2024

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serkan ÖZDEMİR

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
HALK SAĞLIĞI ENSTİTÜSÜ

TIBBİ SÜLÜK (*HİRUDO VERBANA*) SALGI EKSTRATININ PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTI (MIA PACA-2)' NDA İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serkan ÖZDEMİR

BİYOTERAPÖTİK ÜRÜNLER ARAŞTIRMA VE GELİŞTİRME
ANABİLİM DALI

Ankara, 2024

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
HALK SAĞLIĞI ENSTİTÜSÜ

TIBBİ SÜLÜK (*HİRUDO VERBANA*) SALGI EKSTRATININ PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTI (MIA PACA-2)' NDA İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serkan ÖZDEMİR

BİYOTERAPÖTİK ÜRÜNLER ARAŞTIRMA VE GELİŞTİRME
ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN

Ankara, 2024

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

HALK SAĞLIĞI ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Sülük (*Hirudo Verbana*) Salgı Ekstraktının Pankreas Kanseri Hücre Hattı (MIA PaCa-2)'nda İn Vitro Etkisinin Araştırılması

Serkan ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

28.11.2024

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN

Jüri ÜYELERİ

Prof. Dr. Salih MOLLAHALİLOĞLU

Doç. Dr. Kübranur ÜNAL

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Salih MOLLAHALİLOĞLU

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi tez çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi,bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

28.11.2024

Serkan ÖZDEMİR

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN'a,

Enstitü Müdürümüz Sayın Prof. Dr. Salih MOLLAHALİLOĞLU'na ve Enstitü Müdür Yardımcımız Sayın Doç. Dr. Nilüfer VURAL'a,

Tez çalışmamda destek sağlayan Sayın Doç. Dr. Kübranur ÜNAL ve Sayın Doç. Dr. Mustafa GÜNGÖRMÜŞ hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan anneme ve rahmetli babama en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Tıbbi Sülük (*Hirudo Verbana*) Salgı Ekstratının Pankreas Kanseri Hücre Hattı (MIA PaCa-2) 'nda İn Vitro Etkisinin Araştırılması

Serkan ÖZDEMİR

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Halk Sağlığı Enstitüsü

Biyoterapötik Ürünler Araştırma ve Geliştirme AnaBilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN

Bu çalışmada *Hirudo verbana* türü tıbbi sülükten alınan salgı ekstratının pankreas kanseri hücre hattı (MIA PaCa-2) üzerindeki in vitro etkisi araştırılmıştır. Tıbbi sülükten elde ettiğimiz salgı ekstraktı -80°C' de 24 saat bekletildikten sonra liyofilizatör cihazında 48 saat tutularak toz haline getirilmiştir. Toz halindeki salgıda öncelikle toplam protein analizi yapılmıştır. İnsandan alınan pankreas kanseri hücre hattının hücre kültürü hazırlanarak otomatik hücre sayım cihazında hücre sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu plaka üzerine hücrelerin ekimi yapılmıştır. Bu hücrelerin üzerlerine çalışmamızda kullanacağımız 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml ve 1200 µg/ml doz oranlarında tıbbi sülük salgı ekstraktları eklenmiştir. Hücre canlılığı XTT cihazı kullanılarak ölçülmüştür. 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. 24. saatteki IC_{50} değeri 484,48 µg/ml, 48. saatteki IC_{50} değeri 330,92 µg/ml son olarak da 72. saatteki IC_{50} değeri 542,75 µg/ml olarak hesaplanmıştır. *Hirudo verbana* sülük salgısının MIA PaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin lineer olmadığı gözlemlenmiştir. 600 µg/ml konsantrasyonun altındaki dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktlarının pankreas kanseri hücre hattı üzerinde zayıf antiproliferatif etki görülürken 600 µg/ml ve 1200 µg/ml dozlarda ise sitotoksik etki gözlemlenmiştir.

Kasım 2024, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Hirudo verbana*, Kanser, MIA PaCa-2, Pankreas Kanseri, Sülük Salgı, Tıbbi Sülük

ABSTRACT

Serkan ÖZDEMİR

Ankara Yıldırım Beyazıt University

Public Health Institute

Department of Biotherapeutic Products Research and Development

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hüseyin AYHAN

Investigation of the In Vitro Effect of Medicinal Leech (*Hirudo verbana*) Salivary Extract on Pancreatic Cancer (MIA PaCa-2) Cell Line

In this study, the in vitro effect of the secretory extract from the Hirudo verbana species medicinal leech on the pancreatic cancer cell line (MIA PaCa-2) was investigated. The secretion extract we obtained from the medicinal leech was kept at -80°C for 24 hours and then kept in the lyophilizer device for 48 hours and turned into powder. Firstly, total protein analysis was performed on the powdered secretion. A cell culture of the human pancreatic cancer cell line was prepared and the cells were counted on an automatic cell counting device. Cells were seeded on a 96-well plate. Medicinal leech secretion extracts were added to these cells at the dose rates of 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml and 1200 µg/ml, which we will use in our study. Cell viability was measured using the XTT device. IC_{50} values were calculated separately for the 24th, 48th and 72nd hours. The IC_{50} value at the 24th hour was calculated as 484.48 µg/ml, the IC_{50} value at the 48th hour was calculated as 330.92 µg/ml, and finally the IC_{50} value at the 72nd hour was calculated as 542.75 µg/ml. It has been observed that the effect of Hirudo verbana leech secretion on MIA PaCa-2 cell viability is not linear. While a weak antiproliferative effect of medicinal leech secretion extracts was observed on the pancreatic cancer cell line at doses below 600 µg/ml, a cytotoxic effect was observed at doses of 600 µg/ml and 1200 µg/ml.

Nowember 2024, 61 pages

Key Words: Cancer, *Hirudo verbana*, Leech Saliva, Medicanal leech, MIA PaCa-2, Pancreatic cancer

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
TABLOLAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Tıbbi Sülükler 3
2.1.1 Tıbbi Sülükler ve Hirudoterapinin Tarihçesi 3
2.1.2 Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri 4
2.1.3 Tıbbi Sülüklerin Etki Mekanizması 8
2.1.4 Hirudo Verbana 10
2.2 Kanser 12
2.2.1 Kanserin Tarihçesi 12
2.2.2 Kanser ve Oluşum Mekanizmaları 13
2.2.3 Pankreas ve Pankreas Kanseri 14
3. MATERYAL VE YÖNTEM 21
3.1 Tıbbi Sülüklerin Temini ve İncelenmesi 21
3.2 Sülük Salgısının Elde Edilmesi 22
3.3 Sülük Salgısının Liyofilize Edilmesi 24
3.4 Tıbbi Sülük Ekstratında Toplam Protein Analizi 25
3.5 MIA PaCa-2 Hücre Hattının Temin Edilmesi 28
3.6 Çalışmada Kullanılan Araç – Gereçler ve Kimyasal Maddeler 28
3.7 MIA PaCa-2 Hücrelerinin Çözülmesi İşlem Basamakları 30
3.8 Hücre Kültürünün Hazırlanması 30
3.9 Hücre Sayımı 32
3.10 Hücrelerin Plaklara Ekiminin Yapılması 33
3.11 Hücre Canlılığının XTT Yöntemi ile Ölçülmesi 34
4. BULGULAR 35
4.1. Hücre Canlılığının XTT Testi ile Ölçülmesi 35

4.1.1 MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Tıbbi Sülük Ekstraktının 24. Saatteki Etkisinin XTT ile Ölçülmesi 35
4.1.2 MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Tıbbi Sülük Ekstraktının 48. Saatteki Etkisinin XTT ile Ölçülmesi 36
4.1.3 MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Tıbbi Sülük Ekstraktının 72. Saatteki Etkisinin XTT ile Ölçülmesi 37
4.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Hirudo Verbana Salgı Ekstraktı Etkisi IC_{50} Değerinin Ölçülmesi 38
4.2.1. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine *Hirudo Verbana* Salgı Ekstraktı Etkisi 24. Saatteki IC_{50} Değerinin Ölçülmesi 39
4.2.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine *Hirudo Verbana* Salgı Ekstraktı Etkisi 48. Saatteki IC_{50} Değerinin Ölçülmesi 40
4.2.3. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine *Hirudo Verbana* Salgı Ekstraktı Etkisi 72. Saatteki IC_{50} Değerinin Ölçülmesi 41
4.3 Tıbbi Sülük Ekstrakt Konsantrasyonlarının Zamana Göre Karşılaştırılması 42
5. TARTIŞMA 44
5.1 Sonuçlar 46
6. KAYNAKLAR 48
7. EKLER……..….61
7.1 Özgeçmiş 61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

FDA : Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
PDAK : Pankreatik Duktal Adenokarsinom
AJCC : American Joint Committee on Cancer
TNM : Tümör nod metastaz
DMSO : Dimetilsülfoksit
FBS : Fetal bovine serum
BSA : Bovine serum albümin
DMEM : Dulbecco’s Modified Eagle Medium

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hirudo spp. sülüklerin çekmenleri ve sindirim sistemi anatomisi ……... 5

Şekil 2.2. *Hirudo verbana'*da kokon yapısı ……..……..... 7

Şekil 2.3. Tıbbi sülüklerin sinir sistemi yapısı ……...….. 8

Şekil 2.4. *Hirudo verbana* görünüşü ……....…….. 11

Şekil 2.5. Pankreasın konumu ve anatomisi ……... 15

Şekil 3.1. Cam kavanozlarda muhafaza edilen *Hirudo verbana*……..…..... 21

Şekil 3.2. Tıbbi sülüklerin bakımı, sularının değiştirilmesi ……..…. 22

Şekil 3.3. Bağırsak zarlarının sıcak suda bekletilmesi …… 22

Şekil 3.4. Tıbbi sülüklerin özel solüsyon ile beslenmesi ……...……. 23

Şekil 3.5. Tıbbi sülüklerin içi buz dolu kapta bekletilmesi ……. 23

Şekil 3.6. Tıbbi sülük salgılarının soğutucuda bekletilmesi ……...… 24

Şekil 3.7. Sülük salgılarının liyofilizatöre alınması ……...…….……... 24

Şekil 3.8. Katı hale getirilmiş sülük salgısı ……. 25

Şekil 3.9. Spektrofotometre cihazı ……...…….. 26

Şekil 3.10. Santrifüj cihazı …….……...…….. 27

Şekil 3.11. Dilüe adilmiş MIA PaCa-2 hücre çözeltisi …… 27

Şekil 3.12. MIA PaCa-2 hücreleri içeren çözeltilerin vortkes cihazında karıştırılması ….. 28

Şekil 3.13. Laminer akış kabini ……..……...….. 31

Şekil 3.14. İnkübatör cihazı ……..……..……. 31

Şekil 3.15. MIA PaCa-2 hücre hattının invert mikroskopla incelenmesi ……..……. 32

Şekil 3.16. MIA PaCa-2 hücre kültürü olan Hücre sayım lamı ……..…… 32

Şekil 3.17. Otomatik hücre sayım cihazı ……..……... 33

Şekil 3.18. 96 Kuyucuklu plaka üzerine ekim yapılmış MIA PaCa-2 hücreleri …….. 33

Şekil 3.19. XTT cihazı ……...…. 34

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler ve etkileri …… 9

Tablo 2.2. Pankreas kanseri değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri …..…….. 16

Tablo 2.3. Pankreas kanseri klinik / radyolojik evreleme ……...……...…… 19

Tablo 2.4. Pankreas kanseri TNM sınıflaması ……... 19

Tablo 2.5. AJCC Pankreas kanseri evrelemesi ….……...…... 20

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve marka model listesi ……...…… 28

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler üretici firma listesi ...….. 29

Tablo 4.1. 24. saat 3 tekrar XTT cihazı ile yapılan okuma verileri …… 35

Tablo 4.2. 24. Saatteki sitotoksik etki ……..……...…… 36

Tablo 4.3. 48. saat 3 tekrar XTT cihazı ile yapılan okuma verileri ……...…... 36

Tablo 4.4. 48. Saatteki sitotoksik etki …….……...…… 37

Tablo 4.5. 72. saat 3 tekrar XTT cihazı ile yapılan okuma verileri …… 37

Tablo 4.6. 72. Saatteki sitotoksik etki …….……...…… 38

Tablo 4.7. 24. Saatteki tıbbi sülük konsantrasyonları ve hücre canlılığı oranları ……..…. 39

Tablo 4.8. 24. Saatteki IC_{50} Değeri ……...….. 39

Tablo 4.9. 24. Saatteki IC_{50} Grafiği ……...……... 40

Tablo 4.10. 48. Saatteki tıbbi sülük konsantrasyonları ve hücre canlılığı oranları ……..… 40

Tablo 4.11. 48. Saatteki IC_{50} Değeri …….…….. 40

Tablo 4.12. 48. Saatteki IC_{50} Grafiği ……..……. 41

Tablo 4.13. 72. Saatteki tıbbi sülük konsantrasyonları ve hücre canlılığı oranları ……..….41

Tablo 4.14. 72. Saatteki IC_{50} Değeri …….……. 41

Tablo 4.15. 72. Saatteki IC_{50} Grafiği ……...……..…….. 42

Tablo 4.16. Zamana göre tıbbi sülük ekstraktının hücre canlılığına etkisi …….....…… 42

1. GİRİŞ

Kanserlerin sebep olduğu ölümler tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir (WHO, 2023). Kanser vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu oluşan, çevre şartlarından ve kalıtımdan etkilenen karmaşık bir hastalıktır (Baykara, 2016). Kanser, bir tek organı etkilediği gibi birçok organa yayılım göstererek bu organları da etkisi altına alabilmektedir. Kanser tedavilerinde uygulanan tedavi şekilleri standart olarak belirlenmiş olsa da farklı kanser türleri için farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Her insanın DNA yapısının birbirinden farklı olması kanser tedavi metotlarında çeşitlenme sağlamaktadır. Kanser tedavilerinde; kemoterapi, immünterapi, gen terapisi, radyoterapi yöntemleri ve cerrahi yöntemler tek başlarına ya da birlikte uygulanmaktadır (Fitzmaurice vd. 2015; Pavlopoulou vd. 2015).

Teşhisi ve tedavisi kolay olmayan pankreas kanseri, dünyada görülen tüm kanser türleri arasında en yaygın görülen on dördüncü kanser türü olup mortalitelik sıralamasında ise diğer tüm kanser türleri arasında yedinci sırada baş göstermektedir. (Modi ve Shires, 2020; McGuigan vd., 2018). Pankreas kanserinin %85-90'ı hızlı yayılma özelliği göstermekle birlikte yakın dokulara ve hatta uzak organlara metastaz yapabilme yetisine sahip duktal adenokarsinomalardır (Wolfgang vd., 2013; Modi ve Shires, 2020). Pankreas kanseri vakalarının %60 -70'inde kanserleşme pankreasın başında, %15'inde pankreasın gövde kısmında ve %15'inde ise pankreasın kuyruk kısmında yer almaktadır (McGuigan vd., 2018).

Hastalıkların tıbbi sülükler kullanılarak tedavi amaçlı kullanılmasına hirudoterapi denir (Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Tedavi; tıbbi sülüklerin kendileri kullanılarak veya sülük salgılarının ekstraksiyon yöntemi ile elde edilip kullanılmasıyla uygulanmaktadır. Tıbbi sülük salgılarından elde edilen biyoktif bileşenler bazı ilaçların içeriğini oluşturmaktadır. Bu biyoaktif bileşenler hücresel aktiviteleri olumlu yönde etkilemektedir. Günümüze değin yapılan çalışmalarla sülük salgısında tespit edilen biyoaktif bileşen sayısı 100'ün üstündedir (Baskova vd., 2008). Tıbbi sülüklerin tükürük salgılarında tespit edilen vazodilatörler, antikoagulant maddeler, antiinflamatuvar maddeler, analjezik ve bakteriyostatik maddeler; bağışıklık sisteminin güçlenmesinde, kan basıncının düzenlenmesinde, organ ve dokuların hasar görmüş hücrelerinin onarılmasında olumlu etkilerinin olduğu görülmektedir (Gödekmerdan vd., 2011; Ünal ve Erol, 2022). Amerika

Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tıbbi sülüklerin tedavi amacıyla kullanılmasına 2004 yılında onay vermiştir (Trak, 2019). Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı, 2014 yılında Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp yönetmeliği çıkararak tıbbi sülüklerin kullanılmasını düzenleme altına almıştır (Geleneksel, Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği, 2014).

Yaptığımız bu çalışma ile *Hirudo verbana* türü tıbbi sülükten elde ettiğimiz salgı ekstraktının pankreas kanseri hücre hattı (MIA PaCa-2) üzerindeki in vitro etkisi araştırılarak bundan sonra yapılacak çalışmalara katkı sunması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tıbbi Sülükler

2.1.1 Tıbbi Sülükler ve Hirudoterapinin Tarihçesi

Tıbbi tedavi amacı ile sülüklerin kullanılması çok eski çağlara dayanmaktadır (Işık ve Aksoy, 2012). Tedavi amaçlı sülüklerin kullanılmasıyla ilgili ilk yazılı belge milattan önce 600 yılında Hindistan'da yazılmıştır. Milattan önce 14. yüzyıldan kaldığı bilinen Mısır duvar resimlerinde tedavi amaçlı olarak sülüklerin kullanıldığı tasvirlenmiştir. Yine Babillere ait yazılı kaynaklarda, milattan önce 15. yüzyıllarda tedavi amaçlı sülük kullanımından bahsedilmiştir. Tedavi amaçlı tıbbi sülük kullanılması Mayalar, Aztekler, Yunanlılar ve Mezopotamyalılar gibi çok eski uygarlıklarda; Eski Hindistan, Arap ve Roma medeniyetlerinde sıklıkla görülmüştür (Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018).

11.yüzyılda yaşayan İbni Sina sülük tedavisini geniş çaplı olarak incelemiş olup El Kanun Fi't Tıb (Tıbbın Kanunu) isimli kitabında sülükler hakkında bilgiler vererek birçok hastalığın tedavisinde bu sülüklerin kullanılabileceğini ifade etmiştir. İbni Sina'nın bu eseri 18. yüzyıla kadar Avrupa'nın birçok ülkesinde ders kitabı olarak okutulmuştur (Sert vd., 2015).

1754 yılında İsveçli bilim adamı Linnaeus tedavi amaçlı kullanılan sülükler için *Hirudo medicinalis* ismini kullanmıştır (Linnaeus, 1789; Küçük ve Yaman, 2019; Sert vd., 2015). 1884 yılında Haycraft isimli bilim adamı sülük salgısında bulunan antikoagülan etkideki hirudinin ismindeki maddenin varlığını tespit etmiştir. Avrupa'da tıpta tedavi amaçlı tıbbi sülüklerin kullanılması 18. ve 19. yüzyıllarda çok yaygınlaşmıştır. (Işık ve Aksoy, 2012).

