

T.C
ŐIFA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ACTIVATION INDUCED DEAMINASE (AID)'IN
PANKREAS KANSERİNDEKİ ROLÜ

Betül Melike OĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hüseyin SARIBAŞAK

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU

2016 - İZMİR

T.C.
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ACTIVATION INDUCED DEAMINASE (AID)'IN
PANKREAS KANSERİNDEKİ ROLÜ

Betül Melike OĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hüseyin SARIBAŞAK

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU

Tez No: 2016 - 513

Bu tez Şifa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 2013 - 13 Proje numarası ile desteklenmiştir

2016 - İZMİR

KABUL VE ONAY

Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

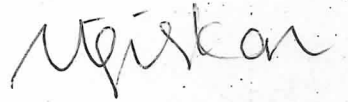
Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Ortak Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/05/2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hüseyin SARIBAŞAK – Şifa Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Uğur TÜRKAN – Gediz Üniversitesi

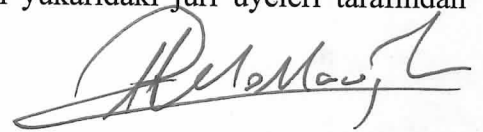


Üye : Yrd. Doç. Dr. Işın KAYA - Şifa Üniversitesi



ONAY :

Bu “**Activation Induced Deaminase (AID)’nin Pankreas Kanserindeki Rolü**” yüksek lisans tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan MOLLAOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanıp son halini aldığı ana kadar beni yalnız bırakmayan, cesaretlendiren ve sınırları aşmanın ötesinde yeni ufuklar kazandıran, her takıldığımda hatalarımla sorularıma büyük bir sabırla cevap veren ve elini üzerimden bir an olsun çekmeyen danışman hocam Sayın , Doç. Dr. Hüseyin SARIBAŞAK'a,

Çalışmalarımda maddi manevi desteğini üzerimden esirgemeyen, yüksek lisansın ilk gününden bu yana yanımdan biran olsun ayrılmayan değerli arkadaşlarım Sümeyye ERTUĞRUL'a,

Son olarak tez çalışmamı en iyi şekilde bitirmemde maddi manevi katkı sağlayan, bilgisinden, tecrübesinden yararlandığım ve bu süreçte en büyük moral kaynağım değerli meslektaşlarım, dost ve hocalarım, Sayın Öğr. Gör. Fatma KARAKUŞ'a, Sayın Öğr. Gör. Yağmur DİLBER'e, Sayın Araş. Gör. Öznur SAYILIR'a, Sayın Şeyda ONAT'a, aileme ve yakın dost çevreme,

Teşekkürü bir borç bilirim...

Bu tez 214S228 proje numarası TÜBİTAK 1001 kapsamında desteklenmektedir.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	iii
Önsöz	iv
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	vii
Şekiller Dizini	viii
Resimler Dizini	ix
Tablolar Dizini	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Pankreas	2
2.1.1. Pankreas Anatomisi ve Histolojisi	2
2.1.2. Pankreas Fizyolojisi	5
2.2. Pankreas Kanseri.....	6
2.2.1. Pankreas Kanserinin Etyolojisi	8
2.2.2. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri	9
2.2.3. Pankreas Kanserinin Belirtileri	10
2.2.4. Pankreas Kanserinde Evreleme.....	11
2.2.5. Pankreas Kanseri Tipleri.....	13
2.2.6. Pankreas Kanserinde Tanısal Görüntüleme	13
2.2.7. Pankreas Kanseri Tedavi Yöntemleri.....	16
2.3. <i>Activation Induced Cytidine Deaminase (AID)</i>	18
2.3.1. Genel Tanım.....	18
2.3.2. AID Ekspresyonu	18
2.3.3. AID'nin Görevleri.....	22
2.3.4. AID İlişkili Hastalıklar.....	22
2.3.5. AID ve Kronik Enflamasyon	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	25

3.1.2. Kullanılan Kitler.....	25
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Aletleri.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Hastalardan Doku Temini	27
3.2.2. RNA İzolasyonu:.....	27
3.2.3. RNA Miktar Tayini	29
3.2.4. cDNA Dönüşümü.....	30
3.2.5. Q-PCR.....	31
3.2.5.1. AID Ekspresyonunun Gösterilmesi.....	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
ÖZET.....	42
ABSTRACT.....	43
KAYNAKLAR	44
EKLER.....	55
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	55
Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	58

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

AID	: Activation Induced Deaminase
C	: Sitozin
cDNA	: Complimentary DNA
CSR	: Class-Switch Rekombinasyon
DNA	: Deoskiribonükleik Asit
HIGM	: Hiper IgM Sendromu
Ig	: Immünoglobülin
IL	: Interlökin
µl	: Mikrolitre
miR (miRNA)	: Mikro RNA
M	: Molar
Ng	: Nanogram
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
Q-PCR	: Quantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SHM	: Somatik Hipermutasyon
TLR	: Toll Like Reseptör
TNF-α	: Tumör Nekroz Faktör – α
TNM	: Tumör Lenf Düğümü Evreleme
U	: Urasil
UNG	: Urasil DNA Glikosilaz

Şekiller Dizini

Şekil 1: Pankreatik asinüs ve kanal sistemi	4
---	---



Resimler Dizini

Resim 1: Pankreas Bezi.....	3
------------------------------------	----------



Tablolar Dizini

Tablo 1: Pankreas kanserinde sempton ve bulguların sıklığı	11
Tablo2: Pankreas kanserinde sempton ve bulguların sıklığı	12
Tablo 3: Qubit deneyi için kullanılan solüsyon miktarları.....	29
Tablo 4: cDNA hazırlama deneyi ve kullanılmış olan solüsyon miktarları	30
Tablo 5: cDNA için termal döngü programı	31
Tablo 6: Q-PCR deneyi için kullanılan solüsyon miktarları	32
Tablo 7: Q-PCR termal döngü programı.....	33
Tablo 8: Hastalara ait RNA konsantrasyonları ve konsantrasyon normalizasyonu..	34
Tablo 9: Hastaların normal bölgeden Beta Actin geni için Q-PCR değerleri.....	35
Tablo 10: Hastaların kanserli bölgeden Beta Actin geni için Q-PCR değerleri.....	37

1. GİRİŞ

Kanser, son yıllarda ölüm oranı hızla artan bir hastalıktır. Geçmişten bugüne kadar ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında 7 - 8. Sıralarda bulunurken bugün Dünya'nın birçok ülkesinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıraya sahiptir (Haydaroğlu 2007). Kanser tedavisinde ölüm oranını azaltmak ve sağkalımı artırmak için birçok farklı tedavi yöntemleri kullanılır. Bu tedavi yöntemleri arasında; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri sayılabilir (Terrero and Li 2004).

Kanser tedavisi için son yıllarda çok sayıda ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen günümüzde ilerlemiş kanser vakalarında tedavi seçenekleri neredeyse yok gibidir. Bu durum, özellikle kanser gelişim sürecinin karmaşık olması ve daha birçok kısmının henüz aydınlatılması ile kısmen açıklanabilir (Aktaş 2010).

Pankreas kanseri, bayanlara nazaran erkeklerde daha sık görülen, ileri yaşlarda daha çok (40-85 yaş) ortaya çıkan, agresif seyreden, ölümcül malign kanserlerden biridir (Wolfgang et al. 2013).

Pankreas kanserinin son yıllarda diğer kanserlere oranla sıklığı giderek artmaktadır. Tüm kanser içinde %2 ve kansere bağlı ölümlerden de %5'ni oluşturmaktadır. Aynı zamanda herhangi bir belirti vermeden seyreden kanser türleri arasında ilk sıralarda bulunmaktadır. Pankreas kanser vakalarının %90'ı adenokanser yapısındadır. Ayrıca, % 10 vakada ailesel eğilim görülmektedir (Göral 2014).

Öncesinde herhangi bir belirti vermediği için çok zor teşhis konulan ve çevresindeki organlara hızla yayılan hastalık, kanserin en ölümcül tiplerinden biridir (Göral 2014).

Diğer kanserlerde olduğu gibi pankreatik kanserde de, kromozomal değişikliklerden nokta mutasyonlarına kadar birçok genetik ve epigenetik değişikliklere neden olduğu bulunmuştur. Bulunan bu heterojenik moleküler değişiklikler, hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açarak kanser olgusunu meydana getirmektedir (Şahin ve ark. 2007).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas

Pankreas, yediğimiz besinlerin parçalanması ve besinlerden alınan enerjinin kullanımını sağlayan midenin arka kısmında bulunan bir salgı bezidir. (<http://www.pankreas.gen.tr/pankreas-kanseri-nedir.html>, Erişim Tarihi: 28 Ocak 2014). Aynı zamanda, vücutta besinlerin kullanılması ve parçalanması sırasında gerekli olan enzim ve hormonların salgılanmasından sorumludur (Edlund 2001).

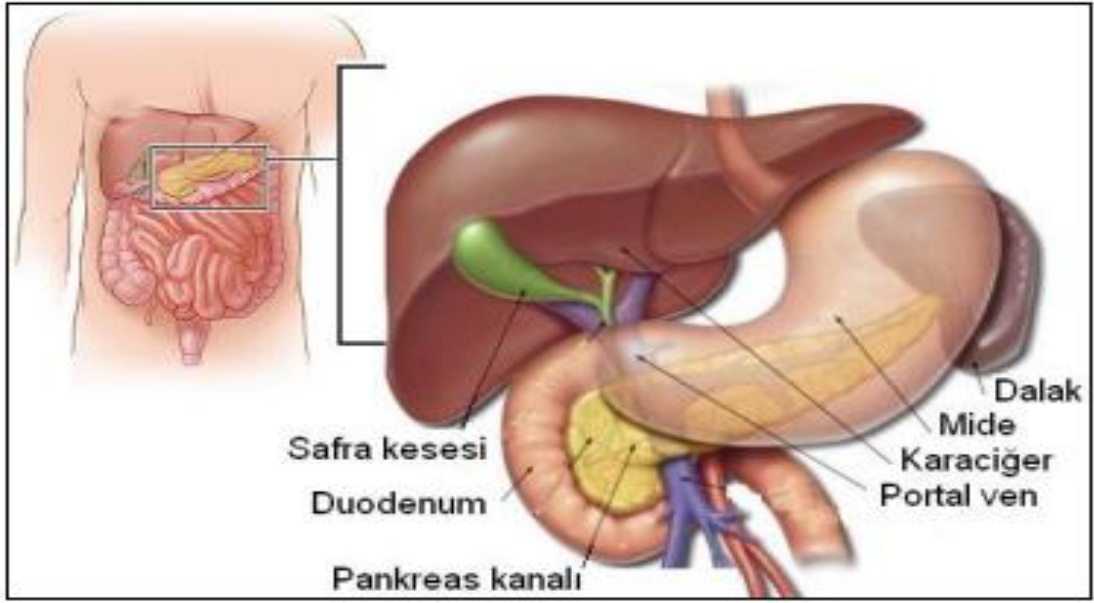
Pankreas, en önemli enzim kaynağıdır. Pankreas özsuğu, buradaki hücrelerin salgılarından meydana gelir. Pankreas midenin hemen arkasında yer alır. Bu organ, yetişkin kişilerde ortalama 18 cm uzunluğunda (2,5-3) cm kalınlığında yaprak şeklindedir. Baş, gövde ve uç olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Baş kısmı duodenum kıvrımı içine sokulmuş şekilde bulunur. Uç kısmı ise dalağa kadar uzanır. Dış salgısı uzun bir kanal boyunca ilerler ve onikiparmak bağırsağına dökülür. Langerhans adacıkları Pankreas içinde bulunan özel hücre kümeleridir. Bu kümeler hormonların salgılandığı yerdir (Semiz 1990).

2.1.1. Pankreas Anatomisi ve Histolojisi

Pankreas Anatomisi

Pankreas, duodenum kıvrımı içine yerleşmiş şekilde, karın boşluğunda, midenin arka kısmında, dalağa kadar uzanmış bir biçimde bulunur. Ortalama uzunluğu 12–15 cm'dir ve yaklaşık 80-120 gram ağırlığındadır (Resim1). (Milli Eğitim Bakanlığı 2011). Pankreas, retroperitona yerleşmiş bir biçimde ince bir periton ile örtülü olarak bulunur. Rengi, sarımtırak ve hafif kırmızı olan bir organdır (Paulsen and Waschke 2010). Pankreas, hem ekzokrin, hem de endokrin salgı yapan karışık bir bezdir. Pankreasın %98'lik kısmı ekzokrin görevi yaparken, kalan %2'lik

kısmı ise endokrin görevi yapar. Salgılamış olduğu sindirim enzimlerini ductus pankreaticus kanalı aracılığı ile duodenuma aktarır. Ayrıca, salgılamış hormonları ise doğrudan kana verir. Langerhans adacıkları, pankreasın endokrin kısmını oluşturur. (MEB 2011). Pankreas kütlesinin %80'i ekzokrin dokusunu, %18'i kanal, damar, sinir ve bağ dokusunu geri kalan %2'si ise endokrin dokudan oluşur (Norton and Mulvihill 1990).



Resim:1 Pankreas Bezi.

Pankreas Histolojisi

Pankreas, dıştan ince gevşek bir bağ dokusu tabakası ile sarıdır. Bu bağ dokusundan çıkan septumlar bez içine ilerleyerek organı belirgin olmayan lobüllere böler. Lobüllerin içinde gevşek bağ dokusundan olan stroma parankimal birimleri çevreler. Lobüllerin arasında fazla miktarda bağ dokusu, büyük kanalları, kan damarlarını ve sinirleri kuşatır. Ayrıca pankreatik kanalı çevreleyen bağ dokusunda kanala boşalan küçük müköz bezler bulunmaktadır.

