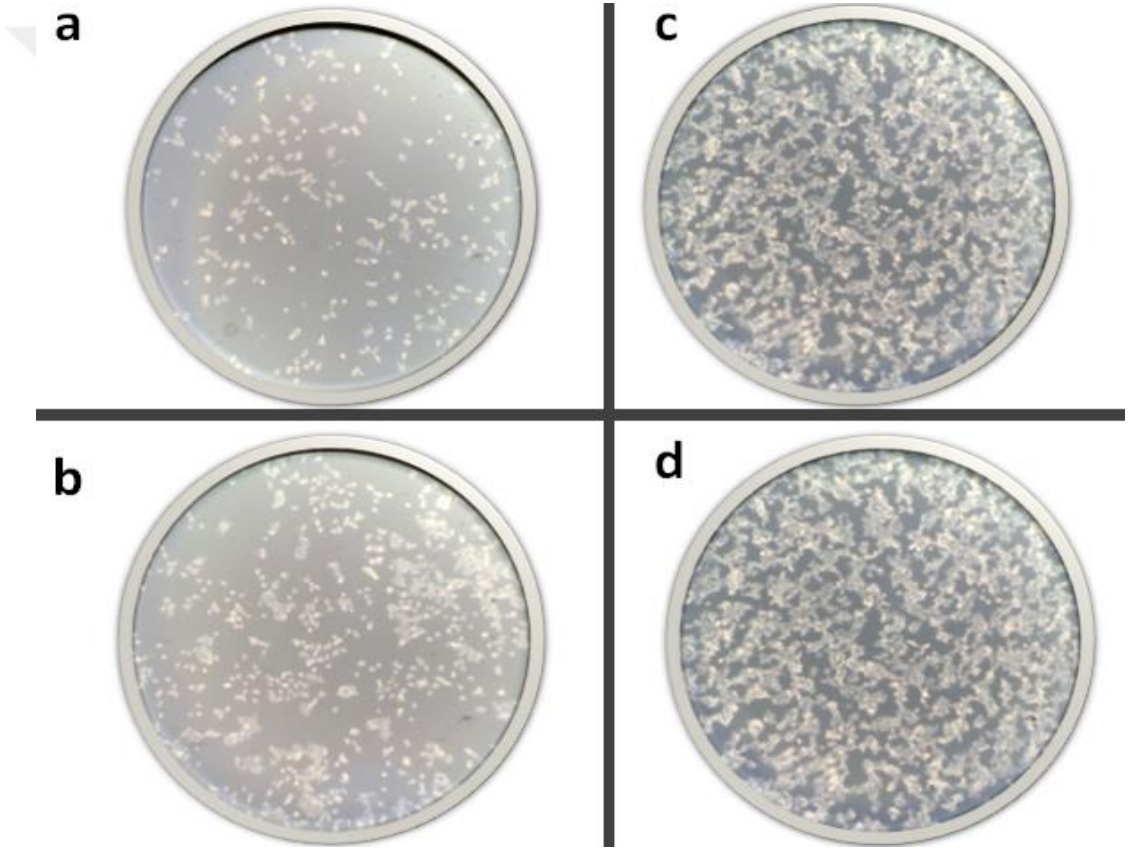
3.9. Klonojenik Analizi

Her bir kuyucuğa 8000 hücre ekimi yapıldı. 4farklı deney grubu oluşturuldu. Çalışma sonucu çıkan IC_{50} değerinin klonojenik deney için yarısı kullanıldı. IC_{50} değeri Gemcitabine için 2mg/ml, İncir yağı için ise 1µl DMSO/İncir baz alındı. Daha sonra ilaç dozları için gerekli hesaplamalar yapıldı, gereken miktarda besi yeri ile kuyucuklara eklendi. Kontrol grubunda hücreler tutunana kadar bekletildi. 72 saat hücrelerin inkübatörde tutunması sağlandı. Daha sonra 6 kuyucuklu plakalardaki besi yeri uzaklaştırıldı. Kontrol grubuna 3ml medium eklendi. Geri kalan kuyucuklarda deney grupları oluşturuldu. Bu gruplar; Gem, Gem+İncir, İncir şeklindedir. 5gün hücreler inkübatörde bekletildikten sonra plakalardaki besiyeri uzaklaştırılarak 1mL PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Her 6 kuyucuklu plakaya metanol:acetic acid=3:1 miktarda eklendi. 5dakika inkübe edildikten sonra,reaktif ortamdan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 0.5% crystal violet (in methanol) 1mL eklenerek, 15 dakika bekletildi. Daha sonra musluk suyuyla yıkandı.Deney gruplarına kıyasla kontrol gruplarında canlı hücre kolonileri gözlemlendi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü bulgarı

Panc-1 pankreas kanseri hücre hattı adeherent hücreler olup, tek tabaka halinde çoğalan hücrelerdir. Panc-1, %10 Fötal Sığır Serumı (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren tam besiyeri içinde 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde T-25 kültür flasklarında çoğaltıldı.