Çok eski medineyetlerden itibaren tedavi amacıyla tıbbi sülüklerin kullanılması halen devam etmekte ve pek çok sayıda çalışmanın konusunu oluşturmaktadır (Ünal vd., 2023). Günümüzde tıbbi sülüklerin hastane ve kliniklerde hastalıkların tedavisine yardımcı olarak kullanılması Fransa, Rusya, Almanya, İngiltere ve İsviçre başta olmak üzere ABD, Kanada ve Hollanda gibi birçok ülkelerde giderek artmakta olduğu görülmektedir (Arusan vd., 2013). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 2004 yılında tıbbi sülüklerin tedavi amacıyla kullanılmasına onay vermiştir. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı Geleneksel

ve Tamamlayıcı Tıp yönetmeliği çıkararak bu konuda düzenlemeler yapmıştır (Geleneksel, Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği, 2014).

2.1.2 Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri

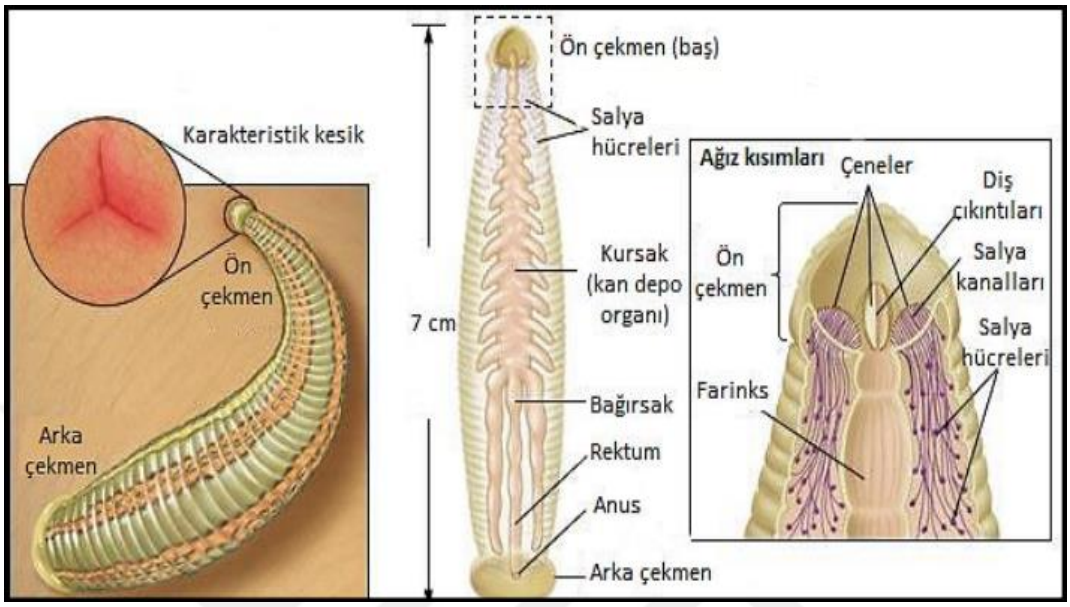
Tıbbi sülükler, Annelida şubesinin Clitellata sınıfı ve Hirudinea alt sınıfı içerisinde yer almaktadırlar. 800'ün üzerinde türü olan sülüklerin yalnızca 15 üyesi tıbbi sülük olarak tanımlanmıştır (Kvist vd., 2013). Ülkemizde doğal yaşam alanlarında *Hirudo verbana* ve *Hirudo sulukii* olmak üzere iki tip tıbbi sülük türü görülmektedir (Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Tıbbi sülüklerin çoğunluğu *Hirudo* cinsi içerisinde yer alırlar (Elliott ve Kutschera, 2011; Kvist vd., 2013). Şu ana kadar *hirudo* cinsi içerisinde 8 tıbbi sülük tanımlanmış olup bu sülükler; *H. medicinalis, H. nipponia, H. tianjinensis, H. verbana, H. orientalis, H. troctina, H. sulukii, H. verbana*dır (Utevsky vd., 2010; Liu vd., 2013; Saglam vd., 2016; Wang vd., 2022) *Hirudo* cinsi içerisinde yer almayan tıbbi sülükler de bulunmakta olup bunlara *Macrobdella decora, Hirudinaria granulosa, Hirudinaria manillensis, Limnatus paluda* ve *Whitmania pigra* örnek olarak verilebilir (Liu vd., 2013; Zulhisyam vd., 2015; Khalili vd., 2021; Haq vd., 2021; Müller vd., 2022).

Sülüklerin bir kısmı predatör olarak beslenen (*Heamopis spp, Whitmania spp*. vb.) bir kısmı ise parazit olarak beslenen (*Hirudo spp*., *Glossiphonia spp*.) karnivor canlılardır. Hirudo cinsi sülükler kan emerek ektoparazit olarak beslenirler. Bataklık, göl ve dingin sular gibi tatlı su alanlarında omurgalıları hareket sensörleri ve ısı ile tespit ederek bu canlılara tutunurlar ve bu canlıların kanları ile beslenirler (Elliott ve Kutschera, 2011; Hildebrandt ve Lemke, 2011; Lemke ve Vilcinskas, 2020).

Sülüklerde posterior çekmen ve anterior çekmen olmak üzere iki çekmen bulunmaktadır. Posterior çekmen tutunma ve hareket işlevinden dolayı anterior çekmene göre daha büyük ve daha kaslı yapıdadır. Sülüğün konakçıya tutunması çoğunlukla posterior çekmen ile olurken anterior çekmen ise bu sırada hareketli olup reseptörleri ile kanın emileceği bölgeyi tespit ederler (Dickinson ve Lent, 1984; Whitaker vd., 2005; Elliott ve Kutschera, 2011; Ayhan vd., 2021).

Konakçıya tutunan sülüklerde beslenme fonksiyonu sülüğün ağzında bulunan üç çenesiyle konakçının derisine atılan kesikle başlar. Konakçının kanı, sülüğün ağız boşluğundan ritmik ve faringeal kasılmalarla sülüğün kursağına gelerek burada depolanır.

Beslenme sırasında sülüğün konakçıda tutunduğu süre boyunca kan akışının kesintisiz devam etmesi için konakçının vücuduna içerisinde çok sayıda enzim ve biyoaktif madde bulunan salya salgılanır (Lent vd., 1988; Whitaker vd., 2005; Ayhan vd., 2021).



Şekil 2.1. *Hirudo* cinsi tıbbi sülüklerin çekmenleri ve sindirim sistemi anatomisi (Britannica Encyclopaedia, 1999; Haq vd., 2021)

Sülüklerin emmiş olduğu kanın vücutlarında aylarca kalması ve sindirimin yavaş gerçekleşmesinde simbiyotik bakterilerin etkin olduğu var sayılmaktadır. Aeromanas sp. ve Rikenalla-like bakteriler gibi simbiyotik bakteriler birçok araştırmacı tarafından sülüklerin sindirim ve boşaltım sistemlerinde izole edilmişlerdir. Bu bakterilerin üreme sırasında anaç sülükten kokana, kokondan da yavru sülüklere geçtiği var sayılmaktadır (Graf vd., 2006; Nelson ve Graf, 2012; Maltz vd., 2014; Lemke ve Vilcinskas, 2020).

Türlerin dağılımlarında sıcaklık, yağış, coğrafi izolasyon gibi ekolojik faktörler rol oynamaktadır. (Kutschera ve Elliott, 2014; Utevsky vd., 2009, 2010). *H. medicinalis* Avrupa tıbbi sülüğü olarak isimlendirilen kuzey yarım kürede ve kuzey kesimlerde yaşayan sülük türüdür. Batıda İngiltere'den doğuda Rusya Federasyonu içerisinde kalan Altay bölgesine kadar uzanan kuzeyde İsveç ve Norveç'e güneyde ise Hırvatistan, Romanya ve Sırbistan'ın kuzey kesimlerine kadar dağılım gösterir (Utevsky vd., 2010). *H. orientalis* İran ve Orta Asya bölgeleri ile Transkafkasya ülkerinde, *H. troctina* İspanya ve Kuzey Afrika ülkelerinde, *Hirudinaria manillensis* Güneydoğu Asya ülkelerinde dağılım göstermektedir (Petrauskienė vd., 2011; Trontelj ve Utevsky, 2012; Utevsky vd., 2010). *H. sulukii*

Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Adıyaman, Batman ve Gaziantep civarında yayılım göstermekte olup Türk tıbbi sülüğü olarak bilinmektedir (Saglam vd., 2016; Özbay vd., 2022). *H. verbana* güney tıbbi sülüğü olarak isimlendirilmekte olup İtalya'dan başlayarak Akdeniz, Balkanlar ve Türkiye'den Orta Asya'ya kadar uzanan alanda yayılım göstermektedir (Utevsky vd., 2010; Petrauskienė vd., 2011).

Sülüklerin vücut yapısı dorso ventral yassılaşmış ve segmentli yapıdadır. Vücutlarında daima 34 segment bulunur. Segmentler anterior ve posteriorde çekmen (vantuz) şeklindedir. Anterior çekmen baş ve ilk iki segmentten oluşurken posterior çekmen ise arka kısımdaki son sekiz segmentten oluşur. 9. 10. ve 11. Segmentin olduğu bölgeler klitellar bölge olup dişi ve erkek üreme organları bu segmentlerin olduğu bölgede bulunur. Sülüklerde gövde bölümü 12. ve 26. segmentler arasında kalan ve 15 segmentten oluşan vücutlarının en büyük kısmıdır. Sülüklerde seta yapısı bulunmazken vücut renkleri genelde siyah, zeytin yeşili, kahverengi ve kırmızıdır (Kaestner 1967; Barnes 1974; Sawyer 1986; Davies 1991; Sağlam 2000).

Sülüklerde 5 çift göz olup bunlar vücutlarının anterodorsalinde hilal biçiminde sıralanmıştır (Dickinson ve Lent, 1984; Kutschera ve Elliott, 2014; Wollina vd., 2016). Gözlerin bazı hareketleri ve ortamın ışık yoğunluğunu algılayabildiği fakat bunlardan yüksek çözünürlükte görüntü oluşturamadığı düşünülmektedir (Phillips vd., 2020). Ağız kısmı ön çekmende bulunmuş olup Y biçiminde 3 çeneden oluşur. Bu çenelerde 100'ün üzerinde küçük kesici dişler vardır (Whitaker vd., 2005; Wollina vd., 2016; Kuo ve Lai, 2018). Sülüklerin herhangi bir yere tutunmasında ve hareketinde ise arka çekmen görev alır (Whitaker vd., 2005; Kutschera vd., 2010; Kuo ve Lai, 2018).

Sülükler poikiloterm canlılar olup 0 ℃ ile 30 ℃ arasındaki sıcaklıklar arasında yaşayabilirler. Yaşadıkları ortamdaki ani sıcaklık değişimleri sülüklerde ölümlere sebep olabilmektedir. Suda çözünmüş klor miktarı çok düşük oranlarda olsa dahi sülüklerde mortaliteye sebep olabilmektedir (Abdullah vd., 2012). Sülükler havadaki oksijeni ve suda çözünmüş oksijeni vücut yüzeylerinden almaktadırlar (Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018; Aloto ve Eticha, 2018).

Sülükler sürünme, yüzme ve dalgalanma olmak üzere üç tip hareket gösterirler. Sürünme hareketi arka çekmenin bir yüzeye tutunmasıyla başlar. Serbest duruma gelen ön çekmenden uzayan sülük ağız kısmındaki vantuzları ile yüzeye tutunur. Bu sefer de arka çekmen tutunduğu yüzeyi bırakıp serbest duruma geçip ön çekmene doğru kendini uzatır ve

yüzeye tutunur. Bu işlemlerin tekrarlanmasıyla yer değiştirme işlemi yaparlar. Dalgalanma hareketini su içerisinde vücutlarını ileri geri ve sağa sola sallayarak veya titreterek yaparlar. Yüzme hareketini ise dorsa-ventralden dalgalanma yaparak gerçekleştirirler (Kaestner, 1967; Çağlar, 1973; Barnes, 1974; Demirsoy, 1982; Sağlam ve Sarıeyyüpoğlu, 1998). Sülükler hermafrodit canlılar olup kendi kendilerini dölleyemezler, birbirlerinin yumurtalarını karşılıklı olarak dölleyebilirler. (Whitaker vd., 2005; Sket ve Trontelj, 2008; Rio vd., 2009; Sawyer, 2020). Yumurtalarını bırakmak için Temmuz Eylül ayları arasında nemli toprağa geçiş yaparlar. Ebeveynler yumurtalarını korumak, yumurtadan çıkan yavrularını beslemek için kokon denilen yapılar oluştururlar. Bu kokonlarda albümin içerisinde dağılmış halde yumurtalar bulunur. Klitellum bölgesinden salgılanarak oluşan kokonların çevresi darbelere ve predatörlere karşı koruyucu ve kokon çevresindeki nemi düzenleyici süngerimsi bir maddeyle kaplıdır. Süngerimsi yapı yumurtaların etrafını saran bir köpük gibi görünse de nemli toprakla ve hava ile temaslarında katılaşırlar (Sket ve Trontelj, 2008; Zhang vd., 2008; Hildebrandt ve Lemke, 2011; Kutschera ve Elliott, 2014; Saidel vd., 2018).

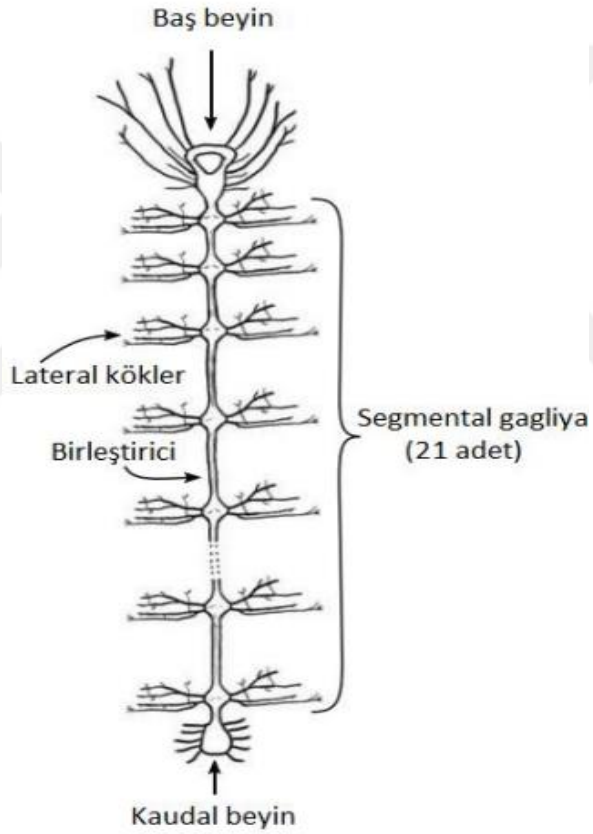


Şekil 2.2. *Hirudo verbana*da kokon yapısı (Fotoğraf; Dr. Hüseyin Ayhan)

Her bir kokonun içerisinde 3 ile 30 arasında embriyo bulunabilir. Yumurtaların kuluçka süresi yaklaşık 4 hafta olup bu yumurtalar içerisinde yoğun miktarda albümin bulunan besleyici bir sıvı içerisinde bulunurlar. Yavruların ortalama ağırlıkları 12-60 mg,

ortalama boyları 8-12 mm arasında değişmektedir. Kuluçka döneminin bitmesiyle birlikte yavrular kokonlardan ayrılarak suya geçiş yapmaktadırlar (Kutschera ve Roth, 2006; Sket ve Trontelj, 2008; Rio vd., 2009; Elliott ve Kutschera, 2011; Hildebrandt ve Lemke, 2011; Kutschera ve Elliott, 2014).

Sülüklerin sinir sistemleri ventral bir sinir kordonu, segmental sinir düğümü, baş sinir düğümü ve kaudal sinir düğümünden oluşur. Kaudal sinir düğümünün arka çekmeni kontrol ettiği tahmin edilmektedir. Ortalama 21 tane segmental düğüm bulunmakla birlikte bu düğümlerin her biri 400 nörondan oluşmaktadır (Wagenaar, 2015).



Şekil 2.3. Tıbbi Sülüklerin Sinir Sistemi Yapısı (Wagenaar, 2015).

2.1.3 Tıbbi Sülüklerin Etki Mekanizması

Tıbbi sülüklerin tedavi edici etkileri vücuttan aldıkları kandan değil, kanı emerken insan vücuduna verdikleri salgılarından ileri gelmektedir. Tıbbi sülüklerin salgılarında terapötik etkiye sahip sayıları 100'ün üzerinde olan biyoaktif madde tanımlanmıştır. (Arusan ve ark., 2013; Das, 2014).

Tablo 2.1. Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler ve etkileri (Das, 2014; Ayhan ve Mollahaliloğlu 2018; Alaama vd., 2011; Flecken ve Michalsen, 2007).

Biyoaktif Madde	İşlevleri
Hirudin	Trombine bağlanarak kan koagülasyonunu inhibe eder
Calin	Von Willebrand faktörünün kolajene bağlanmasını bloke ederek kan koagülasyonunu inhibe eder, kollajen aracılı trombosit agregasyonunu inhibe eder.
Destabilaz	Monomerik aktivite ile fibrini eritir, trombolitik etki gösterir.
Hirustatin	Kallikrein, triptin, kimotriptin ve nörofolik cathepsin G'yi inhibe eder.
Bdellinler	Anti inflamatuardır. Plazmin, tristin ve akrosin'i inhibe eder.
Hyaluronidase	İnterstisyel viskoziteyi artırır ve antibiyotik etkisi gösterir.
Tryptase inhibitor	Mast hücrelerinin proteolitik enzimlerini inhibe eder.
Eglinler	Anti inflamatuardır. α-Kimotripsin, kimaz, subtilisin, elastaz ve katepsin G'nin etkinliğini inhibe eder.
Faktör Xa inhibitörü	Moleküler yoğunlukları aynı kompleksler oluşturarak pıhtılaşma faktörü Xa'nın aktivitesini inhibe eder.
Karboksipeptidaz-A	Isırık bölgesinde kan akışını arttırır.
Asetilkolin	Vazodilatördür.
Histamin Benzeri Maddeler	Vazodilatör olup, Isırık bölgesinde kan akışını arttırır.