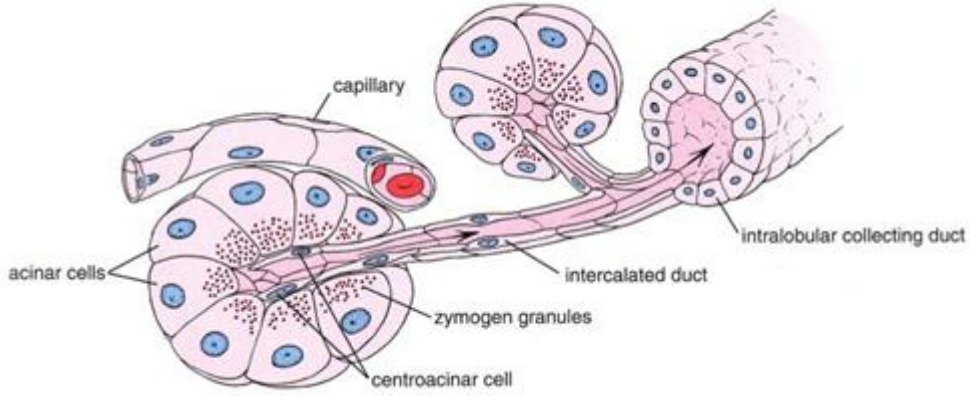
Pankreas hem ekzokrin hem endokrin bir bezdir. Bu iki fonksiyon yapısal olarak farklı iki bölüm tarafından yerine getirilmektedir. Ekzokrin pankreas organ boyunca bulunmaktadır. Ekzokrin pankreasın içinde dağınık halde Langerhans

adacıkları olarak adlandırılan hücre kitleleri bulunmaktadır ve bunlar endokrin pankreası oluştururlar.

Ekzokrin pankreas seröz bir bezdir. Salgı birimleri asiner ya da tübüloasiner şekillidir ve piramidal seröz hücrelerden oluşan tek katlı epitelden oluşmaktadır. Hücreler dar bir serbest yüzeye ve geniş bir bazal yüzeye sahiptirler.

Asinüsün seröz salgı yapan hücreleri, pankreas tarafından salgılanan sindirim enzimi prekürsörlerini üretir. Asinüsün içinde yer alan kanal hücreleri sentroasiner hücreler olarak adlandırılmaktadır. Asinüsten çıkan ilk kanal olan interkalar kanal asinüsün içinde başlamaktadır. Bu kanallar kıvadırlar ve intralobüler toplama kanallarıyla devam ederler. İntralobüler kanalların oluşturduğu kompleks daha geniş olan interlobüler kanallara boşalır. İnterlobüler kanal prizmatik epitel ile döşelidir ve bu epitelde enteroendokrin hücreler ile az sayıda goblet hücreleri bulunur. İnterlobüler kanallar doğrudan ana pankreatik kanala açılırlar (Şekil 1). Ana pankreatik kanal, bez boyunca, bezin uzun eksenine paralel olarak uzanır (Ross and Pawlina 2014).

Endokrin komponenti olan langerhans adacıkları değişik boyutlarda hücre grupları halinde organ boyunca dağılmışlardır. Bu adacıkları oluşturan hücreler adacık içindeki yerleri, boyutları ve salgı veziküllerinin yapılarına bakılarak dört çeşit hücre tipine ayrılmaktadır. Bu hücreler, glukagon üreten A (alfa) hücreleri, insülin salgılayan B (beta) hücreleri, somatostatin meydana gelmesini sağlayan D (delta) hücreleri ve pankreatik polipeptid oluşturan F hücreleridir (Ovalle and Nahirney 2009).



Şekil 1: Pankreatik asinüs ve kanal sistemi

2.1.2. Pankreas Fizyolojisi

Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapabilen bir bezdir. Sindirim enzimlerinin yapım ve salgılanmasından sorumlu olan asini bölümü pankreasın büyük bir kısmını kapsar. Pankreasın diğer bölümü ise, Langerhans adacıkları adı verilen endokrin hücre gruplarından oluşur. Bu kısım, vücudun glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan insülin ve glukagonun salgılandığı yerdir (Guyton and Hall 2011).

İncebaşağın üst kısmında bulunan kimusun uyarısı, pankreastan sindirim sıvısı salgılanmasını sağlar. Bu salgının kalitesini, kimusta bulunan besin maddelerinin tipi belirler. Buradan salgılanan proteolitik enzimler; tripsin, kemotripsin, karboksipeptidaz, elastazdır. Buradaki enzimler; inaktif tripsinojen, kemotripsinojen, prokarboksipeptidaz ve proelastaz olarak salgılanırlar. Tripsin inhibitörü, Enzimlerin barsağa dökülene kadar inaktif halde bulunmasını sağlar. Proteolitik enzimleri salgılayabilen hücreler tripsin inhibitörünü de salgılar. Değişik bir nedenden dolayı pankreas zarara uğrarsa bezden ve kanallardan dışarı çıkan tripsin aktive edilebilir ve az zamanda pankreas dokusu tamamen tahrip edilir (Guyton and Hall 2011).

Pankreas salgısının regülasyonu 2 farklı şekilde olur. Bunlar; hem sinirsel hem de hormonal yol ile. Sinirsel yol; pankreasın mide sekresyonunun sefalik ve gastrik fazı ortaya çıktığı anda vagus yolu ile uyarılır. Hormonal yol ise; sekretin ve kolesistokinin aracılığı ile başlar. Bu enzimler, besinlerin incebaşağa geçişi sırasında

oluşan intestinal duvar gerilmesi ile salgılanır. Sekretin hormonu pankreastan çok miktarda bikarbonat ve su salgılamak üzere kolesistokin sindirim enzimleri salgılar. Bu durum, pankreas salgılama bağırsak evresini temsil eder (Norton and Mulvihill 1990, Guyton and Hall 2011).

Pankreasın bir diğer önemli görevi; kan şekeri seviyesinin düzenlenmesini sağlar. Bunuda, glukagon salgılayan alfa hücreleri, insülin salgılayan beta hücreleri ve somatostatin salgılayan delta hücreleri ile yaparlar. (Norton and Mulvihill 1990, Guyton and Hall 2011).

2.2. Pankreas Kanseri

Kanser, bazı etkiler yüzünden değişime uğramış hücrelerin, kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan hastalıklar grubu olarak ifade edilir. Kanser, tüm dünyada özellikle de gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilir (Uçar 2010). Pankreas kanserinde de diğer kanserlere oranla görülme sıklığında belirgin bir artış vardır (Jemal et al. 2010) Pankreas kanseri dünyada görülme sıklığı bakımından 9. Sıradadır (www.iacr.com.fr, Erişim Tarih: 23 Mart 2016) ve ölüm oranı % 95 ile en yüksek kanser türüdür (Jemal et al. 2002). Dünya’da kansere bağlı ölüm sıralamasında da 4. Sırada bulunmaktadır (Jemal et al. 2008).

Yüksek ölüm oranı, risk faktörlerinin yeterince anlaşılır olmamasından dolayı ortaya çıkmaktadır (Silverman et al. 1999). Pankreas kanserinin 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %20-25 oranındadır (Chang 2009). Pankreatik kanser tanısı, Amerika’da her yıl yaklaşık 30.000 kişiye konulmuştur. Aynı oranda pankreatik kanserden ölüm gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tamada et al. 2005).

Ülkemizde ise; T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2009 yılı verilerine göre; pankreas kanserinin erkeklerde görülme sıklığı bakımında 9. Bayanlarda ise 14. Sırada olduğudur. Ancak pankreas kanserinin ölüm oranı her ne kadar diğer kanser türlerine göre düşük olsa da kansere yakalandıktan sonra 5 yıllık sağ kalım oranı en düşük olan kanser türüdür. Bu yönüyle pankreas kanseri tüm

kanserler arasında **en ölümcül** olanıdır. Buda bu kanserin **prognoz ve diagnoznun** yapılan çalışmalara rağmen hala düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2013) yılında yaşa standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde 267,9 kadınlarda ise 186,5'dir (100000 kişide). 2013 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde her yıl 103.070 erkek ve 71.233 kadının kansere yakalandığı tahmin edilmektedir.

Pankreas kanserine yakalananlarda ilaçla tedavi ve cerrahi sonrası müdahale sık olarak görülür. Fakat hastalığın ilerlemesi, hastaların %80'de cerrahi sonrasında ilk bir yıl içinde ortaya çıkar (Mu et al. 2004, Shibata et al. 2005).

Pankreas kanserlerinin yerleri farklılık göstermektedir. Bunların %60-70'i pankreas başında, %15-20'si pankreasın gövdesinde ve %5-10'u da pankreasın kuyruğunda bulunur. Pankreas kanserinin %16-30'unda çok odaklı bir şekildedir (Sarmiento et al. 2001).

Pankreas kanseri, komşu organlara, lenfatik ve vasküler kanallardan uzak alanlara kadar yayılım göstererek yaygın bir biçimde metastaz yapar. (Cubilla and Fitzgerald 1975). Yapılan araştırmalarda pankreas kanseri gelişimindeki genetik etkenlerin etkili olduğu gösterilmiştir. Bu hastaların %10'unda ailesel olarak pankreas kanserine eğilim bulunmuştur (Lakatos and Tulassay 2010).

Dünya Kanser Örgütü (International Union Against Cancer-UICC) eski başkanı Dr. Franco Cavalli (2007)' de yaklaşık 7,9 milyon kişi, farklı birçok kanser türlerine bağlı hastalıklardan yaşamını yitirmiştir. 2008 Yılı Dünya Kanser Kongresi'nde sunulan veriler ise; hastalığın küresel olarak büyük boyutlara ulaştığını ortaya koymuştur;

1. Yaklaşık 11 milyon kişide her yıl kanser vakası ortaya çıkmaktadır.
2. Gelişmemiş veya az gelişmiş ülkelerde kanserden ölenlerin oranı %80' dir.
3. 2030 yılına kadar 12 milyon insanın kanserden öleceği tahmin edilmektedir. (www. Tuba. Gov. Tr /. Erişim tarihi: 17 Kasım 2008).

2.2.1. Pankreas Kanserinin Etiyolojisi

Pankreas kanseri, kanser ile ilişkili genlerde (onkogenler, tümör süpresör genler, hücre siklus genleri, apoptozis ve genom bakım genleri) ortaya çıkmaktadır. Herediter germline veya akkiz somatik mutasyonlar ile oluşur. Aynı zamanda mutasyonlar, kanserin ilerlemesine ve yayılmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, hücrede eksilme, telomerazın kısılması ve genomik dengesizlik, pankreas epitel hücrelerinin pankreas kanserine ilerlemesinde önemli bir role sahiptir (Gnoni et al. 2013).

Pankreas kanseri araştırma sonuçlarına göre, pankreas kanserine yakalanmış hastalarda, otozomal dominant kalıtım kalıbına uyumlu kalıtsal bir riskin varlığından (%10) bahsedilmektedir. Pankreatik kanser tanısı konulmuş olan kişilerin birinci dereceden akrabalarında pankreatik kanser riski artış göstermektedir. Aynı aile içerisinde iki pankreatik kanserli hasta bulunması durumunda birinci dereceden akrabalarda pankreatik kanser riski 18 kat, eğer 3 birey varsa 57 kat artış olduğu belirtilmektedir (Adler 2004).

Pankreas kanserine ilişkin belirlenmiş birçok risk faktörleri arasında, ileri yaş, Afrikalı Amerikan ırkı, düşük sosyoekonomik durum gösterilebilir (Lowenfel and Maisonneuve 2006). Bu kansere yönelik birçok araştırma; sigara içiminin bireylerde tespit edilen en önemli risk faktörü olduğunu göstermektedir. Sigara içen kişilerde risk, içmeyenlere oranla 2 kat daha fazladır (Pancreatic 2015, Özkan 2002).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, yüksek vücut kitle indeksi, uzun boy ve düşük düzeyde fiziksel aktiviteye sahip kişilerde pankreas kanser riskini arttığı yönündedir (Michaud 2001).

Pankreas kanseri diğer kanser türlerine göre daha zor teşhis edilen bir hastalıktır. Bu kansere yakalanan kişilerde teşhis, çok sık hastaneye giden veya sıklıkla sağlık kontrolü yaptırmasıyla doktorun o anda şüphe etmesi ve belirli testler yapması sonucunda ortaya çıkar. Aksi halde, yeni oluşum gösterdiyse veya hastalık ilk evrelerdeyse tanı konulması oldukça zordur. Pankreas kanseri tanısı radyolojik incelemeler ve kan tahlillerinden elde edilen kötü sonuçlar doğrultusunda tespit edilir. Pankreas kanseri tümörlerinin metastaz yapması ve büyümesine bağlı olarak 4 ayrı evresi bulunmaktadır. Kanser tanısı, eğer ilk evrede ortaya çıkmışsa diğer

evrelere oranla tedavisi daha kolay olur (<http://www.pankreas.gen.tr/>, Erişim Tarihi: 28 Ocak 2014).

Pankreas kanserine yönelik çalışmalar, hem hücre düzeyinde hem de hayvan modellerinde belirlenen genetik ve epigenetik değişiklikler göz önüne alınarak yoğun bir biçimde yapılmaktadır. Bu konuda geliştirilen ve dokuya zu hedeflenen bir genin kesip çıkarılmasını (knock out) sağlayan fare modelleri, pankreatik kanserin oluşumu ve ilerleyişi hakkında çok önemli bilgiler ortaya koymaktadır. Pankreatik kanserin erken teşhisi ve tedavisi için, pankreatik kanserin başlangıcında ve ilerleyişinde rol oynayan moleküler değişikliklerin ve fonksiyonlarının tanımlanması önemli hedefler arasında bulunmaktadır (şahin ve ark. 2007).

Pankreas kanserinde son yıllardaki teknolojidaki hızlı gelişmeye rağmen erken teşhiş ve tarama amaçlı hiçbir hassas ve spesifik serum markeri keşfedilememiştir. Ameliyat edilebilir pankreas kanserli hastalarda genellikle çoklu tedavi yaklaşımları tercih edilir. Hastalara operasyon, kemoterapi, radyoterapi ve kemoradyoterapi tedavi kombinasyonları uygulanabilir. Fakat, tüm tedavi seçeneklerine rağmen pankreas kanserinde sağkalım oranları yeterli sonuçlara ulaşmamıştır (Uğur ve ark. 2010).

2.2.2. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri

Araştırmacılar tarafından pankreas kanseri etiyolojisi tam olarak bilinmese de bazı risk faktörleri belirlenmiştir. Bunlar (Perek 2002):

- ✓ **Sigara:** Pankreas kanseri bulgularının %30'unun sigara içimi ile kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Sigara içimi pankreas kanseri olma riski olmayanlara göre 2 kat daha fazla risk taşımaktadır. Sigara içen kişilerde 'fingerprint' yöntemi ile, sigara içmeyenlere göre daha fazla mutasyon saptanmıştır (Gral 2014).
- ✓ **Cinsiyet:** Pankreas kanserine yakalanma riski erkeklerde bayanlara oranla daha fazladır.
- ✓ **Yaş:** 50 yaşından sonra risk artar.
- ✓ **Diyet:** Diyet ve eksersiz hakkında kesin bir bilgi yoktur fakat, meyve, sebze ve lifli besin tüketiminin riski azaltığı et ve yağlı ürünlerin ise arttırdığı

düşünülmektedir. Eskiden kahve alınımının riski arttığı söylenmişse de şimdi ki kaynaklar bunu doğrular nitelikte değildir.