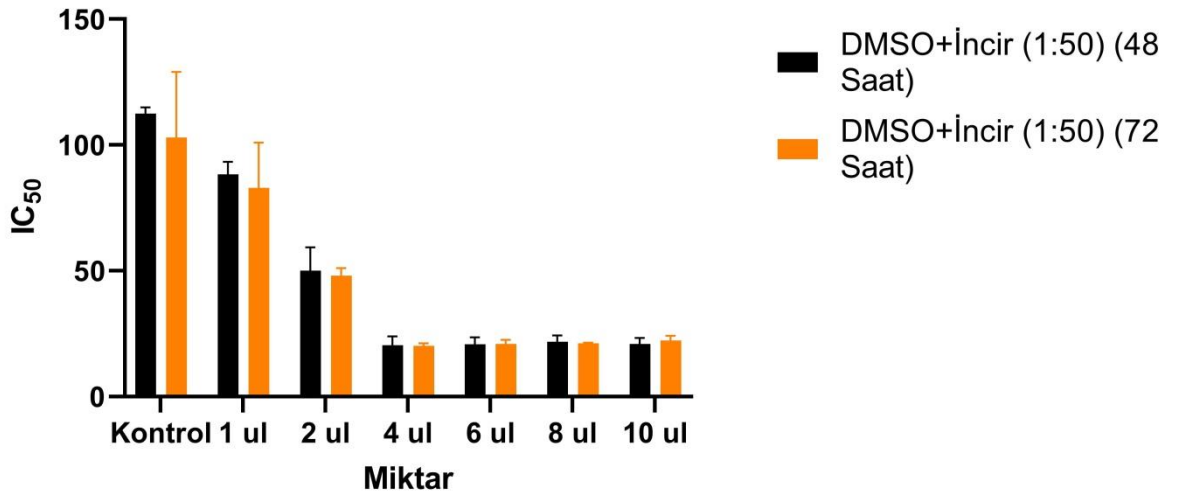


Şekil 4. Panc-1 hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüleri. a: %20 konfluent Panc-1 hücre hattı, b: %40 konfluent Panc-1 hücre hattı, c: %70 konfluent Panc-1 hücre hattı , d: %85 konfluentPanc-1 hücre hattı.

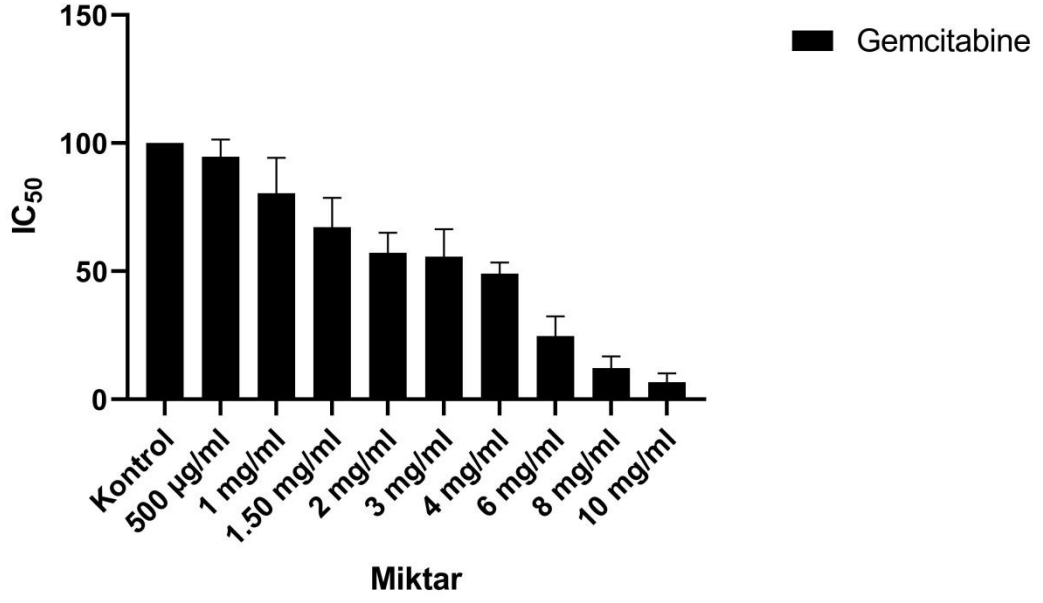
4.2. Doz Belirleme ve MTS/PMS Bulguları

Çalışmamızda incir yağı hem direkt hem de DMSO ile 1:50 oranında seyreltilerek denenmiştir. Sadece incir yağı 100 µl’de 1µl, 2µl, 4µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 20 µl olacak şekilde denendi. İncir Yağı/DMSO ise önce 1:50 oranında seyreltildi ve yine 100 µl’de 1µl, 2µl, 4µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 20 µl olacak şekilde denendi. Gemsitabin ise 500 µg/ml ile 10 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda test edildi.

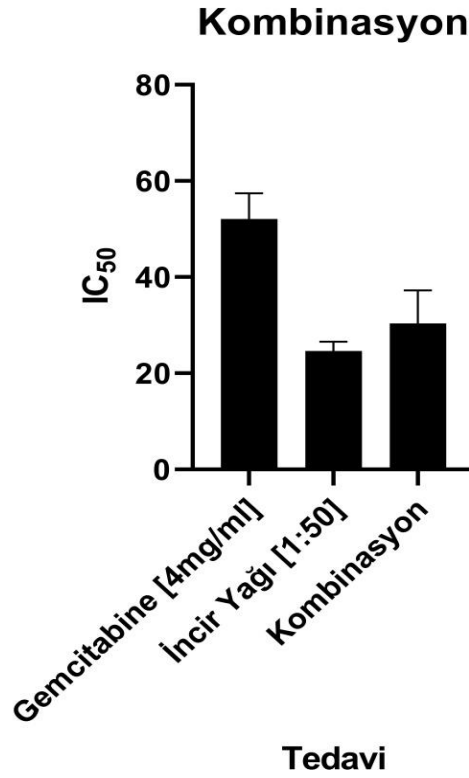
İncir Yağı, Gemcitabine ve Kombine (Gem+İncir) gruplarında IC₅₀ değerlerini belirlemek için MTS/PMS deneyi yapılmıştır. Gemcitabine 4mg/ml dozda anlamlı sonuç vermiştir. Yapılan MTT sonuçlarına istinaden IC₅₀ değeri Gemcitabine 4mg/ml, İncir Yağı 100 µl’de 2µl anlamlıdır. Deney gruplarımızı belirlediğimiz dozlarla 48 ve 72 saat inkube ettik. 48saatlik gruplarımızda olumlu sonuçlar elde ettik. Bu değerleri göz önünde bulundurarak kombine grubunu Gemcitabine+İncir (4mg/ml+2µl) şeklinde oluşturduk.