Hirudin, tıbbi sülüklerin salgıladığı temel bileşenlerden biri olup trombine bağlanarak kanın pıhtılaşmasını engelleyici özelliği vardır (Papavramidou vd. 2009).

Calin, Von Willebrand faktörünün kollajene bağlanmasını önleyerek kanın koagülasyonunu engeller (Küçük ve Yaman 2019).

Destabilaz, fibrinin ve kan pıhtılarının erimesinde etkili olan lizozim karaktere sahip enzimdir (Nikonov ve Titova 1999).

Hirustatin, ilk olarak *Hirudo medicinalis'*ten alınmış olup kallikrein, tripsin, katepsin G ve kimotripsini inhibe ederek reperfüzyon oluşumunu arttırır. (Abdisa 2018).

Bdellinler, anti-inflamatuar özellikte olup plazmin, tripsin ve akrosini inhibe ederek kanama süresini uzatan bileşiktir (Das 2014).

Hyaluronidaz enzimi viskoziteyi azaltarak sülük tarafından dokulara enjekte edilmiş bileşenlerin geçirgenliğini artırırır ve difüzyonu kolaylaştırır. Kanama halindeki kanın ve dokularda meydana gelen fazla sıvıların lokal anestezisinin oluşmasında etili olmaktadır (Sawyer ve Edwards 1989; Hovingh ve Linker 1999; Menzel ve Farr 1998).

Tryptase inhibitörü, mast hücrelerinin proteolitik enzimlerini inhibe etmekle sorumludur (Das 2014).

Eglinler; anti-inflamatuar özellikte olup kimaz, elastaz, katepsin G, alfa-kimotripsin ve subtilinsini inhibe ederek etkinliklerini azaltır (Zaidi vd. 2011).

Faktör Xa inhibitörü, pıhtılaşma zincirine etkide bulunarak faktör Xa' yı inhibe eder ve bunun sonucunda anti kuagülan özellik gösterir (Eldor vd., 1996).

Asetilkolin, sülüğün uygulandığı yerde vasküler dilatasyon oluşmasına neden olarak kan akışını artırıp, dolaşımın devamlılığını sağlar (Andreas ve Gustav, 2011).

Histamin benzeri maddeler, vazodilatör etki göstererek sülüğün uygulandığı yerde kan akışını arttırmada görevlidir (Zaidi vd., 2011).

2.1.4 Hirudo Verbana

Hirudo verbana türü tıbbi sülüğün sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (Schoch vd., 2020; ITIS, 2022).

Alem: Animalia
Şube: Annelida
Sınıf: Clitellata
Takım: Hirudinida
Aile: Hirudinidae
Cins: *Hirudo*
Tür: *Hirudo verbana* (*Carena*, 1820)

*Hirudo verbana'*da dış görünüş yeşil, kırmızı, sarı ve siyah renklerden oluşmakla birlikte ventralde koyu yeşilin hâkim olduğu bazen ventralin orta kısmında siyah benek şeklinde desenlerin görüldüğü gözlemlenmiştir. Dorsalin kenar kısımlarında kırmızı-turuncu ve siyah desenler bulunurken orta kısmında ise yoğun bir kahverengi ve yeşil renklenme görülür. Lateralde ise yine siyah desenler görülür (Sağlam, 2019).



Şekil 2.4. *Hirudo verbana*

Hirudinidae familyasının Hirudo cinsi içerisinde yer alan sülük türü olan *Hirudo verbana* Avrupa kıtasında İsviçre ve İtalya'dan başlayarak Türkiye ve Özbekistan'a kadar dağılım gösteren, Türkiye'de ise özellikle Yeşilırmak ve Kızılırmak deltaları başta olmak üzere sulak alanlarda yayılım gösterirler (Sağlam, 2011; Utevsky, 2009; Ceylan ve Çetinkaya, 2021).

*Hirudo verbana*da her bir segmentte bir çift göz olmak üzere toplam on göz bulunmaktadır. Bu gözler sülüklerin anterodorsalinde siyah noktalar halinde hilal şeklinde dizilmişlerdir. Dorsal yüzeylerinin rengi siyah olmasından dolayı gözlerin ayırt edilmesi zordur. Gözlerin ilk üç çifti arka arkaya sıralanmış iken dördüncü ve beşinci çifti aralarındaki iki halkayla birbirinden ayrılmışlardır (Sağlam 2019).

2.2 Kanser

2.2.1 Kanserin Tarihçesi

Bilinen en eski kayıtları milattan önce 3000 yılına dayanan kanser insan ve hayvanlarda sık görülen ve ciddi sorunlara neden olan bir hastalıktır. Latince 'carcinos' ve 'canker' kelimelerinden türetilmiş olan kanser kelimesi yengeç anlamına gelmektedir. Bu kelimeyi ilk olarak Hipokrat milattan önce 3. yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş haldeki damarları yengecin bacaklarına benzeterek türetmiştir (Baykara, 2016).

Türk tıp tarihine bakıldığında ise kansere 'seretan' denilmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi Kenzüsıhhatül Ebdaniye adlı kitabında seretanı küçük yumru ya da fındık büyüklüğünde etrafı damarlı, ağrılı bir hastalık olarak tanımlamıştır. Şerafettin Sabuncuoğlu'nun Cerrahiye-i İlhaniye adlı kitabında ise seretanların etrafının dağlanarak seretanlı bölgenin kesilip atılması önerilmektedir. Uzun zamandır duran büyük seratanların dağlanmaması gerektiği vurgulanırken seratanın yara olması durumunda ise yara üzerine kurflun veya tutya merhemi sürülmesini önerilmektedir. (Ünver,1938).

Avrupa'da Rönesansla birlikte kanserin tanımlanması ile ilgili yeni çalışmalar olmuştur. Dönemin ünlü cerrahı Ambroise Paré malign tümörleri, bulunduğu yerin elemanlarından oluşan etin fazla büyümesi olarak tanımlamıştır. (Yener,1973) Kanser üzerinde ilk bilimsel çalışma Marcello Malpighi (1628-1694) tarafından mikroskobik inceleme ile başlamıştır (Bettmann, 1956). Morgagni, (1682-1771) günümüzde bilinen birçok kanser türünü tanımlayarak birincil tümörleri ikincil tümörlerden ayırmıştır (Yener, 1973). 17. yüzyılda yaşayan hekimler ile birlikte kanser dokunulmaması gereken bir hastalık olmaktan çıkarılmıştır (Bettmann, 1956).

19. yüzyılın başlangıcında Marie François Xavier Bichat (1771-1802) patolojik anatominin temellerini atarak tümörler için 'normal örgülere benzeyen iğreti örgü' ifadesini kullanmıştır. Ayrıca tümöral yapıda parankim ve strumayı da tanımlamıştır. 18. yüzyılda lenfatik sistemin bulunmasıyla birlikte tümörlerin oluşumundan lenf sıvısının sorumlu olduğu düşüncesi yaygınlaşmıştır. Dönemin bilim insanlarından John Hunter'la birlikte lenf bezlerinin çıkarılması kanser tedavilerinde uygulanmaya başlamıştır. Laönnec (1781-1826) vücudun normal yapısına benzeyen tümörleri homolog, benzemeyenleri ise heterolog tümör adını vererek tümörlerin ilk anatomik sınıflandırmasını yapmıştır (Yener, 1973).

19. yüzyılın başlarında mikroskobun da kullanılmasıyla birlikte kanserle ilgili yapılan çalışmalar artmış bunun sonucunda tıpta onkoloji bölümü ortaya çıkmıştır. Rudolw Virchow onkolojinin patolojiyle alakalı olduğunu savunmuştur. Cerrahi yöntemlerle insan vücudundan alınan parçalar incelenerek hastalıklar üzerinde teşhisler yapılmaya başlanmıştır (Bayrak, 2010)

2.2.2 Kanser ve Oluşum Mekanizmaları

Günümüzün en yaygın ve en bilinen hastalıkları arasında yer alan kanser; insan vücudundaki hücrelerin kontrol edilemez bir biçimde çoğalmasıyla sonucu oluşan, kalıtım ve çevre şartlarından etkilenen karmaşık bir hastalıktır (Baykara, 2016).

Kanser, hücrelerin anormal bir şekilde çoğalması sonucu vücudun herhangi bir bölümünde oluşup o bölümü aşarak birçok organa yayılabilen hastalık çeşididir. Metastazlar kanserli hücrelerin yayılma süreci olup kanserden ölümlerin birinci nedeni olarak kabul edilmektedir (WHO, 2022).

Kanserli kitleler cerrahi bir müdahale ile alınmadıkça, kemoterapi veya tedavide kullanılan ilaçlar kullanılmadıkça, radyasyon tedavisi uygulanmadıkça yayılmaya ve büyümeye devam edeceği vurgulanmaktadır. Bununla beraber bazı kanserli hücreler azalarak kendiliğinden de yok olabilmektedir. Bu durum bazı melanomlarda ve böbrek kanserlerinde meydana gelebilen nadir durumlardır (Roy ve Saikia, 2016).

Kanseri meydana getiren birçok neden olmakla beraber; bunların % 85-90'lık kısmı canlı hücrelerdeki DNA'nın mutajenlere maruz kalması, onarılamayan kötü değişikliklerle birlikte replikasyonda hataların oluşması ile %10-15'lik kısmının ise genetik olarak bireylere gen yoluyla aktarılarak meydana geldiğini ifade edilmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanserler meydana geldiği hücre tiplerine göre beş ana grupta toplanmaktadır. Bunlar;

- Sarkoma: Kıkırdak, kemik, yağ, kas veya kan damarları gibi bağ ve destek dokularda meydana gelen kanser türleridir.
- Karsinoma: Deride veya iç organları kaplayan hücrelerde meydana gelen kanser türleridir. Adenokarsinoma ve bazal hücre karsinoma gibi alt türleri bulunmaktadır.
- Lösemi: Kemik iliğinde üretilen anormal hücrelerin kan dokuya geçmesi sonucu oluşan kanser türleridir.

- Lenfoma ve miyelom: İmmün sistem hücrelerinde oluşan hasar sonucu meydana gelen kanser türleridir.
- Beyin ve omurilik: Merkezi sinir sisteminde meydana gelen kanser türleridir (Cancer Research UK.,2024).

Kanser, üç dış ajan grubunun genetik faktörlerle etkileşimi sonucu meydana gelmektedir. Bu üç dış ajan grubu;

- Ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kansorejenler,
- Asbest, tütün dumanı bileşenleri, alkol, aflatoksin, arsenik vb. gibi kimyasal kansorejenler
- Belirli virüs, bakteri ve parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlara bağlı olan biyolojik kansorejenler olarak sınıflandırılmaktadır (WHO, 2022).

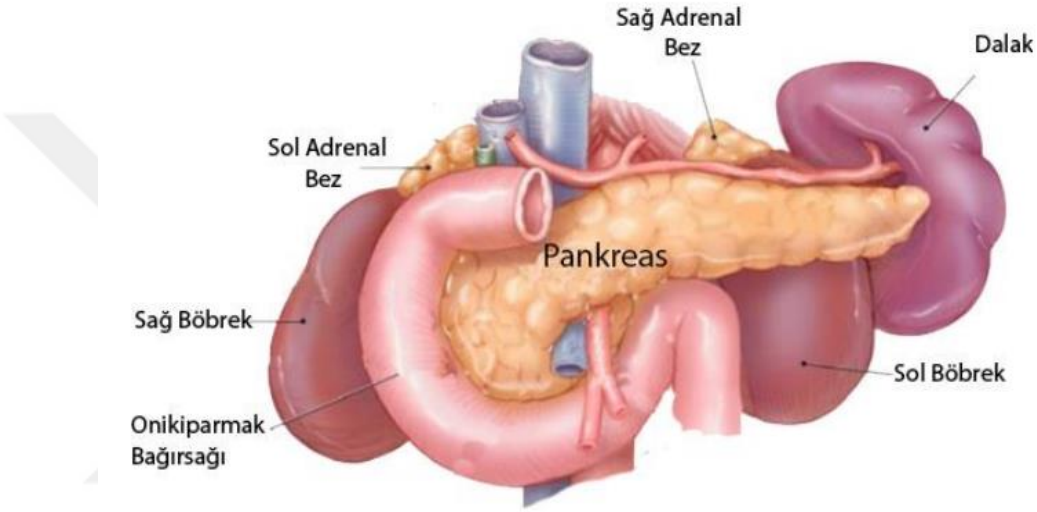
Sigara vb. tütün kullanımı, sağlıksız beslenme, alkol tüketimi, hareketsiz yaşam tarzı ve hava kirliliği kanserde başlıca risk faktörleri olarak değerlendirilir. Hepatit B ve Hepatit C virüsleri, bazı HPV tipleri sırasıyla karaciğer ve rahim ağzı kanseri riskini artırmaktadır. Kanserlerin %30 ila %50'sinin bu risk faktörlerinden kaçınarak kanıtlanmış önleme stratejileri uygulayarak önlenebileceği vurgulanmıştır. Kansere neden olan risk faktörleri aşağıdaki uygulamalarla azaltıla bilinmektedir.

- Tütün kullanımından kaçınmak,
- Sağlıklı vücut ağırlığını korumak,
- Meyve ve sebzelerin dahil olduğu sağlıklı beslenmek,
- Düzenli hareketli yaşama dikkat etmek,
- Alkol kullanımından kaçınmak,
- Aşılamanın önerildiği risk grubunda olanların HPV ve Hepatit B'ye karşı aşı olmak,
- Ultraviyole radyasyon ve güneşin zararlı ışınlarından korunmak,
- Hava kirliliğine maruz kalmayı azaltmak (WHO, 2022).

2.2.3 Pankreas ve Pankreas Kanseri

Pankreas, midenin arkasında abdomenin üst kısmında yer alan bir organdır. Ortalama 100 gram ağırlığında ve 14 ile 20 cm arasında uzunluğa sahiptir. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmı onikiparmak bağırsağının yanında yer alırken kuyruk kısmı ise dalağa kadar yayılmaktadır. Organ olarak %95'inin üstü dış salgılar

(ekzokrin) salgılamakla, %1-2'si ise iç salgılar (endokrin) salgılamakla görevlidir (Longnecker, 2014). Endokrin dokusunu Langerhans hücreleri oluşturmakta olup bu hücreler vücuttaki insülin, glukagon, pankreatik polipeptit ve somatostatin hormonlarını salgılamakla görevlidir. Pankreas tarafından üretilen iç salgılar kana geçerek enerji metabolizmasında ve enerji depolanmasında düzenlenme görevi üstlenir (Longnecker, 2014; Teitelman vd., 1993). Ekzokrin dokusunu, asiner ve duktal hücreler oluşturmakta olup bu hücreler; sindirimi gerçekleşmesine ve mide pH'ının düzenlenmesine yardımcı olan amilaz, lipaz ve proteolitik enzimleri salgılamaktan sorumludur. (Longnecker, 2014; Schulz, 1980).



Şekil 2.5. Pankreasın konumu ve anatomisi (Longnecker, 2014)

Teşhisi ve tedavisi zor olan pankreas kanseri, dünyada görülen kanser türleri arasında en yaygın on dördüncü kanser türü olup ölümcüllük sıralamasında ise diğer kanser türleri arasında yedinci sırada gelmektedir. (Modi ve Shires, 2020; McGuigan vd., 2018). Pankreas kanserinde tümörler; %60 ila %70'inde pankreasın baş bölgesinde, %15'inde pankreasın kuyruk bölgesinde ve %15'inde ise pankreasın gövde bölgesinde yer almaktadır (McGuigan vd., 2018).

İnsanların yaşamları boyunca pankreas kanserine yakalanma risk oranları yaklaşık %1,6 oranındadır. Ülkelere göre farklılık göstermekle beraber insidans oranları her yıl %0.5 ile % 1 oranında artış gözlemlenmektedir. Eğitim düzeylerine göre gelişmekte olan ülkelerde düşük insidans görülürken eğitim düzeylerine göre gelişmiş ülkelerde ise yüksek insidans ile karşılaşılmaktadır (Daniel, 2018; Ilic, 2016; T.C. Sağlık Bakanlığı İstatistikleri Yıllığı 2018). Pankreas kanseri 40-85 arası ileri yaşlarda ortaya çıkmakla beraber genellikle

erkeklerde görülen ve mortalitesi yüksek bir kanser türüdür (Wolfgang, 2013; IARC, 2018). Ülkemizde kadınlarda pankreas kanseri görülme insidansı 2016 yılında yüz binde 3.6 iken erkeklerde ise yüz binde 5.7'dir. Erkelerde görülme insidansı 2002 yılında yüz binde 3.1'lerde olması bu oranın 2016 yılında ise yüz binde 5.7'lere yükselmesi vakalarda ciddi bir artışı göstermektedir. Erkeklerde görülen tüm kanser türleri arasındaki oranı %2.2 olmakla beraber en sık görülen on kanser türünden biridir (T.C. Sağlık Bakanlığı İstatistikleri Yıllığı, 2018; Göral, 2014).

Pankreas kanserine yakalanan hastalar arasında sağ kalım oranına; yaş, cinsiyet, sağlık bakımın kalitesi, yaşantı ile ilgili alışkanlıklar ve kansere eşlik eden başka hastalıkların olup olmaması etki etmektedir. Bunlarla birlikte kanserin sonucunu etkileyen en önemli faktör kanserin evresidir. Pankreas kanserinin belirtileri geç ortaya çıkmakla beraber hastaların %20'si tanı konduğunda tümör rezektabl olarak sonuçlanması gerekmektedir (Ilic, 2016)

Pankreas kanserinde risk faktörleri, değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri olarak iki grupta değerlendirilir. Bu faktörler Tablo 2.2' de belirtilmiştir (Zhao Z, Liu W., 2020).

Tablo 2.2. Pankreas kanseri değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri (Zhao ve Liu, 2020).

Pankreas Kanseri Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	**Pankreas Kanseri Değiştirilebilir Risk Faktörleri**
Yaş	Sigara
Cinsiyet	Alkol
Irk- Etnik Köken	Kronik Pankreatit
Kan Grubu	Obezite
Aile Öyküsü ve Genetik Yakınlık	Diyet Faktörleri
Diyabet	Enfeksiyon
Mikrobiata	

Pankreas kanserine nelerin tam olarak sebep olduğu bilinmemekle birlikte risk etmenleri tanımlanmıştır. Pankreas kanserine yakalanmış hastaların % 30'nun sigaradan kaynaklı kansere yakalandığı tahmin edilmektedir (Daniel, 2018). Sigara kullanımı kansere

yakalanmada çok önemli bir risk faktörü olup sigara kullananların pankreas kanserine yakalanma oranı sigara kullanmayanlara göre 2,2 kat fazla olduğundan söz edilmektedir (Wolfgang, 2013; Ilic ve Ilic, 2016; Göral, 2014).