- ✓ **Alkol kullanımı:** pankreas kanserinden alkolün direk sorumlu olması çok düşük bir ihtimaldir fakat, alkole bağlı kronik pankreatit oluşmuş bir pankreastan adenokarsinom gelişebilir (Kelly et al. 2004).
- ✓ **Endüstriyel ve kimyasal maruziyet:** Benzin, ağır katkı maddeli kokular ve böcek ilaçlarının pankreas kanseri riskini arttırmış olduğuna dair kanıtlar vardır.
- ✓ **Aile anamnezi:** Pankreas kanseri gelişimi %5-10 arasında genetik yapıdan etkilenmektedir. Kronik pankreatitin (pankresta şişme) ailesel formu olan kişilerde hayatları boyunca pankreas kanseri gelişme riski %40 ila 75 oranında değişiklik gösterir.
- ✓ **Predispozan (Yatkınlaştıran) hastalıklar:**
 - a) **Diyabet:** Bu hastalarda pankreas kanser riskinin daha fazla olduğu bulunmuştur.
 - b) **Kronik pankreatit:** Kronik pankreatit, pankreas kanseri riskini, kronik pankreatit olmayanlara oranla, 2.71 kat daha fazla artırmaktadır (Göral 2014). Ayrıca, ince barsak ve ülser kanamalarına yönelik daha önceki mide operasyonları sonrasında da pankreas kanser oluşum riski artar (Perek 2002).

2.2.3. Pankreas Kanserinin Belirtileri

Pankreas kanseri, kanser ile ilişkili genlerde (onkogenler, tü- mör süpresör genler, hücre siklus genleri, apoptozis ve genom bakım genleri) herediter germline veya akkiz somatik mutasyonlar ile oluşmakta, mutasyonlar aynı zamanda kanser progresyonuna ve metastaza neden olmaktadır. Ayrıca, hücre turnoveri, telomerazda kısalma ve genomik instabilite, pankreas epitel hücrelerinin pankreas kanserine ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Gnoni et al. 2013, Hezel et al. 2006, Wood 2013, Fang et al. 2013, Avila and Kissil 2013, Jamieson 2012).

Tablo 1: Pankreas kanserinde sempton ve bulguların sıklığı

SEMPТОMLAR – BULGULAR	%
• Kilo kaybı	92
• Sarılık	82
• Ağrı	72
• İştahsızlık	64
• Koyu idar	63
• Açık renkli gaita	62
• Bulantı	45
• Kusma	37
• Halsizlik	35
• Kaşıntı	24
• Diabetes Mellitus	15
• Palpabl karaciğer	83
• Hepatomegali	65
• Palpabl safra kesesi	29
• Asit	14
• Karında kile	13

2.2.4. Pankreas Kanserinde Evreleme

Araştırmacılar tarafından Pankreatik kanser için son 15 yılda iki evreleme sistemi geliştirilmiştir. *Japanese Pancreas Society evreleme sistemi* Japon hastalar için kullanılan bir evreleme sistemidir. Bu sistem pankreasa komşu dokuların tutulmasını değerlendirilmeisnde ve 21 lokal tümör büyümesini gözlemlemekte kullanılır. Ancak karmaşık bir sistemdir ve batı ülkelerinde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Batı ülkelerinde ise, kolay uygulanabilen *TNM evreleme sistemi* kullanılmıştır. Bu sistem primer tümörün büyüklüğüne (T) , bölgesel lenf nodlarının durumuna (N) ve metastatik hastalık (M) varlığına göre adlandırılmaktadır. Aynı zamanda bu sistem, lenf nodu metastazını en önemli belirleyici olarak ele almaktadır. Pankreas dışı adenokarsinomlar için TNM sınıflaması benzer ifadelerle sahiptir. Ayrıca, Pankreas tümörünün durumuna göre, R0 –rezeksiyon artık tümörün olmaması, R1- rezeksiyon mikroskobik artık tümör kalması, R2- rezeksiyon ise makroskobik artık tümörün kalması olarak tanımlanır (Baytekin 2005).

Tablo 2: Pankreatik Karsinom için TNM Evrelemesi (Baytekin 2005).

	Evre	Derecelendirme
Primer Tümör (T)	TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
	T0	Primer tümör ile ilgili bulgu yok
	Tis	İn situ karsinom
	T1	Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm' den küçük
	T2	Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm' den büyük
	T3	Tümör direkt olarak doudenum, safra kanalı veya peripankreatik dokulara yayılmış
Bölgesel lenf nodları (N)	T4	Tümör direkt olarak mide, dalak, kolon veya komşu kan damarlarına yayılmış.
	NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
	N0	Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok
	N1	Bölgesel lenf nodu metastazı
	pN1a	Tek bir bölgesel lenf noduna metastaz
Uzak metastaz (M)	pN1b	Multipl bölgesel lenf noduna metastaz
	MX	Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor
	M0	Uzak metastaz yok
	M1	Uzak metastaz (13).

Pankreas kanserinde TNM sınıflaması

Stage I: Tümör pankreas sınırları dışına çıkmamış lenf nodülü metastazı yoktur.

Stage II: Tümör pankreas dışındaki yakın komşu dokulara taşmıştır fakat lenf nodülü metastazı yoktur.

Stage III: Lenf nodu metastazı (+).

Stage IV: Uzak mesefali metastaz var.

Detaylı bir değerlendirmeyi, pozitif rezeksiyon sınırlarının fazlalığından ve lokal tümör nüksü insidensinin yüksekliğinden anlamak kolaydır. Eğer geride tümör dokusu kalmışsa rezeksiyonun hiçbir anlamı olmaz (Perek 2002).

2.2.5. Pankreas Kanseri Tipleri

Pankreas tümörleri, WHO (Dünya sağlık örgütü) tarafından (2000) yılında yeniden düzenlenmiştir. Bu tümörler ilk olarak primer ve sekonder tümörler daha sonra da ekzokrin ve endokrin tümörler olarak ikiye ayrılır. Tüm pankreas karsinomlarının %80'inini Pankreas duktal adenokarsinomu meydana getirir. Duktal adenokarsinomların seyrek görülen diğer çeşitleri; müsinöz non-kistik karsinom (%1-3), adenoskuamöz karsinom (%3-4) ve indiferansiye (anaplastik) karsinom (%2-7)'dur. Bu sonuçlara bakarak, pankreatik tümörlerin %90'lık kısmını duktal adenokarsinom ve çeşitleri oluşturmaktadır. Pankreasın diğer tümörlerinin görülme sıklığı %8-10 arasında değişmektedir. Bunlar, seröz kistadenom %1, müsinöz kistik tümör %2, intraduktal papiller müsinöz tümör %1, pankreatoblastom %0.5'ten az, solid-psödopapiller tümör %1 ve endokrin tümörler %2'lerdir. (www.iacr.com.fr, Erişim Tarih: 23 Mart 2016). Bundan dolayı pankreas kanseri denilince ilk akla gelen pankreasın duktal adenokarsinomu (PDAK) anlaşılır ve diğer periampuller tümörler (koledok alt uç, papilla vateri ve duodenumun papillaya komşu tümörleri) ve pankreasın kistik tümörleri bu konudan hariç tutulur. Çünkü bu tümörler davranış biçimleri, tedavi tarzları ve prognozları itibariyle diğerlerinden farklılık gösterir (Perek 2002).

2.2.6. Pankreas Kanserinde Tanısal Görüntüleme

- Endoskopik ultrasonografi (EUS): primer tip kanserlerin görüntülenebildiği ve ince iğne aspirasyon biyopsisine imkan sağlayan bir yöntemdir. Bilgisayarlı tomografi ile gösterilemeyen pankreastaki kitle, EUS ile mide ve duodenum duvarı vasıtasıyla, görüntülenebilmektedir. Histolojik açıdan tanı imkanı, %91 duyarlılık ve %100 özgünlük sağlar (Dewitt et al. 2006).
- Bilgisayarlı tomografi (BT): Pankreas kanserinin tanısal olarak görüntüleme teknikleri içinde, bilgisayarlı tomografi (BT) en sık kullanılanıdır. Arteriyel, portal venöz ve parankim fazlarında, hızlı ve ince kesitler alınarak yapılan intravenöz kontrastlı multifazik BT, pankreas kanserinin tanısal olarak

değerlendirilmesinde büyük öneme sahiptir. Bu teknik sayesinde, süperior mezenterik arter (SMA), çölyak aks, süperior mezenterik ven/ portal ven (SMV-PV) kompleksi ve komşu yapılar, uzak metastaz olup olmadığı açık bir şekilde bakılabilir (Tamm et al. 2003). Ayrıca, bilgisayarlı tomografi sonuçlarına göre, pankreasın C, V, L biçimlerini alabildiği görülmüştür. (Edlund 2001).

- Magnetik Rezonans Kolanjiyopankreatografi (MRCP): Magnetik Rezonans Kolanjiyopankreatografi (MRCP), diğer radyolojik tetkiklere ek olarak çok yararlı bir tekniktir. Bu teknik; Pankreatikobiliyer ağacın, karaciğer parankiminin ve vasküler yapıların üç boyutlu görüntülenmesini sağlar. MRCP, biliyer ağacın ve pankreatik kanalın anatomisini gösterme bakımından, BT tekniğinden çok daha yararlıdır. Safra kanallarındaki tıkanıklığın hem proksimalini hem de distalini çok iyi bir şekilde gösterebilir ve aynı zamanda intrahepatik kitledeki doku bozukluğunu saptayabilir. Pankreas kanserinin tanısında, en azından, Endoskopik Retrograd Kolanjiyopankreatografi (ERCP) kadar hassaslık sağlayabilir (Ademek et al. 2000).
- Endoskopik Retrograd Kolanjiopankreatografi (ERCP): Pankreatit, kanama ve perforasyon, ERCP ile alakalı çok ciddi komplikasyonlardır ve ERCP' nin pankreas kanserini teşhis etmesinde kısıtlamalar getirir. Bundan dolayı ERCP, endoskopik stent gereksinimi olan kişilerde, stabil olarak gerçekleşen tedaviler sırasında şüpheli bulgu tespit edilen kişilerde ya da doku teşhisi gerekli hastalarda uygulanmalıdır (Royal et al. 2008).
- PET (pozitron emisyon tomografisi) taraması: Pozitron emisyon tomografisi, dokuların perfüzyonunu, metabolik aktivitesini ve canlılığını (viabilite) yansıtan non-invaziv bir görüntüleme yöntemidir. Pozitron salıcısı olarak kullanılan radyonüklidlerin üretildiği aygıtı siklotron, görüntüleme yapılan aygıtı ise PET tarayıcısı (PET Scanner) adı verilmektedir. PET görüntüleme için kullanılan radyofarmasötik ve radyonüklidlerin en önemli özelliği vücudun temel altyapı taşları olan karbon (C), oksijen (O₂), flor (F), azot (N₂) gibi elementleri içermeleri ve vücutta biyolojik olarak bu moleküller gibi davranmalarıdır. Pozitron emisyon tomografisinin çeşitli

hastalıklar hakkında anatomik (yapısal) bilgi sağlayan radyolojik görüntüleme yöntemlerinden (direkt radyografiler, bilgisayarlı tomografi, anjiyografi gibi) en önemli farkı fonksiyonel bir görüntüleme yöntemi olmasıdır. Pozitron emisyon tomografisi diğer nükleer tıp yöntemleri gibi ‘emisyona’ tekniğine dayalı bir görüntüleme sistemidir. Emisyon görüntülemede hastaya verilen bir radyonüklid veya radyofarmasötikten yayılan gama ışınları dışarıdan saptanarak vücut içindeki dağılımları ölçülür veya görüntüye çevrilir (Sönmezoğlu 2001).

- İnce iğne aspirasyonu (İİA): Bu yöntem, 0.7 mm’ den daha küçük çaplı iğnelerle hedef kitledeki hücreleri ya da çok küçük doku parçalarını yerlerinden çıkarıp, iğne lümeninin ve iğnenin enjektörle birleştiği şeffaf bölümünün (hub) içine almaya dayalı bir yöntemdir. İİAB, ucuz, kolay ve her ortamda uygulanabilir (Polat ve ark. 2013).
- Anjiyografi: BT ile rezektabilitenin şüpheli olduğu durumlarda, daha önce ayrı bölgeden ameliyat geçirmiş olanlarda, damarların durumu hakkında çok daha sağlıklı bilgi edinilmek istenen kritik sağlıklı hastalarda, damar rezeksiyonu düşünülüyorsa buna hazırlık aşamında rutin olarak uygulanmaktadır (Perek 2002).
- Endoskopi Laparoskopi (EL): Laparoskopik, cerrahide son zamanlarda geniş kabul gören bir yöntemdir (Salman ve ark. 2005). EL’nin standart görüntüleme cihazlarıyla görülemeyen doku hasarlarını tespit etmedeki başarısını bildiren çalışmalar mevcuttur. EL’nin pankreas kanserlerinde rutin olarak yapılan bilgisayarlı tomografinin görüntüleyemediği doku hasarlarının (1 cm’den küçük) tespit edilmesinde ve bu lezyonlardan biyopsi alınmasında sağladığı faydalar tekniğin en önemli özellikleri arasındadır. Birkaç milimetrelik doku hasarlarından dahi biyopsi yapılabilmesi bu yöntemin en önemli avantajlarından biridir (Salman ve ark. 2005).

2.2.7. Pankreas Kanseri Tedavi Yöntemleri

Pankreas kanser tedavisinde, hastalığın evresine ve sağlık durumuna göre tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Temelde 3 farklı tedavi yöntemi vardır. Bunlar; cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyasyon tedavi yöntemidir. Hastalık çok fazla ilerleyiş göstermediyse ve tümörler alınabilecek bir durumdaysa tümör alınarak cerrahi tedavi yöntemi uygulanabilir. Kemoterapi, hastaya damardan kan dolaşımı ile kan verilerek kanserli hücrelerin öldürülmesini hedefleyen tedavi yöntemidir. Kemoterapi, hastalığın ileri evresi için uygulanır. Radyoterapi yöntemi ise, X ışınları veya yüksek enerjiye sahip ışınlar kullanarak tümörlerin ölmesini hedefler (<http://www.pankreas.gen.tr/>, Erişim Tarihi: 28 Ocak 2014).