Şekil 5 . DMSO/İncir Yağı(1:50) doz belirleme sonuçları.



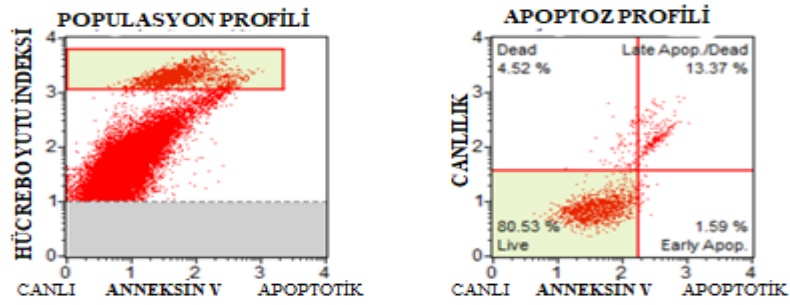
Şekil 6. Gemcitabine doz belirleme sonuçları.



Şekil 7. İncir yağı, Gemcitabine, Gemcitabine+İncir Proliferasyon sonuçları.

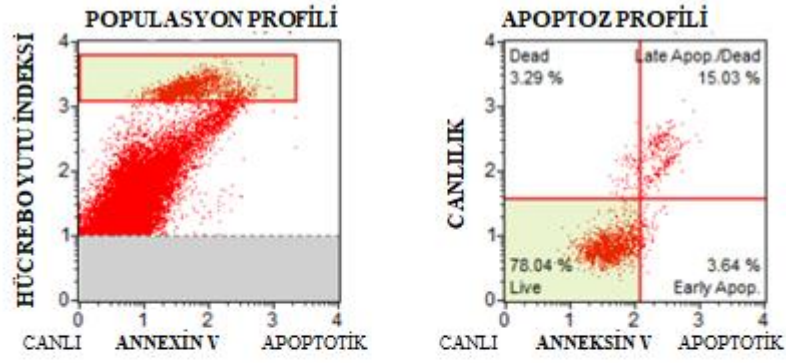
4.3. Muse Analizi Bulguları

Bu analiz annexinV kiti kullanılarak kontrol, gemcitabine, incir, kombine (gemcitabine+incir) gruplarında apoptotik değerlendirme için yapılmıştır. Tüm grublarda canlılık ve apoptoz sonuçları yüzdelik oranla gösterilmiştir. Sonuç olarak kontrol grubunda; canlılık %80.53, total apoptoz %14.96, gemcitabine grubunda; canlılık %78.04, total apoptoz %18.67, incir grubunda; canlılık %2.90, total apoptoz %97.06, kombine grubunda (gem+incir); canlılık %2.35, total apoptoz ise %97.45'tir. Sonuçlara baktığımız zaman, incir yağının gemcitabine ile oluşturduğu kombine grubunda apoptoz oranının daha fazla olduğunu gözlemleyerek incirin gemcitabine ile daha etkili olup, nekroza yakın sonuçlar verdiği kanısına varıldı.



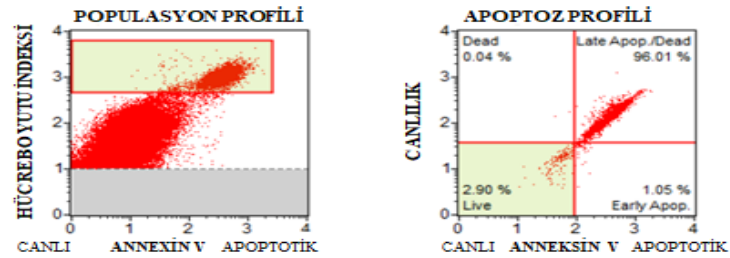
	Cell Conc. (Cells / mL)	% ORAN
CANLI (LL):	2.74E+05	80.53 %
ERKEN APOPTOZİS (LR):	5.40E+03	1.59 %
GEÇ APOP/ ÖLÜ (UR):	4.55E+04	13.37 %
KALINTI (UL):	1.54E+04	4.52 %
TOTAL APOPTOZ:	5.09E+04	14.96 %

Şekil 8. Kontrol grubu sonuçları.