Uzun süreli şeker hastalığı olan kişilerin pankreas kanserine yakalanmaları sağlıklı insanlara göre iki kat fazla olduğundan bahsedilmektedir. Ayrıca ilerleyen yaşlarda yeni başlamış şeker hastalığının da pankreas kanserinin belirtisi olabileceği göz ardı edilmemelidir (Göral, 2014; Lowenfels, 2006).

Hareketsizlik, fiziksel aktivitelerin yetersizliği, aşırı alkol kullanımı, siroz, kolesistektomi, petrol türevleri ve kimyasal maddelere maruz kalma pankreas kanseri riskini artırdığı görülmüştür (Çetin ve Dede, 2019; Şahin ve Cindoruk, 2019).

A, B, AB kan gruplarının 0 kan grubuna oranla pankreas kanserine yakalanmada daha riskli kan grupları olduğu bildirilmiştir (McGuigan vd., 2018; Ilic ve Ilic, 2016).

Pankreas kanserleri, ekzokrin ve endokrin hücrelerinden ileri gelebilmektedir. Bu hücrelerden meydana gelen endokrin ve ekzokrin tümörler histolojik özellikleriyle ayırt edilebilirler. Endokrin tümörler ekzokrin tümörlere göre daha az görülen ve tüm pankreas kanserleri arasındaki oranı %5'ten az olan tümörlerdir. Endokrin tümörler pankreas kanserleri arasında daha yaygın görülen pankreas adenokarsinomuna göre kıyaslandığında ortalama 27 ay sağkalım ve daha düşük oranda ölüm riski seyreden tümörlerdir (Fesinmeyer vd., 2005).

Çoğunlukla pankreas adacık hücrelerinde meydana gelen endokrin tümörler yüksek oranda pankreas hormonları üretirler. Üretilen bu hormonlar hücrenin tipine ve salgıladıkları hormonlara göre glukagonomalar, gastrinomalar ve insülinomalar gibi alt türlere ayrılabilirler. Endokrin tümörler deri döküntüleri ve hipoglisemi gibi semptomlarla kolaylıkla teşhis edilebilinmektedir (Xhan vd., 1998).

Pankreas ekzokrin hücrelerinden kaynaklanan ekzokrin tümörler, endokrin tümörlere daha yaygın görülen tümörlerdir. Ekzokrin tümörlerin çoğunluğunu oluşturan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK), pankreasa ait tüm kötü huylu tümörlerin de %90'nından fazlasını oluşturmaktadır. PDAK'ler pankreas kanalında bulunan epitelyal hücrelerden meydana geldikleri için bez benzeri bir görünüşe sahiptir (Fesinmeyer vd., 2005).

PDAK kanser tipleri çoğunlukla karaciğere ve lenf düğümlerine metastaz yaparlar (Kern vd., 2002). PDAK tip tümörler, kanserin erken evrelerinde semptom göstermemeleri sebebiyle çoğunlukla geç teşhis edilirler. Buna bağlı olarak da kanserin metastaz yapmış olabileceği, bu nedenle kanserin tedavisinde kullanılan yöntemlerin daha az etkili olabileceği kabul görmektedir (Fesinmeyer vd., 2005). Metastatik PDAK hastaları için günümüzde gemcitabine/nab-paclitaxel, modifiye folinik asit, irinotecan, irinotecan/fluorouracil, fluoracil, oxaliplatin, gemcitabine/capecitabine ve tek başına gemcitabine tedavileri uygulanmaktadır. Fakat bu kemoterapi uygulamalarının etkinliği sınırlıdır. Bu nedenle PDAK'lerin hücresel kökeni ve moleküler profili ile yapılan çalışmalar neticesinde onkologlara PDAK hastaları için kişiselleştirilmiş tedavi çalışmaları uygulamalarına yardımcı olmuştur (Taherian vd., 2022). Pankreas kanserine yakalanan hastalarda, hastalığın seyri ve uygun tedavinin belirlenmesi amacı ile kanser evrelendirilmesi yapılmaktadır (Tandoğan, 2012; Roalsø vd., 2020). Bu evrelendirmelerde genellikle TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tandoğan, 2012; Roalsø ve ark., 2020). Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) pankreas kanseri için evreleme kılavuzunun 8. baskısını 2016 yılında çıkarmıştır. Bu evreleme kılavuzuna göre T kategorisi, pankreas dışı yayılımdan bağımsız olarak birincil olarak tümör boyutuna göre sınıflandırma yapmıştır. Metastatik lenf nodlarının sayısı da kanserin seyrini etkilediği için N kategorisinin de alt kısımlara ayrılması gerektiği vurgulanmıştır (Roalsø vd., 2020; Song vd., 2018). Herhangi bir hastalığın varlığını veya olmayışını ise M kategorisi vurgulamaktadır (Ramzan vd., 2015).

Tedavi hastalığın klinik seyrine göre tümörün rezeke edilebilir olması, ileri evrede olması ya da metastatik durumda olmasına göre belirlenmektedir. Tablo 2.3' te klinik ve radyolojik sınıflamaya yer verilmektedir (Koçatakan ve Ataseven, 2021; Tandoğan, 2012; Braunwald vd., 2004). Radyolojik sınıflamaya göre ortalama sağ kalım 1. evre için 13-20 ay, 2. evre için 6-10 ay, 3. evre için ise 3-6 aydır (Verslype vd., 2006). Evre 1A'dan evre 2B'ye kadar olan tümörler rezeke edilebilirken evre 4 olan tümörler rezeke edilemezler. Evre 3 olan tümörler ise durumlarına göre rezeke edilebilir veya rezeke edilemez olarak değerlendirilir (Ramzan vd., 2015).

Tablo 2.3. Pankreas kanseri Klinik / Radyolojik Evreleme

Pankreas Kanserlerinde Klinik / Radyolojik Evreleme	
EVRE I**:** Rezektabl	T1, T2, Seçilmiş T3 / Nx / M0
EVRE II**:** Lokal İleri Evre	T3, T4 / Nx, N1 / M0
EVRE III**:** Metastatik Evre	T1, T2, T3, T4 / Nx, N1 / M1 (karaciğer, periton, akciğer)

Pankreas kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım yüzdeleri; birinci ve ikinci evre için %23,3, üçüncü evre için %8,9, dördüncü evre için ise %1,8 olarak bildirilmektedir (Fisher vd., 2022). Güncel yapılan çalışmalarda sağkalım oranları birinci evre için %61, ikinci evre için %25, üçüncü ve dördüncü evre için ise %5 olarak belirtilmiştir (Shakeel vd., 2020). Pankreas kanseri TNM sınıflaması Tablo 2.4' te yer almaktadır.

Tablo 2.4. AJCC 8. Baskıya göre pankreas kanserlerinde TNM sınıflaması (Roalsø vd., 2020; Shin ve Kim, 2020; Van Roessel vd., 2018; Song vd., 2018; Kang vd, 2022)

TNM Sınıflaması	**Primer Tümör**
Tx	Değerlendirelemeyen tümör
T0	Tümör bulgusu yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Max. Tümör çapı ≤ 2 cm
T1a	Max. Tümör çapı ≤ 0.5 cm
T1b	Max. Tümör çapı >0.5 , ≤ 1 cm
T1c	Max. Tümör çapı >1 , ≤ 2 cm
T2	Max. Tümör çapı >2 , ≤ 4 cm
T3	Max. Tümör çapı > 4 cm
T4	Tümör Çölyak Arter veya SMA'yı invaze eder. (unrezektabl tümör)
Bölgesel Lenf Nodu	
NX	Değerlendirilemeyen Bölgesel Lenf Nodu

N0	Bölgesel Lenf Nodu metastazı yok
N1	1-3 Bölgesel Lenf Nodu metastazı
N2	≥ 4 Bölgesel Lenf Nodu metastazı
Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Pankreas kanseri AJCC evrelemesi Tablo 2.5' te verilmiştir

Tablo 2.5. AJCC 8. Baskıya göre pankreas kanserlerinde evreleme (Roalsø vd., 2020; Shin ve Kim, 2020; Van Roessel vd., 2018; Song vd., 2018; Kang vd, 2022)

EVRE	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1, T2, T3	N1	M0
III	T4	Herhangi N	M0
IV	Herhangi T	N2	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M1

3. MATERYAL VE YÖNTEM

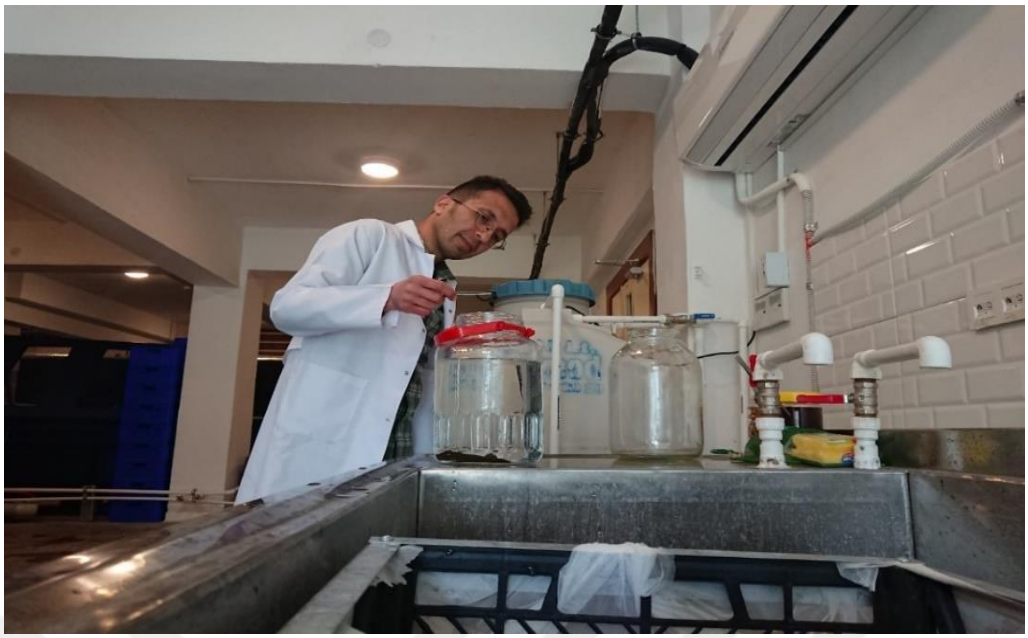
3.1 Tıbbi Sülüklerin Temini ve İncelenmesi

Çalışma kapsamında kullanacağımız tıbbi sülüklerin türü *Hirudo verbana*dır. Bu sülükler Tarım ve Orman Bakanlığından onaylı sülük çiftliklerinden temin edilmiştir. Temin edilen sülüklerin morfolojik olarak tür tayinleri yapılmış *Hirudo verbana* türüne ait oldukları teyit edilmiştir. Sülükler dinlendirilmiş çeşme suyuyla doldurulan cam kavanozların içerisine konulmuştur.



Şekil 3.1. Cam kavanozlarda muhafaza edilen *Hirudo verbana* türü sülükler

Kavanozların içerisindeki sülükler çalışmanın yapılacağı güne kadar + 22°C ila + 25°C arasında laboratuvarda muhafaza edilmiştir. Kavanozların kapağı delinerek sülüklerin hava almasına olanak sağlanmıştır. Ayrıca tıbbi sülüklerin doğrudan güneş ışığından etkilenmeleri önlenmiştir. Bu süre içerisinde 2 güne bir suları değiştirilmiştir.



Şekil 3.2. Tıbbi sülüklerin bakımı ve sularının değiştirilmesi

3.2 Sülük Salgısının Elde Edilmesi

Çalışma kapsamında kullandığımız sülükler beslenmesi yapılmamış aç sülüklerdir. Sülüklerin beslenmesi için 0.07 M NaCl ve 0.0005 M arginin içeren solüsyon hazırlanmıştır (Abdualkader, 2011). İçerisine solüsyon koyacağımız suni bağırsak zarı tedarikçi firmadan satın alınmıştır. Çalışmaya başlamadan önce suni bağırsak zarları önce sıcak su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.3. Suni Bağırsak zarlarının sıcak suda bekletilmesi

Suni bağırsak zarlarının içleri solüsyon ile doldurulup uçları iple bağlanmıştır. Çalışmada kullandığımız sülüklerin vücut sıcaklıkları ortalama 37°C olduğu için sülüklerin beslenmesinde kullandığımız solüsyonun sıcaklığının da 37°C olmasına dikkat edilmiştir. İçlerinde solüsyon olan suni bağırsak zarları geniş bir kap içerisine koyulmuştur. Çalışma kapsamında kullanacağımız sülükler de beslenmeleri için bu bağırsak zarlarının üzerlerine bırakılmıştır. Sülükler anterior ve posterior çekmenleriyle bağırsaklara tutunmuşlardır. Beslenmeleri bittikten sonra suni bağırsak zarlarına tutunmayı bırakmışlardır.



Şekil 3.4. Tıbbi sülüklerin özel solüsyon ile beslenmesi

Sülükler bir pens yardımıyla bulundukları yerden alınarak boş temiz plastik bardaklar içerisine konulmuşlardır. İçlerinde sülük bulunan bu plastik bardaklar da içi buz ile dolu olan geniş bir plastik kap içerisine konulmuştur. Buzlu kap içerisinde belli bir süre durarak kusmaları sağlanmıştır.



Şekil 3.5. Tıbbi sülüklerin içi buz dolu kapta bekletilmesi

Kusmalarına yardım için sülükler posteriorlarından anteriorlarına doğru sağımları yapılarak salgıları temiz bir kap içerisinde toplanmıştır. Alınan tüm salgılar ağzı kapalı olacak şekilde temiz kaplar içerisinde -80°C de bir gün boyunca soğutucuda bekletilmiştir.



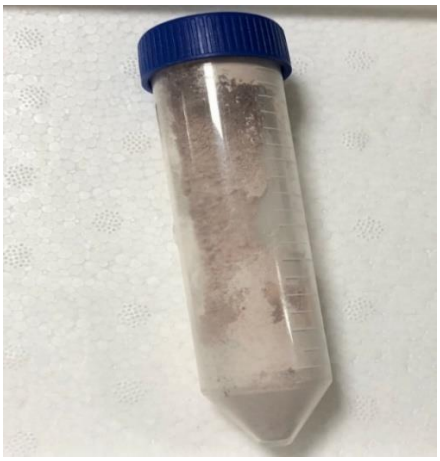
Şekil 3.6. Tıbbi sülük salgılarının soğutucuda bekletilmesi

3.3 Sülük Salgısının Liyofilize Edilmesi

Soğutucudan çıkarılan tıbbi sülük salgıları plastik kaplarla birlikte liyofilizatör cihazına koyulmuştur. Burada salgıların 48 saat gibi sürede katı toz haline getirilmesi sağlanmıştır. Bu işlem sırasında salgı içerisindeki bileşenlerin formları korunmuştur.



Şekil 3.7. Sülük salgılarının Liyofilizatöre alınması (Fotoğraf; Özgen Tural)



Şekil 3.8. Katı hale getirilmiş sülük salgısı (Fotoğraf; Dr. Hüseyin AYHAN)

Tıbbi sülükler tarafından kusulan renksiz tükürük sıvıları 0,8 µm'lik bir filtreden süzülerek bir havuzda toplanmış ve 3500 rpm ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Alınan salgılar -80°C 24 saat bekletilerek dondurulduktan sonra toz haline getirilmiştir. Sülük tükürük özütünün liyofilize edilip toplanmasından sonra, renksiz özüt 14.000 g'de santrifüj edilerek berraklaştırılmış ve üstteki sıvı 0,8 µm'lik bir filtreden süzülmüştür. Liyofilizatörde katı toz forma getirilen sülük salgısı DMEM ile sulandırılmıştır. Elde edilen bu sıvı, 0.22 µm'lik memranlı filtreden (ISOLAB) geçirilerek istenmeyen partiküllerden arındırılmıştır. Ardından 4°C'de 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatandan protein tayini yapılarak hücre kültüründe kullanılmıştır.

3.4 Tıbbi Sülük Ekstratında Toplam Protein Analizi

Tıbbi sülük ekstratında toplam protein analizi, Bradford tarafından uygulanan Bradford metoduna göre Bradford Protein Assay Kit (ABP Biosciences – A.B.D) kullanılarak yapılmıştır (Bradford 1976).

Protein ve boyanın birbirine bağlanmasına dayalı olan bu teknik, proteinlerin miktarlarının mikrogram cinsinden belirlenmesinde, yeterince hassas, hızlı ve pratik bir yöntemdir. Çalışma süresinin kısa olmasından dolayı protein kaybı mümkün olduğunca az olan bir tekniktir. Bu yüzden de protein ve peptit oranı yüksek olan tıbbi sülük salgıları için kullanılabilecek en iyi yöntemdir.

Bradford protein tayini metoduna göre yaptığımız çalışmamızda Coomassie Brillant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Sülük esktradı içerisindeki proteinlerden dolayı çözeltinin

rengi maviye dönüşmüştür. Spektrofotometrede toplam protein konsantrasyonu, sığır serum albüminine (Sigma Chemical, St Louis, ABD) karşı kalibrasyona dayalı olarak 595 nm'de bir kolorimetrik Bradford testi (Bio-Rad, CA, ABD) kullanılarak ölçüldü.



Şekil 3.9. Spektrofotometre cihazı (Firma kataloğu)

Bu bilgiler ışığında Bradford metodu ile protein tayini analizinde uygulama basamaklarımız aşağıdaki gibi olmuştur.