1. Cerrahi Dışı Müdahaleler: Öncelikle fiziksel muayene sonrasında laboratuvar ve radyolojik incelemelerle, pankreas tümörünün hangi evrede olduğu ve komşu organlarla ilişkisinin hangi durumda bulunduğu ve özellikle komşu damarlara invazyonunun olup olmadığı anlaşılmaya çalışılır (Güneyi 2005).

İleri evredeki tümörlerde herhangi bir cerrahi işlem uygulanmaz. Bu kişilere ömrünü bir süre daha uzatabilmek ve ıstıbabını dindirmek için bazı tedaviler uygulanır. Bu kişilere uygulanacak kemoterapi ile birlikte, beslenme desteğinin sağlanması, mevcut sarılığının düzeltilmesi, ağrı eşik değerinin azaltılması ve diğer sağlık kalitesinin düzeltilmesi hedeflenerek bazı girişimler uygulanmaktadır. Bunlar;

- ERCP (endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi) yapılarak safra yoluna stent takılması,
- PTK (Perkütan Transhepatik Kolanjiografi) yapılarak safranın dışarı akıtılmasının sağlanması,
- Devamlı olarak analjezinin sağlanması için kateter takılarak Ağrının azaltılması,
- Tıkanıklığa yol açan Oniki parmak barsağındaki tümörlerde, bu kısma stent takılması (Güneyi 2005).

2. Kemoterapi: Genel olarak kemoterapötik ajanların kullanımının, seçilmiş olaylarda cevap düzeyini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak, herhangi bir kemoterapötik ajanın ölüm oranındaki azalmayı olumlu etkilediği

gösterilememiştir. Kemoterapi ve radyoterapinin birlikte kullanımının tedavi etmek amaçlı yapılan rezeksiyon sonrası ölüm oranını azalttığı belirlenmiştir (Güneyi 2005).

3. Radyasyon Tedavisi: Radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları bu zamana kadar istenildiği gibi sonuçlar vermemiştir. Bundan başka, kısa zamanda büyüyen tümör safra yolunu tıkayıp karaciğeri devre dışı bırakır. Alınan besinlerin karaciğerde sentezi yapıldıktan sonra oniki parmak barsağına gönderildiği noktada tıkanma olduğunda karaciğer ve safra kesesi devre dışı kalıp, bilirubin kana geçmektedir. Sonrasında kanın yapısı bozularak beyinsel ve tüm organsal faaliyetlerde aksamalar meydana gelir. Aynı zamanda, tüm deri rengini de sarı renge boyamaktadır. Bunun sonucunda hastalarda zaman kazanmak ve safra yollarının sindirim kanallarına boşalmasını sağlamak için ameliyatla drenaj açılmaktadır. Maalesef ki buda bir çözüm sağlamamaktadır (Güneyi 2005).
4. Cerrahi Tedavi: Pankreas başında veya uncinat prostedede lokalize olmuş pankreas kanserinin standart operasyonu pankreatikoduodenektomi, diğer adıyla Whipple'dır. Bu operasyonla, pankreas başı, duodenum, jejunumun ilk 15 cm.si, ortak safra kanalı ve safra kesesi alınabilir. Kısmi gastrektomi de uygulanabilir. Deneyimli kişilerce yapılan standart Whipple yöntemiyle, tam rezeksiyon yapılmış hastalarda 5-yıllık sağkalım %10-30 ve mortalite oranı ise %2'den az olduğu gözlemlenmiştir. Whipple yöntemiyle veya distal pankreatektomiyle herhangi bir sonuç elde edilemediği durumlarda, total pankreatektomi uygulanır. Doku hasarının kesip çıkartılabilir olduğu düşünülen çok az sayıda hastada total pankreatektomiye geresinim duyulur. Pankreasın gövde ve kuyruk kısmında yerleşim gösteren tümörlerinde cerrahi rezeksiyon, distal subtotal pankreatektomi yöntemi uygulanır. Bu rezeksiyona çoğunlukla splenektomi de ilave edilir (Adsay et al. 2007).
5. İmmünoterapi: Pankreatik kanser için uygulanmak istenen diğer bir tedavi yaklaşımı immünoterapidir; fakat, pankreatik kanserinin az bir immünolojik cevaba sahip olması ve tümör antijenlerinin kesin olarak saptanamaması, tedavi protokollerinin uygulanmasını güçleştirmektedir. İmmünotedavi, antikor temelli ve kanser aşısı üretimi şeklinde yapılmaya çalışılmış fakat henüz

bugüne kadar kliniğe yansımamıştır. İmmün tedavide başarılı sağlayacak temel araştırma konularının en başında, pankreatik kansere özgü tümör antijenlerinin belirlenmesi yer almaktadır (Şahin ve ark. 2007).

Teknolojideki hızlı gelişim hızına karşın erken teşhis ve tarama amaçlı hiçbir hassas ve spesifik serum markeri bulunamamıştır. Ameliyat edilebilir pankreas kanserli hastalarda genel olarak çoklu tedavi yaklaşımları denir. Operasyon, kemoterapi, radyoterapi ve kemoradyoterapi ortak tedavileri uygulanır. Fakat, tüm tedavi yaklaşımlarına karşın pankreas kanserinde ölüm oranında azalma kesin olarak sağlanamamıştır (Perek 2002).

2.3. Activation Induced Cytidine Deaminase (AID)

2.3.1. Genel Tanım

Activation-induced cytidine deaminase (AID), DNA ve RNA'nın bir editör gibi davranan sitidin-deaminaz ailesinin bir üyesidir. Aynı zamanda 198 amino asitli bir proteindir (Zang and Casali 2013). İmmünglobulin genlerde, somatik hipermutasyon ve class-switch rekombinasyon için gerekli bir enzimdir (Matsumoto et al. 2007). Ayrıca AID, B hücrelerinde gerçekleşen antikorların farklı ve olgun olmasını sağlayan somatik hipermutasyon (SHM) ve class-switch rekombinasyon (CSR) adlı mekanizmalar için gerekli bir protein olarak keşfedilmiştir (Muramatsu et al. 2000). Bu mekanizmalarda AID, B hücrelerinin immunoglobulin (Ig) genlerinde bulunan sitozinleri urasillere çevirmektedir (Maul et al. 2011). Bu sitidin ve sitidin deaminazlar bir APOBEC ailesinin diğer üyeleri ile korunmuş bir katalitik etki paylaşır. Bu ailenin üyeleri, C-to-U düzenleme enzimleridir (Zang and Casali 2013).

2.3.2. AID Ekspresyonu

AID ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu proteinin B hücrelerinin immunoglobulin (Ig) genlerinde bulunan sitozinleri urasillere çevirdikten sonra bu urasiller normalin aksine farklı şekillerde tamir edilerek error-prone polimerase'ler

etkisi ile ardında mutasyonlar bıraktığı görülmüştür. Sonraki safhada ise non-stop kodon gibi anlamsız mutasyon ile neticelenen antikora sahip olan B hücreleri elenerek geriye yabancı antijenlere özgü antikora sahip olan B hücrelerinin bulunduğu gözlemlenmiştir. Tamir mekanizmalarına bağlı olarak bu urasiller eğer V bölgelerinde olmuşsa SHM'leri, C bölgelerinde olmuşsa CSR'ler ile sonuçlanmaktadır. SHM afinite olgunlaşması için gerekli iken CSR başlangıçta IgM olan immüoglobulinlerden patojenik duruma göre IgA, IgE veya IgE sentezini mümkün kılar. AID'nin mekanik olarak birbirinden farklı her iki sisteminde başlangıç safhasına olan bu büyük etkisi daha önce hiç tahmin edilememiştir çünkü her iki mekanizma farklı yollarla olmaktadır. Mesela SHM'de rastgele nokta mutasyonları varken, CSR'da DNA çift sarmal kırıkları olduğu görülmüştür (Fugmann et al. 2002). AID ile ilgili daha sonraki araştırmalar bu proteinin daha farklı yönlerini de ortaya koymuştur. DNA'da urasilleri tamir ile görevli mekanizmalar olan Base Excision Repair ve Mismatch Repair'i knockout edilmiş farelerde AID'nin sadece Ig bölgelerinde değil esasında B hücresi genomunun birçok bölgesinde nokta mutasyonlarına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır (Liu et al. 2008). Sonrasında ise AID'nin global olarak DNA'da çift sarmal kırıklarına yol açtığı iki farklı çalışmada gösterilmiştir (Hasham et al. 2010). Öbür taraftan klinik olarak AID'nin B hücreleri ve prekürsör hücre malinitelerinden lenfoma ve myeloma'da da aktive edildiği yakın zamanda keşfedildi (Koduru et al. 2012).

AID'nin DNA'da mutasyon oluşturarak değişik patolojik sonuçlar doğurabileceği düşüncesiyle farelerde overexpresse edilmiştir. Sonrasında da akciğer, mide ve karaciğer gibi birçok organda tümör oluşumuna katkıda bulunabileceği görülmüştür (Okazaki et al. 2003). Bu sonuçlar ve B hücrelerindeki diğer sonuçlar araştırmacıları AID'nin hangi transkripsiyon faktörler sayesinde aktive olduğu sorusuna yöneltmiştir ve AID geninin değişik bölgelerinde NF-kB, Stat6 ve Smad4/5 transkripsiyon faktörleri için bağlanma yerleri olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda, deneysel olarak da bu bölgelerin AID'nin ekspresyonu için önemli olduğu bulunmuştur (Pone et al. 2012, Endo et al. 2007). Yapılan çalışmalarda transjenik farelerde AID yapısal ifadesi yüksek mutasyon frekansı ile ilişkili olarak çeşitli organlarda tümör gelişimini indüklediği anlaşılmıştır (Matsumoto 2007).

Ayrıca birçok çalışma da insan lenfoid malignitelerin de AID kodlayan genin kopyalarının ifadesi gösterilmiştir (Matsumoto 2007).

NF-kB'nin kronik enflamasyonlar ve bu enflamasyon neticesi oluşan kanserlerde normalden daha fazla sentezlendiği bilindiğinden, Matsumoto ve arkadaşları bu NF-kB'nin normal zamanlarda gastrik epitel dokularda ekspresse olmayan AID'nin ekspresse olmasını sağlayıp sağlamadığını mide AGS hücrelerinde ve mide kanserleri hastalarda test etmişlerdir (Matsumoto 2007). Sonuçta da, AID'nin bu dokularda ekspresse olduğunu göstermekle kalmayıp aynı zamanda p53 proteinini kodlayan TP53 geninde ve başka genlerde de mutasyonlara neden olduğunu gösterdiler. Bu çalışmadan sonra yine kronik enflamasyona bağlı olarak gelişen karaciğer, kolon, safra kesesi ve özafagus kanser tiplerinde AID'nin varlığı tespit edilmiş olup farklı genlerde mutasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Marusawa et al. 2011, Shimuzu et al. 2012). Çok yakın zamanda Miyazaki ve ark. tarafından AID'nin oral epitel displazi ve oral squamous hücre karsinomasında da etkili olduğu gösterilmiştir (Miyazaki et al. 2013).

HoxC4, *Aicda* transkripsiyonunu kontrol altına alan ve yüksek oranda korunmuş olan bir transkripsiyon faktörüdür. Antikor ve otoantikor cevapları içinde HoxC4 östrojen potansiyelli AID indüksiyon aracılıdır. Çoğunlukla NF-kB aktivasyonu aracılığıyla T bağımlı CSR uyarılar (temelde CD40 sinyalleri), T-bağımsız CSR indükleyici uyarılar (genelde TLR (Toll Like Reseptör), B hücre reseptörü (BCR), TACI-BCR ya da TLR-TACI eşleşmesi). Sitokinler, HoxC4'ü uyarır. Temelde bu durum NF-kB aktivasyonu ile olur. HoxC4, AID ekspresyonuna sebep olur (Zan and Casali 2013).

Bilim adamları AID'nin post-trasnkripsiyonel olarak nasıl kontrol edildiğini anlama amacıyla değişik modeller kullanarak deneyler yapmışlardır. Bilindiği üzere post-trasnkripsiyonel regülasyonlar hücrelerde non-coding RNA'lar tarafından ifa edilmektedirler. Bunlar arasında lncRNA: long non-coding RNA, PIWI interacting RNA (piRNA's), ve micro RNA (miRNA/miR)'ları gösterilebilir. Tüm non-coding RNA'lar arasında en fazla çalışılmış olanı micro RNA'lardır. *C. elegans*'ta keşiflerinden sonra en son yayınlara göre insanda 2000'in üzerinde miR keşfedilmiştir (Tang et al. 2014). Micro RNA'larla ilgili yapılan çalışmalarda miR'lerin vücudun fizyolojik fonksiyonlarının yanısıra patolojik durumlarda da

rolleri olduğu gösterilmiştir. Bunlardan en önemlisi hiç şüphesiz kanser sırasında oynamış olduğu rollerdir. miR'ler değişik kanser türlerinde bazen upüregüle olarak bazen de downüregüle olarak vazife yapmaktadırlar. Kanser sırasında rolü olan miR'lere 'Oncomir' denilmektedir (Esquela-Kerscher and Slack 2006). Bazı miR'ler tümör suppressor olarak çalışırken bazıları ise oncogene olarak görev alabilir. Mikro RNA'ların kanser sırasındaki rollerini anlamak önemlidir, çünkü hem biyobelirteç hemde tedavi amaçlı kullanılabilirler. miR'lerin teşhis sırasındaki kullanımının bir avantajı dokudan iğne ucuyla alındığında dahi tayinleri mümkündür. Pankreas kanserinin teşhis ve prognoz'unun geç olduğu düşünüldüğünde, kronik pankreatit evresinde ve pankreas kanseri sırasında miR'lerin regülasyonunun anlaşılması büyük önem arz etmektedir ve son yıllarda bu konularla ilgili çalışmalar aratarak devam etmektedir (He and Yuan 2014, Gayral et al. 2014, Sum et al. 2014, Srivastava et al. 2014, Khan et al. 2013, Costello et al. 2012, Elton et al. 2013). Öbür taraftan AID'nin post-transkripsiyonel regülasyonunu anlamak için yapılan çalışmalarda araştırmacılar, 4 farklı miR tarafından kontrol edildiğini göstermişlerdir; **miR-93**, **miR-155**, **miR-181b** ve **miR-361**. Diğer immün sistemi hücrelerinde olduğu gibi B hücreleri de başlangıçta kemik iliklerinde **naif** olarak üretilirler. Daha sonra lenf nodu veya dalak gibi organlara göç eden bu hücreler, antijenle karşılaştığı vakit uyarılırlar. Bunun neticesinde olgunlaşma, farklılaşma ve proliferasyon görülerek ya antikor üreten **plazma hücrelerine** ya da ileriki zamanlarda tekrar karşılaştığı vakit hızlı reaksiyon için **hafıza hücrelerine** dönüşürler. AID lenf nodunda ve dalakta B hücreleri antijenle karşılaştıktan sonra gerekli olduğundan, miR'ler bu safhada üretilmeyip baskılanmaktadır. Tam tersi B hücresi ilk doğduğunda naif halde iken ve son hale geldiğinde yani plazma hücresi oluştuğunda AID'nin vazifesi yoktur ve bu sefer miR'ler AID'yi baskılamaktadırlar. (Teng et al. 2008, Doesett et al. 2008, De yebenes et al. 2008, Boerchert et al. 2011, Basso et al. 2012).