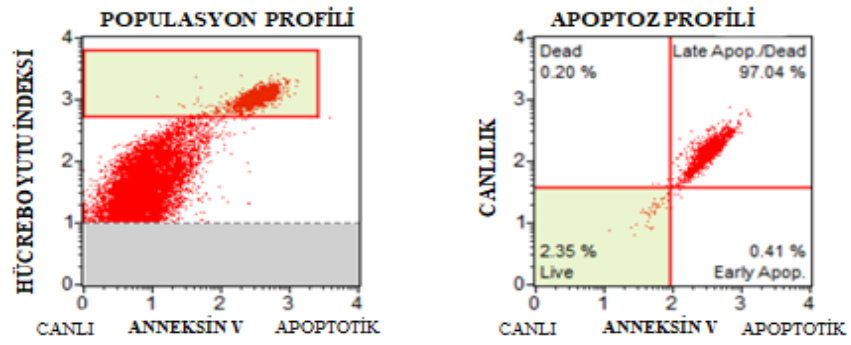
	Cell Conc. (Cells / mL)	%ORAN
CANLI (LL):	1.95E+05	78.04 %
ERKEN APOPTOZİS (LR):	9.10E+03	3.64 %
GEÇ APOP/ ÖLÜ (UR):	3.76E+04	15.03 %
KALINTI (UL):	8.22E+03	3.29 %
TOTAL APOPTOZ:	4.67E+04	18.67 %

Şekil 9. Gemcitabine grubu sonuçları.



	Cell Conc. (Cells / mL)	% ORAN
CANLI (LL):	1.42E+04	2.90 %
ERKEN APOPTOZİS (LR):	5.14E+03	1.05 %
GEÇ APOP/ ÖLÜ (UR):	4.71E+05	96.01 %
KALINTI (UL):	2.01E+02	0.04 %
TOTAL APOPTOZ:	4.76E+05	97.06 %

Şekil 10. İncir yağı grubu sonuçları.

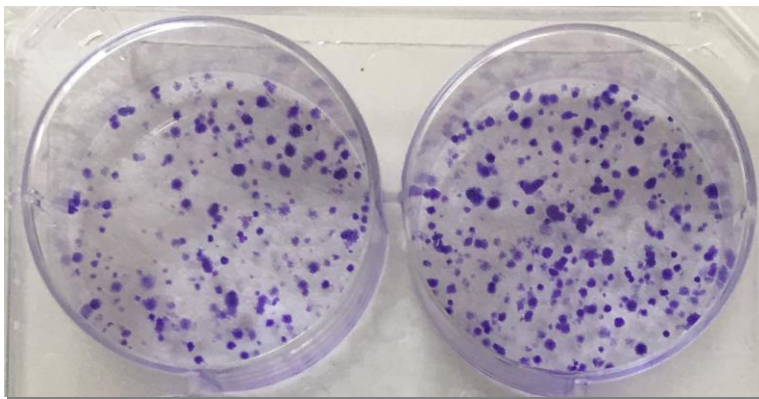


	Cell Conc. (Cells / mL)	% ORAN
CANLI (LL):	1.36E+04	2.35 %
ERKEN APOPTOZİS (LR):	2.36E+03	0.41 %
GEÇ APOP/ ÖLÜ (UR):	5.61E+05	97.04 %
KALINTI(UL):	1.18E+03	0.20 %
Total APOPTOZ:	5.63E+05	97.45 %

Şekil 11. Kombine(gem+incir) grubu sonuçları.

4.4.Klonojenik Deney

Değerlendirme 4 grup üzerinde; kontrol, gemcitabine, incir, incir+gemcitabine yapıldı.Yapılan deney sonucunda, kontrol grubunda hücrelerin koloni oluşturduğu, ancak ilaç uygulanan kuyucuklarda (incir yağı, gemcitabine, gemcitabine+incir) koloni oluşturmadığı gözlemlendi.



Resim 1. Kontrol Grubu Klonojenik Deney sonucu.



Resim 2. Gemcitabine, incir, ve kombine gruplarının klonojenik deney sonuçları.

Klonojenik Deney Grupları	Ortalama ve Standart Sapma
Kontrol	57.882±7099.5
İncir Yağı	67±46.5
Gemcitabine	2.523±506
Kombine	817±75.5

Şekil 12. Klonojenik deney koloni verileri.

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde hızlıca ölüme götüren türlerdendir ve dünyadaki en ölümcül malign neoplazmalardan biridir (Chakupurakal ve diğerleri, 2017). Pankreas kanserinin iki esas tümör tipi adenokarsinom (vakaların yaklaşık% 85'ini oluşturur) ve pankreas endokrin tümörleridir (tüm vakaların% 5'inden azını oluşturur) (*Global Cancer Observatory*, n.d.; Vickers, 2017). GLOBOCAN 2012 verilerine göre, pankreas kanseri yılda 331.000'den fazla ölüme sebep olmakla birlikte (tüm ölümlerin% 4.0'ını oluşturur) her iki cinsiyette de görülen kanser ölümlerinde yedinci sırada yer almaktadır (Ilic ve diğerleri, 2016). Pankreas kanseri için varsayılan 5 yıllık sağkalım oranı% 5'in altındadır. Dünya çapında pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi, artan yaşla alakalıydı ve kadınlara kıyasla erkeklerde daha yaygındı. Geçtiğimiz on yıllarda, pankreas kanseri ölümleri her iki cinsiyette de arttığı görülmüştür (örneğin, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ülkeleri, Japonya, Çin). Sigara içimi, pozitif aile öyküsü ve genetik, diabetes mellitus (DM), obezite, diyet faktörleri, alkol kullanımı, fiziksel hareketsizlik gibi bazı risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen, pankreas kanserinin nedenleri hala yeteri kadar bilinmemektedir (Parkin ve diğerleri, 2011) .