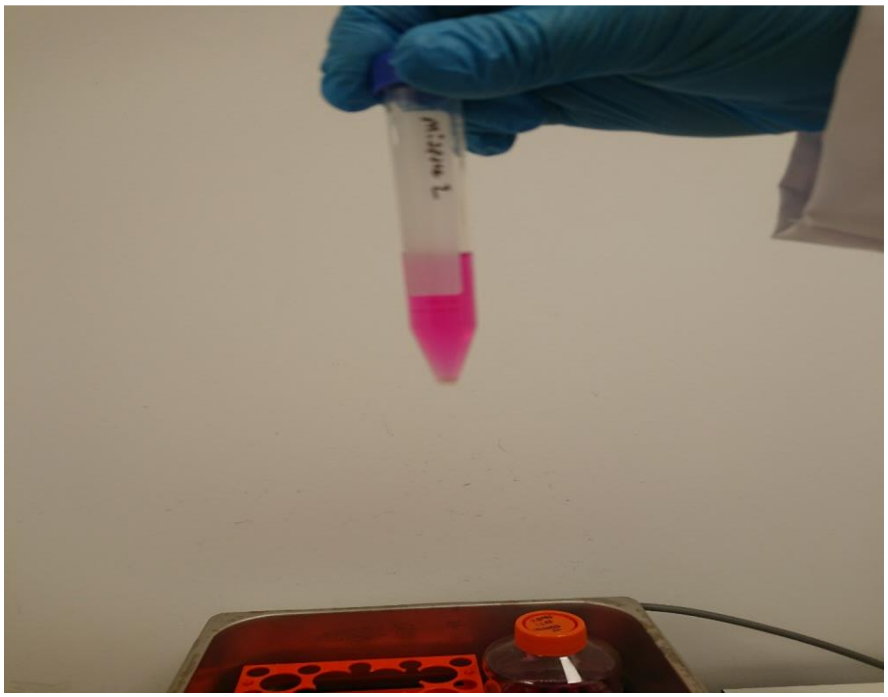
1- Çalışmada kullanılmak üzere konsantrasyonları 25 µg/ ml – 1500 µg/ ml arasında değişen 8 farklı dilüsyon hazırlanmıştır. (0-25-125-250-500-750-1000-1500 µg/ ml)

2- Testte kullanılan tüplere 30 µl sülük salgıları ve standartlar bir pipet yardımıyla dikkatlice eklenip etiketlenmiştir.

3- Cihazda okuması yapılacak tüplere 1.5 ml Bradford reaktifi eklenip iyice karıştırılmıştır.
4- Salgılar ve standartlar 37 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
5- Örnekler 595 nm absorbans değerinde köre karşı spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.
6- Protein miktarları standart eğri grafiğinden yararlanarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. Santrifüj Cihazı



Şekil 3.11. Dilüe adilmiş MIA PaCa-2 hücre çözeltisi



Şekil 3.12. Mia PaCa-2 Hücreleri içeren çözeltilerin vortkes cihazında karıştırılması

3.5 MIA PaCa-2 Hücre Hattının Temin Edilmesi

Çalışma kapsamında kullandığımız kanserli MIA PaCa-2 hücre hattı Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılmış kanserli hücre hattı insan kökenli, viral testleri yapılmış, steril ve çalışmaya başlayıncaya kadar – 80℃'de muhafaza edilmiştir

3.6 Çalışmada Kullanılan Araç – Gereçler ve Kimyasal Maddeler

Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve marka modelleri **Tablo 3.1.**'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve marka model listesi

Kullanılan Cihazlar	Marka / Model
+4 °C Buzdolabı	Arçelik
-20 °C Buzdolabı	Arçelik
-80 °C Buzdolabı	Sanyo
Liyofilizatör	Teknosem Toros TRS 2/2 V
İnvert Mikroskop	Leica DMIRB
Su Banyosu	Chicago Surgical and Electrical 1170

Santrifüj	Nüve NF815
Dondurma tüpleri (Croyogenic Vial)	Corning
Kuru buz makinası	AF 80/ Scatsman
Hassas Terazi	Adventurer Pro
CO2 'li inkübatör	Sanyo MCO-18AIC
Eliza çoklu plak okuyucu	Thermo Scientific
Vorteks	Nüve NM10
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	Costar
Eppendorf Mikrotüpü	Merck
Otomatik pipetler	Biologix
96 kuyucuklu plaka	Costar
75 cm2 hücre büyütme kapları	Thermo Scientific
Spektrofotometre	Hıtachı
Biyogüvenlik Kabini (2.seviye)	Nüve MN120
Hücre sayım lamı	Neubauer Haemocytometry
Serolojik Pipet Tabancası	Biologix
Serologic pipetler (5ml) tek kullanımlık	Greiner Cellstar
Serologic pipetler (10ml) tek kullanımlık	Greiner Cellstar
15 ml Centrifuge Tube kapaklı	Costar
50 ml Centrifuge Tube kapaklı	Costar
Pipet Ucu (1-200 µL)	Biologix
Pipet Ucu (100-1000 µL)	Biologix

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler **Tablo 3.2.'**de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler üretici firma listesi

Kullanılan Kimyasallar	Üretici Firma
Etil Alkol	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applichem
Fetal bovine serum (FBS)	Biological Insdustries
L-Glutamine	Capricorn Scientific
Goomessi blue G250	Abpbio
Bovine serum albumin (BSA)	Abpbio

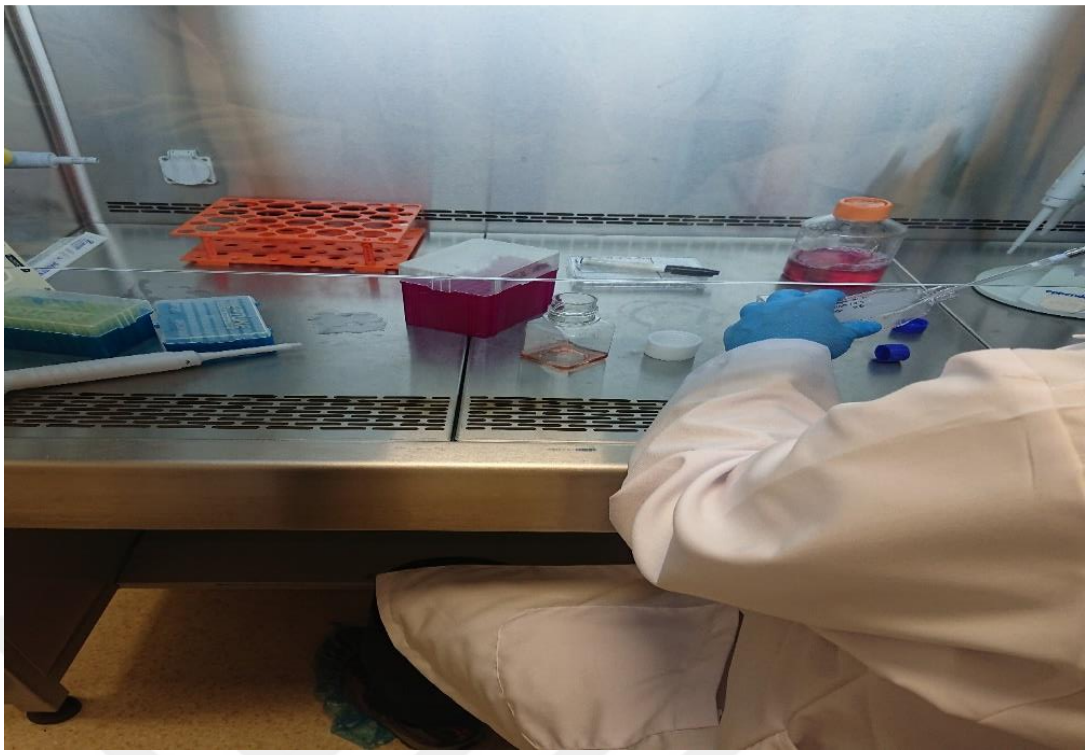
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Capricorn Scientific
Penicilin	Capricorn Scientific, PS-B
XTT cell proliferation Kit	Sartorıus
Tripsin	Capricom Scientific
µ-Plate Angiogenesis 96 Well	Ibıdi, Almanya

3.7 MIA PaCa-2 Hücrelerinin Çözülmesi İşlem Basamakları

- Çalışmada kullandığımız kanserli MIA Paca-2 hücresi -80°C derecede muhafaza edildiği dondurucudan çıkarılarak bir cryo tüp içerisinde su banyosuna alındı. Su banyosunda sıcaklığı 37°C'ye ulaşıncaya kadar tutulmaya devam edildi.
- Sıcaklığı 37°C'ye ulaşan hücreler su banyosundan çıkarıldı.
- Kontaminasyonu engellemek için hücreler laminer akış kabini içerisinde %70'lik alkolle strelize edildi.
- Çözünen hücre hattı bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 5 mL %10 serumlu medyum eklendi.
- Santrifüj tüpü içerisindeki karışım santrifüj cihazında dakikada 1000 devir olacak şekilde 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda tüpte üste kalan sıvı süzüntü kısım döküldü. Çökeltide oluşan dimetil sülfoksitin (DMSO) etkisini kaldırmak için tüp içerisindeki çökeltiye 5 mL %10 serumlu medyum ilave edilerek dakikada 1000 devir olacak şekilde 5 dk tekrar santrifüj işlemi yapıldı.
- Santrifüj işlemi sonunda hücrelerin flakslara ekimi yapıldı. Üzerlerine %10 serumlu medyan eklendi.

3.8 Hücre Kültürünün Hazırlanması

İnsandan alınmış kanserli MIA PaCa-2 hücre hattından hücre kültürünün hazırlanması laminer akış kabini içerisinde yapılmıştır.



Şekil 3.13. Laminer Akış Kabini

İçerisinde 500 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bulunan şişe içerisine 5 ml Penisilin-Streptomisin ve 50 ml FBS (fetal bovine serum) ilave edildi. Karışım birkaç kez çalkalanarak homojen bir şekilde karışması sağlandı. Hazırlanan besi yeri 75 cm^{2}'lik hücre hatları ile birlikte flakslara alınarak inkübatöre konuldu.



Şekil 3.14. İnkübatör Cihazı

Hücre hatları için haftada 3 kez rutin pasaj işlemleri yapılmıştır. Pasaj işlemlerinden sonra invert mikroskop ile hücre kültürleri incelenmiştir.



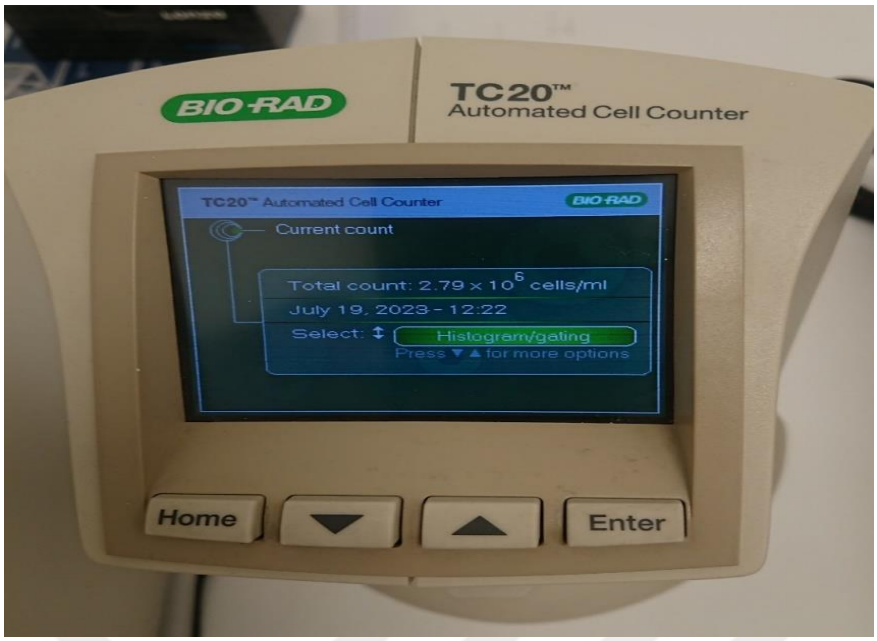
Şekil 3.15. MIA PaCa-2 hücre hattının invert mikroskopla incelenmesi

3.9 Hücre Sayımı

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazında hücre sayım lamı (hematositometre) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için Eppendorf tüpü içerisinde 10µl Trypan mavisi ve 10 µl hücre süspansiyonu bir pipet yardımıyla alınıp karıştırıldı. Hazırlanan bu karışımdan 10µl alınarak hücre sayım lamı üzerine konuldu. Hücre sayım lamı otomatik hücre sayım cihazı içerindeki yerine koyularak cihaz üzerinden sayım işlemi başlatıldı.



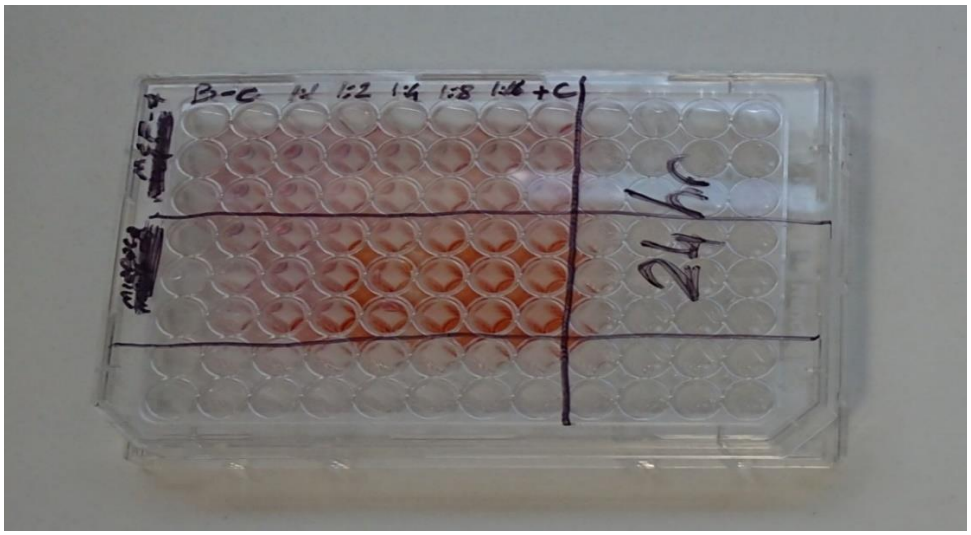
Şekil 3.16. MIA PaCa-2 hücre kültürü olan Hücre sayım lamı



Şekil 3.17. Otomatik Hücre Sayım Cihazı

3.10 Hücrelerin Plaklara Ekiminin Yapılması

Hücre sayımı işleminden sonra 96 kuyucuklu plaka üzerine 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı üçer tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara hücre ekimi işlemi yapıldı. 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml, 1200 µg/ml, blank grubu, pozitif grup ve negatif kontrol grubu olmak üzere 8 grupta ekim yapıldı. Negatif kontrol grubuna sadece hücre konularak etken madde konulmadı. Blank grubuna ise sadece medya solüsyonundan konuldu. 24. 48. ve 72. saatler için blank grubu dışındaki okuma yapılacak tüm kuyucuklara hücre ekimi yapıldı.



Şekil 3.18. 96 Kuyucuklu plaka üzerine ekim yapılmış MIA PaCa-2 hücreleri

3.11 Hücre Canlılığının XTT Yöntemi ile Ölçülmesi

Hirudo Verbana salgı ekstraktının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin gözlemlenmesi XTT cihazı ile ölçülmüştür. Hücre canlılığının gözlemlenmesi 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide tetrazolyum tuzu kullanılarak ölçülmüştür. Sarı renkteki bu tuz aktif haldeki hücrelerin metabolik aktiviteleri ile turuncu renge dönüşmektedir. XTT testi üretici firmanın uygulama talimatlarına uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

96 kuyucuklu plakta ekimi yapılan MIA PaCa-2 hücre hatları üzerine tıbbi sülük salgısı eklenerek bu plak XTT cihazının içerisine yerleştirilmiştir. Plak içerisindeki hücre canlılığı 450 nm ve 650 nm'de ölçülmüştür.

650 nm'de ölçülen değerler 450 nm'de ölçülen değerlerden çıkarılarak cihaz okuması tamamlanmıştır. Negatif hücre grubu olarak belirlediğimiz tıbbi sülük salgısı eklemediğimiz gruptaki hücrelerin canlılığı %100 var sayılarak diğer gruplardaki hücrelerin canlılık oranları da bu negatif hücre grubuna oranlanarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.19. XTT Cihazı

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığının XTT Testi ile Ölçülmesi

MIA PaCa-2 hücre hattı üzerine uygulanan 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml ve 1200 µg/ml konsantrasyonlarında kullandığımız *Hirudo verbana* salgı ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi XTT testi ile 450 nm ve 650 nm dalga boylarında okuma yapılarak ölçülmüştür. Hücre canlılığının yüzdesi, deney grubunun ortalama değerinin kontrol grubunun ortalama değerine bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Kontrol grubunun hücre canlılığı % 100 kabul edilmiştir.