AID henüz 15 yıl kadar önce bulunmuş olmasına rağmen önceleri sadece B hücreleri antikor farklılaşması sırasında görevli olduğu düşünülürken, başka bir yerde (aberrant) anormal olarak ifade edildiği vakit B hücresi malinitelerine ve epitel hücrelerde kronik enflamasyon neticesi oluşan kanserlerin belirli bir kısmında etkisi olduğu gösterilmiştir. Bunların yanında çok yakın zamanda yapılan başka

çalışmalarla birlikte AID apoptozis sırasında (Zaheen et al. 2009). Hücrelerdeki epigenetik değişikliklerde (Bhutani et al. 2010) merkezi B hücreleri tolerans oluşumunda (Kuraoka and Kelsoe 2011) ve bunların yanında otoimmünitede (Frasca et al. 2013) etkili olduğu gösterilmiştir.

2.3.3. AID'nin Görevleri

- Uygun olmayan şekilde ifade olan AID ifadesi, tümör oluşumu için genomik bir mutator görevi görür (Matsumoto et al. 2007).
- AID proteini, B hücre malignitelerinde serbest radikaller veya bozuk DNA tamir mekanizmalarının yanısıra mutasyona sebep olan diğer bir faktördür (Robbani et al. 2012).
- AID, B hücrelerinde antikor oluşumu sırasında master bir regülatör konumundadır. Bir yandan immunoglobulin V bölgelerinde nokta mutasyonları ile antikor olgunlaşmasına olanak verirken, diğer yandan immunoglobulin C bölgelerinde çift sarmal kırıklıkları yaparak antikor alt türü belirlenmesine yol açar. Böylelikle B hücresi gelişiminde önemli roller oynar (Fugmann et al. 2002).

2.3.4. AID İlişkili Hastalıklar

✓ **Kanser**

Kalıtımsal olarak kansere yatkınlığı bulunan genler sıklıkla hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrol edilmesinde, DNA onarımında ve genomik bütünlüğün sağlanmasında önemli rol almaktadırlar (Doğan ve Güç 2004).

Malignant hücrelerde AID ifadesi ilk olarak insan B hücresi *Non-Hodgkin* lenfomu (NHL)'da tanımlanmıştır (Takaishi and Wang 2007). Aynı zamanda AID ifadesi, insan hepatoselüler karsinomda meydana da geldiği bulunmuştur (Takaishi and Wang 2007).

Güçlü bir mutator olarak AID, sadece Ig bölgelerinde mutagenesi değil; Ig genlerinden olmayan mutasyonları dahi etkileyebilir. Böylece B hücreleri ve B hücresi olmayan genom instabilitesine neden olur. Lenfoid hücreler dahil olmak üzere, tümör oluşumuna da katkıda bulunabilir (Zan and Casali 2013).

AID keşfedildikten sonra AID'nin DNA'da mutasyon oluşturarak değişik patolojik sonuçlar doğurabileceği düşüncesiyle AID, farelerde overexprese edilmiştir. Sonuçta görülmüştür ki AID akciğer, mide ve karaciğer gibi birçok organda tümör oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (Okazaki et al. 2003). Ayrıca AID, kanser hücrelerinde p53 mutogenezisinin başlamasına neden olur (Takaishi and Wang 2007). Ayrıca, önceki yapılan çalışmalarda da AID'nin p53 proteinini kodlayan TP53 geninde mutasyona neden olduğu bulunmuştur. Buna bağlı olarak bu sonuçlara dikkate alınıp, karaciğer, kolon, safra kesesi ve özafagus kanser tiplerinde etkisinin olduğu gösterilmiştir (Matsumoto et al. 2007).

✓ **Otoimmün Hastalıklar**

Anormal AID ifadesi, otoimmünite hastalıkları, alerji, kanser ile ilişkilidir. Otoimmün sistemik lupus eritematozis (SLE), AID ifadesindeki bozukluk CSR, SHR' de otoantikör üretiminin artışı destekler (Zan and Casali 2013). Aynı zamanda AID, enzimatik fonksiyonlarını ve onların hedeflerini düzenleyebilir. AID, güçlü transkripsiyonel ve translasyonel düzenlemeler altındadır (Zan and Casali 2013).

✓ **Hiper Ig M**

AID, Ig genleri için CSR, SHM' de şarttır. Aynı zamanda B hücre farklılaşmasında ifade olur (Zan and Casali 2013). Anormal AID ifadesi, çeşitli patojenik faktörler tarafından tetiklenebilir. Bunlar arasında Hiper Ig M sendromunda bulunur. Ayrıca, AID'nin APOBEC benzeri etkisi, DNA etrafındaki C'lere bağlanır ve AID geni içerisindeki doğal olarak meydana gelen mutasyonlar hiper-Ig M sendromundan sorumludur (Zan and Casali 2013). Bu mutasyonlar deneysel olarak oluşturulan mutasyonlar kadar CSR ya da SHM içindeki etkilere de neden olur. AID deaminasyon aktivitesi ve CSR, APOBEC domain ve R24 DNA bağlayıcı N-terminal bölgesi içinde

R112 mutasyonları tarafından neredeyse kaldırılmıştır. Bu iki pozitif yüklü artıklar sık sık HIGM2 sendromlu hastalar içinde mutasyona uğramıştır (Zan and Casali 2013).

2.3.5. AID ve Kronik Enflamasyon

Enflamasyon sadece tümörün başlangıç safhasında değil sonraki aşamalarında da etkili olduğu gösterilmiştir (Grivennikov et al. 2010). Enflamasyonun tümörle ilgisi esasında bundan 150 yıl kadar önce Rudolf Virchow tarafından tümör etrafına infiltre olan lökositleri gözlemlemesiyle keşfedilmiştir. Yakın zamana kadar üzerine çok fazla çalışılma yapılmamış olup son 10 yılda bu alanda büyük araştırmalar yapılmıştır. Enflamasyonu kansere mekanistik olarak bağlayan ise bir transkripsiyon factor olan NF-kB proteindir (Grivennikov et al. 2010, Ben-neria et al. 2011). NF-kB hücre için hayati bir öneme sahip olup farklı şekillerde uyarılıp, uyarılara bağlı olarak farklı şekillerde cevap verebilmektedir. NF-kB kronik enflamasyon sırasında hücrenin enflamasyon hazırlayıcıları olan TNF-a, IL1 ve IL6 yapımını hızlandırmaktadır (Ghosh and Hayden 2012). Diğer enflamasyonla ilgili olan kanserlerde olduğu gibi pankreas kanserinin oluşumunda da NF-kB'nin aktive olduğu gösterilmiştir (Wang et al. 1999).

Vücudumuzda farklı bölgelerde oluşan farklı kronik enflamasyonlar ve neticesinde uzun dönemde gelişen kanserler vardır (Li et al. 2005). Bu enflamasyonların 20'den fazla kanserin oluşmasına katkı yaptığı değişik çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu kanserlerden en ölümcül olanı pankreas kanseridir. Uluslararası Kanser Üzerine Araştırmalar Kurumu (International Agency for Research on Cancer) GLOBOCAN 2008 verilerine göre Türkiye'de 2000 civarında kişi bu kansere yakalanmış ve bunların % 97'lik kısmı yakalandıktan sonra vefat etmiştir. Pankreas kanserinin bu denli yüksek ölüm riskinin olması ise hastalığın prognozundaki yetersizliği göstermektedir (Klein 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

1. **Trizol:** Hücrenin çevresindeki zarın geçirgenliğini etkileyerek hücre içeriğinin hücre dışına çıkmasını sağlar.
2. **Klorofol:** Laboratuvarında kullanılan yaygın bir çözücüdür. Organik ayırma ve saflaştırma işleminde kullanılır.
3. **İzopropil Alkol:** Çalışmamızda dezenfektan olarak kullanılmıştır.
4. **RNAz free water:** Çalışmamızda RNA kalite tayini yaparken nanodrop aletinde örneğimizle birlikte kullanılmıştır.
5. **Etanol:** Çalışmamızda RNA yıkama aşamasında kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kitler

RNA izolasyonunda: TRIzol® (Thermofisher, Waltham, MA, USA) RNA izolasyon kiti

RNA miktar tayini: Qubit® (Thermofisher, Waltham, MA, USA).

cDNA dönüşümü: High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher, Waltham, MA, USA)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Aletleri

Deneyisel çalışmalar İzmir Şifa Üniversitesi Genetik Uygulama ve Araştırma biriminde bulunan Laboratuvar imkanlarından faydalanılmıştır. Kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir.

1. **Saf Su Cihazı**; Çalışmalarımızda reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında distile ve nükleaz suyun sağlanması amacıyla kullanılmıştır.
2. **Mikrobiyolojik Emniyet Kabini**; Gerek RNA, cDNA izolasyonu gerekse de diğer tüm deneysel aşamaların steril koşullarda gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır.
3. **Mini Masa Üstü Santrifüj**; Moleküler genetik çalışmalarda merkez kaç kuvveti ile çökeltilerin oluşturulması amacıyla RNA izolasyonunda santrifüj aşamasında kullanılmıştır.
4. **Hassas Terazı, (0,0000g)**; Çalışmamızdaki bazı maddelerin tartımı için kullanılmıştır.
5. **Buz Makinesi/Scotsman AF80**; Moleküler genetik çalışmalarda kullanılan kimyasallar için oda koşullarında +4 °C ortamı oluşturmak için kullanılmıştır.
6. **Soğutmalı Santrifüj/Thermo Scientific MR 23i**; Moleküler genetik çalışmalarda merkez kaç kuvveti ile çökeltilerin oluşturulması amacıyla RNA izolasyonunda santrifüj aşamasında kullanılmıştır.
7. **Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Cihazı**; İstenilen bölgenin amplifikasyonu için kullanılmıştır.
8. **Tek Işınlı Spektrofotometre/Thermo Electron Corporation Nicolet Evolution100**; DNA, RNA ve protein konsantrasyonları ve saflıklarının tespiti için yararlanılmıştır.
9. **Derin Dondurucu -86°C/Nuaire Glacier**; RNA izolasyonundan önce dokuların saklanması için kullanılmıştır.
10. **-20°C Dondurucu**; Numune ve analizlerde kullanılan hazır reaktifleri saklamada kullanılmıştır.
11. **+4°C Soğutucu**; Solüsyon saklamak için yararlanılmıştır.
12. **Thermal Cycler (1x96 lık)**; cDNA amplifikasyonunda kullanılmıştır.

13. **pH metre/Hanna Instruments HI 2211;** Moleküler genetik çalışmalarında kullanılan solüsyonların Ph değerlerinin ölçümü için yararlanılmıştır.
14. **Homojenizatör;** Gerekli durumlarda solüsyonlarda homojenizasyon sağlanması için kullanılmıştır.
15. **Dik Tip Otoklav;** Pipet uçları, ependorf tüpleri, makas, bistüri vb. malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
16. **Vorteks;** Moleküler çalışmalarda çözeltilerin karıştırılmasında kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastalardan Doku Temini

15.04.2015 - 01.03.2016 tarihleri arasında hastanemize müracaat eden kronik pankreatit ve veya pankreas kanseri tanısı almış toplam 21 hastadan, cerrahi operasyonla çıkarılan 0.5-1 cm³ ebatlarındaki tümörlü ve normal doku cryo tüplere konularak deney gününe kadar sıvı azot tankında saklanmıştır. Optimizasyon amaçlı olarak öncelikle alınan iki farklı örnek 3'e bölünerek aşağıda belirtilen 1,2 ve 3 no'lu protokoller denenmiştir. Ancak alınmış olan dokuları her 3 farklı deney içinde yeterli olmadığı anlaşılınca toplanmış olan örneklerle sadece AID transkripsiyonuna bakılmıştır.

3.2.2. RNA İzolasyonu:

RNA İzolasyon, Trizol Solüsyonu (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) kullanılarak yapılmıştır. Protokol aşağıdaki gibi uygulanmıştır. Aşağıdaki protokol bu kitten uyarlanarak yazılmıştır.

Örneklerin Homojenizasyonu:

1. Örnekler öncelikle hassas bir terazide tartıldı. Daha sonra homojenizasyon yapılacak tüpe aktarıldı ve 50-100mg doku başına 0.75ml Trizol konuldu.

2. Daha sonra yukarı ve aşağı hareketlerle buzlarla doldurulmuş soğuk bir beher içerisinde homojenize edildi. Homojenizatör (IKA T18, Ultra Turrax, Staufen, Almanya).

Faz Ayrımı:

1. Örnekler nükleoprotein kompleksinin tam olarak ayrılmasını sağlamak için, oda sıcaklığında 5 dakika süre ile inkübe edildi.
2. Homojenizasyon için kullanılan TRIzol® reaktif maddesinin her 1 ml'si için 0.2 mL kloroform eklendi. Tüpler dikkatli bir şekilde kapatıldı.
3. 15 saniye boyunca elle kuvvetli bir şekilde tüp çalkalandı.
4. Oda sıcaklığında 2-3 dakika daha inkübe edildi.
5. Örnekler 4°C'de 15 dakika süre ile 12,000 x g 'de santrifüj edildi.