Apoptotik hücreler tarafından sergilenen belirli morfolojik değişiklikler iyi tanımlanmış ve belgelenmiştir. Bu değişiklikler, hücre kabarması, büzülme, nükleer parçalanma, genetik materyallerin (kromatin ve nükleozomal DNA) yoğunlaşması ve parçalanması ve ApoBD'ler (apoptotik cisimler) olarak bilinen küçük veziküllerin oluşumunu içerir. Hücreler, apoptozun erken evresinde karakteristik bir büzülme geçirerek, içindekiler daha yoğun bir paketlenme yaşarken hücre boyutu küçülür. Mevcut bilgiler, ApoBD'lerin, apoptotik hücre kalıntılarını (yani sitoplazma, organeller ve nükleer içerikler) içerdiğini belirttiği için bu sebeple, herhangi bir apoptotik gövdede belirli bir organel veya nükleer içerik bulunabilir yada bulunmayabilir. Apoptotik cisimler daha sonra nihai bozunma için fagositler, örneğin nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) tarafından yutulur. Fagositoz, apoptotik döngünün son adımını işaret eder ve apoptotik hücreler içinde paketlenmiş tehlikeli maddelerin çevreye yayılmasını önlemektedir (Xu ve diğerleri, 2019).

Ficus carica L. (Moraceae) antik çağlardan beri çeşitli kültürler tarafından geleneksel olarak şifalı incir ağacı olarak kullanılmıştır. İncir meyvesi (*Ficus carica L.*) yüksek düzeyde polifenoller, flavonoidler, antosiyaninler içerir ve yüksek antioksidan kapasite sergilemektedir

(Solomon ve diğerleri, 2006b). Tüketiciler incirleri farklı şekillerde; kurutulmuş, taze, reçel veya meyve suyu olarak tüketmektedirler. Çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar, incir bitkisinin gastrointestinal, solunum, inflamatuvar, kardiyovasküler bozukluklar ve kanser gibi çeşitli rahatsızlıklarda tedavi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Rubnov ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada incirin birkaç kanser hücre hattında antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, Fig lateksinin farelerde ksenograftlı ve spontan tümörlerde antitümör aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, *Ficus carica*'nın kolorektal kanser hücrelerine karşı antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan araştırmadaki sonuçlar, hem HT-29 hem de HCT-116 kolorektal kanser hücreleri üzerinde *Ficus carica* özütlerinin büyük bir antiproliferatif ve pro apoptotik aktivitesini göstermiştir. İncir meyvesinin büyük antitümör aktiviteye sahip olduğu belgelemekte olup, antioksidan özellikleri ve zengin biyoaktif bileşikler ile ilişkili antikanser aktivitesi, onları kemoterapötik veya kemopreventif ajanlar olarak kullanılmak için harika adaylar haline getirmektedir. *Ficus carica*'dan etkilenen moleküler hedefleri ve yolları anlamak için daha ileri deneyler devam etmektedir (Soltana ve diğerleri, 2019).

Önceki yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarda, Khodarahmi ve arkadaşları *Ficus carica*'nın meyveleri, yaprakları ve lateksinin HeLa hücre hattına karşı ortalama 10-20 µg/ml IC50 değerleri ile sitotoksikiteye sahip olduğunu göstermiştir (Felimban, 2016). *Ficus carica* ile ilgili yapılan başka bir çalışmada *F carica* yaprağı ve meyve özlerinin çeşitli antioksidanlar (flavonoid ve tanen gibi) içerdiği gösterilmiştir. *F carica* yaprağı ve meyve ekstraktlarının antioksidan aktivitesi IC50 değeri ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, kanser hücresi büyümesinin IC50 değeri yaprak ekstresinde >653 µg/mL ve meyve ekstresinde >2000 µg/mL olarak gösterilmiştir. Daha küçük IC50 değeri, ekstraktların kanser hücrelerine karşı daha yüksek inhibitör aktivitesini gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle, *F carica* yaprak özütü, meyve özü ile karşılaştırıldığında Huh7it (karaciğer hücre hattı) kanser hücresi büyümesini inhibe etmede daha aktif olduğu saptanmıştır (Purnamasari ve diğerleri, 2019).

Çalışmamızda bu araştırmalar kapsamında yola çıkarak kurutulmuş incir yağının pankreas kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerinde etkisini ve bu durumun prognoza olan izlemine araştırdık. Yapmış olduğumuz çalışmada doz belirleme bulguları olumlu çıkmıştır. Doz belirlemede kurutulmuş incir yağının DMSO ile kombine olmuş şeklinin daha etkili olduğunu gözlemledik. Sonuçlarda incir yağının IC50 değeri 2µg/ml, Gemcitabine IC50

değeri 6 mg/ml ve kombinasyon grubunun IC50 değeri 2 µg/ml+4mg/ml sitotoksositeye sahip olduğu saptanmıştır.

Muse analizi sonuçlarımıza göre tüm gruplar arasında anlamlı bulgular gözlemledik. Çalışmada 4 grub (kontrol, incir yağı, gemcitabine, kombine) oluşturulmuş ve AnnexinV kiti kullanılarak apoptoza bakılmıştır. Alınan sonuçlarda gruplar arasında farklılıklar saptanmıştır. Kontrole (14.96%) kıyasla Gemcitabine grubunda apoptoz 18.67%, İncir grubunda 97.06%, Kombine grubunda ise 97.45% olmuştur. İncir yağı ve Kombine gruplarında apoptozun yükseldiği gözlemlenmiştir. Ve sonuç olarak, İncir yağı ve Kombine gruplarının etkisinin nekroza yakın olduğu düşünülmüştür. Literatür taraması yaptığımız zaman yapılan çalışmalarda nekroza yakın etkisi gözlemlenmemiştir ama bizim çalışmada gözlemlenmiştir. Risa.P ve ark 2019 yılında yaptıkları çalışma sonucunda Flow sitometri analizinde, düşük dozda *F.carica* yaprağı ekstresine maruz bırakılan %0.5 Huh7it hepatoselüller karsinom hücrelerinin toplam apoptoz yaşadığını ancak yüksek dozda maruz kalanların %5.37'sinin ise toplam apoptoz yaşadığını göstermiştir. Doz ne kadar yüksekse, apoptoza giren daha fazla kanser hücresi ve hücre büyümesinin daha düşük bir yüzdesi ile sonuçlanmıştır.