4.1.1 MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Tıbbi Sülük Ekstraktının 24. Saatteki Etkisinin XTT ile Ölçülmesi

Tablo 4.1. 24. saat 3 tekrar XTT cihazı ile yapılan okuma verileri

24 Saat Tekrarlar	Kontrol	1200 µg/mL	600 µg/mL	300 µg/mL	150 µg/mL	75 µg/mL
1	0,4165	0,0948	0,1186	0,3953	0,3935	0,4006
2	0,3976	0,1008	0,1673	0,3357	0,3357	0,3670
3	0,3974	0,1232	0,1896	0,4027	0,4103	0,4134
Ortalama	0,4038	0,1063	0,1585	0,3779	0,3798	0,3937

Elde ettiğimiz bu verilerden yola çıkarak beş farklı konsantrasyondaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24. saatin sonunda hücre canlılığına etkisini hesaplayacak olursak;

1200 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.1063/0.4038) ×100 = 26.32

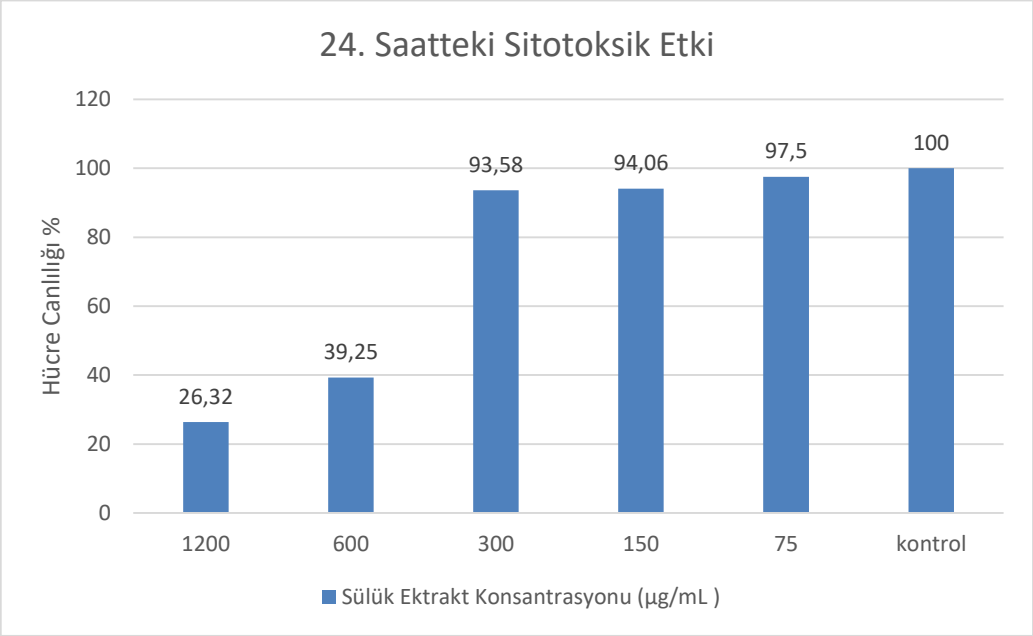
600 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.1585/0.4038) ×100 = 39.25

300 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.3779/0.4038) ×100 = 93.58

150 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.3798/0.4038) ×100 = 94.06

75 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.3937/0.4038) ×100 = 97.50 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2. 24. Saatin Sonundaki Sitotoksik Etki



4.1.2 MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Tıbbi Sülük Ekstraktının 48. Saatteki Etkisinin XTT ile Ölçülmesi

Tablo 4.3. 48. saat 3 tekrar XTT cihazı ile yapılan okuma verileri

48 Saat Tekrarlar	Kontrol	1200 µg/mL	600 µg/mL	300 µg/mL	150 µg/mL	75 µg/mL
1	0,8165	0,3074	0,2444	0,6843	0,7246	0,7376
2	0,8762	0,3680	0,3218	0,6015	0,6283	0,7096
3	0,8095	0,2932	0,2503	0,6473	0,6503	0,7486
Ortalama	0,8341	0,3229	0,2722	0,6444	0,6677	0,7319

Elde ettiğimiz bu verilerden yola çıkarak beş farklı konsantrasyondaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 48. saatin sonunda hücre canlılığına etkisini hesaplayacak olursak;

1200 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.3229/0.8341) ×100= 38,71

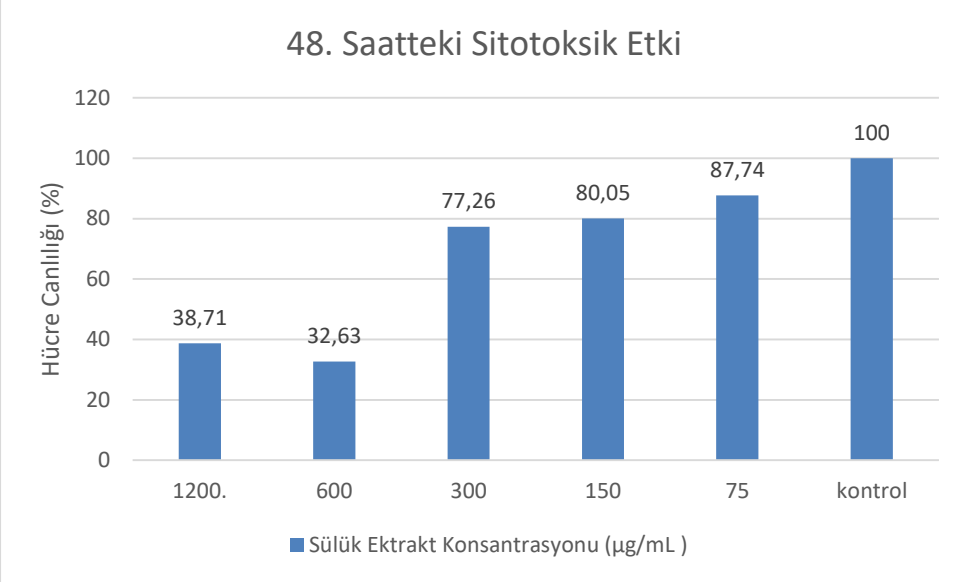
600 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.2722/0.8341) ×100= 32.63

300 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.6444/0.8341) ×100= 77,26

150 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.6677/0.8341) ×100= 80,05

75 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.7319/0.8341) ×100= 87,74 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.4. 48. Saatin Sonundaki Sitotoksik Etki



4.1.3 MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Tıbbi Sülük Ekstraktının 72. Saatteki Etkisinin XTT ile Ölçülmesi

Tablo 4.5. 72. saat 3 tekrar XTT cihazı ile yapılan okuma verileri

72 Saat Tekrarlar	Kontrol	1200 µg/mL	600 µg/mL	300 µg/mL	150 µg/mL	75 µg/mL
1	0,7370	0,1974	0,3093	0,7860	0,8453	0,7020
2	0,7715	0,2377	0,4569	0,6297	0,5183	0,5649
3	0,6535	0,2522	0,0865	0,4878	0,4472	0,6911
Ortalama	0,7207	0,2291	0,2842	0,6345	0,6036	0,6527

Elde ettiğimiz bu verilerden yola çıkarak beş farklı konsantrasyondaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 72. saatin sonunda hücre canlılığına etkisini hesaplayacak olursak;

1200 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.2291/0.7207) ×100= 31,79

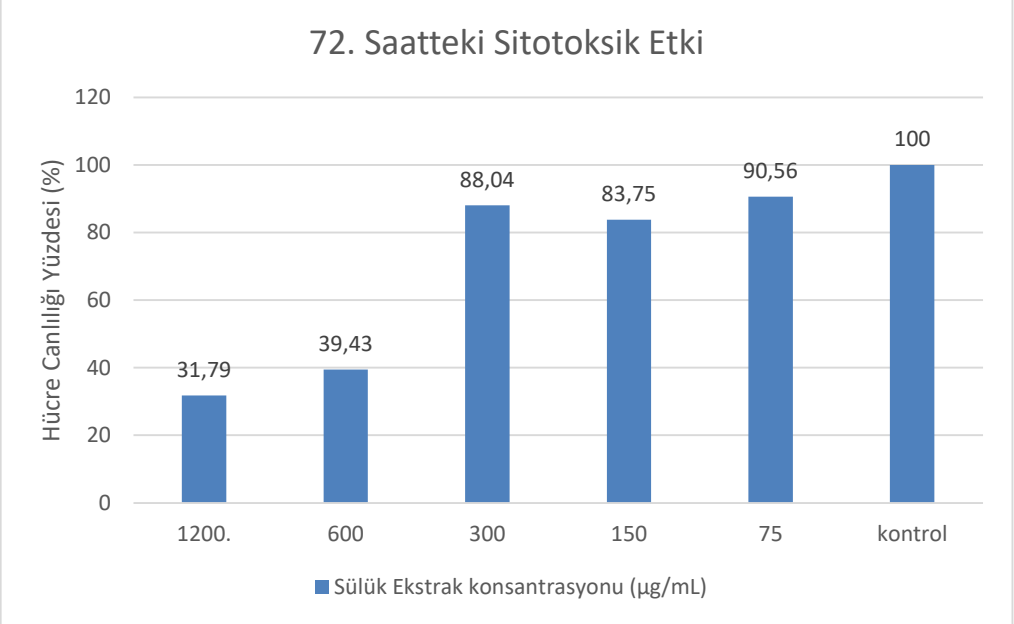
600 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.2842/0.7207) ×100= 39,43

300 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.6345/0.7207) ×100= 88,04

150 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.6036/0.7207) ×100= 83,75

75 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı yüzdesi = (0.6527/0.7207) ×100= 90,56 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.6. 72. Saatteki Sitotoksik Etki



4.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine Hirudo Verbana Salgı Ekstraktı Etkisi IC_{50} Değerinin Ölçülmesi

Farklı konsantrasyonlardaki *Hirudo verbana* salgı ekstraktlarının insan pankreas kanseri hücre hattı (MIA PaCa-2) üzerine etkisiyle, hücrelerin %50'sini inhibe etmesi için gerekli konsantrasyon değeri IC_{50} ile hesaplanmıştır. Elde edilen veriler sigmoidal eğri (S şeklinde) oluşturacak şekilde grafiğe aktarılmıştır. Grafiğin y eksenine hücre aktivitesi x eksenine ise konsantrasyon değerleri girilmiştir. Eğride %50 hücre canlılığının kestiği noktadaki konsantrasyon değeri IC_{50} değeri olarak bulunmuştur. Ayrıca IC_{50} değeri IC_{50}

calculatur programı ile sülük salgı konsantrasyon değerleri ve MIA PaCa-2 hücre canlılık değerleri programa girilerek hesaplanmıştır.

4.2.1. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine *Hirudo Verbana* Salgı Ekstraktı Etkisi 24. Saatteki IC_{50} Değerinin Ölçülmesi

İnsandan alınan MIA PaCa-2 kanserli hücre hattında 24. saatte hücrelerin %50 büyümesini inhibe edecek *Hirudo verbana* salgı ekstraktı konsatrasyon değeri 484,49 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

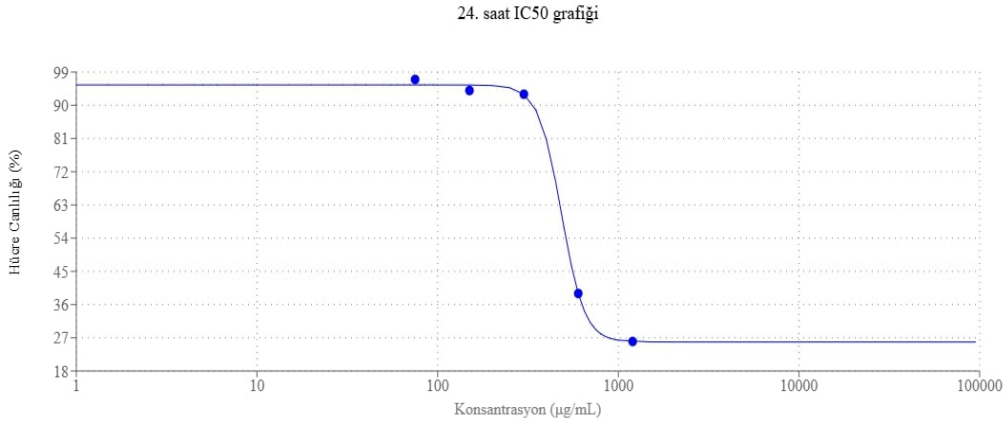
Tablo 4.7. 24. Saatteki tıbbi sülük konsantrasyonları ve hücre canlılığı oranları

Konsantrasyon (µg/mL)	Hücre Canlılığı (%)
1200	26,31
600	39,25
300	93,58
150	94,06
75	97,50

Tablo 4.8. 24. Saatteki IC_{50} Değeri

Parametre	Değer
IC_{50}	484.4881
Denklem	
Denklem	$Y = 25.8547 + \frac{95.5255 - 25.8547}{1 + \left(\frac{x}{484.4881}\right)^{6.8198}}$
Denklem Formu	$Y = min + \frac{Maks - Min}{1 + \left(\frac{X}{IC50}\right)^{Tepe\ katsayısı}}$

Tablo 4.9. 24. Saatteki IC_{50} Grafiği



4.2.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine *Hirudo Verbana* Salgı Ekstraktı Etkisi 48. Saatteki IC_{50} Değerinin Ölçülmesi

48. saatteki IC_{50} değeri 330,92 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

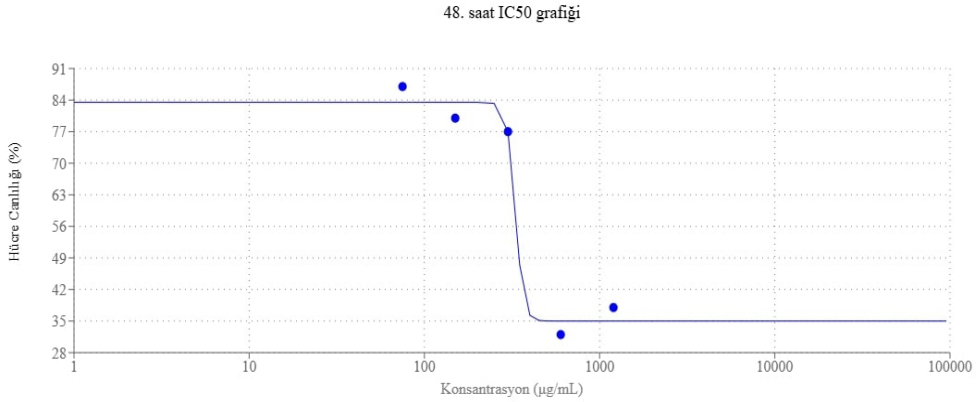
Tablo 4.10. 48. Saatteki tıbbi sülük konsantrasyonları ve hücre canlılığı oranları

Konsantrasyon (µg/mL)	Hücre Canlılığı (%)
1200	38,71
600	32,63
300	77,26
150	80,05
75	87,74

Tablo 4.11. 48. Saatteki IC_{50} Değeri

Parametre	Değer
IC_{50}	330.9155
Denklem	
Denklem	$Y = 34.9997 + \frac{83.4997 - 34.9997}{1 + (\frac{x}{330.9155})^{19.0249}}$
Denklem Formu	$Y = min + \frac{Maks - Min}{1 + (\frac{X}{IC50})^{Tepe\ katsayısı}}$

Tablo 4.12. 48. Saatteki IC_{50} Grafiği



4.2.3. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerine *Hirudo Verbana* Salgı Ekstraktı Etkisi 72. Saatteki IC_{50} Değerinin Ölçülmesi

72. saatteki IC_{50} değeri 542,75 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

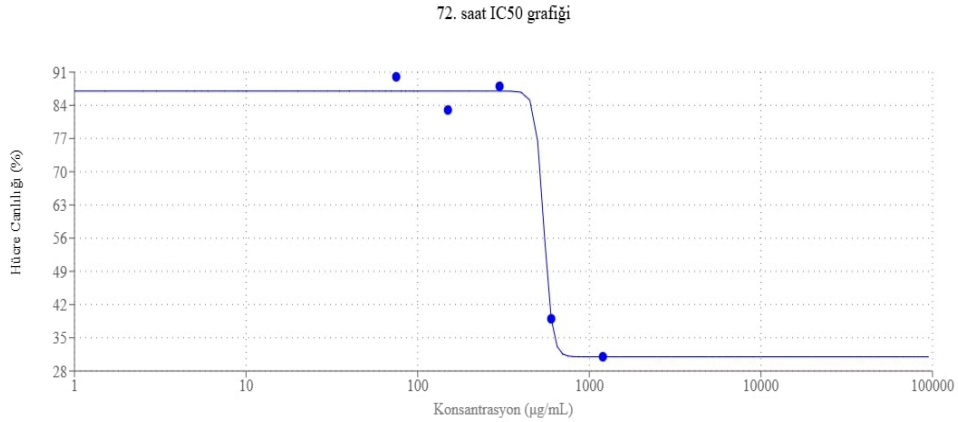
Tablo 4.13. 72. Saatteki tıbbi sülük konsantrasyonları ve hücre canlılığı oranları

Konsantrasyon (µg/mL)	Hücre Canlılığı (%)
1200	31,79
600	39,43
300	88,04
150	83,75
75	90,56

Tablo 4.14. 72. Saatteki IC_{50} Değeri

Parametre	Değer
IC_{50}	542.7473
Denklem	
Denklem	$Y = 31.0001 + \frac{87.0005 - 31.0001}{1 + (\frac{x}{542.7473})^{17.8669}}$
Denklem Formu	$Y = min + \frac{Maks - Min}{1 + (\frac{X}{IC50})^{Tepe\ katsayısı}}$

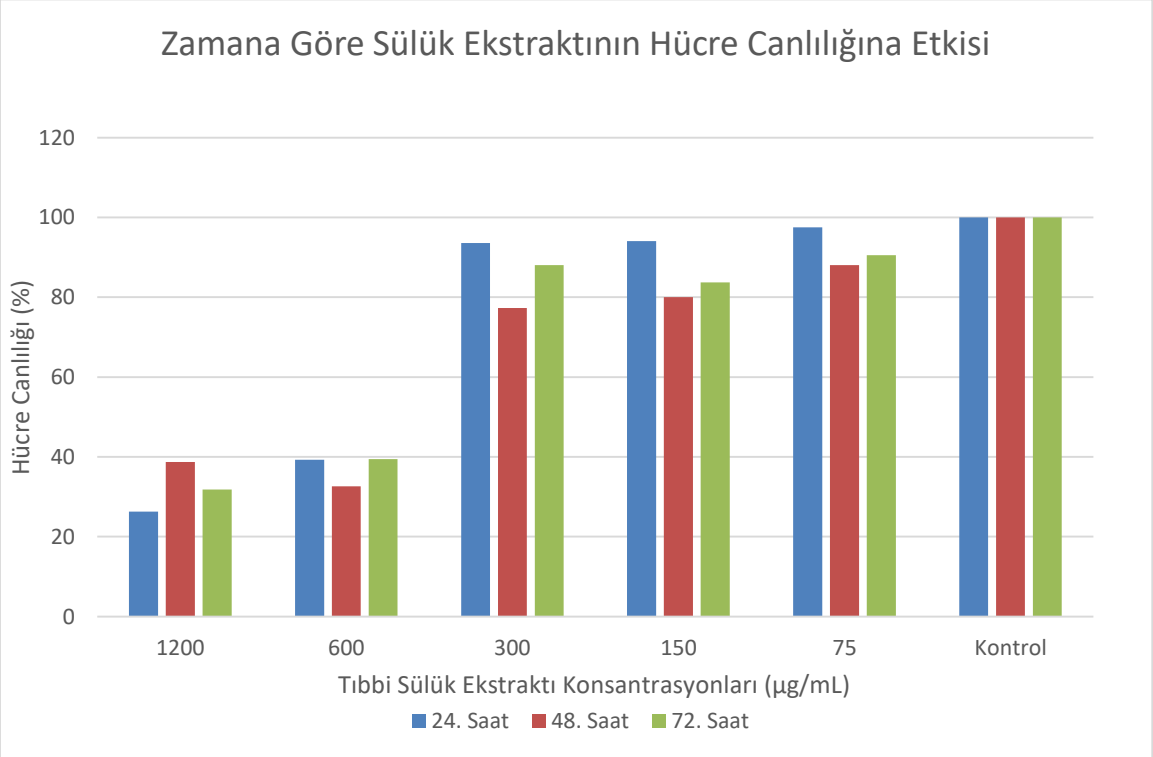
Tablo 4.15. 72. Saatteki IC_{50} Grafiği



4.3 Tıbbi Sülük Ekstrakt Konsantrasyonlarının Zamana Göre Karşılaştırılması

Hirudo verbana cinsi tıbbi sülüğünden aldığımız salgı ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerine etkisinin zamana göre değişimini gösteren grafik tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16. Zamana Göre Tıbbi Sülük Ekstraktının MIA Paca-2 Hücre Canlılığına Etkisi



Grafiğe batığımızda 1200 µg/mL ve 600 µg/mL konsantrasyonlardaki tıbbi sülük ekstraktlarının 24, 48 ve 72. saatlerde MIA Paca-2 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi görülürken düşük konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkinin görülmediği gözlemlenmiştir. 300 µg/mL, 150 µg/mL ve 75 µg/mL konsantrasyonlarındaki tıbbi sülük ekstraktları eklenen MIA PaCa-2 hücre hatlarının 24. saatteki hücre canlılığı % 90'nın üzerindeyken 48. saatteki hücre canlılığı %77 ile %88 arasında, 72. saatteki hücre canlılık değerleri ise % 83 ile % 90 arasında değişen seviyelerdedir.