Not: Karışım alt kırmızı fenol-kloroform fazına, bir ara faz ve renksiz bir üst sulu faza ayrılır. RNA, sulu faz içinde tamamen kalır. Üst akıcı faz toplam hacmin ~ 50% 'dir.

6. Tüp 45° eğimle tutularak pipetleme ile numunenin üst sulu fazı çıkarıldı. Sulu faz çıkarılırken pipet içine interfaz veya organik tabakanın herhangi birinin karışmasından kaçınıldı.
7. Sulu faz yeni bir tüp içine yerleştirildi ve RNA izolasyonu işlemine devam edildi.

RNA Presipitasyonu:

1. Homojenizasyon için kullanılan TRIzol® reaktif maddesinin her 1 ml'si için süpernatant'a 0.5 mL 100% izopropanol eklendi.
2. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
3. 4°C'de 10 dakika boyunca 12,000 x g'de santrifüjlendi.

RNA yıkama:

1. Sadece RNA peleti bırakılarak, süpernatant kısım tüpten ayrıştırıldı.
2. Homojenizasyon için kullanılan TRIzol® reaktif maddesinin her 1 ml'si için % 75'lik etanolden 1 mL kullanılarak pelet yıkandı.
3. Örnek kısaca vortekslenditen sonra 4°C'de 5 dakika boyunca 7500 x g'de santrifüj yapıldı. Yıkama yapılan kısım atıldı.
4. RNA peletine 5-10 dakika vakum veya kuru hava uygulandı.

RNA'nın yeniden süspansiyonu:

1. RNA pelleti, Rnaz içermeyen **50ul su** içinde bir pipet ucu ile pipetaj yapılarak tekrar süspanse hale getirildi.
2. Son olarak miktar tayinine geçildi. Miktar tayininden sonra örnekler -70°C 'e kaldırıldı.

* Pipetaj hataları için tüm deneylerimizde Master Mix hazırlanırken %10 daha fazla mix hazırlanmıştır.

3.2.3. RNA Miktar Tayini

RNA miktar tayininde Q-PCR için floremetrik metod, QUBIT, (Thermofisher, Waltham, MA, USA) uygulanmıştır. Bu metod RNA miktar tayini için en hassas metoddur. Diğer spektrofotometrik metodlardan farklı olarak bu metotta kırılmış, zarar görmüş RNA'lar RNA miktarına dâhil edilmemektedirler. Aşağıdaki protokol bu kitten uyarlanarak yazılmıştır.

QUBIT:

1. Standartlar için iki deney tüpü (protein deneyi için 3 tane) ve her kullanıcı numunesi için bir deney tüpü hazırlandı.
2. Qubit® çalışma çözeltisi, Qubit® buffer solüsyonu içerisinde Qubit® reaktifi 1:200 oranında seyreltilerek hazırlandı.
3. Her standart ve numune için 200 ml çalışma solüsyonu hazırlandı.
4. Deney tüpleri aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.
5. 2-3 saniye süreyle tüm tüpler vortekslendi.
6. Tüpler Qubit® florometre içine yerleştirildi ve talimatlar dikkate alındı.

Tablo 3. Qubit deneyi için kullanılan solüsyon miktarları

	Standart deney tüpleri	Kullanıcı örnekleri deney tüpleri
Eklenecek çalışma solüsyonunun miktarı (2.basamak)	190 μl	180 – 199 μl
Eklenecek standartın (Kit'ten) miktarı	10 μl	-
Eklenecek kullanıcı örneğinin miktarı	-	1 – 20 μl
Her bir deney tüpü için toplam miktar	200 μl	200 μl

3.2.4. cDNA Dönüşümü

cDNA dönüşümü için ‘High capacity cDNA Reverse Transcription Kit’ kullanıldı (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Aşağıdaki protokol bu kitten uyarlanarak yazılmıştır.

Kit birleştirildiğinde 2X Revers Transkripsiyon (RT) Master Mix oluşturan reaktif madde içerir. RNA nümuneleri eşit hacimde ilave edildi. Rnaz kontaminasyonunu önlemek için, Rnaz içermeyen reaktifler ve sarf malzemeler kullanıldı.

2X Revers Transkripsiyon (RT) Master Mix hazırlamak için (Reaksiyonun her biri 20 µL):

Tablo 4. cDNA hazırlama deneyi ve kullanılmış olan solüsyon miktarları:

1.	Öncelikle kit bileşenleri buz üzerinde çözüldü.	
2.	Aşağıdaki tabloya göre, gerekli reaksiyon sayısını hesaplamak için ihtiyaç olan komponentlerin hacmi hesaplandı. Buz üzerinde RT master mix hazırlandı.	
	Bileşen	Reaksiyon Kitinin Hacmi (µL) Rnaz İnhibitör Kit olmadan
	10X RT Buffer	2.0
	25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
	10X RT Random Primers	2.0
	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
	Nuclease-free H ₂ O	4.2
	Her bir reaksiyon toplamı	10.0
	ÖNEMLİ! Reaktif transferi sırasında oluşan kayıp için fazla hacmi karşılamaya yönelik hesaplamalar ek reaksiyonlar içermesi gerekmektedir.	
3.	Buz üzerine 2X RT ana karışımı yerleştirildi ve hafifçe karıştırıldı.	

cDNA Reverse Transkripsiyon reaksiyonlarını hazırlamak için:

1. 96 kuyucuklu bir reaksiyon plakasının her bir kuyucuğu içine 2X RT master karışımından 10 µL pipetlendi.
2. Karışıma 2 kez aşağı ve yukarı pipetaj yapıldı. Her bir kuyucuk içine RNA örneklerinden 10 µL pipetlendi.

Tablo 5. cDNA için termal döngü programı

Aşağıdaki koşullar kullanılarak termal döngü programlandı.				
	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 min	120 min	5 min	∞

3. Plaka ya da tüpler kapatıldı.
4. Hava kabarcıklarını elimine etmek ve içeriğin aşağı çökmesi için plaka ya da tüpler kısaca santrifüjlendi.
5. Termal cycler yüklemeye hazır olana kadar plaka ya da tüpler buz üzerine yerleştirildi.
6. Bu işlemler sonucunda 100ng/ul olan RNA / cDNA miktarı, kendisine eşit miktarda solüsyon konulduğu için yarı yarıya düşmüştür. Sonuç olarak cDNA konsantrasyonu 50 ng/ul'dir.

Termal cycle program için:

3.2.5. Q-PCR

qRT-PCR için **TaqMan® Evrensel Master Mix II** sipariş edilerek uygulandı (Thermofisher, Waltham, MA, USA). Aşağıda tabloda da belirtildiği üzere TaqMan Master Mix, Primer içeren TaqMan Assay, cDNA ve su karıştırılarak PCR plaklarına konuldu. Aşağıdaki protokol TaqMan kitinden uyarlanarak yazılmıştır.

1. Çözülme ve reaktif karışımı:
 - a. Buz üzerinde TaqMan® assay'ler eritildi..
 - b. Testler tamamen çözüldüğü zaman, yavaşça vortekslendi ve kısaca santrifüjlendi.
2. Çalışan örneklerin bir çoğu ve reaksiyon oluşumuna dayalı her bir deney için gereken numune sayısı hesaplandı. **Sonuçların mümkün olduğu kadar doğruya yakın olabilmesi için her bir örnek 3'lü tekrarlar şeklinde denendi.**
3. PCR reaksiyon karışımının hazırlanması:
 - a. Her numune için 1.5 mikrosantrifüj tüplerine pipetlendi. Çalıştırdığımız kopya sayısına göre gerektiği gibi çarpıldı.
 - b. Her tüp kabını ve karışımı birkaç kez ters çevirilerek karıştırıldı.

- c. Kısaca tüpler santrifüj edildi.
4. Reaksiyon plakalarının hazırlanması:
- a. Elimizde her bir hastanın hem tümörlü hemde normal dokusu bulunmaktadır. Her iki örnek grubunda da AID incelemesi yapılmıştır. **Sonuç olarak 21 x 2 = 42 hastada AID ifadesi araştırılmıştır.**
- b. Deneyle için öncelikle İki farklı Master Mix hazırlandı, **AID ve b-actin**. 3'erli tekrarlar yapılacak olduğundan **dolayı 3 x 21 = 63** örnek. Sonuç olarak:

63 örnek Normal doku ve b-actin

63 örnek Normal doku ve AID

63 örnek tümör doku ve b-actin

63 örnek tümör doku ve AID

(Her bir gen ve örnek grubu için), buna ilaveten 10% daha fazlası olacak şekilde Master Mix ler hazırlandı.

- c. Her örnek için, 96 kuyucuklu reaksiyon plakasının ilgili oyuklarına PCR reaksiyon karışımının 19 µL transfer edildi.
- d. Plaka üzerinde 1ul cDNA örnekleri eklendi.
- e. Uygun bir saydam yapıştırıcı/kapak ile plaka kapatıldı.
- f. Kısaca plaka santrifüj edildi.
- g. Real-time PCR sistemi içine plakayı yükledi.

Tablo 6. Q-PCR deneyi için kullanılan solüsyon miktarları

PCR Reaksiyon Karışım Bileşimi	Her Reaksiyon Hacmi (µL)	Son Konsantrasyon
TaqMan® Universal Master Mix II, with/no UNG, 2x	10.0	1X
TaqMan® Assay, 20x (primer) (AID, b-actin)	1.0	1X
cDNA template (50ng/ul)	1.0	50 ng
RNAase free water	8	
Toplam Hacim	20.0	-

5. Örneklerin yürütülmesi, **ABI StepOne Plus Sisteminde** gerçekleştirildi (Thermofisher, Waltham, MA, USA). Örnekler alete konulduktan sonra aletin bilgisayar ekranından plaka kuyucuklarına dek gelecek şekilde tek tek örnekler bilgisayara girildi. Gerekli diğer parametrelerde alete girildikten sonra PCR başlatıldı.

Tablo 7. Q-PCR termal döngü programı

Sistem	UNG İnkübasyon†	Polimeraz Aktivasyonu	PCR	
			Döngü (40 döngü)	
			Denatüre	Anneal/extend
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60
Zaman (mm:ss)	2:00	10:00	00:15	1:00
Reaksiyon Hacmi (µL)	20			
† Optimal Uracil-N-Glycosylase (UNG) aktivitesi için gereklidir. UNG reaksiyonda olmadığı zaman, ihtiyaç değildir.				

3.2.5.1. AID Ekspresyonunun Gösterilmesi

Dataların analizi ‘**Comparative Ct Metodu**’ ile yapılmıştır. Bu metoda aynı zamanda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ da denilmektedir. Kullanmış olduğumuz formüller aşağıda verilmiştir. Burada öncelikle normal dokuda her zaman aktif olan bir genin Ct değeri (Cycle threshold: Ürünün exponential olarak artmaya başladığı siklus) ilgilenmiş olduğumuz genin Ct değerinden çıkarılır. Ardından bu işlem hasta dokusu içinde tekrarlanır. Daha sonra Normal dokunun ifade değeri hasta dokunun ifade değerinden çıkarılır. En son bu rakam ($\Delta\Delta Ct$) ifade değişikliği formülüne girilerek, ifadede ki değişiklik katsayısı tespit edilir. Elde edilen sonuçlar ve hesaplama sonuçları tablolar halinde verilmiştir.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{hasta doku}} - \Delta Ct_{\text{normal doku}}$$

$$\text{İfade değişikliği} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

4. BULGULAR

4.1.RNA miktarları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Örnekler tolandıktan sonra öncelikle RNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından QUBIT ile miktar tayin edilmiştir. Aşağıdaki tabloda elde edilen RNA miktarlarını ve buna ilaveten konsantrasyon normalizasyonu için gerekli olan su miktarı görülmektedir.

Tablo 8. Hastalara ait RNA konsantrasyonları ve konsantrasyon normalizasyonu

	Konsantrasyon (ng/ul)	Eklenen su * (ul)
Hasta No:1	446	173
Hasta No:2	254	77
Hasta No:3	148	24
Hasta No:4	399	149.5
Hasta No:5	468	184
Hasta No:6	204	62
Hasta No:7	109	4.5
Hasta No:8	331	115.5
Hasta No:9	613	256.5
Hasta No:10	539	219.5
Hasta No:11	155	27.5
Hasta No:12	238	69
Hasta No:13	340	120
Hasta No:14	127	13.5
Hasta No:15	245	72.5
Hasta No:16	225	62.5
Hasta No:17	345	122.5
Hasta No:18	444	172
Hasta No:19	86	-
Hasta No:20	134	17
Hasta No:21	487	193.5

*Quatitative Real Time PCR için kitimizde önerilen cDNA miktarı 1ng-100 ng'dır. Bizde RNA miktarlarını kolaylık olsun diye 100ng/ul 'ye ayarladık. Bu konsantrasyona ayarlarken kullanmış olduğumuz formül aşağıdaki gibidir.

$$(50\text{ul} \times \text{Konsantrasyon (ağırlık)} / 100) - 50 = \text{Eklenilecek su (ul)}$$

4.2. Normal bölgeden b-actin değerleri:

RNA'lar izole edildikten sonra miktar tayini yapılarak cDNA çevirimine geçildi. Ardından kit yönergelerine göre Q-PCR yapıldı. Aşağıdaki tabloda hastaların normal bölgelerinden elde dokularda yapılmış olan b-actin Ct sonuçları görülmektedir.

Tablo 9. Hastaların normal bölgeden Beta Actin geni için Q-PCR değerleri

Beta Actin (Normal)	1	2	3	Avg.
1	13.72	13.77	13.31	13.60
2	13.16	13.75	13.32	13.41
3	13.12	13.3	12.94	13.12
4	14.48	14.31	14.29	14.36
5	13.54	13.57	13.38	13.50
6	13.41	13.74	13.48	13.54
7	13.61	13.46	13.54	13.54
8	13.41	13.31	13.25	13.32
9	13.34	13.13	13.11	13.19
10	13.45	13.68	13.65	13.59
11	13.77	13.35	13.69	13.60
12	14.14	13.97	14.13	14.08
13	13.72	13.77	13.31	13.60
14	13.16	13.75	13.32	13.41
15	13.12	13.3	12.94	13.12
16	14.48	14.31	14.29	14.36
17	13.54	13.57	13.38	13.50
18	13.41	13.74	13.48	13.54
19	13.61	13.46	13.54	13.54
20	13.41	13.31	13.25	13.32
21	13.34	13.13	13.11	13.19

4.3. Hasta bölgeden b-actin değerleri:

RNA'lar izole edildikten sonra miktar tayini yapılarak cDNA çevrimine geçildi. Ardından kit yönergelerine göre Q-PCR yapıldı. Aşağıdaki tabloda hastaların

normal bölgelerinden elde dokularda yapılmış olan b-actin Ct sonuçları görülmektedir.