Tüm gruplarda bakmış olduğumuz apoptoz belirteci klonojenik deney sonuçlarına göre olumlu bulgular vardır. Kontrol grubunda hücrelerin proliferasyon yaparak koloni oluşturduğu, ancak ilaç uygulanan gruplarda koloni oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

Tüm sonuçları değerlendirdiğimizde kurutulmuş incir yağının pankreas kanseri hücrelerine etki ettiği ve tümördeki hücre ölümünü tetikleyen bir belirteç olabileceği varsayımında bulunabilir.

Bu tezden elde edilen bilgiler kullanılarak yapılacak olan yeni deneysel araştırmalar pankreas kanserine incir yağının etkisi ve aralarındaki olası mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmanın sonucuna göre *Ficus Carica L.*'de bulunan antosiyaninlerin ve flavonoidlerin pankreas kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerinde etkili olduğu belirlendi. MTS/PMS sonuçlarına göre pankreas kanseri hücrelerinde incir yağı grubunun IC50 değerlerinin etkili olduğu gözlemlenirken, DMSO+İncir yağı grubunda olumlu etki gösterdiği saptandı. Muse analizi sonuçlarımızda İncir yağının tek veya grup şeklinde apoptozu indüklemesi beklenirken, incir yağı ve incir+gemcitabine gruplarında nekroza yakın sonuçlar doğurduğu belirlendi. Klonojenik deney sonuçlarına göre ise ilaç uygulanan kuyucuklarda koloni oluşmadığı gözlemlendi. Farklı pankreas kanseri hücre hatları ile yapılacak çalışmalar ile sonuçlarımız desteklenebilirse daha ileri pre-klinik hayvan modelleri ve klinik çalışmalar için ön ayak olabilir. Çalışmanın pankreas kanseri tedavisi için gelecekte yeni araştırmalara ışık tutabileceği bekleniyor.

KAYNAKLAR

- Adams, J. M. ve Cory, S. (2007, 26 Şubat). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/sj.onc.1210220
- Alpert, L. C., Truong, L. D., Bossart, M. I. ve Spjut, H. J. (1988). Microcystic adenoma (serous cystadenoma) of the pancreas. A study of 14 cases with immunohistochemical and electron-microscopic correlation. *American Journal of Surgical Pathology*, 12(4), 251–263. doi:10.1097/00000478-198804000-00001
- Ansari, D., Tingstedt, B., Andersson, B., Holmquist, F., Stureson, C., Williamsson, C., ... Andersson, R. (2016, 1 Ağustos). Pancreatic cancer: Yesterday, today and tomorrow. *Future Oncology*. Future Medicine Ltd. doi:10.2217/fon-2016-0010
- Ashkenazi, A. ve Herbst, R. S. (2008, 2 Haziran). To kill a tumor cell: The potential of proapoptotic receptor agonists. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation. doi:10.1172/JCI34359
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., ... Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592), 47–52. doi:10.1038/nature16965
- Borhani, A. A., Fasanella, K. E., Iranpour, N., Zureikat, A. H., Singhi, A. D., Furlan, A. ve Dasyam, A. K. (2017, 1 Mart). Lymphoepithelial cyst of pancreas: spectrum of radiological findings with pathologic correlation. *Abdominal Radiology*. Springer New York LLC. doi:10.1007/s00261-016-0932-3
- Brenner, D. ve Mak, T. W. (2009, 1 Aralık). Mitochondrial cell death effectors.

Current Opinion in Cell Biology. Elsevier Current Trends.
doi:10.1016/j.ceb.2009.09.004

Brugge, W. R. (2008). Diagnosis and management of relapsing pancreatitis associated with cystic neoplasms of the pancreas. *World Journal of Gastroenterology*, 14(7), 1038–1043. doi:10.3748/wjg.14.1038

Celik, H., Aydin, T., Solak, K., Khalid, S. ve Farooqi, A. A. (2018). Curcumin on the “flying carpets” to modulate different signal transduction cascades in cancers: Next-generation approach to bridge translational gaps. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4293–4303. doi:10.1002/jcb.26749

Chakupurakal, G., Feiten, S., Burkhard, O., Reiser, M., Ehscheidt, P. ve Weide, R. (2017). Successful Evidence-Based Treatment of Patients with Advanced Pancreatic Cancer in Community-Based Oncology Group Practices. *Oncology Research and Treatment*, 40(12), 784–788. doi:10.1159/000480016

Cizginer, S., Turner, B., Bilge, A. R., Karaca, C., Pitman, M. B. ve Brugge, W. R. (2011). Cyst fluid carcinoembryonic antigen is an accurate diagnostic marker of pancreatic mucinous cysts. *Pancreas*, 40(7), 1024–1028. doi:10.1097/MPA.0b013e31821bd62f

Compagno, J. ve Oertel, J. E. (1978). Microcystic adenomas of the pancreas (glycogen-rich cystadenomas). A clinicopathologic study of 34 cases. *American Journal of Clinical Pathology*, 69(3), 289–298. doi:10.1093/ajcp/69.1.289

D’Arcy, M. S. (2019, 1 Haziran). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1002/cbin.11137

De Jong, K., Bruno, M. J. ve Fockens, P. (2012). Epidemiology, diagnosis, and management of cystic lesions of the pancreas. *Gastroenterology Research*

and Practice. doi:10.1155/2012/147465

Eberhardt, M. V., Lee, C. Y. ve Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903–904. doi:10.1038/35016151

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. Toxicol Pathol. doi:10.1080/01926230701320337

Felimban, A. I. (2016). CYTOTOXIC ACTIVITY OF LEPIDIUM SATIVUM AND FICUS CARICA EXTRACTS ON FOUR TUMOR CELL LINES.