5. TARTIŞMA

Günümüzde sülük salgılarıyla ve sülüklerin kendileriyle ilgili birçok bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ilaç üretiminde tıbbi sülüklerden yararlanılmaktadır (Gödekmerdan vd. 2011).

Hessein ve arkadaşları *H. malinensis* cinsi tıbbi sülük ile yaptıkları çalışmada bu sülüklerden alınan sülük salgısının prostat kanseri hücreleri üzerinde anti-tümör etkiye sahip olduğunu görmüşlerdir (Hessein vd., 2015).

Merzouk ve arkadaşları akciğer kanseri hücre hattı (SW1721) üzerine *H.malinensis* salgısının etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada kanser ilaçlarıyla tıbbi sülük salgısını birlikte kullanmışlardır. Kanser ilaçlarıyla birlikte kullanılan sülük salgısı uygulamasının, tek başına kanser ilacı kullanılarak yapılan uygulamaya göre antitümör özelliği anlamlı derecede artırdığı sonucuna varmışlardır (Merzouk vd., 2012).

Shakouri ve arkadaşları meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerine *Hirudo medicinalis* sülük salgısının etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda MCF-7 kanser hücre hattı üzerine direkt sülük salgısı uygulaması %50 oranında antitümör etki gösterirken, lipozomal olarak uygulanan sülük salgısında bu etki %97'e yükselmiştir (Shakouri vd., 2022).

Zhao *Hirudo medicinalis* salgısında bulunan hirudinin etken maddesinin glioblastoma kanser hücre hatları (U251 ve LN-229) üzerine etkisini araştırmıştır. Yaptığı çalışmada kanserli hücre hatlarına hirudin uygulayarak MTS testi ile hücre canlılıklarını karşılaştırmıştır. Hücre canlılık oranlarının, hirudin konsantrasyonu arttıkça azaldığını gözlemlemiştir (Zhao, 2015).

Mahmoudi ve arkadaşları pankreasta bulunan adacık hücre hattı üzerinde *Hirudo medicinalis* sülük salgısının etkisini MTT testi ile araştırmışlardır. Yüksek konsantrasyonlardaki sülük salgısı uygulamasının kontrol grubuna ve düşük konsantrasyonlardaki sülük salgısı uygulamasına oranla %20 daha fazla proliferasyon olduğunu görmüşlerdir. (Mahmoudi vd., 2016).

Shen ve arkadaşları tıbbi sülüklerde bulunan hirudinin etken maddesinin mesane kanseri hücre hattı (J82 ve EJ) üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları flow sitometri

analizi sonucunda hirudin uygulaması ile mesane kanseri hücre hattında (EJ ve J82) apoptozun arttığını gözlemlemişlerdir (Shen vd., 2022).

Tural ve Ayhan *Hirudo verbana*dan elde ettiği tıbbi sülük salgı ekstraktının insandan alınan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki in-vitro etkisini araştırmışlardır. Liyofilizatörde toz haline getirilen tıbbi sülük salgısında Bradford yöntemi ile protein analizi yapmışlardır. 75µg/ml, 150µg/ml, 300µg/ml, 600µg/ml ve 1200µg/ml konsantrasyonlarından oluşan beş farklı sülük salgı ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisini XTT testi uygulayarak bulmuşlardır. Elde ettikleri bulgulara göre meme kanseri hücre hattının canlılık oranlarının konsantrasyondan ters orantılı olarak etkilendiği sonucuna varmışlardır. 24, 48 ve 72. saatin sonunda her üç günde de en fazla sitotoksik etkinin 1200µg/ml dozundaki tıbbi sülük salgı ekstraktında görüldüğünü ve etkininin lineer bir değişim gösterdiğine ulaşmışlardır (Tural ve Ayhan, 2023).

Yapılan bu çalışmalardan farklı olarak biz kendi çalışmamızda *Hirudo verbana*dan elde ettiğimiz salgı ekstraktının pankreas kanseri hücre hattı (Mia PaCa-2) üzerindeki in vitro etkisini araştırdık. Hücre canlılığı oranları XTT cihazı kullanılarak ölçülmüştür. *Hirudo verbana* cinsi tıbbi sülüklerimizin sağımı yapılarak salgıları alındı. Elde ettiğimiz bu salgıyı 24 saat boyunca -80 °C'de dondurucuda bekletildi. Donmuş katı haldeki salgı liyofilizatör cihazına alındı. Liyofilizatörde toz haline gelen salgıda Bradford metodu ile toplam protein analizi yapıldı. Hücre hatlarına uygulanacak tıbbi sülük salgılarının doz oranları 75µg/ml, 150µg/ml, 300µg/ml, 600µg/ml ve 1200µg/ml olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.

Çalışmada kullandığımız MIA PaCa-2 hücre hatlarındaki hücrelerin sayımı yapılarak 96 kuyucuklu plaka içerisindeki her bir kuyucuğa $1{,}5x10^4$ hücre ekimi yapıldı. Ardından kuyucuklar içerisindeki hücreler üzerine 24, 48 ve 72. saatler için 75µg/ml, 150µg/ml, 300µg/ml, 600µg/ml ve 1200µg/ml konsantrasyonlardaki sülük salgıları 3 tekrarlı olacak şekilde eklendi. Blank grubuna boş medya solüsyonu kontrol grubuna ise hiçbir etken madde eklenmedi. XTT cihazı ile 24, 48 ve 72 saat sonundaki 650 nm'de okuması yapılan veriler 450 nm'de okuması yapılan verilerden çıkarılarak okuma işlemi bitmiş oldu. Kontrol grubundaki hücrelerin canlılık oranı %100 olarak kabul edildi. Diğer grupların canlılık oranları bu kontrol grubuna göre hesaplandı.

MIA PaCa-2 hücre hattı üzerine farklı konsantrasyonlardaki tıbbi sülük salgılarının etkilerini değerlendirdiğimizde; 24, 48 ve 72. saatlerde 600µg/ml ve 1200µg/ml

konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlemlenmiştir. Beş farklı konsantrasyon kullandığımız çalışmamızda 600µg/ml konsantrasyonundaki tıbbi sülük salgısı eşik değer gibi gözlemlenmiş 600µg/ml konsantrasyondan sonra sitotoksik etki görülmemiştir. Konsantrasyonların sitotoksik etkisi sigmoidal bir eğri oluşturmuştur.

5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada tıbbi sülük salgısının pankreas kanseri hücre hattı üzerine etkisini araştırmak *amaç*lanmıştır. Hücre canlılığını izlemek için XTT testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre;

1. 24. saatin sonunda tıbbi sülük salgısının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 600 µg/ml ve 1200 µg/ml konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi görülürken 300 µg/ml ve altı konsantrasyonlarda sitotoksik etki görülmemiş olup hücre canlılığı %100'e yakındır.

2. 48 ve 72. saatin sonunda da tıbbi sülük salgısının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 600 µg/ml ve 1200 µg/ml konsantrasyonların sitotoksik etkisi görülürken 300 µg/ml ve altı konsantrasyonlarda hücre canlılığı 24. saate göre bir miktar azalmıştır.

3. Beş farklı sülük konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisini araştırdığımız çalışmamızda 600 µg/ml dozu eşik değer gibi gözükmektedir. 24, 48. ve 72. saatler için 600 µg/ml sülük salgı konsantrasyonun altındaki dozlarda hücre canlılığı artmıştır. Başka bir deyişle 300 µg/ml ve altı derişimlerde sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. Sülük salgı konsantrasyonunun MIA PaCa-2 hücre hattı üzerine etkisi sigmoidal bir değişim göstermiştir.

4. MIA PaCa-2 hücrelerinin poliferasyonunu %50 inhibe etmek için gerekli doz miktarları IC_{50} değerleri hesaplanarak bulunmuştur. 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı hesaplanan IC_{50} değerleri 330,92 µg/ml ile 542,75 µg/ml arasında değişmektedir.

5.2 Öneriler

Literatürde çeşitli kanser hücreleri üzerinde çeşitli tıbbi sülüklerin salgılarının anti tümör etkilerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Biz bu çalışmalardan farklı olarak

Hirudo verbana cinsi tıbbi sülüklerden elde ettiğimiz salgı ekstraktlarının pankreas kanseri hücre hattı üzerine etkisine yönelik bir çalışma gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçların daha sonraki çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Çalışmamızın sonucunda tıbbi sülük ekstraktının hücre canlılığına etkisi; konsantrasyona bağlı olarak lineer bir şekilde artış göstermemiş olup etki sigmoidal bir değişim göstermiştir. Kullandığımız beş farklı dozdaki sülük salgı konsantrasyonlarından 600 µg/ml altında sitotoksik etki görülmemiştir. Doz aralıkları daraltılarak bu eşik değeri daha hassas bir şekilde bulunması sağlanılabilir. Sülük salgısının etkileri ileri moleküler araştırmalarla ve in vivo çalışmalarla desteklenebilir.

Tural ve Ayhan *Hirudo verbana*dan elde ettikleri tıbbi sülük salgı eksraktının MCF-7 hücre hattı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında etkinin lineer olduğu sonucuna varmışlardır (Tural ve Ayhan, 2023). Aynı cins tıbbi sülükten alınan sülük salgı ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisi lineer iken bizim çalışmamızda MIA PaCa-2 hücre hattı üzerine etkisinin sigmoidal olması başka bir çalışmanın konusu olabilir.

6. KAYNAKLAR

Abdisa, T. (2018). Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development and Therapy*, *2*, 235-242.

Abdualkader, A. M., Merzouk, A., and Ghawi, A. M. (2011). The anticoagulant activity of Malaysian leech saliva extract. In the Abstracts of the 25th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology. Selangor, Malaysia: University Putra Malaysia.

Abdullah, S., Dar, L. M., Rashid, A., & Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. Arch Clin Exp Surg, 1(3), 172-180.

Alaama, M., AlNajjar, M., Abdualkader, A., Mohammad, A., & Merzouk, A. (2011). Isolation and analytical characterization of local Malaysian leech saliva. IIUM Engineering Journal, 12(4)

Aloto, D. and Eticha, E. (2018). Leeches: A review on their pathogenic and beneficial effects. Journal of Veterinary Science & Technology, 9(01), 511.

Andreas Michalsen MR, Gustav J. Dobos. Medicinal Leech Therapy2011.

Arusan, S., Bayar, B., Gödekmerdan, A., Sağlam, N. (2013). Olgu Sunumu: Mikro Cerrahiye Yardımcı Bir Metot Hirudoterapi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 37:154-156.

Ayhan, H., Özyurt Koçakoğlu, N., & Candan, S. (2021). Functional morphology of the suckers and teeth of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida; Clitellata; Hirudinida): A scanning electron microscope study. Microscopy Research and Technique, 84(12), 2930-2935.

Ayhan, H., ve Mollahaliloğlu, S. (2018). Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. Ankara Medical Journal, 18(1), 141-148.

Barnes, R.D., 1974, Invertebrate Zoology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Washington, 233-316 p.

Baskova, I. P., Kostrjukova, E. S., Vlasova, M. A., Kharitonova, O. V, Levitskiy, S. A., Zavalova, L. L., Moshkovskii, S. A., & Lazarev, V. N. (2008). Proteins and peptides of the

salivary gland secretion of medicinal leeches Hirudo verbana, H. medicinalis, and H. orientalis. *Biochemistry (Moscow), 73*, 315–320.

Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(3), 154-165. https://doi:10.5505/bsbd.2016.93823

Bayrak, Ö.F., 2010. İnsan kordomalarında ekspresyon farkı olan mikrorna'ların ve ilgili transkriptlerin incelenmesi ve bunların kordomaların patogenezindeki öneminin belirlenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Bettmann O. 17th century surgeons operate for cancer, a pictorial history of medicine. Springfield: Thomas CC Publisher; 1956. p. 175.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (1999) (last updated 2024, Nowember 04). leech. Encyclopedia Britannica. https://www.britannica.com/animal/leech

Braunwald K (ed), Hauser F, Jameson L. Harison's principles of internal medicine.15 th edition. New York: Mc Graw Hill; 2004. 537-39.

Cancer Research UK. Types of cancer. 31 Temmuz 2024 tarihinde https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer adresinde erişildi.

Ceylan, M. ve Çetinkaya, O. (2021). Size and structure of the Mediterranean medicinal leech, Hirudo verbana populations inhabiting wetlands around Lake Eğirdir, Turkey. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38(4), 437-447.

Çağlar, M. (1973). Omurgasız Hayvanlar. I.Ü. Yay. Sayı:1803, Fen Fak. Sayı: 115, 1. Kısım, 2. Baskı. Fen Fak. Basımevi. s. 419. Istanbul.
Çetin Ş, Dede İ. Prognostic factors in pancreatic cancer. Med J SDU. 2019; 26:30-4.

Daniel D. Von Hoff. Pancreatic Cancer: Harrison's Principles of Internal Medicine 20th ed. Chapter 79, Mc Graw Hill Education: 2018; 591-596

Das, B. K. (2014). An overview on hirudotherapy/leech therapy. Ind Res J Pharm Sci, 1(1), 34

Das, B.K. (2014). An Overview on Hirudotherapy/Leech therapy. Indian Research Journal of Pharmacy and Science, 1(1), 33-45.

Davies, R.W., 1991, Annelida, Leeches, Polychaetes and Acanthobdellids, Ecology and Classification of Nort American Freshwater Invertebrate, Canada, 437-479 p.

Demirsoy, A. (1982). YaĢamın Temel Kuralları. H.Ü. Yayınları. Cilt: 158. s. 139-158.Ankara.

Dickinson, M. H., Lent, C. M. (1984). Feeding behavior of the medicinal leech,Hirudo medicinalis L. Journal of Comparative Physiology A, 154(4), 449-455. https://doi.org/10.1007/BF00610160

Eldor A, Orevi M, Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. Blood Reviews 1996;10(4):201-209.

Elliott, J. M., Kutschera, U. (2011). Medicinal Leeches: Historical use, Ecology, Genetics and Conservation. Freshwater Reviews, 4(1), 21-41. https://doi.org/10.1608/FRJ-4.1.417

Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(7):1766-1773.

Fisher WE, Andersen DK, Windsor JA, Saluja AK, Brunicardi C, Whipple T. Chapter 33 : Pancreas. In: Schwartz's Principles of Surgery, 10e. 2022. p. 1–133.

Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... & Global Burden of Disease Cancer Collaboration. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA oncology*, *1*(4), 505-527.

Flecken, P., & Michalsen, A. (2007). Indications for leech therapy. Michalsen A, Roth M, Dobos G. Medicinal leech therapy, 66-83.

Glyova O., (2005), Modern Hirudotherapy—A Review. (Biotherapeutics, Education and Research Foundation), The Better Letter, 2:1-3.

Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B., & Sağlam, N. (2011). Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. *Turkiye Parazitol Derg*, *35*(4), 234-239.

Göral V. Pankreas kanseri: patogenez ve tanı. Güncel Gastroenteroloji Dergisi 2014; 18/4

Graf, J., Kikuchi, Y., Rio, R. V. M. (2006). Leeches and their microbiota: Naturally simple symbiosis models. Trends in Microbiology, 14(8), 365-371. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.06.009

Haq, A. U., Malik, H. U., Randhawa, S. S., Sudhan, A. (2021). Hirudotherapy in Veterinary Practice: A Modern Twist to Ancient Science. 8.

Hessein, M., Ammar, A., Chin, M., Abdualkader, A., Alaama, M., Merzouk, A.,. and Guns, E. (2015). Assessment of the antitumor activity of leech (huridinaria manillensis) saliva extract in prostate cancer. *American Society of Clinical Oncology*, *33*(15).

Hildebrandt, J.-P., Lemke, S. (2011). Small bite, large impact–saliva and salivary molecules in the medicinal leech, Hirudo medicinalis. Naturwissenschaften, 98(12), 995-1008. https://doi.org/10.1007/s00114-011-0859-z

Hovingh, P., Linker, A. (1999). Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology. 124*, 319-326.

Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2016; 22:9694–705

International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Global Cancer Observatory 2018.

Işık, M., Aksoy, F.N. (2012). Tıbbi Sülük Tedavisi (Hirudoterapi) ve Hacamat. Sağlık Düşüncesi ve Tıp Kültürü Dergisi, 22:80-82

ITIS,2020. Integrated Taxonomic Information System. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=69417 #null

Kaestner, A. (1967). Invertebrate Zoology. Volume I. Interscience Publishers. A Division of John Wiley and Sons. p. 597. New York, London, Sydney.

Kaestner, A. (1967). The Annelids: Polychaeta and Hirudinea. In Invertebrate Zoology. Vol. I, ed., New York, pp. 519-566.

Kang H, Kim SS, Sung MJ, Jo JH, Lee HS, Chung MJ, et al. Evaluation of the 8th Edition AJCC Staging System for the Clinical Staging of Pancreatic Cancer. Cancers (Basel). 2022 Sep 26;14(19):4672.

Kern SE, Hruban RH, Hidalgo M, Yeo CJ. An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. Cancer Biol Ther. 2002;1(6):607-613.