Tablo 10. Hastaların kanserli bölgeden Beta Actin geni için Q-PCR değerleri

Beta Actin (Hasta)	1	2	3	Avg.
1	13.89	13.3	13.99	13.73
2	12.99	13.5	13.15	13.21
3	13.25	13.26	13.99	13.50
4	14.03	14.31	14.29	14.21
5	13.99	13.57	14.96	14.17
6	13.41	14.49	14.2	14.03
7	13.96	14.01	14.98	14.32
8	13.52	12.87	13.25	13.21
9	14.63	14.85	13.5	14.33
10	13.4	12.88	14.23	13.50
11	13.89	13.45	14.1	13.81
12	14.34	14.63	14.99	14.65
13	13.88	14.66	14.86	14.47
14	14.96	14.24	13.89	14.36
15	13.86	14.4	13.89	14.05
16	14.28	14.31	14.76	14.45
17	13.86	13.98	14.5	14.11
18	14.69	14.2	14.35	14.41
19	13.61	13.89	14.54	14.01
20	13.62	14.23	13.25	13.70
21	14.67	14.29	14.88	14.61

4.4. AID primerlerinin kontrolü:

AID geninin TaqMan probe'larının çalışıp çalışmadığının tespiti için kontrol amaçlı olarak daha önce ifade edildiği bilinen insan RAMOS B hücre hattında da qRT-PCR denenmiştir. Beklendiği üzere burada AID geni çalışmıştır. Kronik gastrite bağımlı Gastrik Kanser vakalarında da AID ifadesi gösterilebilir ancak bu oran tüm mide kanser vakaları içerisinde 30-40% civarında olduğu için vakit kaybetmemek adına B hücreleri tercih edilmiştir. Dolayısıyla AID assaylerde herhangi bir sorun olduğu düşünülmemektedir.



5. TARTIŞMA

Kanser, akciğer hastalıkları ile birlikte en ölümcül iki hastalık grubundan biridir. Dünya kanser veri tabanı (GLOBOCAN) 2012 verilerine göre, Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kanserli hasta vefat etmiştir. 2012 yılı öncesi 5 yıllık dönem itibariyle dünyada 32.6 milyon kanserli yaşamaktadır. Pankreas kanseri ülkemizde ve dünyada en sık öldüren bir kanser türü olmamasına rağmen 5 yıllık sağ kalım oranı en düşük ve bununla birlikte yakalandıktan sonra ölümcül olanıdır. Öbür taraftan bu kanser türünü teşhis ve tedavideki zayıflıklar yenilip yeni metodlar ortaya çıkarılmazsa pankreas kanserinin 2030 yılı itibariyle hem en sık aynı zamanda da en ölümcül kanser türü olacağı tahmin edilmektedir. Devletlerin ayırmış oldukları büyük bütçelere rağmen, özellikle pankreas kanseri başta olmak üzere birçok kanser türü için tedavideki yetersizlikler, kanserin molekür mekanizmasının daha iyi aydınlatılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Kanser, mutasyonlar neticesi oluşur. Ancak mutasyonların hangi nedenlerle özellikle kanser genlerinde olduğu tam olarak bilinmemektedir. Mesela; genomun yapısı, epigenetik faktörler, ya da DNA tamirindeki bozukluklar bunlara örnek olarak verilebilir. Kanser sırasında mutasyona uğradığı bilinen proteinler üzerine yoğun ilaç çalışmaları vardır.

Activation Induced Cytidine Deaminase (AID); B hücreleri DNA üzerinde immünoglobulin bölgelerinde, urasil oluşturarak ve sarmal kırıklıklarına yol açarak, antikor olgunlaşmasını sağlayan bir proteindir. Yakın zamanda yapılan farklı çalışmalarda, daha çok kan kanserlerinin etiyolojisinde bulunan translokasyonların, AID'nin yanlış regülasyonu neticesi olduğu keşfedildi. AID'nin bu düzensiz halini dizginlemesi gereken DNA tamir mekanizmalarının işleyişi de aydınlatılmayı beklemektedir.

AID'nin birçok kronik enflamasyonlu kanser türünde varlığı keşfedilmiştir. Bizler de bu çalışmada AID'yi pankreas kanserli hastalarda çalıştık. Toplam 21 hastadan yapmış olduğumuz deneyler neticesinde kontrol geninin de çalıştığı ortamda AID'yi hiçbir hastada gözlemedik. Bunun birkaç farklı sebebi olabilir.

- I. Örnek sayısı düşünülduğünde bu beklenen bir sonuçtur. Nitekim projede de bahsi geçtiği üzere biz kronik pankreatite bağlı pankreas kanseri gelişimlerinde AID ifadesi beklemekteyiz. Klinisyen arkadaşlarla görüştüğümüzde bu oranın 1-5% civarında olduğu söylenmiştir. Sonuç olarak vaka sayısının arttırılması gerekmektedir.
- II. Örnek sayısı artırabilse bile mümkün olduğu ölçüde klinisyenlerle görüşüp geçmişinde kronik pankreatit olan pankreas kanserleri çalışılmalıdır.

Projemiz başladıktan sonra bugüne değin AID ve Pankreas Kanseri üzerine bağlantıyı araştıran iki ayrı çalışma yayınlanmıştır (1,2). Bunlardan ilki hücre hatları üzerine olup diğeri fare üzerine yapılan çalışmalardır. Bu iki çalışmanın da çalışmalarımızı desteklediğini düşünmekte olup Pankreas Kanserli dokularda AID aktivitesinin gösterilmesinin önem arz ettiğini düşünmekteyiz. Öbür taraftan yine bizim planladığımız ve bu iki çalışma da bahsi geçmeyen micro RNA çalışmalarının da ileriki yıllarda yapılabilmesi bu alanda çalışmak isteyen araştırmacılar için bir ışık olabilecektir.

AID'nin pankreasta mutasyona sebep olup olmadığı ise hücre kültürü çalışmalarında yapmak mümkündür. Mutasyon oluşumunu anlamak için hücre hatlarına TNF-a, NEMO, İKK transfeksiyonları yapılarak yeni kolanlar elde edilecektir. Bunun temel amacı, hali hazırda oluşturmuş olduğumuz hatlardan pozitif bir sonucun çıkmama ihtimaline binaen ihtiyatlı olmak içindir.

AID'nin çıkmıyor olmasının bir sebebide ortamda bulunan AID'yi baskılayacak olan miRNA'lardır. B hücrelerde daha önce AID'yi baskılamış olduğu gösterilmiş olan miR'ler tespit edilebilirse bu mekanizmlar da çözülmeye çalışılabilir. Daha önce miR'ler ve AID ile ilgili kronik enflamasyonlu kanserlerde hiç çalışılma yapılmamıştır. Bu deneyler neticesinde AID'nin regülasyonu daha iyi anlaşılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Vücudumuzda mutasyon oluşturabilen ender bir protein olan AID'nin moleküler mekanizmalarının ortaya çıkarılmasının, hem mutasyon oluşumunu anlama adına, hem B hücreleri gelişimini daha iyi anlama adına, hemde miR regülasyonlarını da düşünerek başta kanser olmak üzere bu hastalıkları daha iyi anlama adına önemli olduğunu düşünmekteyiz.



ÖZET

Activation Induced Deaminase (AID)'ın Pankreas Kanserindeki Rolü

Activation induced cytidine deaminase (AID), bağışıklık sistemi B hücrelerinde keşfedilen ve antikorların olgunlaşması ve farklılaşması için gerekli olan bir enzimdir. AID, DNA'daki sitozinleri urasile çevirerek DNA'ya yabancı bir baz tanıtır ve sonraki safhalarda tamir mekanizmalarının hataya meyilli polimerazlar (error-prone) etkisiyle nokta mutasyonlar veya çift sarmal kırıklıkları oluşur. Önceleri AID'nin sadece bu mekanizmalar için gerekli olduğu düşünülürken, yanlış regüle olması sonucunda B hücre malinitelerinde, otoimmün hastalıklarda ve daha da ötesi B hücreleri dışında bazı enflamasyonla ilintili kanserlerde de etkisi olduğu tespit edilmiştir. AID'nin kronik enflamasyon sırasında NF-kB vasıtasıyla aktive olduğu düşünülmektedir. Kanseri daha etkili ve spesifik olarak tedavi edebilmek için kanserin moleküler mekanizmasının tam olarak anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmadaki amacımız, görülme sıklığı olarak yüksek olmasada yakalandıktan sonra ölüm yüzdesi en yüksek olan pankreas kanseri hastalarında AID ifadesini göstermektir.

AID aktivitesi, Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanelerine müracaat eden 21 pankreas kanseri hastasında Q-PCR ile incelenmiştir. Kontrol olarak β -actin kullanılmıştır. Deneylerimiz sonucunda β -actin geninde sinyal tespit edilirken AID geninde sinyal tespit edilememiştir. AID primerlerinin çalışıp çalışmadığı AID'nin daha önce ifade edildiği hürelerden izole edilmiş RNA'larda kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Kronik inflamasyona bağlı olarak gelişen pankreas kanseri hastalarının oranı yüzde 1-5 arasındadır. AID'nin pozitif olarak gösterilebilmesi için daha fazla hastaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: AID, Kronik İnflamasyon, NF-kB, Pankreas Kanseri, Q-PCR.

ABSTRACT

The role of Activation Induced Deaminase (AID) in Pancreatic Cancer

Activation induced cytidine deaminase (AID), is an enzyme discovered in immune system B cells is required for affinity maturation and differentiation of antibodies. AID by transforming cytosines into uracils in DNA, introduces an unwanted base and depending on the repair of those uracils, either point mutations and or double strand breaks may result in. Formerly, it was only assumed that AID is essential for aforementioned mechanisms but recent research indicated AID is regulated aberrantly in B cell malignancies and autoimmunity as well as in inflammation related cancers which occur in non-B cells. It was suggested that AID was activated by NF- κ B during chonic inflammation.

In this study our specific aim is to try to show the existence of AID in the patients with pancreatic cancer.

The expression of AID was analyzed in 21 patients by Q-PCR who came to Sifa University hospitals. As an internal control β -actin was used. At the end of our experiments we detected signal in control gene however AID was not detected. To check if AID primers is working, we used RNA sample that isolated from the cells her AID is ubiquotiously expressed.

It is known that, in about 1-5% of pancratic cancer patients there is chronic inflammation history. Considering that we need to collect more samples and analyze them afterwards.

Keywords: AID, Chronic Inflammation, NF- κ B, Pancreatic Cancer, Q-PCR.

KAYNAKLAR

Adamek HE, Albert J, Breer H, Weitz M et al., Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangio pancreatography and endoscopic retrograde 71 cholangio pancreatography: A prospective controlled study, *Lancet*, 2000; 356: 190-193.

Adler G, Has the biology and treatment of pancreatic diseases evolved?, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004;18(Suppl): 83-90.

Adsay NV, Klimstra DS, Blumgart LH, Belghiti J, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Chapman WC, Büchler MW, Hann LE, D'Angelica M, Pathology and Classification of Pancreatic and Ampullary Tumors, *Surgery of the Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; p:829-848, 2007.

Aieta M, Delcuratolo S, Silvertes N, Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursorlesions, *Int J MolSci*, 2013, Sep 30;14(10):19731-62.

Avila JL, Kissil J., Notchsignaling in pancreatic cancer: oncogene or tumor suppressor?, *TrendsMolMed*, 2013, May;19(5):320-7.

Basso K, Schneider C, Shen Q, et al., Bcl-6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155, *J ExpMed*, 2012;209: 2455–2465.

Baytekin S, Pankreas Adenokarsinomunda Anjiogenetik Aktivite Ve COX-2 Ekspresyonunun Prognostik Önemi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2005.

Ben-neriah Y. et al., Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the match maker, *Nat Immunol*, 2011; 12,715–23.

Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM, Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation, *Nature*, 2010;463 (7284):1042-7.

Boerchert GM, Holton NW, Larson ED, Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155, *BMC Cancer*, 2011; 10:347.

Chang DK et al., *J ClinOncol*, 2009;27(17) : 2855-62.

Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP, New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment, *Nat Rev Gastro enterol Hepatol*, 2012; 9 (8): 435-44.

Cubilla AL, Fitzgerald PJ, Morphological patterns of primary non endocrine human pancreas carcinoma, *CancerRes*, 1975; 35 (8): 2234-48.

Çökmez A, *Pankreas kanserlerinde cerrahi palyasyon*, Pankreas kanseri: patogenez, tanı ve tedavi, 1. Baskı, Güven & Nobel Kitapevleri, İzmir, s:151, 1999.

De yebenes VG, Belver L, Pisano D, et al., miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells, *J. Exp. Med*, 2008; 205: 2199–2206.

Dewitt J, Devereaux BM, Lehman GA, Sherman et al., Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review, *Clin Gastro enterol Hepatol*, 2006; 4: 717-725.

Doesett Y, McBride KM, Jankovic M, et al., MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase- mediated Myc-IgHtranslocation, *Immunity*, 2008; 28: 630–638.

Doğan A. L, Güç D., Sinyal İletim Mekanizmaları Ve Kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 34-42.

Edlund H, Developmental Biology of the Pancreas, *Diabetes*, 2001; 50; 5-9.

Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL, Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes, *Gene*, 2013; 532 (1): 1-12.

Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T, Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling, *Oncogene*, 2007;16;26 (38): 5587-95.

Esquela-kerscher A, Slack FJ., Oncomirs – microRNAs with a role in cancer, *Nat Rev Cancer*, 2006; 6 (4): 259-69.

Fang T, Yao Q, Chen Z, Xiang J, William FE, Gibbs RA, Chen C, Genetic and molecular alterations in pancreatic cancer: implications for personalized medicine, *MedSciMonit*, 2013, Oct 31; 19: 916-26.

Frasca D, Andrisani G, Diaz A, Felice C, Guidi L, Blomberg BB, AID in aging and autoimmune diseases, *Autoimmunity*, 2013;46(2):168-75.