Fulda, S. ve Debatin, K. M. (2006, 7 Ağustos). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/sj.onc.1209608

Fulda, Simone. (2009). Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7), 1221–1227. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00748.x

Furukawa, T., Hatori, T., Fujita, I., Yamamoto, M., Kobayashi, M., Ohike, N., ... Shimizu, M. (2011). Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut*, 60(4), 509–516. doi:10.1136/gut.2010.210567

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018, 1 Mart). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41418-017-0012-4

Garrido-Laguna, I. ve Hidalgo, M. (2015, 30 Haziran). Pancreatic cancer: From state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrclinonc.2015.53

Global Cancer Observatory. (y.y.). 19 Nisan 2021 tarihinde <https://gco.iarc.fr/>

adresinden erişildi.

- Gnoni, A., Licchetta, A., Scarpa, A., Azzariti, A., Brunetti, A., Simone, G., ... Silvestris, N. (2013). Carcinogenesis of Pancreatic Adenocarcinoma: Precursor Lesions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19731–19762. doi:10.3390/ijms141019731
- Goral, V. (2015). Pancreatic cancer: Pathogenesis and diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. doi:10.7314/APJCP.2015.16.14.5619
- Grilo, A. L. ve Mantalaris, A. (2019, 1 Mayıs). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.012
- Hassen, S. (2012). Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 3(3), 71. doi:10.4291/wjgp.v3.i3.71
- Hengartner, M. O. (2000, 12 Ekim). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/35037710
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N. ve DePinho, R. A. (2006, 15 Mayıs). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/gad.1415606
- Hisaka, T., Horiuchi, H., Uchida, S., Ishikawa, H., Kawahara, R., Kawashima, Y., Shirozu, K. (2013). Potential usefulness of mucin immunohistochemical staining of preoperative pancreatic biopsy or juice cytology specimens in the determination of treatment strategies for intraductal papillary mucinous neoplasm. *Oncology Reports*, 30(5), 2035–2041. doi:10.3892/or.2013.2720
- Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z. ve Shi, Y. (2013). Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of

- caspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15142–15147. doi:10.1074/jbc.M112.441568
- Ilic, M. ve Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694
- Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasms of the Pancreas : The American Journal of Surgical Pathology. (y.y.). 5 Mayıs 2021 tarihinde https://journals.lww.com/ajsp/Abstract/1996/08000/Intraductal_Oncocytic_Papillary_Neoplasms_of_the.7.aspx adresinden erişildi.
- Jais, B., Rebours, V., Malleo, G., Salvia, R., Fontana, M., Maggino, L., ... Lévy, P. (2016). Serous cystic neoplasm of the pancreas: A multinational study of 2622 patients under the auspices of the International Association of Pancreatology and European Pancreatic Club (European Study Group on Cystic Tumors of the Pancreas). *Gut*, 65(2), 305–312. doi:10.1136/gutjnl-2015-309638
- Jamieson, N. B., Morran, D. C., Morton, J. P., Ali, A., Dickson, E. J., Carter, C. R., ... Oien, K. A. (2012). MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 18(2), 534–545. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0679
- Kale, J., Osterlund, E. J. ve Andrews, D. W. (2018, 17 Kasım). BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/cdd.2017.186
- Kamal, A., Akshintala, V. S., Kamal, M. M., El Zein, M., Besharati, S., Kumbhari, V., ... Khashab, M. A. (2019). Does Etiology of Pancreatitis Matter? Differences in Outcomes among Patients with Post-Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography, Acute Biliary, and Alcoholic

- Pancreatitis. *Pancreas* içinde (C. 48, ss. 574–578). Lippincott Williams and Wilkins. doi:10.1097/MPA.0000000000001283
- Kenner, B., Chari, S. T., Kelsen, D., Klimstra, D. S., Pandol, S. J., Rosenthal, M., ... Wolpin, B. (2021). Artificial Intelligence and Early Detection of Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 50(3), 251–279. doi:10.1097/MPA.0000000000001762
- Khosravi-Far, R. ve Esposti, M. D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biology and Therapy*. Landes Bioscience. doi:10.4161/cbt.3.11.1173
- Kimura, W., ' H., Nagai, A., Kuroda, T., Muto, I. ve Esaki, Y. (1995). *Analysis of Small Cystic Lesions of the Pancreas*. *International Journal of Pancreatologv* (C. 18).
- Krammer, P. H. (2000, 12 Ekim). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/35037728
- Lautraite, S., Musonda, A. C., Doehmer, J., Edwards, G. O. ve Chipman, J. K. (2002). Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*, 17(1), 45–53. doi:10.1093/mutage/17.1.45
- Lianju, W., Weibin, J., Kai, M., Zhifeng, L. ve Yelin, W. (2003). The production and research of fig (*Ficus carica* L.) in China. *Acta Horticulturae* içinde (C. 605, ss. 191–196). International Society for Horticultural Science. doi:10.17660/ActaHortic.2003.605.28
- Liu, H., Jiang, W. ve Xie, M. (2010). Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 5(2), 152–164. doi:10.2174/157489210790936261
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N. ve Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: Where do they meet? *Apoptosis*, 19(4), 555–566.