Khalili, Z., Malek, M., Seiedy, M., Darabi–Darestani, K., Roohi Aminjan, A., Latif, R. (2021). Reproduction of Limnatis paluda (Tennent 1859) in laboratory conditions. Animal Reproduction Science, 234, 106857. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106857

Koçatakan P, Ataseven H. Pankreas Kanseri. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastan Tıp Derg [Internet]. 2021 Jan 19;54(January):59–65. Available from: https://dergipark.org.tr/tr/doi/10.20492/aeahtd.806164

Kuo, D.H., Lai, Y.T. (2018). On the origin of leeches by evolution of development. Development, Growth & Differentiation, 1-15. https://doi.org/10.1111/dgd.12573

Kutschera, U., Elliott, J. (2014). The European medicinal leech Hirudo medicinalis L.: Morphology and occurrence of an endangered species. Zoosystematics and Evolution, 90(2), 271-280. https://doi.org/10.3897/zse.90.8715

Kutschera, U., Roth, M. (2006). Cocoon deposition and cluster formation in populations of the leech Hirudo verbana (Hirudinea: Hirudinidae). Lauterbornia, 56: 5-8.

Kutschera, U., Roth, M., Ewert, J.P. (2010). Feeding on Bufoid Toads and Occurrence of Hyperparasitism in a Population of the Medicinal Leech (Hirudo verbana Carena 1820). Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 5(1): 9-13.

Küçük, M. Ö., Yaman, O. (2019). Tıbbi Sülük Terapisi (Hirudoterapi). Journal of Biotechnology and Strategic Health Research, 3:29-46.

Kvist, S., Min, G.-S., Siddall, M. E. (2013). Diversity and selective pressures of anticoagulants in three medicinal leeches (Hirudinida: Hirudinidae, Macrobdellidae). Ecology and Evolution, 3(4), 918-933. https://doi.org/10.1002/ece3.480

Lemke, S., Vilcinskas, A. (2020). European Medicinal Leeches—New Roles in Modern Medicine. Biomedicines, 8(5), 99. https://doi.org/10.3390/biomedicines8050099

Lent, C.M., Fliegner, K.H., Freedman, E., Dickinson, M.H. (1988). Ingestive Behavior and Physiology of the Medicinal Leech. J. Exp. Biol. 137, 513-527.

Linnaeus C 1789. Systema Naturae. Vermes.

Liu, F., Guo, Q.-S., Shi, H.-Z., Wang, T., Zhu, Z.-B. (2013). Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within populations of Whitmania pigra and Hirudo nipponica based on ISSR and SRAP markers. Biochemical Systematics and Ecology, 51, 215-223. https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.08.020

Longnecker, D. Anatomy and Histology of the Pancreas. APA (American Pancreatic Association. 2014.

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

Mahmoudi, S., Ebtia, M., Merzouk, A., Stratton, S., Jalili, R., and Ghahary, A. (2016). Evaluation of the Anti-Glucotoxic Effects of Leech Saliva Extract (LSE) on Mouse and Human Pancreatic Islets. Canadian Journal of Diabetes, 40(5), S71.

Maltz, M. A., Bomar, L., Lapierre, P., Morrison, H. G., McClure, E. A., Sogin, M. L., Graf, J. (2014). Metagenomic analysis of the medicinal leech gut microbiota. Frontiers in Microbiology, 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00151

McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World Journal Of Gastroenterology 2018; 24: 4846–61.

Menzel, E.J., Farr, C. (1998). Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. Cancer Lett. 131, 3-11.

Merzouk, A., Ghawi, A. M., Abdualkader, A. M., Abdullahi, A., and Alaama, M. (2012). Anticancer effects of medical Malaysian leech saliva extract (LSE). Pharmaceutica Analytica Acta, 15, 2-6.

Modi B, Shires GT. Pancreatic cancer, cystic pancreatic neoplasms, and other nonendocrine pancreatic tumor. In: Feldman M, Friedman L, Brandt L; eds. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 11th ed. Chapter 60, Philadelphia: Elsevier; 2020. p.947-965.

Müller, C., Wang, Z., Hamann, M., Sponholz, D., Hildebrandt, J. (2022). Life without blood: Molecular and functional analysis of hirudins and hirudin-like factors of the Asian non-hematophagous leech Whitmania pigra. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 20(8), 1808-1817. https://doi.org/10.1111/jth.15762

Nelson, M. C., Graf, J. (2012). Bacterial symbioses of the medicinal leech Hirudo verbana. Gut Microbes, 3(4), 322-331. https://doi.org/10.4161/gmic.20227

Nikonov, G. I., and Titova, E. A. (1999). Destabilase complexes-natural liposome produced by medicinal leeches Hirudo medicinalis. *Fundamental and Clinical Pharmacology, 13*(1), 102-106.

Özbay, Ö., Sağlam, N., Dörücü, M., Balcı, M., Kılıç, A., Özbey, N., Pala, A., Sesli, A., Demir, T., Arca, S., Metin, S., Beri, A., Özkan, K., Doğan Barata, S. (2022). Güney Doğu Anadolu Bölgesi Sülük Faunası Üzerine Araştırmalar. Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research 8(2): 116-130. https://doi.org/10.17216/LimnoFish.894988

Papavramidou, N., & Christopoulou-Aletra, H. (2009). Medicinal use of leeches in the texts of ancient Greek, Roman and early Byzantine writers. *Internal Medicine Journal*, *39*(9), 624-627.

Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., & Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases. *Oncology reports*, *33*(1), 3-18.

Petrauskienė L, Utevska O, Utevsky S. Can different species of medicinal leeches (Hirudo spp.) interbreed?. *Invertebrate biology*, 2009; *128*(4), 324-331.

Petrauskienė, L., Utevska, O., Utevsky, S. (2011). Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus Hirudo). Journal of Natural History, 45(11-12), 737-747. https://doi.org/10.1080/00222933.2010.535918

Phillips, A. J., Govedich, F. R., Moser, W. E. (2020). Leeches in the extreme: Morphological, physiological, and behavioral adaptations to inhospitable habitats. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 12, 318-325. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.09.003

Ramzan Z, Le P, Kapur P, Huerta S. Current Concepts in Pancreatic Cancer. In: Updates on Cancer Treatment [Internet]. InTech; 2015. p. 325–33. Available from: http://journals.lww.com/00006676-199811000-00002

Resmi Gazete, 2014. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Yönetmeliği, Sayı: 29158, Tarih: 27 Ekim 2014, Pazartesi

Rio, R. V. M., Maltz, M., McCormick, B., Reiss, A., Graf, J. (2009). Symbiont Succession during Embryonic Development of the European Medicinal Leech, Hirudo verbana. Applied and Environmental Microbiology, 75(21), 6890-6895. https://doi.org/10.1128/AEM.01129-09

Roalsø M, Aunan JR, Søreide K. Refined TNM-staging for pancreatic adenocarcinoma – Real progress or much ado about nothing? Eur J Surg Oncol [Internet]. 2020 Aug;46(8):1554–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.02.014

Roy, P. S., & Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*, *53*(3), 441-442.

Saglam, N. (2011). Bazı Tıbbi Sülük Türlerinin (Hirudo medicinalis L., 1758 ve Hirudo verbana Carena, 1820) İhracatı, Koruması ve Sürdürülebilirliği. Journal of Fisheries Sciences, 5(1), 1.

Saglam, N., Saunders, R., Lang, S. A., Shain, D. H. (2016). A new species of Hirudo (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches. BMC Zoology, 1(1), 5. https://doi.org/10.1186/s40850-016-0002-x

Sağlam, N. (2000). Sülük biyolojisi ve yetiştirme teknikleri. *Ticari Balık Türlerinin Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri Hizmet İçi Eğitim Semineri*, *1*(5), 51-56.

Sağlam, N. (2019). Internal and External Morphological Characteristics of the Medicinal Leech Species Hirudo sulukii and Hirudo verbana. Turkish Journal of Parasitology, 43(4), 204-209. https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6422

Sağlam, N., & Sarrıeyyüpoğlu, M. (1998). Tatlısu Sülüğü (Nephelopsis obscura)'nün Biyolojisi, Morfolojisi, Bazı Kimyasal Maddelerle Kontrolü ve Alabalığa (Oncorhynchus mykiss) Olan Etkisi. FÜ Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi, 10(2), 105-123.

Saidel, W. M., Saglam, N., Salas-de la Cruz, D., Saunders, R., Shain, D. H. (2018). Elaborate ultrastructure of the Hirudo (Annelida: Hirudinae) cocoon surface. Journal of Morphology, 279(4), 545-553. https://doi.org/10.1002/jmor.20787

Sawyer, R.T., Edwards, J. (1989). Hyaluronidase- Hyaluronldase, isolation and pharmaceutical use thereof, and pharmaceutical and veterinary formulations containing it. In European Patent Office Vol., E.P. Office, ed.^eds., U.K.

Sawyer, R. (2020). Reproduction without cross-fertilisation in the invasive Asian leech Barbronia weberi (Blanchard, 1897) (Hirudinea: Arhynchobdellida). Aquatic Invasions, 15(2), 271- 281. https://doi.org/10.3391/ai.2020.15.2.04

Sawyer, R.T. (1986). Leech Biology and Behavior. Vol. I - III, *Clarendon Press*, Oxford, United Kingdom

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database : the journal of biological databases and curation, 2020, baaa062. https://doi.org/10.1093/database/baaa062

Schulz, I. Bicarbonate Transport in the Exocrine Pancreas. The New York Academy of Sciences. 1980.

Sert, E., Sakarya, AA., Yüksel, ŞB., Sert, A., Tüfekçi, S. (2015). Tıbbi Sülükler ve Tıbbi Sülük Salyasının Özellikleri. integratif Tıp Dergisi, 3(2):12-18.

Shakeel S, Finley C, Akhtar-Danesh G, Seow HY, Akhtar-Danesh N. Trends in Survival Based on Treatment Modality in Patients with Pancreatic Cancer: A Population-Based Study. Curr Oncol [Internet]. 2020 Feb 1;27(1):1–8. Available from: https://www.mdpi.com/1718-7729/27/1/5211

Shakouri, A., Kahroba, H., Hamishekar, H., and Abdolalizadeh, J. (2022). Nanoencapsulation of Hirudo medicinalis proteins in liposomes as a nanocarrier for inhibiting angiogenesis through targeting VEGFA in the Breast cancer cell line (MCF-7). BioImpacts: BI, 12(2), 115.

Shen, Y., Ye, H., Zhang, D., Yang, M., Ji, Y., Tang, L.,. and Yuan, L. (2022). The role of exosomal CDC6 in the hirudin-mediated suppression of the malignant phenotype of bladder cancer cells. Gene, 821, 146269-146278.

Shin DW, Kim J. The American Joint Committee on Cancer 8th edition staging system for the pancreatic ductal adenocarcinoma: is it better than the 7th edition? Hepatobiliary Surg Nutr [Internet]. 2020 Feb;9(1):98–100. Available from: http://hbsn.amegroups.com/article/view/29683/27858

Sket, B., Trontelj, P. (2008). Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. Hydrobiologia, 595(1), 129-137. https://doi.org/10.1007/s10750-007-9010-8

Song M, Yoon SB, Lee IS, Hong TH, Choi HJ, Choi MH, et al. Evaluation of the prognostic value of the new AJCC 8th edition staging system for patients with pancreatic adenocarcinoma; a need to subclassify stage III? Eur J Cancer [Internet]. 2018 Nov;104:62–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.08.027

Şahin M, Cindoruk M. Endosonografi yapılan pankreatik kitle lezyonlarının cerrahi ve ince iğne aspirasyon biyopsi verilerinin patolojik sonuçlar ile analizi: 6 yıllık deneyim. Pamukkale Tıp Dergisi. 2019;12:1-6.

T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstastistikleri Yıllığı 2018: 43.

Taherian M, Wang H, Wang H. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Molecular Pathology and Predictive Biomarkers. Cells. 2022 Sep 29;11(19):3068. doi: 10.3390/cells11193068. PMID: 36231030; PMCID: PMC9563270.

Tandoğan Gülen. Lokal ileri rezeke edilemeyen pankreas kanserinde kemoterapi ve kemoradyoterapi tedavilerinin etkinliklerinin karşılaştırılması. 2012.

Teitelman, G., Alpert, S., Polak, J. M., Martinez, A., Hanahan, D. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. The Company of Biologists Limited. 1993;118:1031-1039.

Trak, G. (2019). Hirudoterapi ve cerrahide kullanımı. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research, 3, 47-54.

Trontelj, P., Utevsky, S. Y. (2012). Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus Hirudo): Fast dispersal and shallow genetic structure. Molecular Phylogenetics and Evolution, 63(2), 475-485. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.022

Tural Ö. ve Ayhan H., (2023). Tıbbi Sülük (*Hirudo verbana*) Salgı Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7) Üzerine Etkisinin İn Vitro Araştırılması, Halk Sağlığı Enstitüsü, Biyoterapötik Ürünler Araştırma ve Geliştirme Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi.

U.S. Food and Drug Administration Dept of Health and Human. FDA. U.S. Food and Drug Administration Dept of Health and Human https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPCD/classification.cfm?ID=NRN (2004).

Utevsky, S., Kovalenko, N., Doroshenko, K., Petrauskienė, L., Klymenko, V. (2009). Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (Hirudo spp.). Systematic Parasitology, 74(2), 95-102. https://doi.org/10.1007/s11230-009-9198-2

Utevsky, S., Zagmajster, M., Atemasov, A., Zinenko, O., Utevska, O., Utevsky, A., Trontelj, P. (2009). Distribution and status of medicinal leeches (genus Hirudo) in the Western Palaearctic: Anthropogenic, ecological, or historical effects? Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 20(2), 198-210. https://doi.org/10.1002/aqc.1071

Utevsky, S. Y. (2010). Order Hirudinida–Leeches. *Illustrated keys to free-living invertebrates of Eurasian Arctic seas and adjacent deep waters*, *2*, 85-113.

Utevsky, S. Y., Utevska, O. M., Boyarshin, K. S., & Utevsky, S. Y. (2010). Polymorphism of the coloration pattern in the medicinal leech Hirudo medicinalis (Clitellata, Hirudinida). *The Journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series: biology*, *11*(905), 139-147.

Utevsky, S., Zagmajster, M., Atemasov, A., Zinenko, O., Utevska, O., Utevsky, A., & Trontelj, P. (2010). Distribution and status of medicinal leeches (genus Hirudo) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects?. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *20*(2), 198-210.

Ünal K., Erol M. E. (2022). Tıbbi Sülük Tedavisinin Bilimsel Değeri; Anadolu Tıbbı Dergisi, Cilt.1, Sa.3, Ss.37-45

Ünal, K., Erol, M., & Ayhan, H. (2023). Literature Review on the Effectiveness of Medicinal Leech Therapy in the Wound Healing. Ankara Medical Journal, 23(1).

Ünver SA. Türk tıp tarihinde kanser ve tedavisine dair. İst. Tıp Fak Mecmuası 1938;1(5):673-8.

Van Roessel S, Kasumova GG, Verheij J, Najarian RM, Maggino L, de Pastena M, et al. International Validation of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System in Patients With Resected Pancreatic Cancer. JAMA Surg [Internet]. 2018 Dec 19;153(12):e183617. Available from: http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamasurg.2018.3617

Verslype C, Van Cutsem E, Dicato M, Cascinu S, Cunningham D, Diaz-Rubio E, et 81 al. The management of pancreatic cancer. Current expert opinion and recommendations derived from the 8th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2006. Ann Oncol [Internet]. 2007 Jun;18(SUPPL. 7):vii1–10. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419420504

Wagenaar, D.A. 2015. A classical model animal in the 21st centry: recent lessons from the leech nervous system. Journal of Experimental Biology (2015), 218: 3353-3359. doi: 10.1242/jeb.113860.

Wang, H., Meng, F.-M., Jin, S.-J., Gao, J.-W., Tong, X.-R., Liu, Z.-C. (2022). A new species of medicinal leech in the genus Hirudo Linnaeus, 1758 (Hirudiniformes, Hirudinidae) from Tianjin City, China. ZooKeys, 1095, 83-96. https://doi.org/10.3897/zookeys.1095.74071

Whitaker, I. S., Cheung, C. K., Chahal, C. A. A., Karoo, R. O. S., Gulati, A., Foo, I. T. H. (2005). By what mechanism do leeches help to salvage ischaemic tissues? British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 43(2), 155-160. https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2004.09.012

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, et al. Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin. 2013; 63:318-48.

Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, *63*(5), 318-348.

Wollina, U., Heinig, B., Nowak, A. (2016). Medical Leech Therapy (Hirudotherapy). Our Dermatology Online, 7(1), 91-96. https://doi.org/10.7241/ourd.20161.24

World Health Organization (WHO), 2022. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer Erişim tarihi: 28.07.2024

World Health Organization (WHO), 2023. https://who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases Erişim tarihi: 28.07.2024

Xhan GQ, Yeo CJ, Hruban RH, Lillemoe KD, Pitt HA, Cameron JL. Surgical experience with pancreatic and peripancreatic neuroendocrine tumors: review of 125 patients. J Gastrointest Surg. 1998;2(5):472-482.

Yener N. Meme kanseri. Ankara Hastanesi Derg 1973;8(1):5-13.

Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. (2012). Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(2), 7-18

Zaidi S, Jameel S, Zaman F, Jilani S, Sultana A, Khan SA. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. Altern med rev 2011;16(1):59-65.

Zhang, B., Lin, Q., Lin, J., Chu, X., Lu, J. (2008). Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the Leech, Hirudinaria manillensis Lesson, 1842. Aquaculture, 276(1-4), 198-204. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.003

Zhao Z, Liu W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. Technol Cancer Res Treat [Internet]. 2020 Jan 1;19:153303382096211. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533033820962117

Zhao, L. (2015). Hirudin inhibits cell growth via ERK/MAPK signaling in human glioma. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(11), 20983-20987.

Zulhisyam, A.K., Jamaludin, M.H., Wei, L.S., Andu, Y., Ibrahim, W.A.I.W., Shazani, S. (2015). Effect of broodstock density on reproduction and juvenile culture of green buffalo leech, Hirudinea manillensis. Songklanakarin J. Sci. Technol. 37 (5), 581-585.

7. EKLER

7.1 Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Serkan ÖZDEMİR
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Halk Sağlığı Enstitüsü, Biyoterapötik Ürünler Araştırma Geliştirme Anabilim Dalı, Ankara
EĞİTİM	
Lise	: Mehmet Rüştü Uzel Kimya Teknik Lisesi-Ankara
Lisans	: Konya Selçuk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü-Konya
Lisans	: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü-Ankara (Yüksek Onur Derecesi)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: Temel Seviye
KONGRELER SUNUMLAR	
Sözlü Sunum	: 4. İnternational Selçuk Scientific Resarch Congress Tıbbi Sülük Salgısının Pankreas Kanseri Hücre Hattı Üzerine İn Vitro Etkisi ile ilgili sözlü sunum
KULÜP DERNEK ÜYELİKLERİ	
AYBÜ Anadolu Tıbbı Araştırma Platformu	