Fugmann SD. et al., Immunology One AID to unite the mall, *Science*, 2002; 295, 1244–5.

Gayral M, Jo S et al., MicroRNAs as emerging biomarkers and therapeutic targets for pancreatic cancer, *World J Gastroenterol*, 2014; 20 (32): 11199-11209.

Ghosh S, Hayden MS, Celebrating 25 years of NF-kB research, *ImmunolRev*, 2012; 246 (1): 5-13.

Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, Nardulli P, Santini D, Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardessy N, Depinho RA, Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes Dev* 2006, May 15; 20 (10): 1218-49.

Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, Nardulli P, Santini D, Aieta M, Delcuratolo S, Silvertes N, Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursorlesions, *Int J MolSci*, 2013, Sep 30;14 (10): 19731-62.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M, Immunity, inflammation, and cancer, *Cell*, 2010; 140,883–99.

Göral V, Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı, İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, *Güncel gastroenteroloji* 18/4, İzmir, 2014.

Hall J.E., Guyton A C, Text Book of Medical Physiology, 12 ed. 780-782, 2011.

Haydaroglu A.,Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi, *Türk Onkoloji Dergisi*, Cilt 22, Sayı 1, 2007; 022-028.

Hasham M. G. et al., Widespread genomic breaks generated by activation-induced cytidine deaminase are prevented by homologous recombination, *Nature Immunol*, 2010; 11,820–6.

He XY, Yuan YZ, Advances in pancreatic cancer research: Moving towards early detection, *World J Gastroenterol*, 2014; 20 (32): 11241-11248.

Hong Z, Casali P, Regulation of Aicda expression and AID activity, *Autoimmunity*, 2013; 46 (2):83-101.

<http://www.pankreas.gen.tr/pankreas-kanseri-nedir.html>, Pankreas kanseri nedir?, Erişim Tarihi: 28 Ocak 2014.

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi, Pankreas Kanseri, No: 28. Ocak 2002; s. 215-230, Prof. Dr. Sadık Perek.

Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA, MicroRNA molecular profile associated with diagnosis, clinico pathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma, *ClinCancerRes*, 2012 Jan 15; 18 (2): 534-45.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, et al, Cancer statistics, 2008, *CA Cancer J Clin*, 2008; 58 (2): 71-96.

Jemal A, Thomas A, Murray T, et al., Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 2002; 52: 23-47.

Keith A. Kelly, Michael G. Sarr, Ronald A. H, Pancreatic and periampullar cancer, *In: Mayo Clinic Gastrointestinal Surgery*. 2004; 271-99.

Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri Ve Mide Kanserinde Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo Ve İn Vitro İncelemesi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Tezi, Aktaş SH, 2010.

Khan S, Ansarullah, Kumar D, Jaggi M, Chauhan SC, Targeting microRNAs in pancreatic cancer: microplayers in the big game, *CancerRes*, 2013;73 (22): 6541-7.

Klein AP, Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer, *Nat Rev Cancer*, 2013;3 (1): 66-74.

Koduru S. et al., Dendritic cell-mediated activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent induction of genomic instability in human myeloma, *Blood*, 2012; 119, 2302–9.

Kuraoka M, Kelsoe G, A novel role for activation-induced cytidine deaminase: central B-cell tolerance, *Cell Cycle*, 2011;10 (20): 3423-4.

Lakatos G, Tulassay Z, The epidemiology of pancreatic cancer, 2010;151 (44): 1816-22.

Liu M. et al., Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation, *Nature*, 2008; 451,841–5.

Li Q, Withoff S, Verma IM, Inflammation associated cancer: NF- κ B is the the lynchpin, *Trends in Immunol*, 2005; 26: 318-25.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006; 20: 197-209.

Marusawa H, Takai A, Chiba T, Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development, *Advances in Immunol*, 2011; 111:109–41.

Matsumoto Y et al., Chromosome Translocation, B Cell Lymphoma, and Activation-induced Cytidine Deaminase, *Annual review of pathology*, 2012; 79–103.

Matsumoto Y. et al., Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium, *Nature Med*, 2007;13,470–6.

Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T et al, Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium, *Nature Medicine*, 2007; 13 (4): 470-6.

Maul RW. et al., Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions, *Nature immunology*, 2011; 12,70–6.

Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA et al., Physical activity, obesity, height, and the risk of the pancreatic cancer, *JAMA*, 2001; 286: 921-929.

Miyazaki Y, Fujinami M, Inoue H, Kikuchi K, Ide F, Kusama K, Expression of activation-induced cytidine deaminase in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma, *J Oral Sci*, 2013; 55 (4): 293-9.

Mu DQ, Peng SY, Wang GF, Risk factors influencing recurrence following resection of pancreatic head cancer, *World J Gastroenterol*, 2004; 10: 906-9.

Muramatsu M. et al., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme, *Cell*, 2000; 102,553–63.

Norton J A. Mulvihill S J, Pancreas Surgery Basic Science and Clinic, Springer-Verlag, 1st ed., 1990; 517- 584.

Okazaki I. et al., Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis, *J Exp Med*, 2003; 197,1173–81.

Özkan H, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji B.D, Türkiye Gastroenteroloji Vakfı kitabı. 2002; P: 365-72.

Pancreatic S, Pancreatic Section of the British Society of Gastroenterology, Guidelines for the management of patients with pancreatic cancer periampullary and ampullary carcinomas, *Gut*, 2005; 54 Suppl 5: v1-16.

Paulsen F, Waschke J, Sobotta İç Organlar, 23. Baskı, Münih, 2010, s: 120-127.

Perek S, Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Sempozyum Dizisi*, 2002, 28: s. 215-230.

Periampuller Bölge Tümörlerinde Pilor Koruyucu Pankreatik oduedenektominin Yeri, İstanbul Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, İstanbul, Güneyi A, 2005.

Polat FR, Yıldız E, Polat S, Ultrasonografi Eşliğinde Memede İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi: 132 Olgunun Retrospektif Analizi, *Bozok Tıp Dergisi*, 2013; 2: 12-18.

Pone EJ, Zhang J, Mai T, White CA, Li G, Sakakura JK, Patel PJ, Al-Qahtani A, Zan H, Xu Z, Casali P, BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway, *Nat Commun*, 2012; 3: 767.

Ross M.H, Pawlina W, Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, 6. Baskı, 2014, s: 647-651.

Royal RE, Wolff RA, DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, Crane CH, *Pancreatic Cancer*, Principles&Practice of Oncology. 8th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2008, p.1087-1143.

Salman B, Ege B, Akyürek N, Tatlıcıoğlu E, Pankreas kanserlerinde rezektabilitenin belirlenmesi ve evreleme laparoskopinin yeri. *Göztepe Tıp Dergisi*, 2005; 20: 173-177.

Sarmiento JM, Nagomey DM, Sarr MG, Farnell MB, Periapullary cancers: are there differences?, *SurgClin North Am*, 2001;81 (3): 543-55.

Semiz B. D. İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi Kitabı, Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Yayın: 476, İstanbul-1990.

ShigeoTakaishi, Timothy C Wang, Providing AID to p53 mutogenesis, *Nature medicine*, 2007, volume 13, number 4.

Silverman DT, M Schiffman, J Everhart, A Goldstein, K D Lillemoe et al., Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer, *Br J Cancer*, 1999; 80 (11): 1830-7.

Shibata K, Matsumoto T, Yada K, Sasaki A, Ohta M et al, Factors predicting recurrence after resection of pancreatic ductal carcinoma, *Pancreas*, 2005; 31:69-73.

Shimuzu T, Marusawa H, Endo Y, Chiba T, Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis, *Cancer Sci*, 2012; 103 (7): 1201-6.

Srivastava SK, Arora S, Singh S, Bhardwaj A, Averett C, Singh AP, MicroRNAs in pancreatic malignancy: progress and promises, *Cancer Lett*, 2014; 347 (2): 167-74.

Sun T, Kong X, Du Y, Li Z, Aberrant Micro RNAs in Pancreatic Cancer: Researches and Clinical Implications, *Gastro enterol Res Pract*, 2014; 386561.

Sönmezoğlu K, Pozitron Emisyon Tomografisi Bülteni, Cilt 1, No:1, s: 5-8, 2001.

Şahin F, Taşpınar M, Sunguroğlu A, Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi, Türkiye Klinikleri, *J MedSci*, 2007; 27: 560-566.

Tamada K, Wang XP, Brunicardi FC, Molecular targeting of pancreatic disorders, *World J Surg*, 2005; 29: 325-33.

Tamm EP, Silverman PM, Charnsangavej C, Evans DB, Diagnosis, staging, and surveillance of pancreatic cancer, *Am J Roentgenol*, 2003; 180: 1311-1323.

Tang YT, Xu XH, Yang XD, Hao J, Cao H, Zhu W, Zhang SY, Cao JP, Role of non-coding RNAs in pancreatic cancer, The bane of the micro world. *World J Gastroenterol*, 2014;20 (28): 9405-9417.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2009 yılı verisi.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2013 yılı verisi.

T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Alanlar Ortak Endokrin Sistem. 720S00026 Ankara, 2011.

Teng G, Hakimpour P, Landgraf P, et al., MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase, *Immunity*, 2008; 28:621–629.

Terrero, M.N, Li, S, Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment, *Gene Ther Mol Biol*, 2004; (8) 175-180.

Türkiye Bilimler Akademisi. Çağın hastalığı kanser. [http:// www. tuba. gov. tr /](http://www.tuba.gov.tr/). Erişim tarihi: 17 Kasım 2008.

Uçar O. Akciğer Kanseri PET/BT Bulguları İle Bilinen Prognostik Faktörlerin Karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Tez Danışmanı Prof. Dr. Serap HASTÜRK, Adana 2010: 75.

Uğur V.I, Kara Ş.P, Küçükplakçı B, Mısırlıoğlu C, Özgen A, Demirkasımoğlu T, Elgin Y, Sanrı E, Yörükoğlu T, Özdamar N, Yükselen Güney Y, Pankreas Kanserli Hastalarımızın Genel Özellikleri ve Sağkalım Sonuçları, 2010; Yayın: 43: s:1-7.

Uluslararası Kanser Üzerine Araştırmalar Kurumu (International Agency for Research on Cancer) GLOBOCAN, 2008.

Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR andChiao PJ, The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adeno carcinoma cells, *Clin Cancer Res*, 1999; 5,119–127.

William K. Ovalle, Patrick C. Nahirney, Netter Temel Histoloji, ISBN: 978-1-929007-86-8. 2009, s: 238-240.

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, HrubanRH, Recent progress in pancreatic cancer, *CA Cancer J Clin*. 2013 Sep;63 (5): 318-48.

Wood LD. Pancreatic cancer genomes: toward molecular subtyping and novel approaches to diagnosis and therapy, *Mol DiagnTher* 2013, Oct;17 (5): 287-97.

WHO (Dünya Sağlık Örgütü), 2000.

www.iacr.com.fr – International Association of Cancer Registries. Erişim Tarih: 23 Mart 2016.

Zaheen A, Boulianne B, Parsa JY, Ramachandran S, Gommerman JL, Martin A, AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis, *Blood*, 2009;114 (3): 547-54.

EKLER


Ek 1. Etik Kurul Onayı

T.C.
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.ŞFÜ.00.50.500/57
Tarih: 17.10.2012
Konu : Etik Kurul Başvurusu Hk.

Sayı; Yrd.Doç.Dr. Hüseyin SARIBAŞAK

Üniversitemiz klinik araştırmalar etik kurulunun 17.10.2012 tarih ve 19 nolu toplantısında sunulan "Activation Induced Deaminase (AID): Bir Enzim Olarak Global Genom Mutajenimidir?" başlıklı araştırma dosyanız ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup bilimsel ve **etik ilkelere uygun olduğuna** oy birliği ile karar verilmiştir.


Prof. Dr. Hüseyin VURAL
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu:

Değerli katılımcı;

Pankreas kanseriyle ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın amacı, pankreas kanserinde önemli olan bir proteini (AID proteini) araştırmaktır.

Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra eğer araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. Çalışmaya katılmanız durumunda size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Sizden onam vermeniz dışında herhangi bir beklentimiz olmayacaktır. Bu çalışmadan doğrudan bir fayda görmeyeceksiniz. Çünkü bugün için elde edilmesi planlanan sonuçlar tedavinizin gidişatını etkilemeyecektir. Çalışma sonuçlarımızın bilime katkısı olacağını aklıda tutmanızı isteriz.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, pankreas kanseri hastalarında AID ifadesinin rolünün gösterilmesi ve bu hastalıkla ilgili literatüre yeni bir destek sağlamaktır. Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümü, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı ve Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Biz inceleme için patoloji laboratuvarına gelen dokunuzda çeşitli incelemeler yapmayı planlıyoruz.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Size ait doku örneğinin rutin olarak yapılan patolojik değerlendirilmesinde hastalığın tanısı ile uyumlu sonuç elde edilemediğinde çalışmaya katılımınız sona erdirilecektir.

Araştırmamızı çalışmanın amacına uygun tanısı bulunan 30 gönüllü bireyin katılımı öngörülmektedir.

Çalışmanın gerçekleştirilmesi tamamen kendi üniversite hastanemizde gerçekleştirilecektir.

Çalışmanın sonuçları konusunda size ayrıca bir bilgilendirilmede bulunulmayacaktır. Aklınıza takılan ve sormak istediğiniz soruları Hüseyin Sarıbaşak'a (0-551-213 81 31) sorabilirsiniz.

Katılımcının beyanı;

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilirim biliyorum. Bu onam formunun bir kopyasının tarafıma verileceğini biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Araştırmanın Adı: “Activation Induced Deaminase (AID)'ın pankreas kanserindeki rolü”

Kullanılacak biyolojik materyal: Patolojik tanı için alınan pankreas kanseri dokusu örneği

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Katılımcı

Adı,soyadı:

Adres:

Tel:

İmza

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı:

Unvanı:

Adres:

Tel:

İmza

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Manisa/Ahmetli’de doğdu. İlköğretimi ve ortaokulunu Zübeyde Hanım İlköğretim okulunda, Lise öğrenimini İzmir Yamanlar Koleji’nde tamamladı. 2007 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandı ve 2013 yılında mezun oldu. 2013 yılında İzmir Şifa Üniversitesinde Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Şifa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik yüksek lisans programı öğrencisidir. Yabancı dili İngilizce’dir.