doi:10.1007/s10495-014-0967-2

- Nicolas Landrault, †, Patrick Poucheret, ‡, Patrice Ravel, §, Francis Gasc, †, Gérard Cros, ‡ and ve Pierre-Louis Teissedre*, †. (2001). Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3341–3348. doi:10.1021/JF010128F
- Oberstein, P. E. ve Olive, K. P. (2013). Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(4), 321–37. doi:10.1177/1756283X13478680
- Oldenhuis, C., Mom, C., Sleijfer, S., Gietema, J. A., Fox, N. L., Corey, A., ... Verweij, J. (2008). A phase I study with the agonistic TRAIL-R1 antibody, mapatumumab, in combination with gemcitabine and cisplatin. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15_suppl), 3540–3540. doi:10.1200/jco.2008.26.15_suppl.3540
- Park. (2010). Anthocyanins are novel AMPK α 1 stimulators that suppress tumor growth by inhibiting mTOR phosphorylation. *Oncology Reports*, 24(6), 1471–1477. doi:10.3892/or_00001007
- Parkin, D. M., Boyd, L. ve Walker, L. C. (2011). The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British Journal of Cancer*, 105(2), S77–S81. doi:10.1038/bjc.2011.489
- Peña-Blanco, A. ve García-Sáez, A. J. (2018, 1 Şubat). Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/febs.14186
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi ve D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. Impact Journals LLC. doi:10.18632/aging.100934

- Purnamasari, R., Winarni, D., Permanasari, A. A., Agustina, E., Hayaza, S. ve Darmanto, W. (2019). Anticancer Activity of Methanol Extract of *Ficus carica* Leaves and Fruits Against Proliferation, Apoptosis, and Necrosis in Huh7it Cells: <https://doi.org/10.1177/1176935119842576>, 18. doi:10.1177/1176935119842576
- Reddy, R. P., Smyrk, T. C., Zapiach, M., Levy, M. J., Pearson, R. K., Clain, J. E., ... Chari, S. T. (2004). Pancreatic mucinous cystic neoplasm defined by ovarian stroma: Demographics, clinical features, and prevalence of cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(11), 1026–1031. doi:10.1016/S1542-3565(04)00450-1
- Rolland, S. G. ve Conradt, B. (2010, 1 Aralık). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends. doi:10.1016/j.ceb.2010.07.014
- Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A. F., Balci, M. K., Omer, A., ... Sanlioglu, S. (2008). High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas. *Pancreas*, 36(4), 385–393. doi:10.1097/MPA.0b013e318158a4e5
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., ... Flaishman, M. A. (2006a). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7717–7723. doi:10.1021/jf060497h
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., ... Flaishman, M. A. (2006b). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7717–7723. doi:10.1021/jf060497h

- Soltana, H., Pinon, A., Limami, Y., Zaid, Y., Khalki, L., Zaid, N., ... Hammami, M. (2019). Antitumoral activity of *Ficus carica* L. On colorectal cancer cell lines. *Cellular and Molecular Biology*, 65(6), 6–11. doi:10.14715/CMB/2019.65.6.2
- Stark, A., Donahue, T. R., Reber, H. A. ve Joe Hines, O. (2016, 3 Mayıs). Pancreatic cyst disease a review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association. doi:10.1001/jama.2016.4690
- Tanaka, M., Chari, S., Adsay, V., Fernandez-del Castillo, C., Falconi, M., Shimizu, M., ... Matsuno, S. (2006). International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* içinde (C. 6, ss. 17–32). Elsevier B.V. doi:10.1159/000090023
- Torres, C. ve Grippo, P. J. (2018). Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine. *Annals of Medicine*, 50(4), 277–287. doi:10.1080/07853890.2018.1453168
- Vickers, N. J. (2017, 24 Temmuz). Animal Communication: When I’m Calling You, Will You Answer Too? *Current Biology*. Cell Press. doi:10.1016/j.cub.2017.05.064
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. ve Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet* içinde (C. 378, ss. 607–620). Elsevier B.V. doi:10.1016/S0140-6736(10)62307-0
- Vogler, M., Dürr, K., Jovanovic, M., Debatin, K. M. ve Fulda, S. (2007). Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene*, 26(2), 248–257. doi:10.1038/sj.onc.1209776
- Vogler, Meike, Walczak, H., Stadel, D., Haas, T. L., Genze, F., Jovanovic, M., ... Fulda, S. (2008). Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in

- vitro and in vivo. *Cancer Research*, 68(19), 7956–7965. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1296
- Willett, W. C. (2000). *Diet and Cancer; Diet and Cancer. The Oncologist* (C. 5). doi:10.1634/theoncologist.5-5-393
- Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K. ve Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(5), 318–348. doi:10.3322/caac.21190
- Xu, X., Y, L. ve ZC, H. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1). doi:10.1042/BSR20180992
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. ve Newmark, H. L. (2001, 28 Kasım). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA . doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.381
- Zhang, L., Ming, L. ve Yu, J. (2007). BH3 mimetics to improve cancer therapy; mechanisms and examples. *Drug Resistance Updates*, 10(6), 207–217. doi:10.1016/j.drug.2007.08.002